

OBSAH

1	Úvod	3
2	Cíl práce	4
3	Teoretická část	5
3.1	Transdermální bioekvivalence	5
3.1.1	Dermální a transdermální biodostupnost.....	6
3.1.2	Vliv vehikula na transdermální permeaci léčiv	8
3.1.3	Transdermální enhancery.....	9
3.1.4	Transkarbam 12.....	11
4	Experimentální část	14
4.1	Suroviny a materiál.....	14
4.2	Přístroje	15
4.3	Biologický materiál.....	15
4.4	Testované krémy	16
4.5	Uspořádání permeačních pokusů.....	17
4.6	Výsledky měření	17
5	Dokumentace	18
6	Výsledky a diskuse	132

7	Závěry.....	135
8	Souhrn	136
9	Použité zkratky a symboly	137
10	Literatura.....	138

1 ÚVOD

Při úvahách o biodostupnosti léčiv platí, že cílem je úspěch terapie, nikoli biodostupnost sama o sobě. Z toho důvodu musí být při výběru složek do přípravků pro dermální a transdermální terapii brán v úvahu také vlastní účinek léčiva. Farmakologický účinek závisí na podání dostatečného množství léčiva o dané aktivitě do cílové oblasti. Čím je látka účinnější, tím méně je jí třeba aplikovat.

Dermální a transdermální dostupnost je pro většinu aplikovaných látek spojena s řadou specifických problémů. Výběr látky z dané terapeutické skupiny je často spojen s její účinností. Pokud je výběr a složení léčivého přípravku správný, nabízí nejlepší šanci pro dosažení klinicky dostačující dostupnosti silně účinný analog. Slabě účinné analogy naopak často selhávají i pokud jsou do příslušné lékové formy resp. léčivého přípravku formulovány optimálně, nahlíženo z tradičních hledisek dermální kompatibility, stability apod. Pro tyto situace bývá řešením využití transdermálních enhancerů. Přestože jejich zakomponováním do složení léčivého přípravku se často výrazně mění velké množství měřitelných vlastností a kvalitativních parametrů přípravku, včetně biodostupnosti, nejsou informace z této oblasti publikovány často.

Pohledem, kterému je v předkládané diplomové práci zejména v experimentu věnována prioritní pozornost, je možnost hodnocení obsahu aktivní formy transdermálního enhanceru známého pod označením transkarbam 12, a to v krémech reálného a prakticky využitelného složení.

Rozšiřuje se tak soubor poznatků, které v této oblasti přinesl společný výzkumný program katedry farmaceutické technologie a katedry anorganické a organické chemie UK FaF v Hradci Králové.

2 CÍL PRÁCE

Prvořadým úkolem práce bylo získání dostatečného množství experimentálních podkladů k formulaci základního stanoviska o možnosti biologického, *in vitro* permeačního hodnocení obsahu transkarbamu 12 v modelových hydrofobních krémech s výrazně odlišným obsahem vody. K tomuto účelu bylo zadáno využít jako permeačního markeru kofein.

Pro práci byl jako doplňující úkol zadáno zpracovat dostupné literární údaje o transdermální bioekvivalenci léčiv.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Transdermální bioekvivalence ¹

Studium bioekvivalence je nezbytné pro vyšetření vlastností a účinků nových léčiv a aplikačních soustav podávaných v humánní a veterinární farmakoterapii, stejně jako ke stanovení principů pro návrh, řízení a vyhodnocení těchto studií. Přesné typy a počty testů, které je třeba vykonat jsou určovány pro jednotlivé případy zvláště, a to jak s ohledem na individuální vlastnosti aktivní látky, způsob podání, typ aplikační soustavy, tak i na očekávané terapeutické indikace. Transdermální podání léčiv a jeho vývoj je založen na klinických potřebách a správném spojení všech fyziologických, farmakodynamických a farmakokinetických ohledů.

K určení bioekvivalence většiny transdermálních přípravků se využívá srovnávacích klinických studií. Existují různé in vivo metody pro určení bioekvivalence a tato oblast se postupně vyvíjí.

Dermatokinetika je termínem používaným k popisu farmakokinetiky externě dermálně podávaných léčivých přípravků v nejsvrchnější vrstvě kůže, ve stratum corneum (SC). K měření koncentrace látky v SC je používán tzv. tape stripping a to ze strany, na které jsme látku aplikovali. Různé studie se snaží ukázat dermatofarmakokinetiku jako spolehlivé a reprodukovatelné metody pro určení bioekvivalence a mají dokázat, že jsou aplikovatelné na reálné kožní přípravky.

Vhodnost strippingové metody pro dermální a transdermální přípravky nicméně musí být založena především na vztahu ke klinickému účinku léčiv. Pro něj musí platit, že

- transdermální podání je efektivní a bezpečné
- není nutné dosahovat opakovaně vysokých koncentrací léčiva v těle ani zajistit definované kolísání hladin látky během dne, aby bylo dosaženo terapeutické aktivity
- existuje jasná a známá závislost mezi koncentrací látky a efektem

Americká FDA vydala pokyny pro hodnocení bioekvivalence topických kortikosteroidů. Od roku 1995 vyžaduje měření kožní výbledové reakce pomocí

chromatografie. Podobné směrnice zavedlo i Japonsko o osm let později, protože strippingové testy nebyly ověřeny pro tzv. žlutou pokožku.

Teprve po jejich ověření ve speciální studii byly získány základní údaje o kortikosteroidy indukované výbledové odpovědi a jejího měření chromatografií u žlutého typu pokožky. Podle japonské verze protokolu byly takto provedeny čtyři studie na skupině zdravých, japonských dobrovolníků. Ty zahrnují:

- ověření správné délky doby expozice přípravku
- srovnání dvou kortikosteroidních přípravků, které představují různé účinnostní třídy
- kontrolu opakovatelnosti s využitím pravého a levého předloktí
- studie sezónních odlišností

3.1.1 Dermální a transdermální biodostupnost

Rozhodujícími faktory pro permeaci kůží jsou aktivita (koncentrace) léčiva v jeho vehikulu, rozdělovací koeficienty léčiva mezi vehikulem a kůží, mezi jednotlivými vrstvami kůže, a difúzní koeficient léčiva v kožních vrstvách. Podobné látky srovnatelné velikosti se svými difúzními koeficienty liší jen málo. Rozdíly uvnitř strukturních skupin určují nejen vazbu na receptory, ale také významně ovlivňují rozpustnost, rozdělovací koeficient a vazebné schopnosti při transportu. Biodostupnost léčiva a klinická účinnost jsou výsledkem všech právě uvedených jevů.²

Příkladem je 21-ester hydrokortisonu, který je hydrofobnější než jeho matečná látka. Jeho rozdělovací koeficient je asi 18krát větší než u samotného hydrokortisonu.³ Existují-li silné paralely v rozdělovacím chování látek v různých systémech, je logické, že podobné řádové zvýšení je možné nalézt také pro rozdělovací koeficienty acetátu hydrokortisonu mezi fázemi stratum corneum/ voda a sebum/ voda. Acetylace hydrokortisonu v poloze 21 zároveň zvýší bod tání o 12°C. Derivatizace tedy nejen značně snižuje rozpustnost ve vodě, ale současně ovlivňuje rozpustnost v ostatních rozpouštědlech.⁴ Ačkoli zvýšení rozdělovacího koeficientu ve srovnání s hydrokortizonem zvýší

současně i koeficient permeability, je tento efekt více než vyvážen sníženou rozpustností. Z roztoků o analogické koncentraci proto prostoupí kůží mnohem méně acetátu.⁵ Při postupném prodlužování alkylového řetězce esteru (C_3 , C_4 , ..., C_7) stále více interferuje rostoucí objem alkylové skupiny s krystalickou strukturou. Proto body tání postupně klesají od 224 °C u acetátu ku 111 °C u heptanoátu.⁴ Zvláště ostrý pokles (o 69 °C) je pozorován mezi pentanoátem a hexanoátem. Rozpustnost esterů hydrokortisonu v organických rozpouštědlech při prodlužování alkylového řetězce zdatelně roste díky snižování jejich krystalinity. Navíc rozpustnosti těchto látek ve vodě, ačkoliv se metodicky snižují vlivem vzrůstající hydrofobicity, zůstávají často vyšší, než by jinak měly být. Spolupůsobením těchto vlivů prostupují hexanoát a heptanoát hydrokortisonu kůží mnohem lépe než hydrokortizon, pokud jsou podány jako nasycené roztoky.^{4,5}

S přihlédnutím k výše uvedeným vztahům lze blíže posoudit farmakologické následky esterifikace hydrokortisonu. Schopnost esterů hydrokortisonu potlačit zánět vyvolaný tetrahydrofurfuralalkoholem, který je zde použit současně jako iritant i jako nosič, ve vztahu k délce jejich alkylového řetězce.⁶ Pro tento účinek je optimální délka řetězce u hexanoátu, estery s podstatně delšími a kratšími řetězci jsou prokazatelně méně účinné. Toto chování přesně odpovídá předchozím úvahám o rozdělování a rozpustnosti.

V nich se odrážejí rozdíly ve vlastní vazomotorické aktivitě jednotlivých typů esterů. Shoda v umístění maxim na ose hodnot rozdělovacího koeficientu naproti tomu zjevně vyplývá z optimální lipofility pro průnik kůží.

Uspokojivé vysvětlení lze nalézt i pro pokles účinnosti u esterů s delším alkylovým řetězcem. Působí zde dva faktory, konkrétně klesající rozpustnost a změny v mechanismu absorpce spojeném s rozvolněním vrstvením bariéry. Rozpustnost ve vodě se u homologů exponenciálně snižuje s prodlužováním alkylového řetězce.^{7,8} Zatímco na začátku homologické řady jsou body tání sniženy, další prodlužování alkyly vede ke snižování rozpustnosti jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech.⁸ Rozdělovací koeficienty o/v touto změnou

struktury ovlivněny nejsou a exponenciálně rostou. Oproti živé tkáni se tím exponenciálně zvýší schopnost rohové vrstvy a kožního mazu transportovat steroidy. Permeační proces pak řídí vrstva živé tkáně.^{9,10} Tato změna se projeví exponenciálním poklesem ustálených toků. Permeace homologů tedy při prodlužování jejich alkylového řetězce rychle klesá. Homology pro svou nerozpustnost ve vodě téměř neprostupují rozhraním stratum corneum/vitální epidermis a stávají se prakticky neúčinnými.¹⁰ Nalezené se tak shodují s výše popsaným modelem permeability kůže.

3.1.2 Vliv vehikula na transdermální permeaci léčiv

K tomu, aby léčivo dosáhlo povrchu kůže, musí být ve vehikulu rozpuštěno v dostatečném množství. V opačném případě koncentrace difuzibilní formy léčiva na rozhraní přípravku/kůže postupně klesá, protože jeho difúze nosičem k styčné ploše s kůží nemůže zcela nahradit úbytek léčiva již prošlého do povrchových tkání. Rychlost průniku kůží je v extrémních případech, kdy je léčivo v nosiči málo rozpustné, řízena jeho rozpouštěním a difúzí v nosiči.^{11,12} Obtíže přitom mohou nastat zvláště pokud farmakologický účinek závisí na dodání veškerého dostupného léčiva do cílové tkáně, nebo je-li léčivo formulováno v nedostatečné difuzibilní koncentraci. V takovém případě nepřejde do kůže v maximální možné míře a nedosáhne maximální biologické dostupnosti. Optima mezi těmito extrémy lze dosáhnout úpravou rozpouštěcí schopnosti vehikula. To by mělo být nasyceno nebo téměř nasyceno a léčivo by pokud možno všechno mělo být rozpuštěno. Tím je zajištěna rovnováha kinetických a termodynamických faktorů.

Vehikulum může ovlivnit transdermální absorpci také změnou fyzikálně-chemických vlastností rohové vrstvy. Toho se většinou využívá ke zvýšení propustnosti kůže, pomocí látek zpevňujících rohovou vrstvu lze však docílit i opačného efektu. Absorpci podporuje také prostá hydratace rohové vrstvy. Té může být dosaženo překrytím kůže vrstvou, která nepropouští vodu (tzv. okluzí). Zamezení odpařování vody vede k hydrataci rohové vrstvy, k jejímu změknutí a ke zlepšení průchodu látek difúzí. Okluzivní překrytí

stabilizuje také aplikovaný přípravek v tom smyslu, že brání odpaření těkavých složek základu, a tak udržuje jeho schopnost rozpouštět léčivo. Okluzivní hydratace zvyšuje transdermální absorpci odhadem asi 5-10krát, což je většinou klinicky významné. Toho se využívá např. při aplikaci přípravků s kortikosteroidy při terapii úporných dermatóz, např. lupénky.

V průběhu odpařování rozpouštědla se léčivo koncentruje a přechází do povrchu kůže. Některá rozpouštědla také přechodně zvyšují rozpouštěcí schopnost rohové vrstvy.¹³

3.1.3 Transdermální enhancery

Několik s vodou mísitelných organických rozpouštědel je rohovou vrstvou přijímáno v množstvích, která oslabují její tekutě krystalickou lipidní oblast,¹³ zvláště pokud jsou aplikovány v koncentrované formě. V laboratorních podmínkách, kde jsou používány ve vyšších koncentracích, tyto tzv. urychlovače penetrace kůží dokonce vymývají intersticiální lipidy a denaturují keratin.^{14,15} V těchto uměle extrémních podmínkách může být jimi způsobené zvýšení transdermální absorpce velmi značné. Hlavními zástupci těchto látek jsou dimetylsulfoxid (DMSO), dimetylacetamid (DMA) a dietyltoluamid (DEET).

DMSO je již dlouho zkoumán a popisován jako zesilovač penetrace kůží. Experimentálními studiemi bylo zjištěno, že reverzibilně denaturuje keratin. Tím otevírá proteinovou matrix a tak usnadňuje permeaci.^{14,15} Pokud je aplikován v dostatečném množství, extrahuje lipidy z kůže. I pokud je používán šetrně, vsakuje se čistý DMSO do rohové vrstvy a zvyšuje její schopnost rozpouštět látky všeho druhu.¹⁶ Podporuje absorpci léčiv díky zvýšení rozpustnosti léčiva ve tkáni, což výrazně zvýší difúzní gradienty ve tkáni. Navíc při aplikaci koncentrovaného DMSO na kůži nastává průnik DMSO dovnitř a protisměrný únik vody, což vede k delaminaci rohové vrstvy, zřejmě s hromaděním rozpouštědla mezi separovanými vrstvami. Ze všech zmíněných účinků DMSO se dva posledně jmenované zdají být nejdůležitějšími, protože procesy extrakce kožních lipidů a denaturace keratinu potřebují mnohem více DMSO, než kolik je přítomno v nanesené vrstvě topických přípravků o obvyklé

tloušťce 20-30 μm . Soubor těchto faktorů může v extrémním případě efektivně chemicky odstraňovat rohovou vrstvu jako jednu z částí kožní bariéry.¹⁷ Ve skutečnosti je však množství DMSO a tím i permeace limitována. Navíc je mnoho z jejich akcelerační kapacity ztraceno v případě jakéhokoli zředění. Čistá organická rozpouštědla jako zesilovače penetrace kůží používají jen málokdy.

Již dlouhou dobu se vědělo, že některé povrchově aktivní látky (např. laurylsíran sodný) dráždí kůži i v relativně zředěném stavu. Částečně je to způsobeno oslabením bariérové funkce rohové vrstvy a usnadněním i jejich vlastní absorpce. Úvahu o použití takovýchto látek jako enhancerů byl eliminován jejich dráždivostí. Některé mírněji dráždivé amfifilní sloučeniny (např. methyloleát, glycerolmonolaurát, propylenglykolmonolaurát), již dlouho používané v terapeutických nebo kosmetických přípravcích, vykazují dříve nevyužívaný akcelerační potenciál.

Je zvláště významné, že tyto a jim podobné povrchově aktivní amfifilní sloučeniny jsou účinné v malých množstvích, která mohou být aplikována v tenké vrstvičce na kůži. Amfifilní molekuly penetrují dovnitř a mísí se s vlastními lipidy rohové vrstvy, které jsou také polárními amfifilními látky. Termoanalytická a spektroskopická data dokazují, že se přitom rozvolňuje uspořádaná struktura přírodních lipidů rohové vrstvy, a tak usnadňuje difúzi látek existujícími kanály a možná vytváří kanály nové.^{18,19,20} Navíc snížení tekuté krystalicity vždy zvyšuje kapacitu rohové vrstvy rozpouštět látky, což dále zvětšuje tento efekt. Zdá se, že relativně krátké alkylové řetězce (C_{10} , C_{12}) a relativně slabě polární koncové skupiny podporují zesílení průniku kůží.

Tyto objevené strukturní požadavky zesílení průniku kůží odstartovaly pátrání po nových, ještě silnějších enhancerech. Z tohoto pátrání se vynořilo několik účinných amfifilů, které přinejhorším jen slabě dráždí tkáň, klíčovými příklady jsou N-dodecylazacykloheptan-2-on (Azone, laurokapram) a decylmetylsulfoxid. Obě tyto vzorové sloučeniny obsahují krátký alkylový řetězec (laurokapram C_{12} ; decylmetylsulfoxid C_{10}) spojený s velmi hydrofilní,

avšak neionogenní hlavní skupinou. Ani jedna z nich se ve vodě sama od sebe nerozpouští, to znamená, že ani jedna z nich nemá amfifilní rovnováhu potřebnou pro tvorbu vlastních micel. Z obou těchto sloučenin byl více zkoumán laurokapram. Podporuje absorpci rozpuštěných polárních látek už v překvapivě nízkých procentuálních koncentracích. Jeho účinky na zvířecích kůžích byly až bezpříkladně velké. Například byly pozorovány až několikasetkrát vyšší permeační rychlosti vysoce polárních cyklických nukleosidů přes bezsrstou myš kůži *in vitro*.²¹ Laurokapram ovšem není srovnatelně účinný na lidské kůži.²² Tak jako u každé látky tohoto druhu jsou jeho účinky závislé na konkrétním složení přípravku.

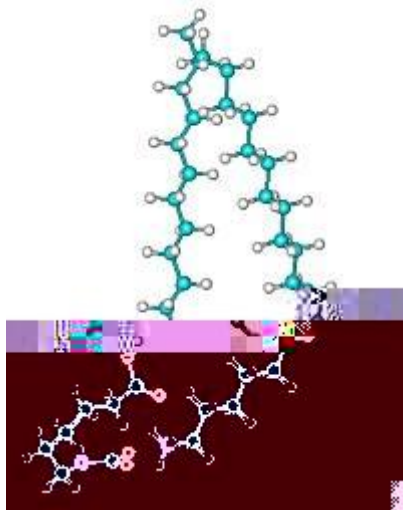
Znepokojení nad toxicitou a zvýšenou dostupností neléčivých látek i při využití komponent s uznaným bezpečným původem se stává překážkou pro zejména pro zavádění enhancerů s novou, zcela neznámou chemickou strukturou.

Účinek akceleračtů či enhancerů penetrace na rohovou vrstvu může, ale nemusí přetrvávat. To záleží na dosaženém stupni změn rohové vrstvy. Nevratnost této změny je chápána jako velký problém, neboť kůže by byla náchylná k absorpci jiných látek, které přicházejí do kontaktu s ošetřenou oblastí. Je zde obava, že tato náchylnost zůstává vysoká, dokud není mitoticky obnovena větší část rohové vrstvy, což znamená minimálně několik dní. Navíc jsou akceleračty do jisté míry sama absorbována, což je další příčinou zájmu toxikologů. O DMSO je například známo, že zvyšuje nitrooční tlak, DMA je spojován s poškozením jater, laurokapram může dráždit, avšak jeho pravá obtíž je v tom, že jeho chemická struktura je zcela nová a bez toxikologického precedensu.

3.1.4 Transkarbam 12

Látka, která dnes nese označení transkarbam 12 (T12), byla navržena a zkoumána s myšlenkou připravit novou sloučeninu, bude strukturně vycházet ze struktur publikovaných, ale bude mít flexibilnější molekulu a především, její metabolické štěpy musí být netoxické. Transkarbam 12 je důkazem toho, že

i nové, a z hlediska biologických vlastností velmi zajímavé sloučeniny, mohou vznikat jednoduchými reakcemi jednoduchých sloučenin.



Obr. 1: Struktura transkarbamu 12

T 12 byl připraven již začátkem 90. let. Dokáže urychlit průnik léčiv přes kůži až 40krát a je výrazně účinnější než většina ostatních urychlovačů. Dále se vyznačuje nízkou toxicitou a po aplikaci nedochází ke kožnímu podráždění.^{23,24,25}

Principem účinku T12 je interakce s komplexem lipidů v mezibuněčných prostorech rohové vrstvy, která představuje hlavní kožní bariéru. Tyto lipidy, tvořící v této části kůže velmi dobře a pevně organizované lamely, představují směs mastných kyselin, cholesterolu a jeho esterů; největší zastoupení zde ale mají ceramidy – sloučeniny sfingosinu, popř. jeho strukturních obměn s mastnými kyselinami (s počtem uhlíků asi 22 – 34). A právě T 12 se díky jeho podobným vlastnostem s ceramide podařilo specificky zasáhnout tyto struktury. Jeho působením jsou lamely reversibilně rozvolněny a vzniklé nepravidelnosti pak představují cestu, kterou může léčivo proniknout do kůže.

Pro stanovení T12 byla využita metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie a jeho biodegradabilita byla vyhodnocena použitím prasečí esterázy. Za vysokou aktivitu T12 je odpovědný karbamát, což bylo potvrzeno tím, že dodecyl-6-aminohexanoát byl ponechán pod argonem tak, aby nezreagoval s CO₂, a následkem toho se stal neúčinným. Za zvýšenou aktivitu

T12 je zodpovědná i esterová skupina, jejím nahrazením se nejen snižuje aktivita, ale asi se také mění mechanismus působení. T12 zvyšuje transdermální permeaci léčiv širokého okruhu fyzikálně chemických vlastností. Jeho aktivita je závislá také na pH, což opět potvrzuje význam karbamátové skupiny.^{24,26}

Pro založení této práce je podstatné to, že dosud žádná z analytických metodik a technik neumožňuje stanovení aktivní, totiž dvouřetězcové formy T12 v přípravku typu krému. Dostatečně přesná kvantifikace T12 v reálném polotuhém dermatologickém přípravku je vzhledem ke zvláštnostem molekuly T12 v principu téměř neproveditelná.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

Abil WE 09 (Polyglyceryl-4-isostearat; CetylPEG/ PPG-10/1 Dimethicone; Hexyl Laurate)	(Goldschmidt, Darmstadt)
Azid sodný p. a.	(Fluka, Buchs)
Acetonitril pro HPLC	(AlliedSignal, Seelze)
Diazolidinylurea (95%)	(Sigma-Aldrich, Praha)
Dihydrogenfosforečnan sodný ČL 2005	(Fluka, Buchs)
Hydrogenfosforečnan sodný ČL 2005	(Lachema, Brno)
Chlorid sodný ČL 2005	(Lachema, Brno)
Isopropylmyristát	(Sigma-Aldrich, Praha)
Kyselina chlorovodíková 36%, p.a.	(Kulich, Hradec Králové)
Kyselina mravenčí p.a.	(Kulich, Hradec Králové)
Propylenglykol	(Kulich, Hradec Králové)
Methanol pro HPLC	(AlliedSignal, Seelze)
Stearan hlinitý (ČL 2005)	(Kulich, Hradec Králové)
Tromethamol (TRIS)	(Sigma-Aldrich, Praha)
Voda čištěná	(FaF UK, Hradec Králové)
Voda pro HPLC	(FaF UK, Hradec Králové)
Vaselina bílá	(Kulich, Hradec Králové)
Transkarbam 12	(FaF UK, Hradec Králové)

Uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti podle daných norem výrobců, resp. dodavatelů.

Transkarbam 12 o čistotě vyšší než 99% byl syntetizován doc. A. Hrabálkem, CSc. (UK-FaF v Hradci Králové).

4.2 Přístroje

Mraznička M 595/6015	(Calex, Zlaté Moravce)
Lednička Ardo	(Ardo, Itálie)
Analytické váhy	(Sartorius, Göttingen)
Digitální pH-metr GRYF 209S	(Elektron. přístroje, Havlíčkův Brod)
Elektronická míchačka	(Variomag Labortechnik, München)
Liberační zařízení SP 01	(FaF UK, Hradec Králové)
Magnetická míchačka MM 2A	(Laboratorní přístroje, Praha)
Ultratermostat Haake L	(Haake, Berlín)
Ultrazvuková lázeň	(Tesla, Vráble)
HPLC sestava Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies, USA

Sestava pro HPLC od Agilent Technologies 1200 Series se skládala z isokratické pumpy, degaseru, autosampleru, termostatu a UV / VIS detektoru.

4.3 Biologický materiál

Pro in vitro permeační pokusy byla použita prasečí kůže z vnější strany boltce prasečího ucha. Po odpreparování byla zbavena chlupů a očištěna vodou a roztokem azidu sodného. Takto upravená kůže, o plné tloušťce, byla následně uložena do sáčků z polyethylenové folie a po evakuaci a zatavení sáčků uchovávána při teplotě -20°C v mrazničce.

4.4 Testované krémy

Složení TRIS pufru pH 7,1 s konzervační přísadou

Trometamol		24,0
Diazolidinylurea		6,0
Kyselina chlorovodíková		q.s.
Čištěná voda	ad	1000,0

Postup přípravy pufru

1. Rozpuštění trometamolu asi v 900 ml vody
2. Změření pH za stálého míchání (pH asi 12,3)
3. Přidání diazolidinylurey (konc. 0,6% hmot.; hodnota pH klesne)
4. Úprava pH na 7,1 pomocí koncentrované HCl
5. Doplnění pufru (pH 7,1) na konečný objem 1000,0 ml (v odměrné baňce)

Složení oleokrémového základu s obsahem 60 % vody (rozpis na 100 g)

	Základ bez T12	Základ s 1 % T12
Aluminium stearicum	5,0	5,0
Abil WE 09	5,0	5,0
Isopropylum- myristicum	11,0	10
Vaselinum album	11,0	16,0
T 12	0	1,0
TRIS pH 7,1	ad 100,0	ad 100,0

Postup přípravy oleokrému s 60 % vodné fáze

A. Příprava vodné fáze

1. Příprava TRIS pufru 7,1 (s 0,6 % diazolidinylurey); viz shora
2. Dispergace T12 v TRIS pufru za laboratorní teploty

B. Příprava lipofilní fáze

1. Důkladné rozetření stearanu hlinitého v isopropylmyristátu

2. Vpravení vaseliny
3. Vpravení Abil WE 09
4. Dokonalé promísení součástí

C. Emulgace za obyčejné teploty

1. Postupné přidávání hydrofilní fáze (A) k lipofilní fázi (B) za stálého míchání při obyčejné teplotě.
2. Závěrečné promíchání krému

4.5 Uspořádání permeačních pokusů

Jednotlivé vzorky kůže byly pro permeační pokusy fixovány mezi dvěma destičkami z plexiskla a umístěny do sestavy liberační buňky. Ta byla po naplnění akceptorovým médiem (izotonizovaný tris pufr o pH 7,1 s obsahem 0,02 % azidu sodného) umístěna do termostátované vodní lázně temperované na 32 °C a promíchávané magnetickým míchadlem. Objem akceptorové fáze byl odečítán s přesností 0,1 ml a obvykle činil přibližně 18,0 ml.

Testované vzorky byly nanášeny v množství 0,20 g na vnější povrch kůže. Přiložením krycích sklíček se zabránilo odpařování média. Spoje mezi akceptorovými a donorovými částmi buňky byly utěsněny silikonovým adhezivem Exponovaná plocha kůže činila přibližně 1 cm².

Vzorky akceptorové fáze byly v množství 0,6 ml odebírány ke stanovení kofeinu v předem stanovených 6 až 9 časových intervalech do 48 hodin. Drobné odchylky od této časové řady, přizpůsobené aktuálním časovým možnostem pro odběry vzorků, byly při následných výpočtech vždy uvažovány. Zároveň byl úbytek tekutiny v buňce nahrazen akceptorovým médiem o stejném objemu. Při konečných výpočtech bylo doplnění akceptorové fáze zohledněno při výpočtu korigovaných koncentrací.

4.6 Výsledky měření

Všechny potřebné údaje z permeačních pokusů jsou zaneseny v **protokolech** a prezentovány v části 5 (Dokumentace).

Výsledky permeačních pokusů vyjádřené formou fluxu **J** kofeinu jsou ilustrovány v části (Výsledky a diskuse)

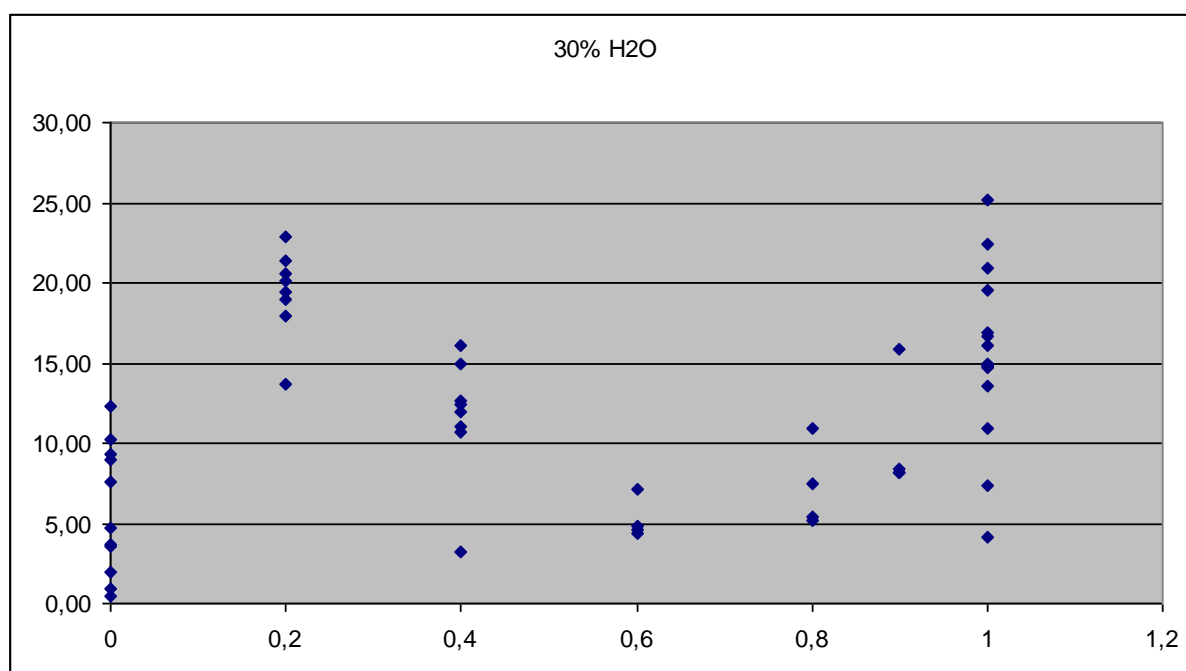
5 DOKUMENTACE

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Ze získaných údajů koncentračních údajů o časovém průběhu byly sestaveny průběhy permeace zkoumaných přípravků v čase (viz protokoly). Hlavním sledovaným parametrem permeačních pokusů byl flux kofeinu J [$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$]. Hodnoty fluxu se liší podle použitého kožního štěpu, což potvrzuje skutečnost, že transdermální penetrace látek je ovlivněna individuálními vlastnostmi kůže. Přesto byl průměr fluxů a další zpracování v první fázi zpracování výsledků spočítán ze všech naměřených hodnot, bez ohledu na použitou kůži.

V dalším kroku byly jednotlivé hodnoty fluxů pro příslušné koncentrace sestaveny do **grafů 1 a 2**.

Graf 1: Fluxy kofeinu z modelového oleokrému s 30 % vody



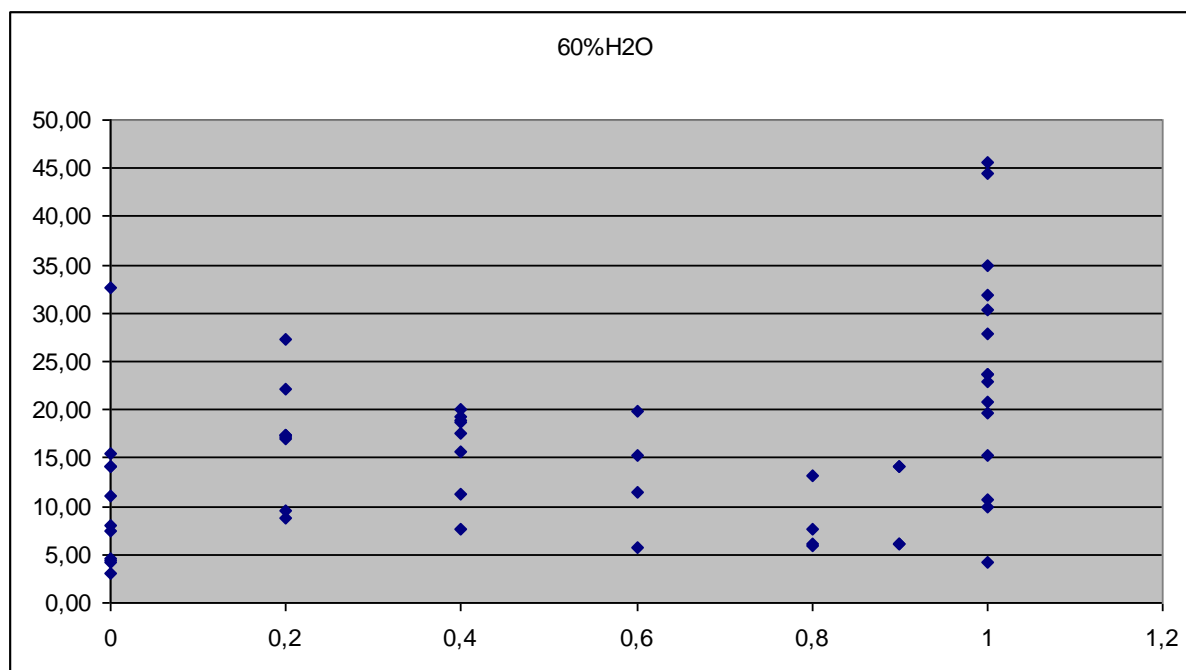
Z tohoto grafu je patrné, že variabilita získaných dat je pro všechny koncentrace T12 značná. Přesto je však jasné, že přítomnost T12 v krémech sice modelových, ale velmi blízkých reálnému složení v praxi zcela použitelných polotuhých soustav vykazuje v testovaném koncentračním rozmezí T12 dvě maxima. První z nich se pro krém s 30 % obsahem vody ve vnitřní fázi poněkud překvapivě nachází již v koncentraci blízké 0,2 procentům

T12 (hmotnostním v modelových krémech). S nárůstem koncentrace T12 potom mezi 0,2% a 0,6% koncentrací akcelerační efekt T12 klesá a s vyšší koncentrací opět stoupá.

Rozdělíme-li tedy výsledky tak, že v reálném přípravku bude výchozí koncentrace T12 nastavena na 0,2 %, bude docela dobře možné posoudit pokles koncentrace aktivní formy T12, tedy koncentrační pohyb směrem k nule. Spolehlivost takového posouzení bude z důvodů zmíněné variability vyžadovat relativně vysoký počet vzorků kůže a permeačních cel, ale zdá se být v zásadě použitelná.

Popsaný jev je do jisté míry patrný i z **obr. 2** pro analogické hodnoty nalezené při permeaci kofeinu z krémů s obsahem 60 % vody. U tohoto krému se ovšem ukazuje, že s nárůstem koncentrace T12 v intervalu nad cca 0,5 % narůstá variabilita fluxů, aniž by se celkový akcelerační efekt použitelným způsobem zvyšoval.

Graf 2: Fluxy kofeinu z modelového oleokrému s 60 % vody



I v tomto případě je možné očekávat maximum fluxů v oblasti kolem 0,2 % obsahu T12, což je příznivé jak z potenciálního ekonomického hlediska, tak především z hlediska dráždivosti a toxicity.

Při daném počtu opakování pokusů se z obou uvedených grafů jeví jako podstatné především konstatování, že stojí za to se myšlenkou biologického stanovení na principu in vitro permeací dále zabývat.

V každém případě bude po předběžném hodnocení provedeném v rámci předložené práce vhodné vymezit, resp zúžit koncentrační rozmezí přísady T12. Současně bude nutné zvýšit počet paralelních měření tak, aby bylo možné zvýšit věrohodnost či spolehlivost získaných závěrů.

7 ZÁVĚRY

1. Hodnoty fluxu kofeinu mohou sloužit jako kritérium pro hodnocení obsahu aktivní formy T12 v přípravcích typu oleokrému s obsahem vody v rozmezí přibližně 30% až 60 % vodné vnitřní fáze.
2. Koncentrační závislosti fluxů kofeinu na T12 vykazuje u hodnocených krémů maximum na úrovni 0,2 % T12, což je zajímavé z funkčního i toxikologického hlediska.

8 SOUHRN

V teoretické části byl na základě ucelené monografické stati zpracován přehled problematiky topické biodostupnosti léčiv.

Experimentální část přináší výsledky *in vitro* permeačních pokusů na excidované kůži z prasečích boltců. Hodnocení bylo zaměřeno na využití permeace kofeinu k stanovení obsahu aktivní formy T12.

Předběžně bylo potvrzeno, že takové hodnocení je možné, předpokladem je dostatečné počet opakování měření a maximální standardizace celého experimentu.

9 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

T 12	transkarbam 12
J, J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	flux permeantu, průměrný flux permeantu
C_{nk} [$\text{mg}/100 \text{ ml}$]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_k [$\text{mg}/100 \text{ ml}$]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
t [hod]	čas
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého kožní membránou
Q_t [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	množství permeantu prošlého přes 2 cm^2 kožní membrány
S_d	směrodatná odchylka
r	korelační koeficient
n	počet naměřených bodů
V_o [ml]	celkové množství akceptorové fáze
ΔV_{dop} [ml]	množství doplňované akceptorové fáze

10 LITERATURA

- 1 Flynn, G. L.: Cutaneous and Transdermal Delivery: Processes and Systems of Delivery. In: Banker, G. S., Rhodes, C. T.(eds.): Modern Pharmaceutics (3rd Ed.), M. Dekker, New York 1998. s. 281- 291
- 2 Flynn, G. L., Rosemann, T. J.: J. Pharm. Sci., **60**, 1971, s.1778 (cit. dle lit. 1)
- 3 Flynn, G. L.: J. Pharm. Sci., **60**, 1971,s. 345 (cit. dle lit. 1)
- 4 Hagen, T. A.: Physicochemical study of hydrocortisone and hydrocortisone n-alkyl-21-esters. Thesis. University of Michigan. 1979. (cit. dle lit. 1)
- 5 Smith, W. M.: An inquiry into the mechanism of percutaneous absorption of hydrocortisone and its al-n-alkyl esters, Thesis, University of Michigan. 1982. (cit. dle lit. 1)
- 6 Schlagel, C. A.: Adv. Biol. Skin **12**, 1972, s. 339, (cit. dle lit. 1)
- 7 Saracco, G., Spaccamella-Marcheti, E.: Ann. Chem., **48**, 1958, s. 1357, (cit. dle lit. 1)
- 8 Yalkowsky, S. H., Flynn, G. L., Slunick, T. G.: J. Pharm. Sci., **61**, 1972, s. 852, (cit. dle lit. 1)
- 9 Scheuplein, R. J.: J. Invest. Dermatol., **47**, 1965, s. 334, (cit. dle lit. 1)
- 10 Flynn, G. L., Yalkowsky, S. H.: J. Pharm. Sci., **61**, 1972, s. 838, (cit. dle lit. 1)
- 11 Wurster, D. E.: Am. Perfum. Cosmet., **80**, 1972, s. 21, (cit. dle lit. 1)
- 12 Higuchi, T.: J. Soc. Cosmet. Chem., **11**, 1960, s. 85, (cit dle lit. 1)
- 13 Stoughton, R. B.: Arch. Dermatol., **91**, 1965, s. 657, (cit. dle lit. 1)
- 14 Scheuplein, R. J., Ross, L.: J. Soc. Cosmet. Chem., **21**, 1970, s. 853, (cit. dle lit. 1)
- 15 Elfbarum, S.G., Laden, K.: J. Soc. Cosmet. Chem., **19**, 1968, s. 163, (cit. dle lit. 1)

-
- 16 Jones, R.: Excipient effects on topical drug delivery. Ind. Pharm. Technol. Sect. Symp., 121st Ann. Meet. Am. Pharm. Assoc., Chicago, Abstr., Vol. **4**, s. 24 (cit. dle lit. 1)
- 17 Flynn, G. L., Linn, E. E., Kurihara-Bergstrom, T., Govil, S. H., Hou, S. Y. E. In: Transdermal Delivery of Drugs, Vol. **2**, CRC Press, Boca Ranton, FL 1987, (cit dle lit. 1)
- 18 Goodman, M., Barry, B. W., Percutaneous Absorption. 2. Vyd. Bronaugh, R. L., Maibach, H. I. (ed.), Marcel Dekker, New York 1989, s. 567 –593, (cit dle lit. 1)
- 19 Abraham, W., Downing, D. T.: Prediction of Percutaneous Absorption. Scott, R. C., Guy, R. H., Hadgraft, J., (ed.) IBC Technical Services, London, 1990, s. 110 – 122, (cit. dle lit. 1)
- 20 Anderson, B. D., Higuchi, W. I., Raykar, P.: Pharm. Res., **5**, 1988, s. 556 –573, (cit. dle lit. 1)
- 21 Higuchi, W.I., Shannon, W. W., Fox, J. L., Flynn, G. L., Ho, W. F. H., Vaidyanathan, R., Baker, D. C.: In Recent Advances in Drug Delivery Systems (Anderson, J. M., Kim, S. W., ed.), Plenum Press, New York 1984, s. 1 –7, (cit. dle lit. 1)
- 22 Hou, S. Y. E., Flynn, G. L.: Pharm. Res., **3** (Suppl.), 1986, s. 525, (cit. dle lit. 1)
- 23 Doležal, P., Hrabálek, A.: Charakteristika transkarbamu 12, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2006
- 24 <http://iforum.cuni.cz/IFORUM-3022.html>
- 25 Holas, T., Vávrová, K., Šíma, M., Klimentová, J., Hrabálek, A.: Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of carbonate and carbamate analogs of transkarbam 12. Bioorg. Medicin Chem., **14** (23), 2006, s. 7671-7680
- 26 Hrabálek, A., Doležal, P., Vávrová, K., Zbytovská, J., Holas, T., Klimentová, J., Novotný, J.: Synthesis and Enhancing Effect of Transkarbam 12 on the Transdermal Delivery of Theophylline, Clotrimazole, Flobufen, and Griseofulvin. Pharm. Res., **23**(5), 2006, s. 912-919