

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**



**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

***Průnik nanočástic sublingvální membránou 3.***

***Permeation of nanoparticles through sublingual membrane 3.***

**Mgr. Pavlína Dvořáková**

Konzultant: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, leden 2020

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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 6. 1. 2020

Mgr. Pavlína Dvořáková

-----

Na tomto místě bych ráda poděkovala těm, co mi pomáhali při realizaci této práce. Poděkování patří mému konzultantovi rigorózní práce doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné vedení, zájem a čas, který mi věnoval. V neposlední řadě také děkuji PharmDr. Pavlu Berkovi, Ph.D., který zpracoval data spektrofotometrických měření. Dále katedře farmaceutické technologie za poskytnuté zázemí, kamarádce a kolegyni Mgr. Martině Spurné, která se mnou spolupracovala a mojí rodině za trpělivost.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	3
ABSTRACT .....	4
1 ÚVOD .....	5
2 CÍLE PRÁCE .....	7
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Sublingvální vstup léčiva do organismu .....	8
3.2 Dutina ústní – sliznice, epitel.....	9
3.2.1 Sliz, mukus.....	9
3.2.2 Sliny .....	10
3.2.3 MCGs – membránová vrstva granulí.....	11
3.3 Prostup látek přes sublingvální membránu.....	12
3.4 OCCAT model.....	13
3.5 Nanočástice .....	18
3.6 Základní pojmy bioimpedance .....	21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1 Použité látky .....	23
4.2 Přístroje .....	23
4.3 Biologický materiál .....	25
4.3.1 Složení a příprava pufrů .....	25
4.3.2 Příprava kalibračních vzorků s Chromeonem 470 .....	27
4.3.3 Příprava donorových vzorků pro permeaci.....	28
4.4 Provedení permeace .....	28
4.4.1 Měření transmembránových impedancí (Z) sublingválních membrán.....	29
4.5 Spektrofluorimetrie .....	32
4.6 Zpracování výsledků permeací .....	32
4.7 Fluorescenční mikroskopie .....	33
5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
5.1.1 Hydrodynamické průměry nanočástic .....	35
5.1.2 Měření impedance .....	38
5.1.3 Transmembránová permeace nanočástic.....	50

5.1.4	Fluorescenční mikroskopie.....	56
6	ZÁVĚRY .....	61
7	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY.....	64
8	LITERATURA.....	65

## ABSTRAKT

V teoretické části byla věnována pozornost vstupu léčiv do organismu sublingvální cestou, popisu dutiny ústní (sliznice, epitel, sliz, sliny, MCGs), OCCAT modelu, a základním pojmům bioimpedance.

V experimentální části byla metodou DLS ověřena hydrodynamická velikost nanočástic PD-Chromeon 470. V prostředí vody, i dvou pufrů pH 6,8 a 7,4 dle Sörensena byly získány prakticky shodné výsledky na úrovni hodnot 40 nm. Pufry byly použity jako donorové, resp. akceptorové prostředí v navazujících *in vitro* permeačních pokusech. Jejich součástí bylo proměření impedancí rozdílně zpracovaných a uchovávaných sublingválních membrán z jazyků prasete domácího. Pro testování průniku nanočástic přes tyto modelové mukosální bariéry byly nanočástice nanášeny v koncentrované (500 µg/ml), zředěné (1:4) disperzi.

Nejnižší impedance měly membrány konzervované azidem sodným, které byly dlouhodobě zmrazeny při -18°C. Tyto také vykázaly nejvyšší hodnoty *in vitro* permeace nanočástic. Rychlé zmrazení kapalným dusíkem membrány z hlediska hodnot impedance zřejmě neovlivňuje.

Nanočástice PD-Chromeon 470 byly schopny průniku přes všechny různým postupem zpracované sublingvální membrány. Nejvyšší hodnoty impedance a nejnižší permeační hodnoty pro nanočástice byly naměřeny u membrány čerstvě vypreparované, nebo membrány po preparaci rychle zchlazené kapalným dusíkem a týden uchovávané při minus 18°C. Obě takto získané sublingvální membrány lze pro *in vitro* permeační pokusy rovnocenně použít.

**Klíčová slova:** anatomie a fyziologie dutiny ústní, sublingvální permeace, OCCAT model, Chromeon 470, transmembránová *in vitro* impedance, transmembránová permeace nanočástic

## ABSTRACT

In the theoretical part, attention was paid to the entry of drugs into the body by the sublingual route, description of the oral cavity (mucosa, epithelium, mucus, saliva, MCGs), OCCAT model, and basic concepts of bioimpedance.

In the experimental part, the hydrodynamic size of the PD-Chromeon 470 nanoparticles was verified by the DLS method. In the environment of water, even two buffers pH 6.8 and 7.4 according to Sørensen, practically identical results were obtained at the level of 40 nm. Buffers were used as donor, resp. acceptor phase *in vitro* permeation experiments. The experiments included measurement of impedances of differently processed and stored sublingual membranes from pig tongue. To test the penetration of nanoparticles through these model mucosal barriers, nanoparticles were applied in a concentrated (500 µg / ml), diluted (1: 4) dispersion.

The lowest impedance had the sodium azide-preserved membranes, which were frozen at -18 ° C for a long time. These also showed the highest *in vitro* permeation values of nanoparticles. Rapid freezing with liquid nitrogen does not seem to affect the membrane in terms of impedance values.

PD-Chromeon 470 nanoparticles were able to penetrate all differently processed sublingual membranes. The highest impedance values and the lowest permeation values for nanoparticles were measured for freshly prepared membranes or membranes after preparation rapidly frozen with liquid nitrogen and stored at -18 ° C for one week. Both thus obtained sublingual membranes can be equally used for *in vitro* permeation experiments.

**Key words:** Anatomy and physiology of oral cavity, sublingual permeation, OCCAT model, Chromeon 470, transmembrane *in vitro* impedance, transmembrane permeation of nanoparticles

# 1 ÚVOD

Biotechnologické postupy umožnily vyvinout nové, velmi specifické, často ale také velmi labilní léčivé látky. Doručení těchto léčiv do požadovaného místa jejich působení je pro farmaceutickou technologii velkou výzvou. Nanočásticové systémy se jeví dobrými kandidáty pro cílený transport léčiv, jsou však obecně rozlišitelné jako cizorodé částice obranným systémem těla. Pro dosažení cílového místa a vstup buněčnými membránami je třeba odhalit, jak se možné „vstupy“ do buněk dají otevřít a pak zase zavřít pro průnik léčiva s nosičem dovnitř buňky bez její desorganizace, tj. stejnou cestou, jako to umějí viry. Tyto požadavky zdůrazňují potřebu výzkumu a vývoje v oblasti dodání aktivní formy léčiv až do požadovaných subcelulárních struktur.<sup>1</sup>

Nanotechnologie se zabývají studiem a využitím struktur o velikostech od 1 nanometru až do 1000 nanometrů.<sup>2</sup> Dosud neexistuje jednotná definice pro nanotechnologii. Očekává se, že nové technologie a materiály přinesou revoluci v medicíně, stejně jako i v jiných oborech. Na druhou stranu nanotechnologie také představují určitá rizika. Rizika spojená s poškozením lidského zdraví (toxicita, teratogenita, aj.) nebo rizika pro životní prostředí (ekologická toxicita, ovlivnění biogeochemických cyklů a další).<sup>3,4</sup>

Velikost nanočástic významně ovlivňuje jejich terapeutické a diagnostické aplikace.

Různé terapeutické a diagnostické aplikace vyžadují v závislosti na požadovaném cíli různé typy a velikosti nanočástic. S pokroky v pochopení vlivu velikosti nanočástic na interakce s lidským tělem, a to jak prostřednictvím modelů, tak i experimentů, je snahou posunout nanočástice na úroveň standardů pro klinické diagnostické zobrazování, ale také při biodistribuci léčivých látek. Nanočástice mají extrémní potenciál být právě v tomto směru efektivní. Použití nanočástic v oblasti farmakoterapie by vedlo k nižším systémovým dávkám, zvýšené terapeutické účinnosti, menšímu počtu nežádoucích vedlejších účinků, snadnějšímu podávání léčiv a zvýšení kvality života pacienta. K posunu nanočástic až do klinického výzkumu je zapotřebí dále objasňovat interakce mezi nanočásticemi a lidským tělem.<sup>5</sup>



Na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové probíhají na katedře farmaceutické technologie výzkumy nanočástic již po několik let.

Předložená rigorózní práce navazuje na řadu diplomových prací, věnuje pozornost nanočásticím PD-Chromeon 470 značeným fluorescenčním barvivem a jejich schopnosti proniknout přes prasečí sublingvální membránu.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Proměření hydrodynamických rozměrů komerčně získaných nanočástic PD-Chromeon 470 v prostředí vodných aplikačních vehikul
2. Proměření *in vitro* hodnot transmembránových impedancí rozdílně zpracovaných, uchovávaných a v pokusech exponovaných vzorků sublingválních membrán
3. Ověření transmembránového průniku dvou rozdílně koncentrovaných donorových vzorků nanočástic PD-Chromeon 470 v permeačních *in vitro* pokusech přes sublingvální membránu prasete.  
Vzorky nanočástic od výrobce použít neředěné (jak byly dodány) a vzorky ředěné pufrům pH 6,6 (ředění 1:4 disperze: 200 $\mu$ l nanočástic + 800 $\mu$ l roztoku kofeinu s pufrům o pH 6,6).
4. Permeační pokusy doplnit mikroskopickým hodnocením sublingválních membrán z permeačních pokusů

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

Systémově působící léčiva zpravidla dosahují cílového orgánu krevní, případně lymfatickou cestou. Do organismu se vpravují různými aplikačními cestami, jejich účinek se očekává až po krevní distribuci. Vlastní volba přírodní cesty je dána úvahou o možných interakcích, možnosti spolupráce s pacientem a v neposlední řadě vlastnostmi samotného léčiva.<sup>6,7,8</sup> Systémové podání léčiv můžeme zjednodušeně rozdělit na podání: perorální, parenterální (intravenózní, subkutánní, intramuskulární, intraarteriální, intrathekální, intraperitoneální), nověji též transmukosální (sublingvální, rektální, vaginální), transdermální, speciálně se vyčleňuje cesta inhalační.<sup>7,9</sup>

#### 3.1 Sublingvální vstup léčiva do organismu

Nanesením léčiva na ústní sliznici se léčivo dostane do krve rychleji než po perorálním podání tablety, protože léková forma dodává léčivo přímo na místo absorpce, a protože při rozpuštění podané dávky slinami vzniká na tomto místě roztok velmi vysoké koncentrace, což průnik epitelem ústní sliznice urychluje.<sup>6,7,8,9,10,11</sup>

Po bukové nebo sublingvální aplikaci obejde absorbovaná látka zpracování v játrech, protože venózní krev z ústní sliznice směřuje do horní duté žíly. Sublingvální podání je pro pacienta technicky nenáročné. Vzhledem k vysoké permeabilitě a bohatému přívodu krve je sublingvální cesta schopna vyvolat rychlý nástup účinku, což je vhodné pro léčiva s krátkou dobou dodání a nepravidelným dávkovacím režimem. Permeabilita oromukosálních membrán stoupá v pořadí palatinální, bukové a sublingvální sliznice.<sup>6,7,8,9,10,11</sup>

Na druhou stranu sublingvální aplikace léčiv není vhodná pro látky špatně rozpustné ve vodě a pro látky, které se špatně absorbují z jiných důvodů (povrchový náboj, velikost a tvar molekuly aj.). Pro taková léčiva je vhodná perorální aplikace, protože množství tekutiny obsažené v tenkém střevě i resorpční povrch, který je v tenkém střevě k dispozici, jsou mnohonásobně větší než v ústní dutině.<sup>6,7,8,9,10,11</sup>

Pasáž játry odpadá také po inhalační aplikaci. Při použití této přírodní cesty se častěji zamýšlí dosáhnout místního účinku než celkového. Inhalační podání má téměř okamžitý nástup účinku, ale je náročné z hlediska technologie výroby či přípravy a techniky aplikace.<sup>6,7,8,9,10,11</sup>

Lokální aplikace na kůži, sliznice, do tělních dutin (výplachy) se obvykle používá pro místní účinek, méně často pro celkový účinek.<sup>9</sup>

### **3.2 Dutina ústní – sliznice, epitel**

Ústní dutina je lemována sliznicí o celkové ploše přibližně 100 až 200cm<sup>2</sup>.<sup>11</sup> Sliznice dutiny ústní se rozlišuje na sliznici bukální, sublingvální, sliznici měkkého patra, tvrdého patra a sliznice pokrývající dásně a rty. Sliznice (tunica mucosa) je výstelkovou tkání, je tvořena vazivem a epitelem, kryje vnitřní povrchy těla. Ústní sliznice se skládá ze tří základních vrstev, a to vrstevnatého dlaždicového epitelu, bazální membrány a pojivové tkáně, na kterou navazuje hladká svalovina. Epitel se obnovuje z bazální vrstvy buněk. V ústní dutině se buňky sliznice obmění za 1 až 2 týdny.<sup>10</sup>

Bukální sliznice je silná 500 až 800 μm, tvoří ji 40 až 50 vrstev buněk, zatímco sublingvální sliznice je o něco tenčí.<sup>10,12</sup> Nejtenčí (100 – 200 μm) je na tvrdém a měkkém patru, spodně dutiny ústní, dásních a ventrální části jazyka.<sup>10</sup> Ve sliznici jsou uloženy seromucinózní žlázy. Kromě malých slinných žláz, které se nacházejí ve slizničním vazivu, ústí do dutiny ústní ještě vývody velkých slinných žláz (příušní, podčelistní, podjazyková žláza). Buňky ústního epitelu jsou obklopeny intercelulární podkladovou látkou, hlenem, jejímiž hlavními složkami jsou komplexy složené z proteinů a sacharidů. Ačkoli samotný epitel je avaskulární, sliznice je bohatě protkána krevními a lymfatickými cévami.<sup>10,11,12,13,14</sup>

#### **3.2.1 Sliz, mukus**

Sliz (mukus, hlen) je složen převážně z vody, bílkovin a sacharidů. Je produkován v pohárkových buňkách a slinných žlázách. Nejvyšší podíl zaujímá voda (95 až 99%), základními stavebními komponentami slizu, dodávajícími mu jeho specifické vlastnosti, jsou makromolekulární látky známé pod označením mucin (1 až 5%). Asi na 70 % celkového mucinu nalezeného ve slinách přispívají malé slinné žlázy.<sup>10,11,15</sup>

Mucin je glykoprotein obsahující velké množství sacharidových jednotek na bílkovinné kostře. Tyto molekuly jsou schopny tvořit kluzný materiál.<sup>11</sup>

Při fyziologickém pH má hlen negativní náboj v důsledku přítomnosti kyseliny sialové a sulfátových zbytků, může hrát úlohu v mukoadhezi. Při kyselém pH může hlen tvořit silně soudržnou gelovou strukturu, která se bude vázat na povrch epitelálních

buněk obdobně jako želatinová vrstva. S touto vrstvou mohou interagovat léčivé látky, čímž může dojít k omezení jejich transportu přes epitel, ale také prodloužení kontaktu s ním (důležité z hlediska farmakokinetiky). Průměrná doba obnovy hlenové vrstvy je 6 hodin. Plní funkci ochrannou, bariérovou, adhezivní a zvlhčující.<sup>10,14</sup>

### 3.2.2 Sliny

Sliny představují ochrannou tekutinu pro všechny tkáně ústní dutiny. Fyziologické prostředí dutiny ústní je udržováno pomocí slin, které představují vhodné médium pro rozpouštění a následnou absorpci léčiva. Sliny jsou vylučovány třemi velkými slinnými žlázami (párové žlázy - příušní, podčelistní a podjazyková, tedy sublingvální), a v menší míře i malými slinnými žlázkami. Malé slinné žlázy jsou rozesety po celé ústní dutině včetně jazyka a ve sliznici předsíně ústní, a produkují sliny neustále. Velké žlázy tvoří sliny jen na nervové podněty. Zabezpečují dostatečnou vlhkost ústní dutiny, obalují sousto, usnadňují polykání, snižují tření sliznice, předchází demineralizaci zubní skloviny a obsahují enzym ptyalin, který štěpí škroby. Regulují ústní mikroflóru udržováním správného pH v ústech s aktivitou enzymů (alfa-amyláza, lysozym, lingvální lipáza). Za 24 hodin se vytvoří od 500 ml do 2 000 ml slin, toto množství tekutiny je k dispozici také pro hydrataci léčivých přípravků podaných na ústní sliznice.<sup>10,11,16</sup>

Sliny mají pH 5,5 až 7,0 a obsahují 99,5 % vody, zbytek tvoří organické a anorganické látky (proteiny, glykoproteiny a elektrolyty). Hlavním důvodem pro výběr hydrofilních polymerních matric jako nosičů perorálních transmukosálních lékových systémů je prostředí v ústní dutině, které je bohaté na vodu.<sup>10,11,16,17</sup>

Struktura sliznice se odlišuje v různých částech dutiny ústní:

Bukální oblast zahrnuje oblast vnitřní strany tváří a vnitřní oblasti horního i dolního rtu, zaujímá asi 1/3 sliznice dutiny ústní, tvoří ji nezrohovatělé buňky, proto je pro svou dobrou přístupnost i vlastnosti nejčastěji využívaná pro aplikaci mukoadhezivních orálních lékových forem.<sup>11</sup>

S vnějším prostředím je v kontaktu sliznice rtů (labiální). V oblasti rtů epitel přechází ve vícevrstevný dlaždicový epitel rohovějící.<sup>11</sup>

Na povrchu jazyka se nachází specializovaná sliznice, jejíž povrch je tvořen zrohovatělými i nezrohovatělými buňkami a obsahuje také chuťové pohárky.<sup>11</sup>

Pod jazykem se nachází sublingvální sliznice, která umožňuje rychlý přechod léčivé látky do krve, protože je zde sliznice nezrohovatělá, tenká a nejlépe prokrvená. Vstřebání některých léčiv (např. trinitrát glycerolu) sliznicí ústní dutiny je pro některá léčiva rychlejší než ze žaludku a vzdálenějších částí trávicího ústrojí. Malé tablety se ponechají rozpustit pod jazykem, vstřebané léčivo obchází játra (vyhnutí se presystémové eliminaci). Aplikace je nebolestivá, snadná, lokální dráždivost používaných lékových forem je nízká.<sup>10,11,12,18,19</sup>

Sublingválně podaná léčiva musí být dostatečně lipofilní, aby se mohla vstřebat difúzí, aktivní absorpční mechanismy nebyly prokázány. Aby nástup systémového účinku byl co nejrychlejší, jsou sublingvální tablety většinou malé a velmi rychle se rozpadají.<sup>11</sup>

Na tvrdém patře a dásních se nachází palatální sliznice, je přizpůsobena zatížení při žvýkání. Obsahuje zrohovatělé buňky, které snesou při zpracování potravy větší tlak (mechanické namáhání). Sliznice je zrohovatělá podobně jako u epidermis. Také zde se nacházejí neutrální lipidy – ceramidy a acylceramidy, které vytvářejí bariéru pro vstup většiny látek (téměř nepropustné pro vodu). Nezrohovatělá místa sliznice naopak obsahují pouze malé množství ceramidů a propouštějí větší množství vody než keratinizované tkáně. Měkké patro je pokryto vícevrstevným dlaždicovým nerohovějícím epitelem.<sup>11,20,21</sup>

Propojenost epiteliálních vrstev sliznice je zvýšena díky MCGs (membránová vrstva granulí), které se v mezibuněčném prostoru vyskytují. Za relativní nepropustnost sliznice dutiny ústní může výskyt u sublingvální sliznice spíše mezibuněčný materiál MCGs než keratinizovaný epitel.<sup>14,15</sup>

V porovnání s bukalní sliznicí je permeabilita sublingvální sliznice vyšší, naopak propustnost palatální sliznice výrazně nižší.<sup>11</sup>

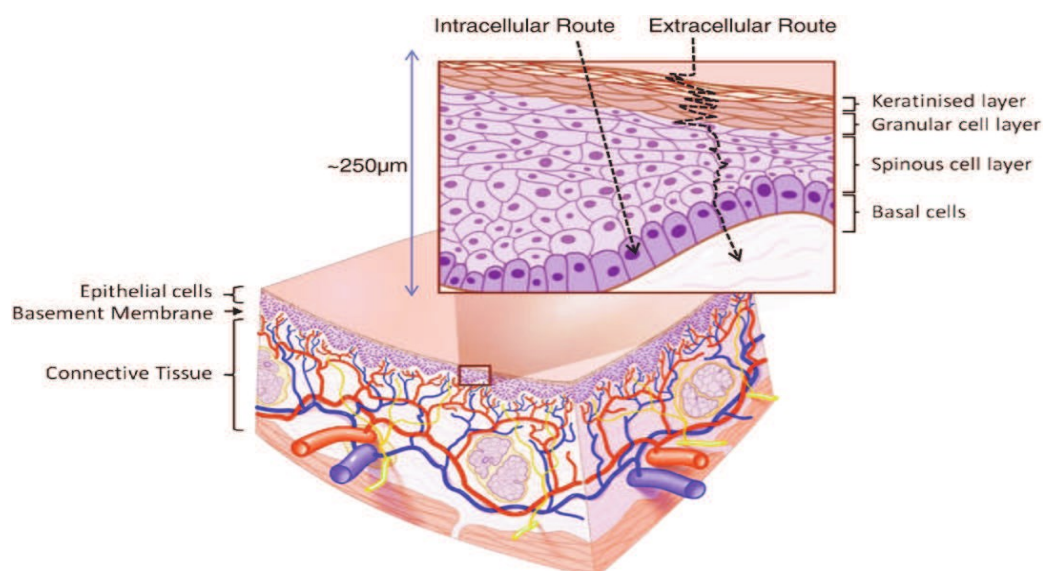
### **3.2.3 MCGs – membránová vrstva granulí**

V současné době se předpokládá, že bariéra propustnosti v ústní sliznici je výsledkem mezibuněčného materiálu odvozeného z tzv. membránových povlakových granulí (MCGs). MCGs jsou organely kulovitého nebo oválného tvaru, které mají v průměru 100 až 300 nm.<sup>14,15</sup> Vyskytují se jak v keratinizovaném tak nekeratinizovaném

epitelu orální mukózy. Nacházejí se pod povrchovými epitelálními buňkami, v jejich těsné blízkosti. Komponenty MCGs v keratinizovaném a nekeratinizovaném epitelu jsou odlišné. MCGs keratinizovaného epitelu jsou tvořeny vrstvami lamelárních lipidů (sfingomyelin, glukosylceramidy, ceramidy a jiné nepolární lipidy), zatímco nekeratinizovaný epitel obsahuje MCGs, které nejsou lamelární (estery cholesterolu, cholesterol a glykosfingolipidy). Z důvodu hydrofobního charakteru těchto struktur je přestup hydrofilních látek komplikován. Keratinizace epitelu má určitou úlohu, ale nehraje v tomto případě při ovlivňování propustnosti orální bariéry tak dominantní roli.<sup>14,15</sup>

### **3.3 Prostup látek přes sublingvální membránu**

Pasivní difúze je nejčastějším absorpčním mechanismem pro oblast dutiny ústní. Léky se mohou z dutiny ústní vstřebat dvojitým mechanismem: paracelulárně a transcelulárně. Ačkoliv v praxi probíhají oba způsoby většinou simultánně, vždy je jeden z nich preferenční v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech podané látky. Jestliže látka prochází kolem buněk a mezibuněčnými prostory, jedná se o transport paracelulární. Paracelulární transport, kde je limitujícím faktorem typ a funkční stav přítomných intercelulárních kontaktů (především gap junctions = skulinové spojení a tight junctions = těsné spojení). Při transcelulárním transportu přechází látka skrze jednotlivé buňky. Tato trasa je výhodná pro léčiva, která působí na intracelulární cíle. Tato léčiva musí mít vhodný rozdělovací a difúzní koeficient, neboť musí nejprve projít lipofilní membránou buněk a následně jejich hydrofilní výplní. Transcelulární transport, který je závislý na jednotlivých mechanismech transportu transmembránového (pět základních transportních mechanismů buněčných membrán: prostá difúze, vstup iontovými kanály, sekundární aktivní transport - spřažený transport, primární aktivní transport, exocytóza a endocytóza).<sup>10,17,22</sup>



**Obr. 3.1:** Stavba sliznice dutiny ústní a paracelulární a transcelulární transport:<sup>20</sup>

Epithelial cells – epiteliální buňky, basement membrane – bazální membrána, connective tissue – vodivá tkáň, intracellular route – transcelulární transport, extracellular route – paracelulární transport, keratinised layer – keratinizovaný epitel, granular cell layer – granulózní buňky, spinous cell layer – spinózní buňky, basal cells – bazální buňky.

### 3.4 OCCAT model

OCCAT model popisuje absorpci a přenos a distribuci léčiv přes kompartmenty dutiny ústní (př. sublingvální tablety se zolpidemem)

Tkáň	Průtok krve [ml/min/100g tkáně]	Povrch [cm <sup>2</sup> ]	Tloušťka epitelu [μm]	Tloušťka lamina propria [μm]	pH
Bukální	22,78	50,2	418,8	500	6,3
Dásně	19,54	46,6	263,8	250	6,8
Dno	12,23	13,3	117,6	200	6,5
Tvrdé patro	15,04	20,1	257,8	200	7,4
Vrch jazyka	100,61	25,7	701	500	7,4
Spodek jazyka	15,84	13,3	235	250	6,5

**Tabulka 3.1:** Fyziologické parametry jednotlivých kompartmentů dutiny ústní u lidí.<sup>16</sup>



Pro predikci a mechanickou analýzu klinické farmakokinetiky intraorálních formulací byl vyvinut komplexní, fyziologicky založený model ústní dutiny s označením OCCAT. Jedná se o výpočetní modul, který umožňuje vysvětlit vztahy řady proměnných veličin, které se na sublingválním podání léčiv podílejí, proto bude dále pojednán podrobněji.<sup>16</sup>

### Polykání a pohyb slin

Jedním z faktorů v tomto modelu je neustálá produkce slin bukální tkání a sublingválními žlázami. Rychlost produkce kolísá v rozsahu 0,04 – 0,30 ml/min. U lidí obvykle činí bazální objem slin 0,9 ml. Sliny tvořené bukální sliznicí stékají po tváři, dále po dásních ke spodině úst, kde se smísí se slinami, které vyprodukuje sublingvální žlázy. Na spodině úst se sliny nahromadí nebo proudí k vrcholu jazyka, kdy se spustí polykání. Předpokládá se, že ke spolknutí slin dochází ve chvíli, kdy se zdvojnásobí bazální objem slin (nad 1,8 ml), pokud se nedostaví jiný impuls (např. objekty dostanou instrukci nepolykat). Při polknutí, se sliny pohybují z ústní dutiny do žaludku s odpovídajícím množstvím přítomné léčivé látky (rozpuštěná, nerozpuštěná). Nepředpokládá se, že by se sliny hromadily v bukální oblasti a oblasti dásní, ale model bere v úvahu ředění léčiva v těchto oblastech v důsledku toku slin (sliny produkované bukálními slinnými žlázami), stejně jako ztrátu léčiva spolknutím. Tím se ustaluje okamžitá rovnováha koncentrace léčiva mezi slinami, sublingvální oblastí (spodina ústní dutiny a spodní strana jazyka) a supralingvální oblastí (vrchní strana jazyka a tvrdé patro).<sup>16</sup>

### Absorpce léčiva

Absorpce v ústní dutině je dána nejen propustností sliznice a koncentrací rozpuštěné látky, ale také komplikovaným obousměrným dělením mezi slinami a tkání a také oddělenými kinetickými procesy mezi úbytkem léčiva z ústní dutiny a jeho absorpcí do krve.<sup>16</sup>

V modelu OCCAT je absorpce definována rozdělením léčivé látky mezi sliny a horní vrstvy epitelu. Volná koncentrace léčiva v epiteliální podvrstvě ( $C_{1,u}^{epi}$ ) v daný čas je rovna koncentraci rozpuštěného léčiva ve slinách ( $C^{sal}$ ). Volná frakce léčiva ( $f_{ut}$ )

v epitelu, nebo alternativně, převrácenou hodnotu rozdělovacího koeficientu (P) epitel/sliny, lze vypočítat poměrem celkové koncentrace léčiva v epitelové podvrstvě 1 ( $C_{1,t}^{epi}$ ) v meziprostoru sliny/epitel proti volné koncentraci léčiva v epitelové podvrstvě 1 ( $C_{1,u}^{epi}$ ) nebo  $C^{sal}$ .<sup>16</sup>

$$f_{ut} = C_{1,u}^{epi} / C_{1,t}^{epi} = C^{sal} / C_{1,t}^{epi} = 1/P$$

Rov. 1

Zůstatek léčiva v mezivrstvě epitelu a slin je vyjádřen rovnicí:<sup>16</sup>

$$(V^{sal}/P + V_1^{epi}) \times dC_{1,t}^{epi}/dt = -Diff/h_1^{epi} \times SA \times (C_{1,u}^{epi} - C_{2,u}^{epi})$$

Rov. 2

kde

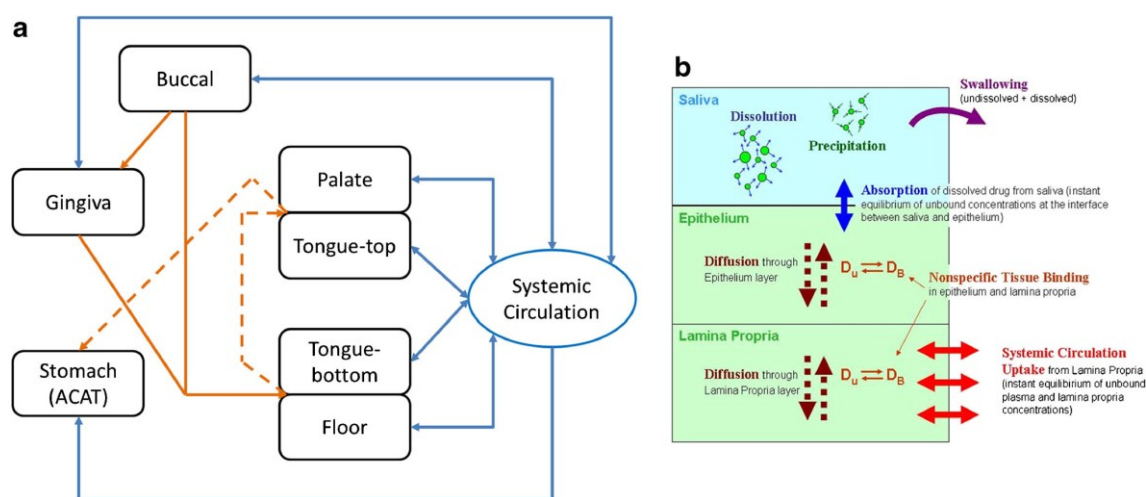
$V^{sal}$  a  $V_1^{epi}$  objemy slin a podpvrchu 1 epitelu v daném kompartmentu

Diff ( $cm^2/s$ ) difuzivita léku přes ústní sliznici

$h_1^{epi}$  tloušťka epitelové podvrstvy 1

SA ( $cm^2$ ) plocha povrchu daného oddělení

Po vstupu léčiva do epitelové podvrstvy 1, léčivo dále difunduje přes zbývající vrstvy tkáňového epitelu do lamina propria. Rychlost difuze je závislá na schopnosti léčiva difundovat přes daný typ epitelu, exponované ploše povrchu dané tkáně ústní dutiny a tloušťce vrstvy epitelu. Musí se brát v úvahu koncentrační gradient kvůli pozvolné difuzi skrz tuto tkáňovou vrstvu, epitel. Epitel se skládá z šesti vrstev. Fyziologicky se tkáň ústní sliznice sice obecně skládá z více buněčných vrstev, ale pro výpočet rychlosti difuze přes epitel a lamina propria předpokládal navržený model šest hypotetických vrstev.<sup>16</sup>



**Obr. 3.2:** Schematický diagram uspořádání modelu ústní dutiny<sup>16</sup>

V levé části tohoto schématu je pod písmenem a) znázorněn fyziologický farmakokinetický model oddílů dutiny ústní: modré čáry znázorňují rozdělení léčiva mezi jednotlivými kompartmenty dutiny ústní a systémovou cirkulací, oranžové čáry znázorňují tok slin v dutině ústní, oranžové přerušované čáry reprezentují směr pohybu spolýkané účinné látky.<sup>16</sup>

V části b) je znázorněn prostup léčiva přes sliznici dutiny ústní (její vrstvy): sliny v dutině ústní léčivo rozpouští, i sráží, díky slinám se část rozpuštěného i nerozpuštěného léčiva spolýká, část se absorbuje do epitelu a z epitelu, dále do vrstvy lamina propria. Mezi jednotlivými kompartmenty se udržuje rovnováha volného a vázaného léčiva. Z lamina propria se léčivo vstřebává do systémové cirkulace (koncentrace léčiva je v rovnováze v plazmě a vrstvě lamina propria).<sup>16</sup>

Kinetický model přenosu léku v modelu OCCAT lze popsat ve třech fázích:

- (1) okamžité rozdělení léku mezi sliny a horní vrstvy epitelu (rozdělovací koeficient),
- (2) difúze léčiv mezi podvrstvy v epitelu ústní dutiny a lamina propria (omezená rychlost difuzivity) a
- (3) příjem léku do systémové cirkulace závisí na okamžitém dělení plazmy/lamina propria a rychlosti průtoku krve lamina propria.

Transmukozální absorpce zolpidemu v ústní dutině se projevuje v rychlejším nástupu účinku ve srovnání s konvenční tabletou pro perorální podání.<sup>16</sup>

Úspěšná podání léčiv přes ústní sliznici představuje neustálou výzvu, stejně jako skvělou příležitost. Lokální aplikace se využívá u léčby onemocnění dásní, bolesti zubů nebo bakteriálních infekcí. Transmukozální aplikace se často využívá u analgetik, antidiabetik, antibiotik a u léčiv používaných při angině pectoris, jak je dále uvedeno několika příklady.<sup>9,23</sup>

Sublingválně podaný glycerol trinitrát je velmi efektivní, silný vasodilatátor při akutních srdečních obtížích.<sup>9</sup> Poskytuje symptomatickou úlevu během jedné až dvou minut.<sup>11</sup> Karvedilol je lék používaný k léčbě srdečního selhání, hypertenze a onemocnění koronárních tepen. Nicméně má nízkou perorální biologickou dostupnost (25 až 35 %) kvůli vysokému metabolismu jaterního průchodu prvním průchodem. Cílem citované studie bylo vyvinout mukoadhezivní nanokapsle s karvedilem jako systémy dodávání sublingválního podávání léčiva. Nanokapsle byly připraveny za použití poly (ε-kaprolaktonu) (CAR-LNC) a Eudragit® RS 100 (CAR-NC) jako součásti polymerní stěny.<sup>24,25</sup>

Existuje několik způsobů léčby nedostatku vitamínu B12: k dispozici jsou intramuskulární (IM), perorální, sublingvální (SL) a intranazální přípravky obsahující vitamín B12. Studie prokázala, že léčba SL přípravky s B12 je dostačující a dokonce lepší než při IM podání. SL překonává také podání IM injekcí a měla by být první volbou pro pacienty s nedostatkem B12.<sup>26</sup>

Sublingvální podávání takrolimu se ukázalo jako dobře proveditelné a poskytuje podobnou expozici léčivem jako při perorálním podání. Při dlouhodobém sledování nebyla sublingvální aplikace spojena s odmítáním jaterních transplantátů.<sup>27</sup>

Hypertenzní poruchy jsou nejčastější komplikací v těhotenství, která může dokonce vést k úmrtnosti matek. Hydralazin hydrochlorid má přímý účinek vazodilatátoru, intravenózně se používá v první linii léčby ke kontrole hypertenze v těhotenství (preeklampsie). Vykazuje špatnou perorální biologickou dostupností (26 % až 50 %) v důsledku metabolického first-pass efektu. Byla potvrzena vhodnost připravených rychle se rozpadajících sublingválních tablet s obsahem tohoto léčiva při rychlé kontrole hypertenzní krize, zejména u těhotných žen, jako vhodné alternativy k parenterálnímu podávání.<sup>28</sup>

Přípravky pro sublingvální podání však nejsou dostupné pouze ve formě rychle rozpustných tablet. Využívá se také tenkých hydrofilních filmů vyráběných z polymerů, sprejů, pastilek, lízátek, žvýkacích gum, past a ústních vod.<sup>6,7</sup>

### 3.5 Nanočástice

S ohledem na zadání části experimentu této práce směrem k sublingválnímu podání prostřednictvím nanočástic budou následující odstavce zaměřeny tímto směrem.

Definice nanočástic není jednotná a tento pojem zahrnuje několik strukturou značně rozdílných typů částic. Z farmakoterapeutického hlediska jsou nanočásticové lékové formy stále vyvíjeny a zaváděny s cílem zmírnění vedlejší nežádoucích účinků léčiv na lokální i systémové úrovni, a tím zvýšení bezpečnosti a účinnosti terapie léčivy.<sup>2</sup>

Nanočástice mohou sloužit jako nosiče pro transport některých obtížně vstřebatelných léčiv (perorálně podaný heparin, inzulin, hormony) do míst pro ně absorpčně přijatelnějších nebo mohou léčivou látku dopravit přímo do cíle jejího terapeutického působení (k postiženým buňkám). Od nanočásticových lékových forem se očekává účinnější a bezpečnější farmakoterapie nádorových onemocnění, měly by snížit vedlejší účinky chemoterapie. Již se podařilo připojit ke speciálním RNA vláknům nanočástice s průměrem kolem 10nm, které jsou naplněny chemoterapeutickou látkou. Tato RNA vlákna jsou přitahována rakovinnými buňkami. Ve chvíli, kdy se nanočástice setká s rakovinnou buňkou, dochází k jejímu přilnutí a uvolnění léku do rakovinné buňky. Při léčbě onkologických pacientů se tak neobjevují škodlivé vedlejší efekty v takové míře, jako je tomu při běžné chemoterapii.<sup>4</sup>

Subcelulární velikost těchto nanočásticových nosičů umožňuje transport léčiv do orgánů, tkání, buněk a nemocných částí těla, které zůstávají jiným lékovým formám nedostupné. Jsou určeny pro cílené uvolňování a působení léčiva při perorálním, parenterálním i lokálním podání, pro aplikaci do oka i nosu. Volbou metody přípravy a aktivizací povrchu částic je možné nasměrovat je na různé cíle.<sup>4</sup>

Nanočástice mohou pronikat do řady orgánů, tkání, ale i buněk, kde mohou působit terapeuticky ale i toxicky a vytvářet tam nežádoucí toxické účinky

jako např. cytotoxicita, genotoxicita, imunotoxicita, nefrotoxicita, hepatotoxicita, karcinogenita a další.<sup>4</sup>

Pro vyjádření dávky nanočástic se dosud nepodařilo definovat parametr popisující aplikovanou dávku tak, aby korelovala s toxicitou. Dávka je chápána jako množství chemické látky, která pronikne do organismu.<sup>4</sup>

### Vlastnosti nanomateriálů

Z hlediska hlavních fyzikálně-chemických odlišností nanomateriálů od konvenčních chemických látek se jedná především o velikost částic ve vztahu k jejich povrchu. S klesající velikostí částic nepřímo úměrně dramaticky roste plocha jejich povrchu. Reaktivita částic je v korelaci s počtem atomů/molekul na jejich povrchu, které jsou tak dostupné pro interakce. S klesající velikostí částic se projevuje výrazně vyšší chemická reaktivita látek. Dalšími významnými vlastnostmi povrchu, které mají vliv na chování částic, je povrchový náboj, chemické složení povrchu, tvar povrchu, defekty na povrchu, porozita apod. Nanočástice také mohou obsahovat zbytky reziduí z chemických procesů syntézy, z použitých stabilizátorů, disperzních činidel, enkapsulovaného materiálu a různých úprav povrchu. Důležitou vlastností částic a nanomateriálů je jejich morfologie a fyzikální forma (amorfní či krystalické), popř. zda tvoří agregáty nebo aglomeráty a jaký mají tvar (částice, trubice apod.).<sup>4</sup>

Při všech pozitivně využitelných vlastnostech nanočástic je nutné mít na zřeteli i různá rizika. Jeden z mnoha příkladů širokého používání nanomateriálů představuje využití oxidů titaničitého a zinečnatého v opalovacích krémech jako ochranné látky proti UV záření. Po aplikaci krému vytvoří na pokožce tenkou vrstvu a po kontaktu s vodou mohou být smývány do vodního prostředí. Tím se znečišťuje životní prostředí s dosud neprobádanými a neznámými dopady.<sup>4</sup>

### Přechod bariér:

Epitely tvoří materiálovou bariéru proti penetraci cizích substancí do krevní a lymfatické cirkulace. Existuje účinné a relativně nepropustné spojení mezi buňkami. Předpokládá se, že paracelulární transport, tedy transport v prostředí mezi buňkami, je pro nanočástice v zásadě málo pravděpodobný, kromě situací patologických

nebo při expozici toxickými látkami, které ovlivňují permeabilitu epitelu. Průnik nanočástic skrz epitel teoreticky zahrnuje i transcelulární transport (tj. přes buňku).<sup>4</sup>

#### Průnik nanočástic do buňky:

Při pronikání nanočástic do buněk hraje klíčovou roli cytoplazmatická membrána buňky a transport částic skrz ni. Rozhoduje, která látka a v jakém množství bude přijata nebo vyloučena z buňky. Udržuje vnitřní prostředí buňky, jež je odlišné od prostředí mimo buňku. Makromolekuly a nanočástice mohou být nakoncentrovány pouze zachycením ve vnějším prostředí buňky pomocí endocytózy, kdy je daná látka nebo nanočástice obalena a začleněna do váčku (vezikulu) z cytoplazmatické membrány.<sup>4</sup>

Endocytóza zahrnuje dva mechanismy: pinocytózu a fagocytózu. Zjednodušeně, fagocytóza znamená pohlcování pevných částic z okolního prostředí. U pinocytózy se jedná o příjem tekutin a roztoků, někdy jsou i touto cestou přepravovány i plyny. Pinocytóza není zaměřena na přepravu specifických látek, ale přijímá tekutinu včetně látek v ní rozpuštěných.<sup>4</sup>

Některé studie ukazují, že díky adhezivní interakci mohou nanočástice pasivně difundovat přes plazmatickou membránu tím, že v ní vytvoří dočasně póry. Tento způsob přenosu nanočástic do buňky byl pozorován u neutrálních a nabitých fluorescenčních polystyrénových nanočástic, nanočástic zlata a oxidu titaničitého a u nanočástic nalezených v červených krvinkách, u kterých neprobíhá standardní endocytický proces.<sup>4</sup>

Pokud nanočástice vstoupí do buňky difúzním mechanismem, mohou jej v jiném preferenčním místě cytoplazmatické membrány buňky stejným mechanismem také opustit a dosáhnout tak transcytózy. Tímto termínem označujeme přenos látky přes buňku, kdy látka vstupuje do buňky a vystupuje z ní ve stejné podobě v jiném místě epiteliální bariéry.<sup>4</sup>

Některé nanočástice mohou po inhalaci přecházet z plic do krve nebo být transportovány po axonech nervových buněk do centrální nervové soustavy, popř. přecházet přes buňky epitelu a sliznici gastrointestinálního traktu, další sliznice

(nosní, vaginální, v dutině ústní). Z krevního oběhu mohou být dále distribuovány dál po těle k cílovým orgánům (játra, ledviny, slezina, lymfatické uzliny a mozek).<sup>4</sup>

V posledních letech studie uvádějí nanočástice jako slibnou alternativu k antibakteriálním činidlům z důvodu jejich prokázané antibakteriální aktivity v několika biomedicínských aplikacích, včetně dodávky léků a genů, tkáňového inženýrství a zobrazování.<sup>29</sup>

Další studie úspěšně vyvinuly výhodný doxorubicin (Dox) zavedený systém podávání léků na bázi cetuximabu (Cet) a nanočástic oxidu křemičitého (Cet-SLN/Dox). Tímto se dosáhlo souběžného podání dvou léčivých látek (Dox a Cet). Dále se prokázalo, že kombinace Cet-SLN/Dox má lepší účinnost u nádorů a u protinádorové léčby než Cetuximab bez SLN/Dox a volný Dox, pravděpodobně kvůli endocytóze zprostředkované EGFR a kombinovaným protinádorovým účinkům Cet a Dox (v Cet – SLN / Dox).<sup>30</sup>

### 3.6 Základní pojmy bioimpedance<sup>31</sup>

Bioimpedance, tkáňový elektrický odpor, je pojem zahrnující pasivní schopnost tkáně bránit průchodu (toku) elektrického proudu. U elektrických vlastností tkání existuje dualita. Tkáň může být považována za řídicího činitele, nebo za pasivní dielektrikum. V kmitočtech 100 kHz nebo méně jsou tkáně převážně elektrolytickými vodiči.

**Impedance** (Imp,  $Z$ ) je poměrem mezi napětím a proudem. Vztahuje se na stejnosměrný proud (DC) a střídavý proud (AC), avšak v zásadě je bioimpedance parametrem AC. Je-li střídavá frekvence v blízkosti 0 Hz, je logické, že se hodnoty impedance střídavého proudu AC přibližují k hodnotám DC. Nemusí to však platit vzhledem k elektrolýze. Při dostatečně nízkých frekvencích trvání jedné polarity může být její doba dostatečná pro nevratné vytvoření produktů, které trvale mění chemické prostředí.

Bioelektrické experimenty se provádějí *in vivo* nebo *ex vivo* se snímacími elektrodami a stimulačními elektrodami. Elektroterapeutické metody využívají řízené elektrické toky s regulací proudu nebo napětí, náboje, energie, a časového průběhu. Impedanci lze vypočítat, pokud se hodnoty měřeného napětí vydělí přiváděným



proudem. Pokud není naměřen žádný proud, přenosová impedance je nulová. Biologická tkáň je velmi heterogenní materiál, její mezifázové procesy jsou velmi důležité.

Buňky mají nerovnoměrnou velikost a mají velmi odlišné funkce, buněčné membrány jsou považovány za vysoce kapacitní s nízkou, ale komplikovanou strukturou vodivosti.

Při stejnosměrném a nízkém kmitočtu prochází proud kolem buněk. Existuje paralelní boční vodivost ve dvou vrstvách. Do jisté míry k průchodu elektrického proudu může přispívat i vnitřek buňky.

Při vyšších frekvencích membrána propouští střídavý proud. Membránový brzdící efekt zmizí a proud teče všude podle místní iontové vodivosti.

Obecně je tkáň anizotropním prostředím kvůli orientaci buněk, makromembrány a orgány mají anizotropii nízkofrekvenční.

Stanovení vodivosti tkáně, zejména živé tkáně, je velmi obtížné. Tkáň je v biologii tradičně klasifikována do čtyř skupin: epitel, svaly, pojivo a nervová tkáň (učebnice v histologie popisují přibližně 35 typů), podle elektrických vlastností bylo identifikováno více než 30 typů tkání.

V epitelech jsou buňky uspořádány ve vrstvách. Mezi buňkami v epiteliální tkáni jsou vytvořeny mezery. Ve zvláště těsných membránách jsou tyto spojeny speciálními těsnými spoji. Transmembránová impedance závisí na typu buněčných spojení a na tom, do jaké míry je epitel protkán kanály nebo specializovanými orgány (např. potními kanály v kůži).

V kůži má dominantní roli při impedanci rohová vrstva (SC), zejména při nízkých frekvencích. Bylo uvedeno, že impedance kůže je určena hlavně SC při frekvencích pod 10 kHz. Závisí na faktorech, jako je hydratace kůže, velikost elektrody a geometrie atd., nicméně může sloužit jako hrubé vodítko. SC představuje přibližně 50% měřené impedance kůže při 10 kHz, ale pouze přibližně 10% při 100 kHz. Proto je důležitá volba kmitočtů.

V předkládané práci byla při měření impedance sublingválních membrán použita frekvence 120 Hz, o které bylo pozitivně referováno v souvislosti se studiem transdermální bariéry.<sup>32,33,34</sup>

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité látky

Název suroviny	Výrobce (dodavatel)
Prasečí jazyk	Skaličan a.s., Česká Skalice, ČR
Aqua pro iniectione	Ardeapharma a.s., Ševětín, ČR
Aqua purificata	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Dinatrii phosphas dodecahydricus	Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové, ČR
Natrii chloridum	Penta. Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470-marked (Lot no.BCBC1020V)	Sigma-Aldrich, a.s. (Merck) Praha, ČR

Uvedené komerčně dostupné suroviny odpovídaly deklarácím výrobců, resp. dodavatelů a byly použity tak, jak byly dodány.

### 4.2 Přístroje

Typ přístroje	Výrobce
Předvážky Kern 440-45N	Kern ande Sohn GmbH, Balingen, Německo
Zetasizer – Nano – ZS	Malvern instruments, Worcestershire, Velká Británie
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Magnetická míchačka, Fisher Scientific 408 N	Fisher Scientific, Pardubice, ČR

Minitřepačka/ vortexová míchačka, MS 3 digital	IKA, Wilmington, USA, NC 28405
Fluorescenční mikroskop, OLYMPUS BX 51	Olympus, Tokyo, Japonsko
Lednička s mrazničkou	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Ohmmetr 41R	CHY, Taiwan
Termostatovaná vodní lázeň Grant JB 5 series	Grant, Anglie
Vícemístné ponorné míchadlo	Variomag Tele system, Německo
AMINCO BOWMAN Series 2, Luminiscence spectrometer	Thermo Spectronic, Madison, USA
Analytické váhy PIONEER TM, PA 430	Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA

Zetasizer: jednorázová polystyrenová kyveta, teplota měření 25 °C, další parametry jsou vyznačeny na záznamech DLS měření ve výsledkové části práce (**Obr. 5.1, Obr. 5.2**).

<b>POMŮCKY</b>	<b>VÝROBCE (dodavatel)</b>
Parafilm „M“	Brand, Německo
DLS plastové kyvety 12,5x12,5x45mm	Brand, Německo
Plastová stříkačka 5ml	Chirana Group a.s., Praha, ČR
Bakteriální filtr Millex® GP (Milli pore Express® PES membráně)	Millipore, Carringtonwohill, Ireland
Kyvety (luminiscenční spektrometr) 10mm	Starna scientific Ltd, UK (Chromspec s.r.o, Mníšek, ČR)
Vialky šroubovací ND13 4ml	Fisher Scientific, Pardubice, ČR
Pipety Transferpette® S (2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Brand, Německo
Laboratorní sklo	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Skleněné Franzovy cely	FaF UK, Hradec Králové, ČR

## 4.3 Biologický materiál

Při permeačních pokusech se pracovalo s jazyky získanými z prasete domácího (*Sus scrofa*, v. *domestica*), dodanými z regionálních jatek. Sublingvální membránu poskytla spodní část jazyka po odstranění svalové hmoty s velkou opatrností za pomoci skalpelu. Vypreparovaný vzorek membrány byl vizuálně kontrolován proti světlému pozadí. Pokud došlo k mechanickému poškození membrány při preparaci, byla z permeačních pokusů vyřazena.

Vypreparované sublingvální membrány byly následně **zpracovány různými způsoby**:

1. Při prvním permeačním pokusu (**P1**) po konzervaci ponořením do fyziologického roztoku s **azidem sodným** (0,01 %) na 10 minut byly osušeny, vloženy do sáčku z polyethylenové folie, po odvzdušnění zataveny a zmrazeny při -18°C (membrány z 22. 3. 2011 a membrány z 15. 9. 2011). Uchovávány byly dlouhodobě v mrazničce. Opatrně rozmrazeny byly v den potřeby opatrným ohřátím v dlani (30. 5. 2012).
2. Při druhém permeačním pokusu, **P2** (6. 6. 2012), byly využity jednak **čerstvé** membrány a také **čerstvé membrány zmrazené ad hoc v kapalném dusíku po dobu cca 10 vteřin**.
3. Třetí permeační pokus **P3** byl proveden (13. 6. 2012) se sublingválními membránami (**bez azidu sodného**), které byly po vypreparování uloženy na **týden do mrazničky** (-18°C). Po týdnu byla část z nich těsně před permeačním pokusem šetrně rozmrazena v dlani a
4. Další část byla ještě **dodatečně zmrazena** v kapalném **dusíku** a až poté použita pro permeační pokus.

### 4.3.1 Složení a příprava pufrů

Pro permeační pokusy byly vybrány Sørensen pufrы o pH 7,4 a pH 6,6. Před přípravou těchto pufrů byla provedena kalibrace pH – metru Gryf 209 L s THETA ´90 elektrodou, typ HC 113.

Při kalibraci pH – metru byl použit pufr s pH 7,0 (Orion application Solution, Orion 910107) od firmy Thermo Electron Corporation a druhý pufr s pH 10,01 (Orion application Solution, Orion 910110).

## Příprava fosfátových pufrů

### **A/ Fosfátový pufr dle Sörensena pH 6,6 (500 ml)**

Složení:

Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	6,2 g
Dinatrii phosphas dodecahydricus	9,5 g
Natrium chloratum	4,9 g
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

Přepočet na 500ml:

Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	3,1 g
Dinatrii phosphas dodecahydricus	4,75 g
Natrium chloratum	2,45 g
Aqua purificata	ad 500,0 ml

### Postup

- 1) Příslušná množství dihydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného byla rozpuštěna v kádince s přibližně 250 ml čišťené vody za použití míchačky.
- 2) Hydrogenfosforečnan sodný byl rozpuštěn v přibližně 200 ml vody.
- 3) Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného byl za stálého míchání a pH metrické kontroly postupně doléván roztok hydrogenfosforečnanu dokud nebylo dosaženo požadovaného pH.
- 4) Po dosažení dané hodnoty pH byl vzniklý roztok přelit do odměrné baňky a doplněn vodou na 500 ml. Odměrná baňka s roztokem byla uzavřena parafilmem, aby se předešlo vniknutí nečistot.
- 5) Po promíchání byl výsledný roztok uchováván v lednici při 2-6°C bez přístupu světla.

### **B/ Fosfátový pufr dle Sörensena pH 7,4 (2000ml)**

Složení:

Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	2,1 g
Dinatrii phosphas dodecahydricus	19,1 g
Natrium chloratum	4,4 g
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

Přepočet na 2000ml:

Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	4,2
Dinatrii phosphas dodecahydricus	38,2
Natrium chloratum	8,8
Aqua purificata	ad 2000,0 ml

Postup:

Fosfátový pufr dle Sørensenova o pH 7,4 byl připraven analogickým způsobem, jako předchozí fosfátový pufr jen s tím rozdílem, že ho bylo připraveno větší množství (sloužil jako akceptorová fáze).

#### 4.3.2 Příprava kalibračních vzorků s Chromeonem 470

Vzorky disperzí nanočástic Chromeon 470 byly pro kalibraci připraveny a proměřeny třikrát.

Příprava:

Základní disperze byla připravena smícháním 10 $\mu$ l disperze nanočástic (Nano beads based on PD, Chromeon 470 - marked, Sigma Aldrich, 0,5%) s fosfátovým pufrem dle Sørensenova o pH 7,4 (akceptorová fáze) ve 100ml odměrné baňce. Následným ředěním základní disperze akceptorovou fází (Sørensen pufr o pH 7,4) byly připraveny kalibrační vzorky o různých koncentracích.

Standard (podíl zákl. disperze)	Základní disperze (ml)	Pufr o pH 7,4 (ml)	Koncentrace ( $\mu$ g/100ml)
0 čistý pufr	0	4,0	0
10	0,4	3,6	5
20	0,8	3,2	10
30	1,2	2,8	15
40	1,6	2,4	20
50	2,0	2,0	25
60	2,4	1,6	30
70	2,8	1,2	35
80	3,2	0,8	40
90	3,6	0,4	45
100 suspenze NČ	4,0	0	50

### 4.3.3 Příprava donorových vzorků pro permeaci

#### Neředěné a ředěné vzorky Chromeonu 470 pro permeační pokusy

Donor byl na apikální stranu sublingvální membrány nanášen v množství 100 $\mu$ l.

Neředěný vzorek	100 $\mu$ l nanočástic (Nano beads based on PD, Chromeon 470 – marked)
Ředěný vzorek 1:4	disperze: 200 $\mu$ l nanočástic + 800 $\mu$ l roztoku kofeinu s pufrům o pH 6,6
Roztoku kofeinu	100 $\mu$ l roztoku kofeinu (bez nanočástic): ve 100ml odměrné baňce s fosfátovým pufrům dle Sørensenů o pH 6,6 (donorová fáze) bylo rozpuštěno 0,5g kofeinu

Při měření impedancí (při 120 Hz) bylo nanášeno na sublingvální membránu u **P1** (15 cel) **400 $\mu$ l** fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 6,6, u **P2** (25 cel) a **P3** (24 cel) **600 $\mu$ l** fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 6,6.

### 4.4 Provedení permeace

Pro permeační pokusy byly použity modifikované Franzovy cely, které obsahovaly část donorovou, akceptorovou o objemu cca 17 ml a plexisklový meziblok pro umístění permeační membrány.

Nejdříve byly cely sestaveny mezibloky s horizontálně umístěnou sublingvální membránou, spodní část byla bočním raménkem naplněna akceptorovou fází (pufr o pH 7,4 dle Sørensenů) za pomoci injekční stříkačky. Postupovalo se opatrně, aby do akceptorové fáze nevnikl vzduch a nevytvořil bubliny, které by musely být odstraňovány, což by mohlo negativně ovlivnit integritu sublingvální membrány a tím i výsledky permeace nanočástic. Do akceptorové fáze bylo vždy umístěno malé tyčinkové míchadlo (cca 1 cm), které poté neustále promíchávalo akceptorové médium. Mezi dvě plexisklíčka byla vložena sublingvální membrána o vhodné velikosti (cca 2 x 2 cm), která byla po bocích utěsněna silikovým tukem. Bylo za potřeby opatrnosti, aby se membrána neprotrhla a přitom byla napnutá.

Do donorové části byl nanášen vzorek nanočástic Chromeon 470 ve výše zmíněných úpravách (ředěný, koncentrovaný).

Modifikované Franzovy cely měly každá poněkud odlišný objem akceptorové fáze, což je způsobeno mírně rozdílným objemem skleněné nádoby, ale částečně i prohnutím sublingvální membrány po naplnění cely oběma fázemi. Tento fakt byl při dalších výpočtech zohledněn. Akceptorová část umožňuje průběžné odebrání vzorků a zpětné doplňování pufru. Každá permeační cela je umístěna do vodní lázně o teplotě asi 37°C na vícemístnou magnetickou desku, která zajišťuje neustálé promíchávání akceptorové fáze pomocí tyčinkového míchadla v akceptorové části komůrek. Teplota ve vodní lázni byla udržována termostatem na 37 °C a sledována teploměrem.

#### **4.4.1 Měření transmembránových impedancí (Z) sublingválních membrán**

Po sestavení byly všechny cely vloženy do termostatované lázně a ponechány asi 60 minut temperovat. Poté byly u všech sestavených cel změřeny impedance jednotlivých sublingválních membrán za pomoci ohmmetru, na který byly připojeny snímací kovové elektrody. Hodnoty impedance byly odečítány před zahájením permeace a po 24hodinách permeace (u **P1**, **P2** třikrát po sobě v 5 vteřinových intervalech a u **P3** pětkrát v 5 vteřinových intervalech).

Odpory byly měřeny i po záměrném proděravění vybraných sublingválních membrán jedním až pěti vpichy injekční jehlou o průměru 0,9 mm. Byla sledována změna naměřených hodnot elektrických odporů.

#### **Postup měření s donorovými vzorky nanočástic:**

Po vytemperování cel byla na sublingvální membrány nanášena donorová fáze (pufr o pH 6,6 dle Söerensena) v množství 400 µl (**P1**) a 600 µl (**P2**, **P3**) do otvoru o ploše 1 cm<sup>2</sup> v mezibloku z plexiskla. Poté byla změřena impedance membrán při 120Hz. Impedance každé membrány byla změřena v pětivteřinových intervalech třikrát či pětkrát (**P3**). Z naměřených hodnot byla vyjádřena průměrná impedance.

Po skončení měření byla donorová fáze odsáta mikropipetou a dosušena buničitou vatou.



Po změřeni impedance byly do permeačních komůrek nanášeny donorové vzorky v množství 100 µl na vnější povrch (plochu asi 1cm<sup>2</sup>) fixované sublingvální membrány pomocí mikropipety.

Po nanesení disperze nanočástic byly komůrky opatrně zakryty krycím sklíčkem a kompletně sestaveny. Dále se zkontrolovala akceptorová fáze, zda v ní není přítomnost bublin.

Při **prvním permeačním pokusu (P1** - zahájena 29. 5. 2012) bylo sestaveno 15 cel. Byly použity dlouhodobě zmrazené sublingvální membrány předem konzervované 0,01% roztoku v azidu sodného ve fyziologickém roztoku chloridu sodného (1. až 13. buňka pocházela z membrán zmrazených 15. 9. 2011, 14. a 15. buňka zmrazeny 22. 3. 2011):

Číslo buňky P1	Vzorek	Sublingvální membrána
1. - 6.	100µl nanočástic (koncentrovaný)	dlouhodobě zmrazená, NaN <sub>3</sub>
7. – 12.	100µl disperze (ředěný)	dlouhodobě zmrazená, NaN <sub>3</sub>
13. – 15.	100µl roztoku kofeinu	dlouhodobě zmrazená v NaN <sub>3</sub>

U vzorku č. 6 (neředěný) se nacházela na sublingvální membráně dvě tenčí místa.

Při **druhém permečním pokusu (P2** – zahájena 6. 6. 2012) bylo 25 buněk:

Číslo buňky P2	Vzorek	Sublingvální membrána
16. – 21.	100µl nanočástic (koncentrovaný)	čerstvá
22. – 27.	100µl disperze (ředěný)	čerstvá
28. – 33.	100µl nanočástic (koncentrovaný)	zmrazená v kapalném dusíku
34. – 39.	100µl disperze (ředěný)	zmrazená v kapalném dusíku
40.	-----	čerstvá

**Vzorek č. 40** byl sestaven jen pro zkoušku změny impedance po záměrném proděravění sublingvální membrány a také bez přítomnosti membrány.

Při **třetím permeačním pokusu (P3)** – zahájena 13. 6. 2012) bylo sestaveno 24 cel:

Číslo buňky P3	Vzorek	Sublingvální membrána
41. – 46.	100μl nanočástic (koncentrovaný)	zmrazené týden + tekutý N <sub>2</sub>
47. – 52.	100μl disperze (ředěný)	zmrazené týden + tekutý N <sub>2</sub>
53. – 58.	100μl nanočástic (koncentrovaný)	zmrazené týden
59. – 64.	100μl disperze (ředěný)	zmrazené týden

Časy odběrů akceptorových fází:

Permeační pokus	Odebrané množství	Intervaly odběrů
P1	0,7ml	po 1, 4, 7, 18, 24 hod
P2	0,7ml	po 1, 4, 7, 18, 24 hod
P3	0,7ml	po 1, 4, 7, 18, 24 a 43 hod

Odebrané množství akceptorové fáze bylo následně doplněno předem vytemperovanou akceptorovou fází na 37°C. Odebrané vzorky byly ve vialkách uloženy v chladu v lednici při 2 až 6°C. Akceptorová fáze byla doplněna i po uplynutí 24hodin permeace (**P1**, **P2**, **P3**), aby mohly být znovu změřeny impedance sublingválních membrán.

Po 24 hodinách byly u vzorků č. 1, 2, 4, 8, 9, 11 (**P1**) změřeny impedance po proděravění a doplnění pufru 6,6 do donoru.

U permeace **P3** byl navíc proveden odběr akceptorové fáze po 43hodinách, ale nebylo již přítomno krycí sklíčko nad donorovou fází. Sklíčko bylo odstraněno po uplynutí 24hodin.

Po ukončení pokusů byly cely rozebrány a následně byly vybrané vzorky sublingválních membrán prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem. Akceptorová fáze a oplachy donorových povrchů prasečích sublingválních membrán byly proměřeny spektrofluorimetrem a na velikost částic metodou DLS Zetasizerem.

## 4.5 Spektrofluorimetrie

Pomocí spektrofluorimetru AMINCO BOWMAN Series 2 byly změřeny kalibrační vzorky a také vzorky odebraných akceptorových fází z permeačních pokusů (**P1**, **P2** a **P3**). Koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků byla stanovena ze dvou po sobě jdoucích měření. Byly proměřeny vždy 2 vzorky (dvakrát) a pak následovalo proměření slepého vzorku (destilovaná voda, také dvakrát). Získané hodnoty z obou jednotlivých měření byly zprůměrovány. Z takto získaných dat byla v aplikaci Microsoft Excel pomocí lineární regrese sestavena kalibrační přímka. Tyto výsledky zpracovával a poskytl k dalšímu využití PharmDr. Pavel Berka, Ph.D.

Stejným způsobem byly proměřeny odebrané vzorky akceptorové fáze (400 $\mu$ l). Jen slepý vzorek (destilovaná voda) byl proměřen po stanovení tří vzorků akceptorové fáze. Ze dvou měření byla vypočtena průměrná koncentrace nanočástic ve vzorku. Měření probíhalo v semimikro-kyvetě z křemenného skla. Před každým měřením byla kyveta propláchnuta lihem a destilovanou vodou, aby se odstranily veškeré nečistoty.

Parametry nastavení spektrofluorimetru, jež jsou uvedeny níže, byly se souhlasem Mgr. Josefa Janečky převzaty z jeho diplomové práce.<sup>35</sup>

### Parametry:

1. Excitační vlnová délka: 470nm +-5nm
2. Emisní vlnová délka: 600 nm
3. Rychlost měření: 5nm/s
4. Citlivost měření: 1275
5. Počet cyklů: 25

## 4.6 Zpracování výsledků permeací

Výsledky byly vyhodnoceny na základě údajů  $Q_{t(\text{exp})}$  získaných spektrofluorimetricky, kde  $Q_{t(\text{exp})}$  představuje množství permeantu prošlého v daném čase **přes 1cm<sup>2</sup>** sublingvální membrány do akceptorové fáze.

Množství nanočástic  $Q_t$  prošlých do akceptorové fáze za **24hodin** v průběhu permeace **P1**, **P2** a **P3** bylo vyjádřeno procentuálně dle následujícího vzorce:

$$R = Q_t (\text{exp}) / Q_d * 100.$$

$Q_d$  ( $\mu\text{g}$ ) – představuje množství nanočástic v donoru v sériích měření P1, P2 a P3. Množství nanočástic v donoru činilo **500  $\mu\text{g}$**  v neředěných vzorcích a **100  $\mu\text{g}$**  v ředěných vzorcích.

**R (%)** – procentuální vyjádření nanočástic prošlých do akceptorové fáze.

#### 4.7 Fluorescenční mikroskopie

Pod fluorescenčním mikroskopem byly pozorovány vybrané vzorky sublingvální membrány, které byly předtím použity v permeačních pokusech a vzorky odebrané akceptorové fáze. Po jejich skončení byly vybrané vzorky membrán (jen jejich část, která byla vymezena pro permeaci nanočástic) umístěny na podložní sklíčko.

Sestava fluorescenčního mikroskopu typu OLYMPUS BX 51:

- světelný zdroj OLYMPUS U – RFL – T
- WIB filtr U – MWIB 3
- digitální kamera OLYMPUS DP 72
- rtuťová lampa model U – LH 100 H GAPO
- excitace při vlnové délce 460 – 495 nm

Pozorovány byly jak neomyté membrány (jejich část), tak po omytí destilovanou vodou.

Preparáty s membránami byly pozorovány pod mikroskopem bez krycího sklíčka.

Nastavení fluorescenčního mikroskopu	
WIB filtr	U-MWIB 3
Citlivost	ISO 200, 400, 800, 1600
Objektiv	10x, 20x, 100x
Okulár	10x
Expozice	7ms, 50ms, 100ms
Excitace	460 – 495nm

U akceptorové fáze byla kapka vzorku překryta krycím sklíčkem, přebytečná tekutina byla odstraněna pomocí buničiny, po okrajích krycího sklíčka zafixována lakem na nehty.

Zkoumané nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeonem 470 lze sledovat za pomoci fluorescenčního mikroskopu, jelikož fluoreskují po excitaci zářením o vlnové délce 470nm.

Vybrané vzorky sublingválních membrán a odebraných akceptorových fází:

**P1** – vzorek 3, 5, 7, 10

**P2** – vzorek 21, 27, 33, 39

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

V předcházejících diplomových pracích<sup>36,37</sup> bylo zjištěno, že pH vodné disperze vzorku nanočástic PD-Chromeon 470 má hodnotu 6,65. Donorovým médiem pro navazující *in vitro* permeační pokusy ve zmíněných pracích byl Sörensenův pufr o pH 6,6, akceptorovou fází byl pufr o pH 7,4 (Sörensen). Pokud šlo o pH, odpovídala pH donorové fáze běžnému pH aciditě dutiny ústní člověka, akceptorové médium svým pH odpovídalo prostředí systémového krevního oběhu lidského těla (lidská krev pH 7,36 až 7,44), do něhož by permeovaná částice hypoteticky mohla dospět.

### 5.1 Hydrodynamické průměry nanočástic

Vzhledem k tomu, že pro permeační *in vitro* pokusy se sublingvální membránou byly jako permeant použity nanočástice PD-Chromeon 470, bylo prvním úkolem ověřit jejich hydrodynamickou velikost (průměr). Záměrem bylo zjistit, jestli experimentálně nalezenou hodnotu velikosti nanočástic ovlivňují obě uvažovaná disperzní prostředí zamýšlená pro permeační pokusy (tedy výše zmíněné donorové a akceptorové pufrы). Relativně malé změny rozměrů nanočástic, kromě dalších parametrů, mohou mít na výsledky permeací zásadní vliv.

Je důležité dodat, že PD je polymer nanočástic Chromeon 470, který má ve srovnání s latexovými polystyrenovými částicemi mnohem nižší propustnost pro kyslík a vykazují tudíž větší odolnost vůči kyslíku a oxidačním změnám celkově. Fluorescenční částice PD jsou proto jako stabilní částice vhodné i pro označování proteinů a k detekci reakcí antigen-protilátka.

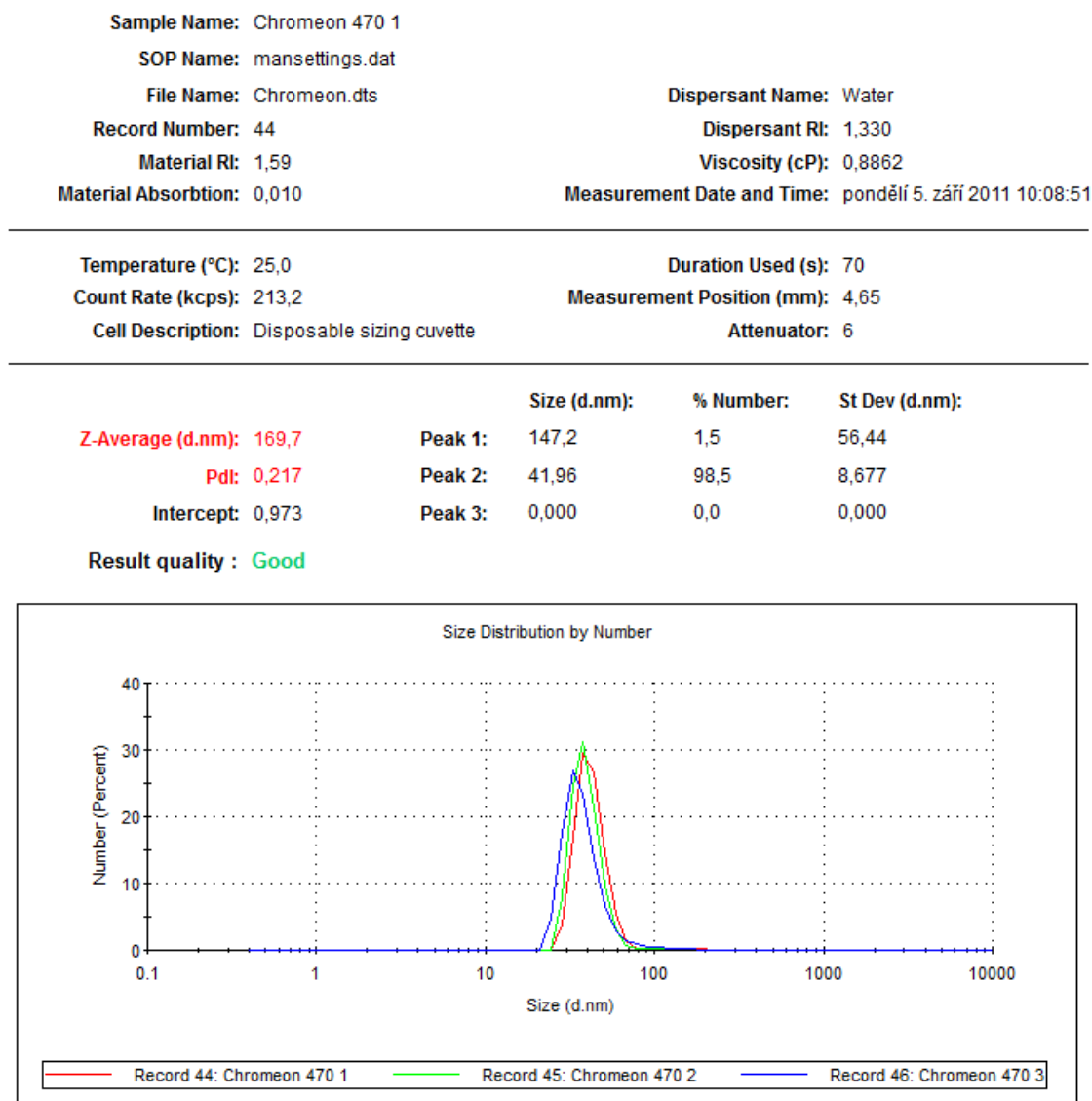
Výrobce charakterizuje PD polymer jako materiál nabízející vlastnosti podobné polystyrenu, povrch částic PD lze karboxylovat nebo jinak modifikovat. Všechny částice jsou dodávány v 0,5 % (hm./hm.) mírně pufrované vodné suspenzi (10 mM MES, pH 7).<sup>38</sup>

V první fázi experimentů této práce bylo metodou **DLS** zjišťováno zastoupení nanočástic přítomných v komerčně dodané disperzi nanočástic PD-Chromeon 470 dle objemu a podle počtu.

Hodnotové a grafické výstupy poskytované zařízením Zetasizer Nanosizer jsou prezentovány na **Obr. 5.1** a **Obr. 5.2**. Křivka pro prostředí Sörensenova pufru

o pH 6,6 je znázorněna červeně (Record 44), pro Sørensenův pufr o pH 7,4 zeleně (Record 45) a pro vodu (Aqua pro injectione) modře (Record 46).

**Obr. 5.1:** Zastoupení nanočástic ve vzorku disperze nanočástic ve vodě Chromeon 470 z hlediska počtu.

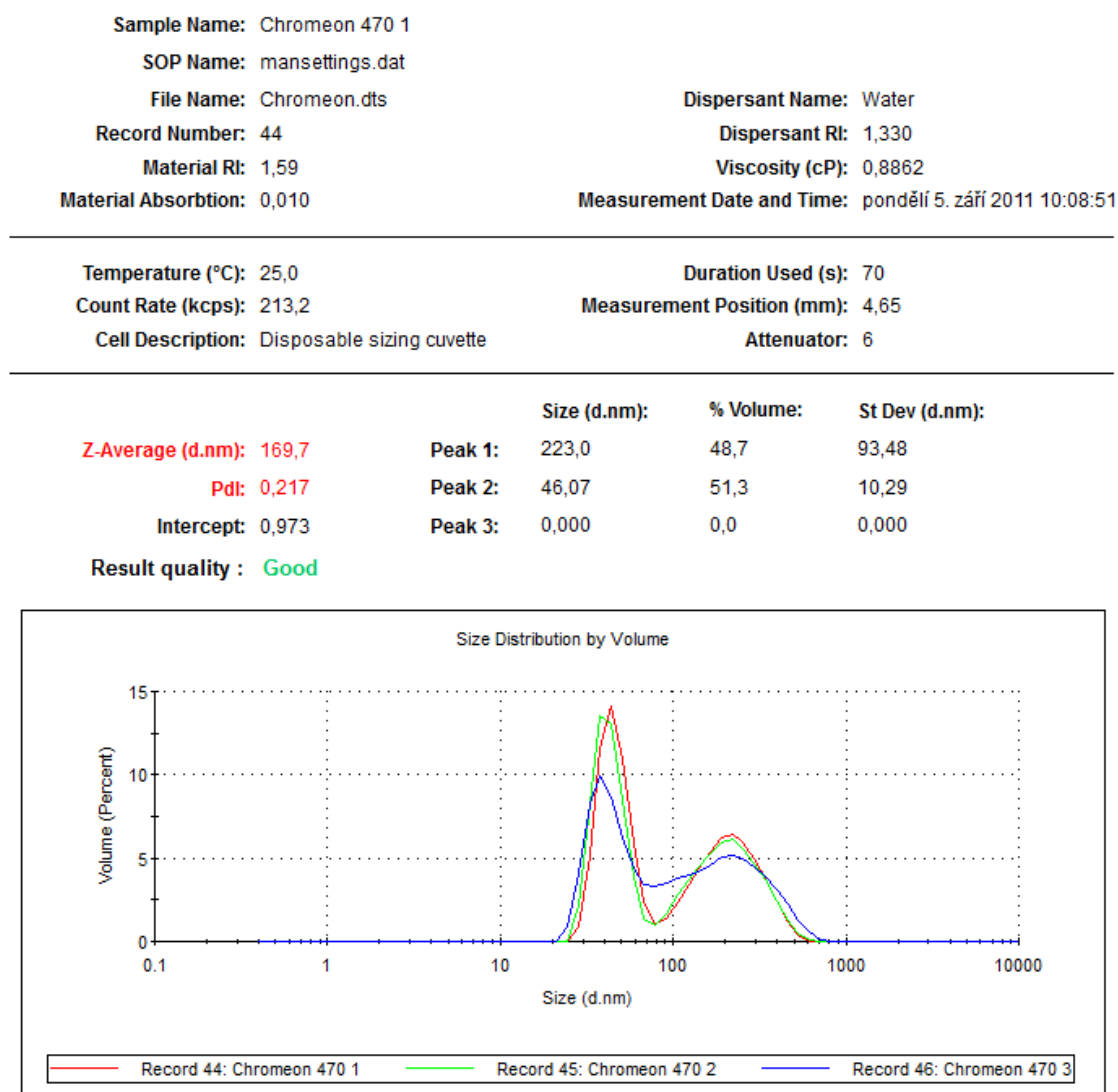


**Legenda:** červeně (Record 44) je křivka pro částice v pufru pH 6,6, zeleně (Record 45) pro pufr pH 7,4, a modře (Record 46) pro částice ve vodě (Aqua pro injectione).

Jak je z **Obr. 5.1** zřejmé, výsledky ukázaly, že jednoznačně největší počet částic (98,5 %) má hydrodynamický průměr v oblasti 40 nm, konkrétněji  $42,0 \pm 8,7$  nm.

Nejpočetněji zastoupené částice přitom představují asi 50 % objemu všech nanočástic ve vzorku, jak dokresluje **Obr. 5. 2**.

**Obr. 5.2:** Záznam DLS spektra



**Legenda:** červená křivka (Record 44) je částice v pufru pH 6,6, zelená (Record 45) je pro pufr pH 7,4, a modrá křivka (Record 46) je částice ve vodu (Aqua pro injectione).

**Prvním závěrem** je tedy potvrzení skutečnosti, že naměřený údaj o hydrodynamickém průměru nanočástic PD-Chromeon 470 je v zásadě v souladu s údajem distributora (Sigma-Aldrich), který udává velikost příslušných nanočástic v suchém stavu 40nm.<sup>38</sup>

**Druhým závěrem** důležitým pro permeační měření je tedy konstatování, jak ukazují výsledky z DLS, že oba navržené Sørensenovy pufrы pro využití v donorové, resp. akceptorové fázi permeačních pokusů, při 6,8 a pH 7,4 **nemají prokazatelný vliv**



na hydrodynamickou velikost ani distribuční charakter velikosti nanočástic PD-Chromeon 470.

Tyto experimentálně zjištěné a potvrzené údaje mají pro interpretaci výsledků popisovaných v dalších odstavcích zásadní význam v tom smyslu, že bude-li věrohodně naměřena fluorescence v donorovém kompartmentu permeačních buněk, bude možné, pokládat průnik částic uvedeného rozměru 40nm přes sublingvální membránu za prokázaný (za předpokladu chemické stability vazby fluoroforu na nanočástice).

Poněkud menší částice o rozměrech těsně nad úrovní 10nm, které se v disperzi nalézají také, mohou zřejmě permeovat rovněž, pokud se neshlukují do větších aglomerátů. Jejich zastoupení v donorových vzorcích je pravděpodobně příliš malé na to, aby mohly významněji ovlivňovat (zkreslovat) fluorescenční kvanta naměřená v akceptorové fázi z *in vitro* pokusů.

Je také potřebné doplnit, že laterální průnik nanočástic v permeacích po okrajích sublingvální membrány v místě jejího upevnění v permeační cele byl praktickými opatřeními při přípravě a při upevnění membrán vyloučen prolepením obvodu exponovaného povrchu membrán akrylátovým lepidlem.

### 5.1.1 Měření impedance

Další součástí práce bylo měření hodnot transmembránových impedancí (**Imp**,  $Z$ ), tedy elektrických odporů sublingválních membrán. Toto měření je pod zkratkou TEER (transepidermální elektrický odpor) popisováno jako součást testů integrity kožních membrán při provádění *in vitro* testů transdemálního průniku látek.

Provádí se jak před tak po realizaci permeačních měření. Měření byla prováděna při 120 Hz, přičemž výsledky byly získávány pro membrány rozdílně zpracované.

**Při permeaci 1 (P1)** byla **impedance** měřena **před** a **po 24hodinovém** permeačním pokusu na **zmrazených** sublingválních membránách **konzervovaných azidem** sodným (měřeny celkem třikrát po 1, 5 a 10 sekundách). Donorové vzorky pro **P1** byly popsány shora, tedy v případě **1P1** až **1P6** šlo o koncentrované vzorky nanočástic, u **1P7** až **1P12** se jednalo o 100  $\mu$ l ředěné disperze, u **1P13** až **1P15** šlo o 100  $\mu$ l roztoku kofeinu (bez nanočástic).

Výsledky získané s kofeinem (měření **1P13** až **1P15**) nebyly v dalších částech práce z technických důvodů vyhodnoceny. V popisu experimentu byly zmíněny pro případné zopakování či revizi pokusných podmínek, resp. záznamů z měření, které jsou uloženy na pracovišti.

V **Tab. 1** jsou shrnuty výsledky měření, které předcházely aplikaci donorových permeačních vzorků. Byly použity sublingvální membrány ze tří různých jazyků, což je v tabulce označeno v kódu permeačního vzorku číslem v závorce.

**Tabulka 1:** Impedance membrán **konzervovaných azidem sodným a zmrazených** při **-18°C** po sestavení 15 buněk **před** začátkem permeace **P1**.

Vzorek **P1 – 6** měl na sublingvální membráně 2 tenčí místa.

Kód vzorku	Imp1 1 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp2 5 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 10 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD
<b>P1-1</b> <sub>(1)</sub>	491	461	459	<b>470</b>	$\pm 18$
<b>P1-2</b> <sub>(1)</sub>	857	854	838	<b>850</b>	$\pm 10$
<b>P1-3</b> <sub>(1)</sub>	322	313	311	<b>315</b>	$\pm 6$
<b>P1-4</b> <sub>(1)</sub>	582	584	580	<b>582</b>	$\pm 2$
<b>P1-5</b> <sub>(1)</sub>	307	305	309	<b>307</b>	$\pm 2$
<b>P1-6</b> <sub>(1)</sub>	543	548	556	<b>549</b>	$\pm 7$
<b>P1-7</b> <sub>(2)</sub>	261	277	275	<b>271</b>	$\pm 9$
<b>P1-8</b> <sub>(2)</sub>	773	756	748	<b>759</b>	$\pm 13$
<b>P1-9</b> <sub>(2)</sub>	514	516	515	<b>515</b>	$\pm 1$
<b>P1-10</b> <sub>(2)</sub>	456	448	447	<b>450</b>	$\pm 5$
<b>P1-11</b> <sub>(2)</sub>	881	892	873	<b>882</b>	$\pm 10$
<b>P1-12</b> <sub>(2)</sub>	464	463	464	<b>464</b>	$\pm 1$

**průměr 1P1 až 1P12 celkem 535**

**SD 1P1 až 1P12 celkem  $\pm 204$**

V **Tab. 2** jsou shrnuty výsledky naměřené ve stejných buňkách na stejných membránách, avšak po 24 hodinách permeačního pokusu.

Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyla nalezena žádná podobná data, jsou hodnoty impedancí uváděny v tabulkách všechny tak, jak byly naměřeny. Jejich doplnění hodnotami aritmetických průměrů a směrodatných odchylek **SD**

jako základních statistických údajů má význam pouze orientační. Počet hodnot, které byly v tomto pokusu k dispozici, neumožňuje ověřit typ jejich rozložení, lze jen předpokládat, že tak, jako mnoho jiných hodnot naměřených na biologických objektech, mají i tyto hodnoty  $Z$  impedance Gaussovskou distribuci.

**Tabulka 2: Impedance a hodnoty  $Q_t$  koncentrací nanočástic prošlých přes membrány o ploše  $1 \text{ cm}^2$  (konzervované azidem sodným a následně zmrazené) v pokusu P1 po 24 hodinách.**

Vzorek P1 – 6 měl na sublingvální membráně 2 tenčí místa.

Kód vzorku	Imp 1 1 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 5 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 10 s [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$Q_t$ 24 [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
P1-1 <sub>(1)</sub>	332	311	297	<b>313</b>	$\pm 18$	7,2
P1-2 <sub>(1)</sub>	313	298	270	<b>294</b>	$\pm 22$	6,6
P1-3 <sub>(1)</sub>	249	235	226	<b>237</b>	$\pm 12$	5,4
P1-4 <sub>(1)</sub>	257	252	252	<b>254</b>	$\pm 3$	4,8
P1-5 <sub>(1)</sub>	235	235	256	<b>242</b>	$\pm 12$	5,2
P1-6 <sub>(1)</sub>	478	464	457	<b>466</b>	$\pm 11$	6,4
P1-7 <sub>(2)</sub>	291	284	285	<b>287</b>	$\pm 4$	5,0
P1-8 <sub>(2)</sub>	306	278	261	<b>282</b>	$\pm 23$	9,0
P1-9 <sub>(2)</sub>	405	385	379	<b>390</b>	$\pm 14$	7,4
P1-10 <sub>(2)</sub>	242	236	230	<b>236</b>	$\pm 6$	4,8
P1-11 <sub>(2)</sub>	360	342	321	<b>341</b>	$\pm 20$	6,4
P1-12 <sub>(2)</sub>	266	245	239	<b>250</b>	$\pm 14$	7,6

**průměr 1P1 až 1P12 celkem 299**

**SD 1P1 až 1P12 celkem  $\pm 67$**

Konkrétněji lze z výsledků uzavřít, že sublingvální membrána **konzervovaná** azidem sodným a následně **zmrazená** vykazuje hodnoty impedance  $Z$  zpravidla na úrovni  $500 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  a vyšší. Tato hodnota by mohla být za daných okolností brána jako **referenční** pro mechanicky nepoškozenou membránu, která byla po konzervaci a fixaci azidem sodným osušena, uložena do polyethylenového sáčku a po jeho odvodu odsávkou uložena do běžného mrazáku a uchovávána obvyklým způsobem při cca  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Hodnoty impedancí **po 24 hodinovém** permeačním pokusu výrazně klesly, přičemž se dostaly na úroveň pod **300  $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$** . Impedance **Z** vyjadřující odpor membrány kladený střídavému elektrickému proudu o frekvenci 120 Hz tak dokládají, že v membráně v průběhu 24 hodinové expozice v permeační buňce proběhly procesy, jejichž charakter může (ale nemusí) ovlivňovat i výsledky *in vitro* permeace léčiv. Přitom určitě záleží také na aktuální velikosti částic a náboji uvažovaného léčiva a dalších parametrech.

Do vybraných permeačních buněk **P1** (1, 2 a 4 s obsahem koncentrovaných vzorků nanodisperzí Chromeonu 470, a vzorků 8, 9 a 11 s ředěnými vzorky nanodisperzí) bylo nanášeno 400  $\mu\text{l}$  Söerensen pufru o pH 6,6. Poté byly v sublingválních membránách záměrně vytvořeny otvory (jehlou) a opět celkem třikrát po 5 sekundových intervalech změřeny impedance (při 120 Hz). Výsledky uvádí **Tabulka 3**.

**Tabulka 3:** Impedance vybraných vzorků sublingválních membrán (konzervovaných azidem sodným a následně zmrazených) **P1 po záměrném proděravění**.

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$\Delta$ [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
<b>P1-1<sub>(1)</sub> pufr 6,6 (konc)</b>	483	395	459	<b>446</b>	$\pm 46$	
<b>P1-1<sub>(1)</sub> pufr 6,6 + 1 díra</b>	273	286	290	<b>283</b>	$\pm 9$	- 163
<b>P1-2<sub>(1)</sub> pufr 6,6 (konc)</b>	270	254	250	<b>258</b>	$\pm 11$	
<b>P1-2<sub>(1)</sub> pufr 6,6 + 1 díra</b>	218	206	213	<b>212</b>	$\pm 6$	- 46
<b>P1-4<sub>(1)</sub> pufr 6,6 (konc)</b>	344	309	304	<b>319</b>	$\pm 22$	
<b>P1-4<sub>(1)</sub> pufr 6,6 + 1 díra</b>	291	292	290	<b>291</b>	$\pm 1$	- 28
<b>P1-4<sub>(1)</sub> pufr 6,6 + 2 díry</b>	230	231	336	<b>266</b>	$\pm 61$	- 53
<b>P1-8<sub>(2)</sub> pufr 6,6 (zřed'</b>	260	270	257	<b>262</b>	$\pm 7$	
<b>P1-8<sub>(2)</sub> pufr 6,6 + 1 díry</b>	252	247	253	<b>251</b>	$\pm 3$	-11
<b>P1-9<sub>(2)</sub> pufr 6,6 (zřed'</b>	251	242	243	<b>245</b>	$\pm 5$	
<b>P1-9<sub>(2)</sub> pufr 6,6 + 1 díry</b>	248	248	246	<b>247</b>	$\pm 1$	+2
<b>P1-9<sub>(2)</sub> pufr 6,6 velká díra</b>	241	247	245	<b>244</b>	$\pm 3$	-1
<b>P1-11<sub>(2)</sub> pufr 6,6 (zřed'</b>	257	252	252	<b>254</b>	$\pm 3$	
<b>P1-11<sub>(2)</sub> pufr 6,6 velká díra</b>	246	237	250	<b>244</b>	$\pm 7$	-10

Vzorky 1,2,4,8,9,11 z permeace **P1** sloužily tedy také pro změření změny impedance po **záměrném proděravění** membrány. Jak vyplývá z **Tabulky 3**, vytvoření makroskopicky zřetelného otvoru v sublingválních membránách **vedlo ke snížení** hodnot impedance. Toto snížení se dalo očekávat, ale především to poněkud podpořilo pozitivní názor na věrohodnost prováděných impedančních měření. V pravém sloupci tabulky jsou pro názornost uvedeny difference  $\Delta$  hodnot impedancí.

Je také dobré zaznamenat, že u membrán exponovaných **koncentrovanými** disperzemi nanočástic v donorových vzorcích, tedy v případech výsledků **P1-1** a **P1-4**, došlo u hodnot impedancí k jejich **výraznějšímu snížení**. Oproti tomu u membrán po expozici **zředěnou** disperzí nanočástic bylo toto snížení **nepatrné**, nejspíše na hranici statistické chyby (tato nebyla počítána pro malý počet hodnot), jako kdyby se na vedení proudu nanočástice podílely. Proto bude zajímavé tyto výsledky porovnat s fluorescenčním měřením množství permeovaných nanočástic.

Z uvedených dat také nepřímo vyplývá, že na zvýšení či snížení impedance, tedy na změnách vodivosti v důsledku záměrného proděravění membrán, se mohlo v daných případech podílet vedení proudu nanočásticemi.

Impedance v jednotlivých permeačních buňkách byla vždy měřena jako součást permeačních pokusů, a to těsně **před** nebo **po** uplynutí času pro permeaci. Naměřené výsledky měření impedance a permeací jsou uvedeny v tabulkách **Tab. 1 až 12**. Permeační data jsou dále prezentována v podobě grafů na **Obr. 5.3 až 5.5**.

V případě **Permeace 2 (P2)** byly impedance měřeny **před** zahájením permeačního pokusu na **čerstvých** sublingválních membránách (získaných ze třech jiných jazyků) **P2 16 až 27** a na membránách (opět ze tří různých jazyků), které po jejich separaci byly rychle **zmrazeny v kapalném dusíku P2 28 až 39** (měřeny celkem třikrát po 5 sekundách).

Pro měření impedancí bylo pro dobrý kontakt kovové elektrody do donorového kompartmentu nanášeno 600  $\mu$ l Söerensen pufru o pH 6,6, impedanční data byla opět pořízena při 120 Hz.

Výsledky impedančních měření **před permeací** jsou zaznamenány v **Tab. 4** pro dvě membrány (a, b, c – tři různé jazyky) **čerstvé** a v **Tab. 5** pro dvě (d, e, f – tři jiné jazyky) membrány **zmražené** v kapalném dusíku.

Při permeačním pokusu s kódy **P2 16 až 21**, a **P2 28 až 33** obsahovaly permeační buňky **koncentrované** donorové vzorky nanočástic a permeační buňky s kódy **P2 22 až 27**, a **P2 34 až 39** obsahovaly **ředěné** (1:4) donorové vzorky nanočástic.

**Tabulka 4:** Impedance **čerstvých** membrán (**P2 16 až 27**), **před** zahájením permeačního pokusu

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD
<i>P2-16 čerstvá (a)</i>	6260	6021	5961	<b>6081</b>	$\pm 158$
<i>P2-17 čerstvá (a)</i>	5478	5521	5530	<b>5510</b>	$\pm 28$
<i>P2-18 čerstvá (a)</i>	2594	2583	2571	<b>2583</b>	$\pm 12$
<i>P2-19 čerstvá (b)</i>	3335	3344	3348	<b>3342</b>	$\pm 7$
<i>P2-20 čerstvá (b)</i>	2499	2477	2473	<b>2483</b>	$\pm 14$
<i>P2-21 čerstvá (b)</i>	3149	3123	3152	<b>3141</b>	$\pm 16$
<i>P2-22 čerstvá (b)</i>	2226	2201	2229	<b>2219</b>	$\pm 15$
<i>P2-23 čerstvá (c)</i>	1888	1961	1991	<b>1947</b>	$\pm 53$
<i>P2-24 čerstvá (c)</i>	1036	1050	1073	<b>1053</b>	$\pm 18$
<i>P2-25 čerstvá (c)</i>	552	554	564	<b>557</b>	$\pm 6$
<i>P2-26 čerstvá (c)</i>	1268	1283	1269	<b>1273</b>	$\pm 8$
<i>P2-27 čerstvá (c)</i>	706	690	694	<b>697</b>	$\pm 8$
<b>P2 16 až 27</b>	<b>Průměrná impedance (<math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math>)</b>			<b>2574</b>	<b>SD<math>\pm 29</math></b>

**Tabulka 5:** Impedance membrán **zmražených dusíkem** (**P2 28 až 39**), **před** zahájením permeačního pokusu **P2**

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD
P2-28 (dusík) (d)	441	437	445	<b>441</b>	$\pm 4$
P2-29 (dusík) (d)	587	597	597	<b>594</b>	$\pm 6$
P2-30 (dusík) (d)	2211	2157	2189	<b>2186</b>	$\pm 27$
P2-31 (dusík) (d)	1829	1824	1826	<b>1826</b>	$\pm 3$

P2-32 (dusík) (e)	692	684	696	<b>691</b>	$\pm 6$
P2-33 (dusík) (e)	1883	1877	1895	<b>1885</b>	$\pm 9$
P2-34 (dusík) (e)	2399	2377	2390	<b>2389</b>	$\pm 11$
P2-35 (dusík) (e)	1231	1244	1237	<b>1237</b>	$\pm 6$
P2-36 (dusík) (e)	1152	1149	1153	<b>1151</b>	$\pm 2$
P2-37 (dusík) (f)	1579	1574	1573	<b>1575</b>	$\pm 3$
P2-38 (dusík) (f)	2405	2434	2437	<b>2425</b>	$\pm 18$
P2-39 (dusík) (f)	2333	2329	2364	<b>2342</b>	$\pm 19$
<b>P2 28 až 39</b>	<b>Průměrná impedance [ <math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math> ]</b>			<b>1562</b>	<b>SD<math>\pm 10</math></b>

**Tabulka 6:** Výsledky měření impedance a množství  $Q_t$  prošlých nanočástic po 24 hodinách permeačního pokusu P2 čerstvou membránou

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$Q_{t24h}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
P2-16 čerstvá (a)	3547	3494	3303	<b>3448</b>	$\pm 128$	3,2
P2-17 čerstvá (a)	4217	4278	4370	<b>4288</b>	$\pm 77$	4,6
P2-18 čerstvá (a)	2517	2026	2325	<b>2289</b>	$\pm 247$	5,2
P2-19 čerstvá (b)	2249	1272	1150	<b>1557</b>	$\pm 602$	5,6
P2-20 čerstvá (b)	2000	1810	1857	<b>1889</b>	$\pm 99$	5,6
P2-21 čerstvá (b)	3072	3663	3354	<b>3363</b>	$\pm 296$	4,4
P2-22 čerstvá (b)	1312	868	944	<b>1041</b>	$\pm 237$	4,2
P2-23 čerstvá (c)	752	754	772	<b>759</b>	$\pm 19$	2,8
P2-24 čerstvá (c)	569	500	591	<b>553</b>	$\pm 47$	3,2
P2-25 čerstvá (c)	1476	1417	2443	<b>1779</b>	$\pm 576$	3,4
P2-26 čerstvá (c)	533	523	467	<b>508</b>	$\pm 36$	4,6
P2-27 čerstvá (c)	445	401	431	<b>426</b>	$\pm 22$	6,2
<b>P2 16 až 27</b>	<b>Průměrná impedance [ <math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math> ]</b>			<b>1825</b>	<b><math>\pm 199</math></b>	

**Tabulka 7:** Výsledky měření impedance a množství  $Q_t$  prošlých nanočástic po 24 hodinách permeačního pokusu P2 membránou zmraženou dusíkem

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$Q_{t24h}$ [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
P2-28 (dusík) (d)	345	305	294	<b>315</b>	$\pm 27$	5,4
P2-29 (dusík) (d)	895	758	694	<b>782</b>	$\pm 103$	5,8
P2-30 (dusík) (d)	1567	1341	1266	<b>1391</b>	$\pm 157$	5,8
P2-31 (dusík) (d)	599	769	687	<b>685</b>	$\pm 85$	6,4
P2-32 (dusík) (e)	930	791	685	<b>802</b>	$\pm 123$	4,2
P2-33 (dusík) (e)	912	938	897	<b>916</b>	$\pm 21$	3,8
P2-34 (dusík) (e)	2295	2312	2382	<b>2330</b>	$\pm 46$	2,4
P2-35 (dusík) (e)	1223	1186	1187	<b>1199</b>	$\pm 21$	3,8
P2-36 (dusík) (e)	688	597	618	<b>634</b>	$\pm 48$	2,6
P2-37 (dusík) (f)	1548	1269	1186	<b>1334</b>	$\pm 190$	3,6
P2-38 (dusík) (f)	2190	2198	2123	<b>2170</b>	$\pm 41$	3,6
P2-39 (dusík) (f)	2787	3176	2800	<b>2921</b>	$\pm 221$	3,4
<b>P2 28 až 39</b>	<b>Průměrná impedance [ <math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math> ]</b>			<b>1290</b>	<b><math>\pm 90</math></b>	

Čerstvá sublingvální membrána byla použita také v **cele** s číslem **40** u permeace **P2**. Na sublingvální membránu byl nanesen donor o pH 6,6 v množství 600  $\mu\text{l}$  a následně probíhalo měření impedancí na dané čerstvé sublingvální membráně.

Tato cela byla sestavena a zařazena pro orientační zjištění vlivu proděravění membrány na hodnotu impedance. Zkouška byla provedena při postupném přidávání otvorů s časovým odstupem cca 5 sekund až do počtu 5 a závěrečně zopakována i po odstranění membrány.



**Tabulka 8:** Výsledky měření impedance čerstvé membrány ve **vzorku č. 40 P2** po záměrném proděravění dané membrány.

Vzorek P2-40 <sub>(c)</sub>	Imp1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$\Delta$ [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
Sestavená cela	989	979	978	<b>982</b>	$\pm 6$	---
Propíchnutí	740	720	733	<b>731</b>	$\pm 10$	-251
1 díra	649	649	647	<b>648</b>	$\pm 1$	-334
2 díry	585	594	595	<b>591</b>	$\pm 6$	-391
3 díry	506	511	516	<b>511</b>	$\pm 5$	-471
4 díry	435	437	433	<b>435</b>	$\pm 2$	-547
5 děr	417	417	419	<b>418</b>	$\pm 1$	-564
Bez membrány	181	200	196	<b>192</b>	$\pm 10$	-790

Z hodnot naměřených impedancí uvedených v **Tabulce 8** vyplývá, že malé poškození (okem nepostřehnutelné) se hned ve výsledcích neprojeví. S nižším počtem děr byla naměřena vyšší impedance. Výraznějšího poklesu impedance si povšimneme při zvýšeném proděravění membrány, kdy jsou makroskopicky viditelné známky poškození membrány.

**Permeace 3 (P3)** – impedance měřeny **před** zahájením permeačního pokusu **P3 41 až 52** na zmrazených sublingválních membránách týden (při  $-18^\circ\text{C}$ ) a následně zmrazených tekutým dusíkem a **P3 53 až 64** zmrazených týden (při  $-18^\circ\text{C}$ ), měřeny celkem třikrát (po 1, 5 a 10 sekundách) po nanesení 600  $\mu\text{l}$  Söerensen pufru o pH 6,6 při 120 Hz. Donorové vzorky **P3 41 až 46, P3 53 až 58** představovaly koncentrované vzorky a **P3 47 až 52, P3 59 až 64** = 100  $\mu\text{l}$  disperze (ředěné vzorky).

Výsledky impedančních měření **před permeací P3** jsou zaznamenány v **Tab. 9** pro dvě membrány získané ze tří jiných jazyků (g, h, i) **zmrazené týden při  $-18^\circ\text{C}$  a následně zmrazených tekutým dusíkem** a v **Tab. 10** pro dvě membrány (ze tří jiných jazyků j, k, l) **zmrazené týden při  $-18^\circ\text{C}$ .**

Výsledky naměřených impedancí (měřeny pětkrát po 5 sekundách) po 24hodinách permeace **P3** a množství prošlých nanočástic  $Q_t$  za 24 a 43 hodin permeace **P3** jsou uvedeny v **Tab. 11** a **12**. Odběr akceptorové fáze po 43hodinách permeace **P3** byl proveden již za nepřítomnosti krycího sklíčko nad donorovou fází. Sklíčko bylo odstraněno po uplynutí 24hodin.

**Tab. 9:** Impedance membrán zmrazených týden při  $-18^{\circ}\text{C}$  a následně zmrazených tekutým dusíkem po sestavení 12 buněk **před začátkem** permeace **P3**.

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 [ $\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	Průměr [ $\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	<i>SD</i>
<i>P3-41(g)</i>	1794	1814	1817	<b>1808</b>	$\pm 13$
<i>P3-42(g)</i>	1958	1961	1970	<b>1963</b>	$\pm 6$
<i>P3-43(g)</i>	873	882	887	<b>881</b>	$\pm 7$
<i>P3-44(g)</i>	2122	2123	2125	<b>2123</b>	$\pm 2$
<i>P3-45(g)</i>	1158	1162	1161	<b>1160</b>	$\pm 2$
<i>P3-46(g)</i>	1154	1153	1158	<b>1155</b>	$\pm 3$
<i>P3-47(h)</i>	1335	1350	1357	<b>1347</b>	$\pm 11$
<i>P3-48(h)</i>	1040	1045	1046	<b>1044</b>	$\pm 3$
<i>P3-49(h)</i>	505	503	506	<b>505</b>	$\pm 2$
<i>P3-50(h)</i>	340	339	337	<b>339</b>	$\pm 2$
<i>P3-51(h)</i>	987	982	982	<b>984</b>	$\pm 3$
<i>P3-52(i)</i>	746	746	746	<b>746</b>	0
<b><i>P3 41 až 52</i></b>	<b>Průměrná impedance [ <math>\Omega\cdot\text{cm}^{-1}</math> ]</b>			<b>1171</b>	<b><i>SD</i><math>\pm 4,5</math></b>

**Tabulka 10:** Výsledky měření impedance membrán zmrazených týden (při -18°C) před zahájením pokusu **P3** po sestavení 12 cel.

Kód vzorku	Imp 1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp 3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD
P3-53 <sub>(j)</sub>	987	942	974	<b>968</b>	$\pm 23$
P3-54 <sub>(h)</sub>	2059	2069	2071	<b>2066</b>	$\pm 6$
P3-55 <sub>(h)</sub>	1375	1378	1380	<b>1378</b>	$\pm 3$
P3-56 <sub>(h)</sub>	1132	1155	1150	<b>1146</b>	$\pm 12$
P3-57 <sub>(h)</sub>	599	604	607	<b>603</b>	$\pm 4$
P3-58 <sub>(h)</sub>	647	631	624	<b>634</b>	$\pm 12$
P3-59 <sub>(k)</sub>	1402	1416	1307	<b>1375</b>	$\pm 59$
P3-60 <sub>(k)</sub>	630	625	630	<b>628</b>	$\pm 3$
P3-61 <sub>(k)</sub>	419	422	423	<b>421</b>	$\pm 2$
P3-62 <sub>(k)</sub>	583	587	606	<b>592</b>	$\pm 12$
P3-63 <sub>(k)</sub>	327	327	327	<b>327</b>	0
P3-64 <sub>(l)</sub>	804	805	808	<b>806</b>	$\pm 2$
<b>P3 53 až 64</b>	<b>Průměrná impedance [ <math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math> ]</b>			<b>912</b>	<b>SD<math>\pm 12</math></b>

**Tabulka 11:** Výsledky měření impedance (měření po 1s, 5s, 10s, 15s a 20s) a množství **Qt** prošlých nanočástic **po 24 a 43 hodinách** permeačního pokusu **P3** přes zmrazenou sublingvální membránu týden (při -18°C) a následně zmrazenou tekutým dusíkem

Kód vzorku	Imp1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp4 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp5 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	<b>Qt24h (exp)</b> [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]	<b>Qt43h (exp)</b> [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
<b>P3-41</b>	805	946	1268	1190	1290	<b>1100</b>	$\pm 214$	3,4	6,8
<b>P3-42</b>	1464	1090	1159	1154	954	<b>1164</b>	$\pm 187$	4	6,2
<b>P3-43</b>	1287	1259	1195	1158	1076	<b>1195</b>	$\pm 84$	4,4	5,4
<b>P3-44</b>	1478	1470	1497	-	-	<b>1482</b>	$\pm 14$	4,6	6,2

<b>P3-45</b>	746	719	686	594	656	<b>680</b>	$\pm 59$	4,4	6,4
<b>P3-46</b>	1263	1182	1134	1101	1176	<b>1171</b>	$\pm 61$	4,8	-
<b>P3-47</b>	833	634	719	684	663	<b>708</b>	$\pm 77$	4,2	5,2
<b>P3-48</b>	1181	571	517	518	526	<b>663</b>	$\pm 291$	3,8	6,0
<b>P3-49</b>	500	503	530	504	526	<b>513</b>	$\pm 14$	5,2	5,6
<b>P3-50</b>	363	366	407	408	325	<b>374</b>	$\pm 35$	5,4	6,4
<b>P3-51</b>	835	954	916	935	982	<b>924</b>	$\pm 56$	4,6	6,0
<b>P3-52</b>	721	557	573	559	461	<b>574</b>	$\pm 93$	5,4	-
<b>P3 41 až 52</b>	<b>Průměrná impedance [<math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math>]</b>					<b>879</b>	<b><math>\pm 99</math></b>		

**Tabulka 12:** Výsledky měření impedance (měřeny celkem pětkrát po 5 sekundách) a množství  $Q_t$  prošlých nanočástic **po 24 a 43 hodinách** permeačního pokusu **P3** zmrazenou sublingvální membránou týden (při  $-18^\circ\text{C}$ )

Kód vzorku	Imp1 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp2 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp3 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp4 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Imp5 [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Průměr Imp [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	SD	$Q_{t24h}$ (exp) [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]	$Q_{t43h}$ (exp) [ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]
<b>P3-53</b>	416	364	387	367	372	<b>381</b>	$\pm 21$	4,8	7,0
<b>P3-54</b>	680	803	791	768	825	<b>773</b>	$\pm 56$	5,2	6,8
<b>P3-55</b>	558	490	440	428	435	<b>470</b>	$\pm 55$	3,6	6,6
<b>P3-56</b>	584	575	588	557	593	<b>579</b>	$\pm 14$	4,2	4,6
<b>P3-57</b>	731	599	639	559	640	<b>634</b>	$\pm 64$	3,8	6,2
<b>P3-58</b>	1487	1283	1165	1104	1039	<b>1216</b>	$\pm 176$	3,2	-
<b>P3-59</b>	865	827	814	795	802	<b>821</b>	$\pm 28$	4,6	6,2
<b>P3-60</b>	384	381	380	373	361	<b>376</b>	$\pm 9$	3,8	5
<b>P3-61</b>	590	582	509	472	490	<b>529</b>	$\pm 54$	3,4	4,2
<b>P3-62</b>	343	293	279	273	261	<b>346</b>	$\pm 32$	4,2	5
<b>P3-63</b>	259	218	22	219	199	<b>223</b>	$\pm 93$	3,4	4,8

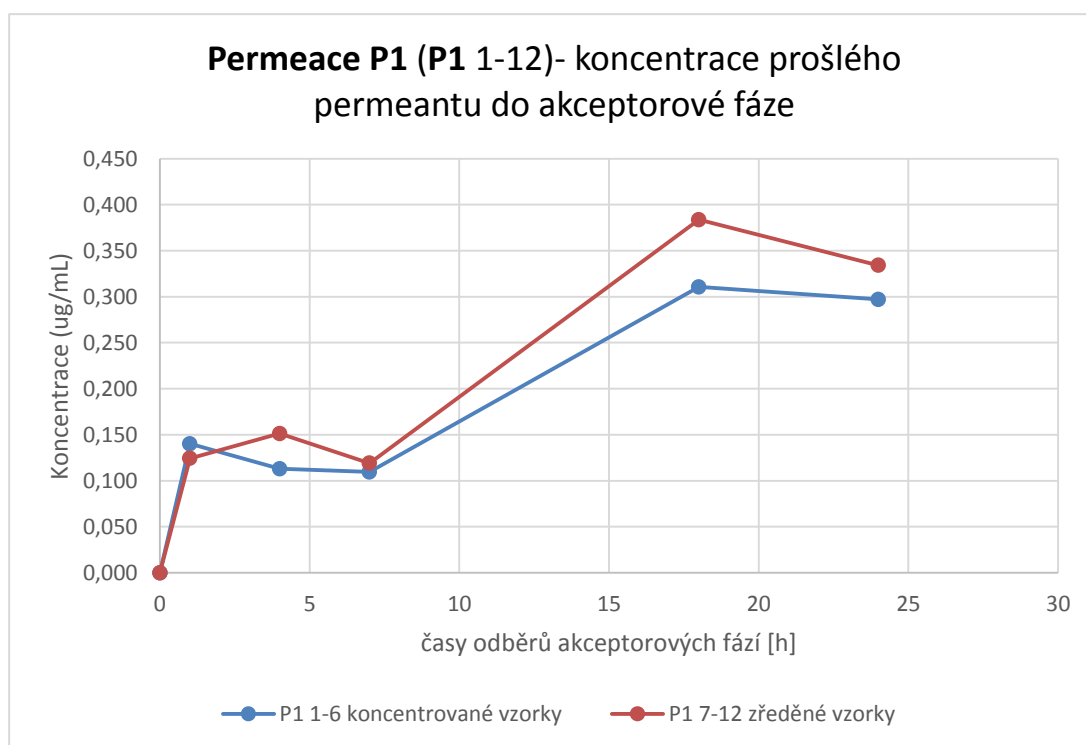
<b>P3-64</b>	522	464	465	462	472	<b>477</b>	±25	3,8	-
<b>P3 53 až 64</b>	<b>Průměrná impedance [<math>\Omega \cdot \text{cm}^{-1}</math>]</b>					<b>569</b>	<b>±52</b>		

### 5.1.2 Transmembránová permeace nanočástic

Dalším z cílů experimentu bylo získat data pro srovnání impedančních a permeačních údajů za *in vitro* podmínek pro rozdílně zpracované sublingvální membrány.

Výsledky z permeačních pokusů jsou prezentovány graficky na **Obr. 5.3 až Obr. 5.5**.

**Obr. 5.3: Průběh permeace P1 Chromeonu 470 přes dlouhodobě zmrazené membrány konzervované azidem sodným: vzorky P1 1 až 6 koncentrované disperze nanočástic, vzorky P1 7 až 12 zředěné disperze nanočástic**



Pro lepší znázornění koncentrace prošlého permeantu na čase vychází linie na grafu z nulového počátku, i když nanočástice určitě procházejí se zpožděním. V daných případech nebylo možné lag-time průniku nanočástic hodnotit.

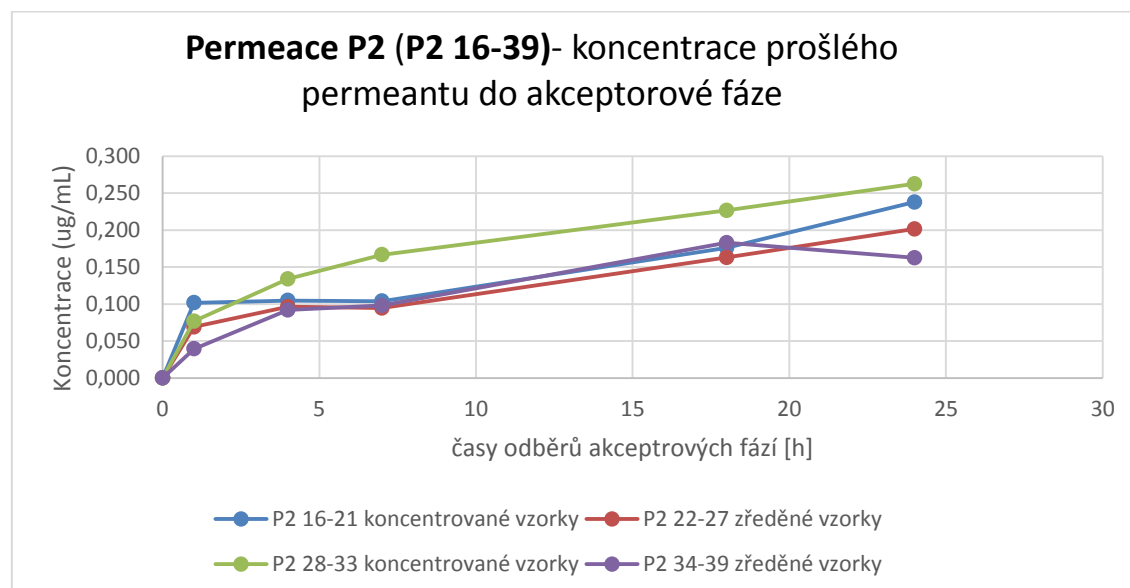
Hodnoty koncentrace pronikuvších nanočástic v první hodině odběru akceptorové fáze pokusu **P1** ukazují na stejný a v případě obou donorových vzorků poměrně rychlý počáteční nárůst kvant nanočástic v akceptorové fázi.

Tento fakt je zajímavý a významný sám o sobě, kromě výsledků předchozích dvou diplomových prací<sup>36,37</sup> nebyl v dostupné literatuře transmembránový průnik nanočástic o průměru cca 40nm nalezen. Naopak by se mělo očekávat, že takový nálezn svědčí o porušenosti použité membrány. Průnik nanočástic nicméně pokračoval způsobem, který takový názor na porušení kvality membrány nepotvrzoval, jak je patrné například na **Obr. 5.3**. V pozdějších hodinách množství nanočástic prošlých do akceptorového média v zásadě pomalu stoupá, mírně vyšší průnik je zaznamenán ze zředěných donorových vzorků. V každém případě jsou zajímavé výsledky z permeačních měření za použití nejen membrány čerstvé, ale také sublingvální membrány zmražené v rozdílném teplotním a časovém režimu.

Analogicky je na **Obr. 5.4** zobrazen průběh druhého permeačního pokusu. Vzorky **P2 16 až 21** obsahovaly v donoru opět **koncentrovanou** disperzi, vzorky **P2 22 až 27** měly v donoru disperzi **zředěnou**. Permeace probíhala přes čerstvou sublingvální membránu.

Vzorky **P2 28 až 33** s membránou zmrazenou **kapalným dusíkem** nesly koncentrovanou disperzi nanočástic, vzorky **P2 34 až 39** donorovou disperzi zředěnou.

**Obr. 5.4:** Průběh permeace P2 nanočástic Chromeonu 470 přes **čerstvou** membránu

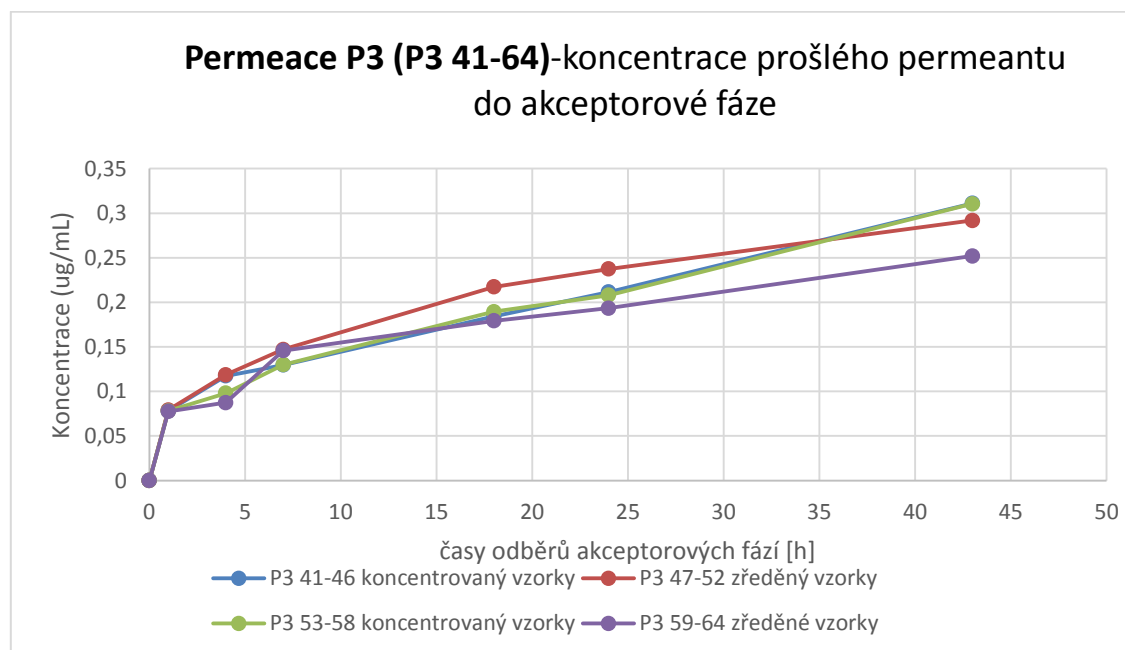


Při permeaci **P2** o něco více pronikaly nanočástice z koncentrovaných donorových vzorků, a to jak přes membránu **čerstvou** (zelená křivka), tak membránu rychle **zmrazenou kapalným dusíkem** (světle modrá křivka).

Rozdíly mezi naměřenými hodnotami koncentrací proniknuvších částic nejsou však natolik odlišné, aby bylo nutné jejich rozdílnost statisticky dále prověřovat. Vzhledem k variabilitě by se jednalo nanejvýš o velmi hrubé statistické odhady, avšak se stejným vyzněním.

Také v permeačním pokusu **P3** pronikaly nanočástice již v první hodině (**Obr. 5.5**) a to stejně z donorů se zředěnými nanočásticemi tak z donorů koncentrovaných. Přitom **koncentrované** disperze byly použity jako donorové vzorky u **P3 41 až 46** a **P3 53 až 58**. **Zředěné** disperze nanočástic byly jako donorové vzorky použity u **P3 47 až 52** a **P3 59 až 64**

**Obr. 5.5:** Permeace **P3** nanočástic přes membránu bez konzervace zmrazenou týden při -18 °C (**P3 41 až 52**) a membránu doplňkově zmrazenou kapalným dusíkem (vzorky **P3 53 až 64**)



Nárůst koncentrace permeovaných nanočástic od 1 hodiny do 10. hodiny má přibližně opět exponenciální charakter, v pozdějších hodinách se časový profil průniku blíží přímce. Nejdůležitější je však konstatování, že i v případě tohoto pokusu, tedy **P3**, byl průnik nanočástic opět potvrzen.

Překvapivá byla skutečnost, že časový průběh průniku nanočástic nesignalizoval proděravění či jiné větší poškození použitých sublingvální membrán, což platí i pro oba poměrně nešetrné způsoby jejich uchovávání. Tedy jak membrány pomalu zmrazené

na -18 °C bez konzervace, tak i pro část těchto membrán dodatečně exponované zchlazením v kapalném dusíku.

Je zřejmé, že z aplikačního hlediska je za prakticky významnou považována především doba **1 hodiny** expozice, myšleno od podání přípravku na slizniční membránu. Ostatní hodnoty tedy potvrzují především skutečnost, že k průniku nanočástic v časovém intervalu 24 a 43 hodin stále dochází, jejich koncentrace v akceptorovém kompartmentu pomalu ale měřitelně stoupá.

S opatrností lze říci, že **Qt po 24 hodinách** u **P1** poukazuje na lepší průnik zředěných vzorků, ale u **P2** a u **P3** tomu tak není.

Získané výsledky transmembránového průniku nanočástic Chromeon 470 jsou shrnuty v **Tabulkách 13 až 17**, v nichž jsou uvedeny procentuální podíly nanočástic prošlých za 24 hodin permeačního pokusu z donorových vzorků koncentrovaných (neředěných) a donorových vzorků ředěných Sørensenovým pufrem pH 6,8.

**Tab. 13: Permeace P1** přes membránu konzervovanou azidem sodným a dlouhodobě zmrazenou při -18 °C

P1 – 1 koncentrovaný – <b>1,44%</b>	P1 – 7 ředěný (1:4) – <b>5,0%</b>
P1 – 2 koncentrovaný – <b>1,32%</b>	P1 – 8 ředěný (1:4) – <b>9,0%</b>
P1 – 3 koncentrovaný – <b>1,08%</b>	P1 – 9 ředěný (1:4) – <b>7,4%</b>
P1 – 4 koncentrovaný – <b>0,96%</b>	P1 – 10 ředěný (1:4) – <b>4,8%</b>
P1 – 5 koncentrovaný – <b>1,04%</b>	P1 – 11 ředěný (1:4) – <b>6,4%</b>
P1 – 6 koncentrovaný – <b>1,28%</b>	P1 – 12 ředěný (1:4) – <b>7,4%</b>
<b>Průměr 1,19%</b>	<b>Průměr 6,67%</b>

**Tab. 14: Permeace P2** přes čerstvou membránu:

P2 – 16 koncentrovaný – <b>0,64%</b>	P2 – 22 ředěný (1:4) – <b>4,20%</b>
P2 – 17 koncentrovaný – <b>0,92%</b>	P2 – 23 ředěný (1:4) – <b>2,80%</b>
P2 – 18 koncentrovaný – <b>1,04%</b>	P2 – 24 ředěný (1:4) – <b>3,20%</b>
P2 – 19 koncentrovaný – <b>1,10%</b>	P2 – 25 ředěný (1:4) – <b>3,40%</b>



P2 – 20 koncentrovaný – <b>1,10%</b>	P2 – 26 ředěný (1:4) – <b>4,60%</b>
P2 – 21 koncentrovaný – <b>0,89%</b>	P2 – 27 ředěný (1:4) – <b>6,20%</b>
<b>Průměr 0,77%</b>	<b>Průměr 4,07%</b>

**Tab. 15: Permeace P2** přes membránu zmrazenou v kapalném dusíku:

P2 – 28 koncentrovaný – <b>1,10%</b>	P2 – 34 ředěný (1:4) – <b>2,40%</b>
P2 – 29 koncentrovaný – <b>1,20%</b>	P2 – 35 ředěný (1:4) – <b>3,80%</b>
P2 – 30 koncentrovaný – <b>1,20%</b>	P2 – 36 ředěný (1:4) – <b>2,60%</b>
P2 – 31 koncentrovaný – <b>1,30%</b>	P2 – 37 ředěný (1:4) – <b>3,60%</b>
P2 – 32 koncentrovaný – <b>0,84%</b>	P2 – 38 ředěný (1:4) – <b>3,60%</b>
P2 – 33 koncentrovaný – <b>0,77%</b>	P2 – 39 ředěný (1:4) – <b>3,40%</b>
<b>Průměr 1,07%</b>	<b>Průměr 3,23%</b>

**Tab. 16: Permeace P3** přes membránu týden zmrazenou při -18 °C a dodatečně zmrazenou v kapalném dusíku:

P3 – 41 koncentrovaný – <b>0,68%</b>	P3 – 47 ředěný (1:4) – <b>4,20%</b>
P3 – 42 koncentrovaný – <b>0,80%</b>	P3 – 48 ředěný (1:4) – <b>3,80%</b>
P3 – 43 koncentrovaný – <b>0,88%</b>	P3 – 49 ředěný (1:4) – <b>5,20%</b>
P3 – 44 koncentrovaný – <b>0,92%</b>	P3 – 50 ředěný (1:4) – <b>5,40%</b>
P3 – 45 koncentrovaný – <b>0,88%</b>	P3 – 51 ředěný (1:4) – <b>4,60%</b>
P3 – 46 koncentrovaný – <b>0,96%</b>	P3 – 52 ředěný (1:4) – <b>5,40%</b>
<b>Průměr 0,85%</b>	<b>Průměr 4,02%</b>

**Tab. 17: Permeace P3** přes týden zmrazenou membránu:

P3 – 53 koncentrovaný – <b>0,96%</b>	P3 – 59 ředěný (1:4) – <b>4,60%</b>
P3 – 54 koncentrovaný – <b>1,04%</b>	P3 – 60 ředěný (1:4) – <b>3,80%</b>
P3 – 55 koncentrovaný – <b>0,72%</b>	P3 – 61 ředěný (1:4) – <b>3,40%</b>

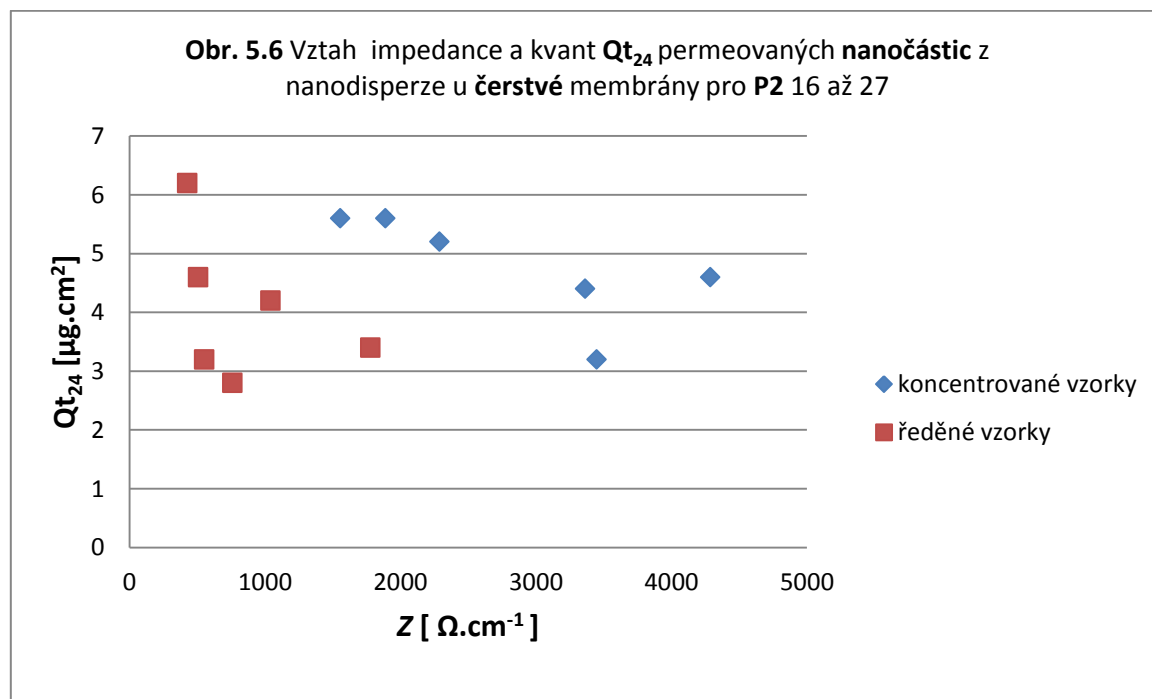
P3 – 56 koncentrovaný – <b>0,84%</b>	P3 – 62 ředěný (1:4) – <b>4,20%</b>
P3 – 57 koncentrovaný – <b>0,77%</b>	P3 – 63 ředěný (1:4) – <b>3,40%</b>
P3 – 58 koncentrovaný – <b>0,64%</b>	P3 – 64 ředěný (1:4) – <b>3,80%</b>
<b>Průměr 0,83%</b>	<b>Průměr 3,87%</b>

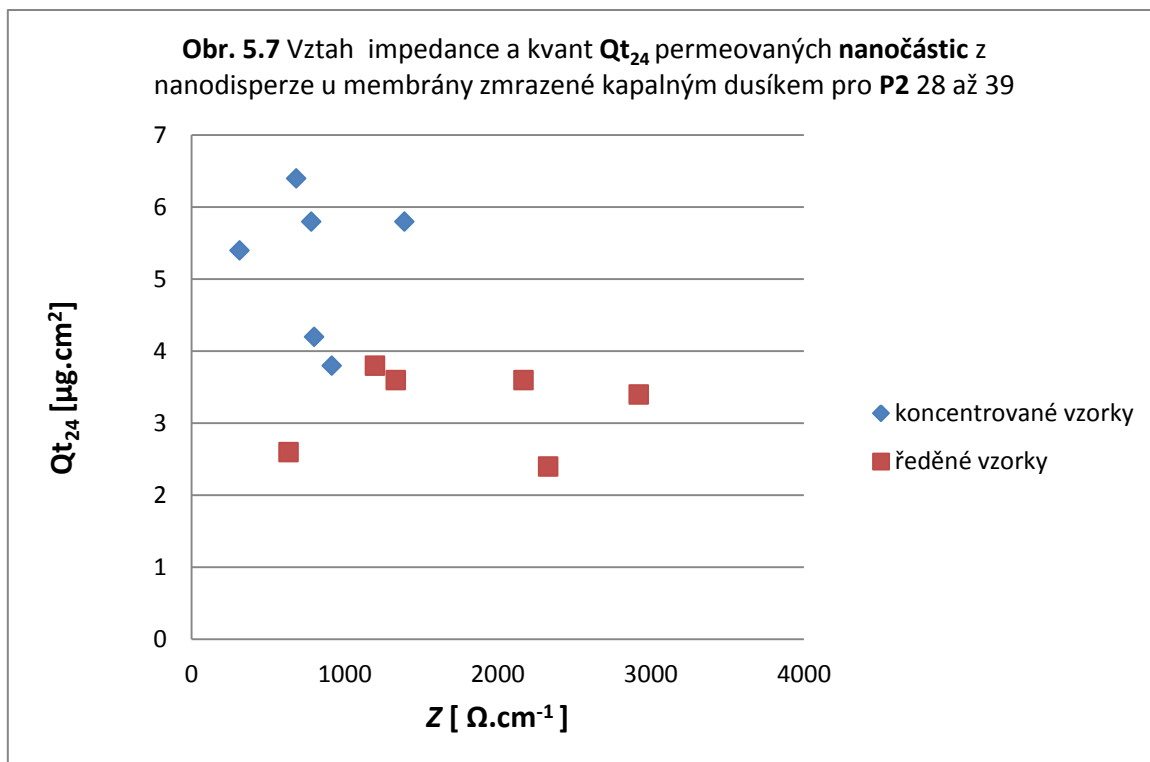
Při porovnání permeability zkoumaných membrán se ukázalo, že nanočástice více pronikaly přes sublingvální membrány zpracované běžným pomalým zmrazením při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které také současně poskytovaly nejnižší hodnoty impedance. Mohlo to být způsobeno narušením struktury membrány zmrazením.

**Čerstvě** preparované membrány a po preparaci **okamžitě zamražené** v kapalném dusíku vykazovaly přibližně stejné permeabilitní vlastnosti po aplikaci nanočástic Chromeonu 470.

Podstatné je, že ve všech případech modelové částice Chromeonu 470 transmembránově procházejí přes všechny různě zpracované a uchovávané membrány, včetně čerstvě vypreparovaných.

Jedním z dalších úkolů experimentu bylo porovnat hodnoty impedance sublingválních membrán s jejich permeabilitou pro nanočástice. Výsledky jsou ilustrovány na **Obr. 5.6** a **Obr. 5.7**.





Z pohledu na rozložení hodnot v obou bodových prezentacích výsledků je zřejmé, že souvislost mezi hodnotami impedancí a permeačních dat pro nanočástice nebyla nalezena.

Vysvětlení této skutečnosti pravděpodobně spočívá v zásadně rozdílné velikosti a charakteru částic, které se podílejí na měřených hodnotách impedance na straně jedné a nanočásticích Chromeon 470 jako permeantu (ostatně překvapivého).

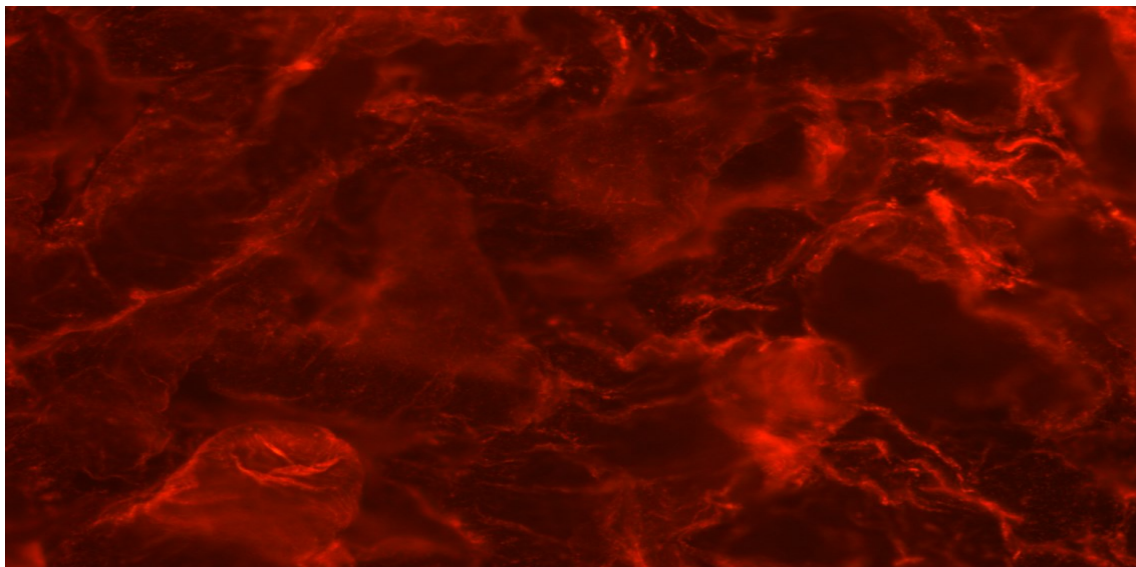
### 5.1.3 Fluorescenční mikroskopie

Pro mikroskopické pozorování byly vybrány vzorky použitých sublingválních membrán z permeačních experimentů **P1** a **P2**. Preparáty byly sledovány pod fluorescenčním mikroskopem, bez plexiskla, pod plexisklíčkem, před oplachem i po oplachu sublingvální membrány destilovanou vodou. Membrány byly pozorovány shora i ze spodní strany.

Nastavení mikroskopu pro různé obrázky se lišilo (filtr WIB, citlivost snímače ISO, objektiv, doba expozice, zvětšení).

Získané snímky dokumentují fotografické záznamy na následujících obrázcích.

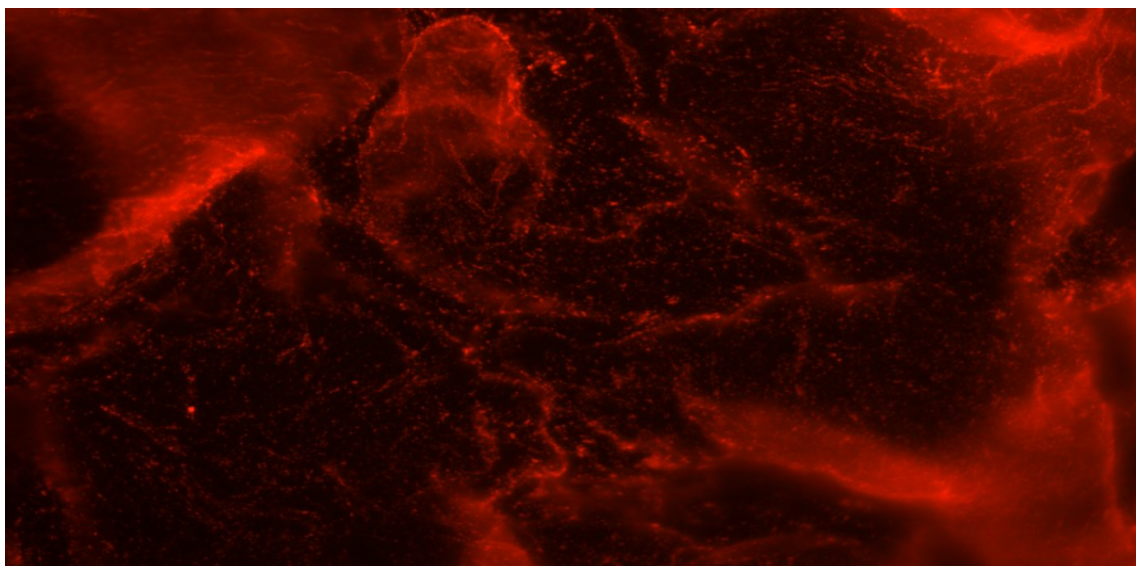
**Obr. 5.8: Vzorek P1-3**



Popis: 20x, ISO 200, VIS-OFF, WIB, zvětšení 200x.

Jde o situaci po nanesení koncentrovaného donorového vzorku na dlouhodobě zmrazenou membránu konzervovanou azidem sodným, po oplachu vodou na injekce. Nanočástice zůstávají na membráně a jsou nepravidelně rozprostřeny.

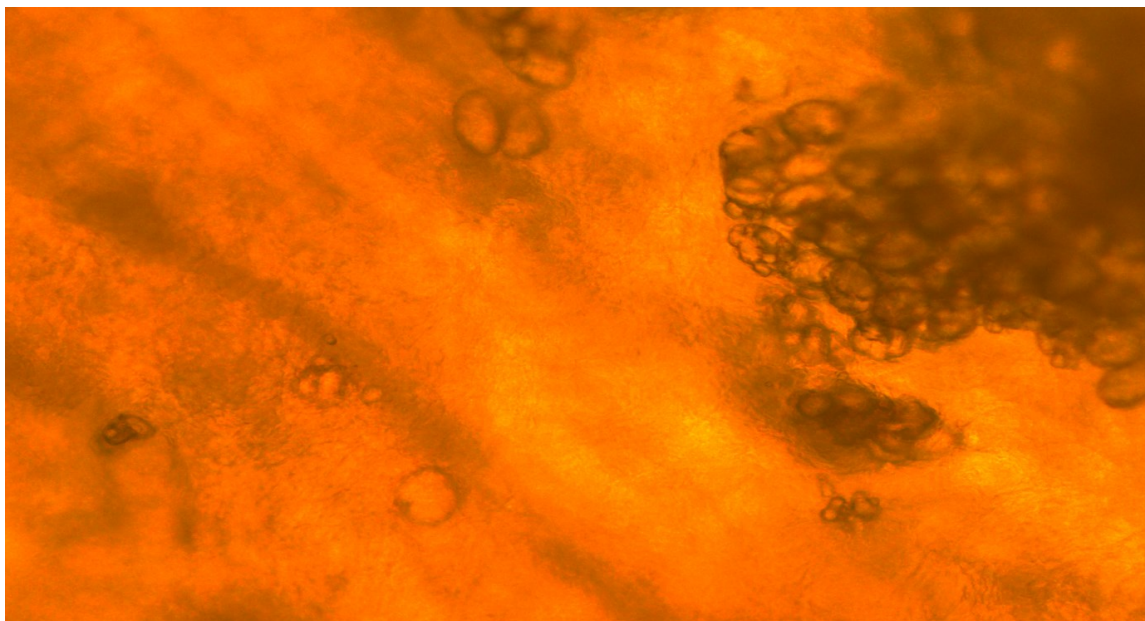
**Obr. 5.9: P1-3**



Popis: 40x, ISO 200, Exp 8ms, WIB, VIS:OFF, zvětšení 400x.

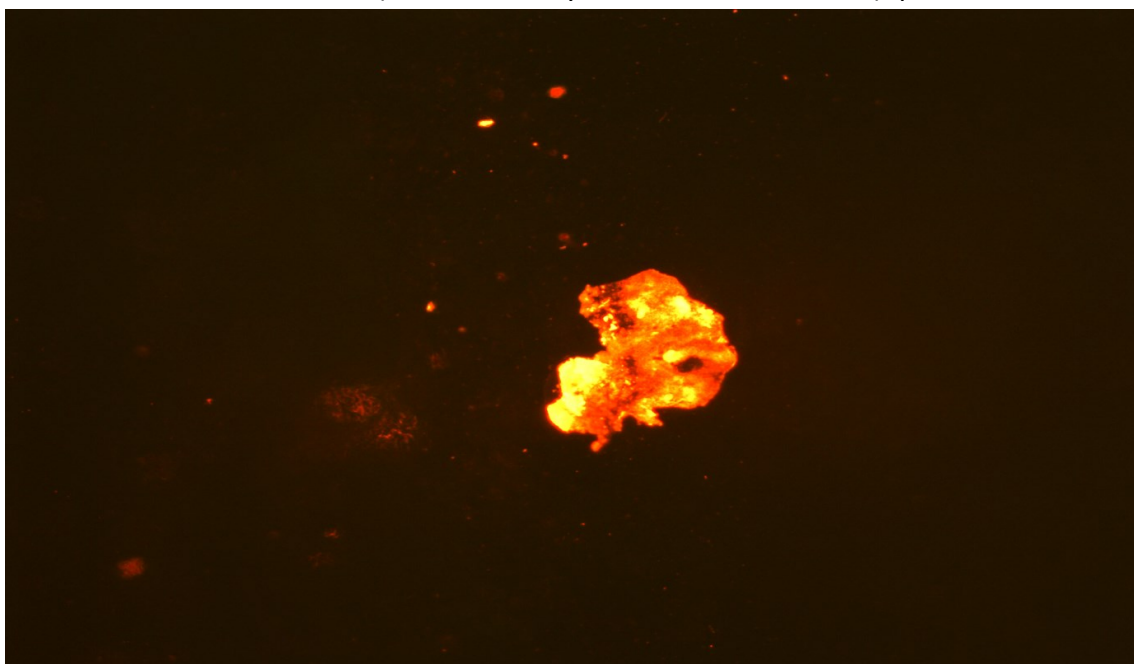
Jde o snímek získaný po nanesení koncentrované disperze nanočástic na dlouhodobě zmrazenou membránu konzervovanou azidem sodným mezi rámečkem z plexiskla na okraji vzorku vpravo od exponované 1 cm<sup>2</sup> plochy a krycím sklíčkem. Bylo sledováno, zda nanočástice unikaly do stran pod krycí sklíčko - pravděpodobně ano.

**Obr. 5.10 :** Vzorek **P2 - 21** (koncentrovaný vzorek, čerstvá membrána), pohled zespoda, blíž středu.



*Popis: 10x, ISO 200, Exp. 14ms (Auto SFL), WIB, VIS – ON (6), zvětšení 100x.*

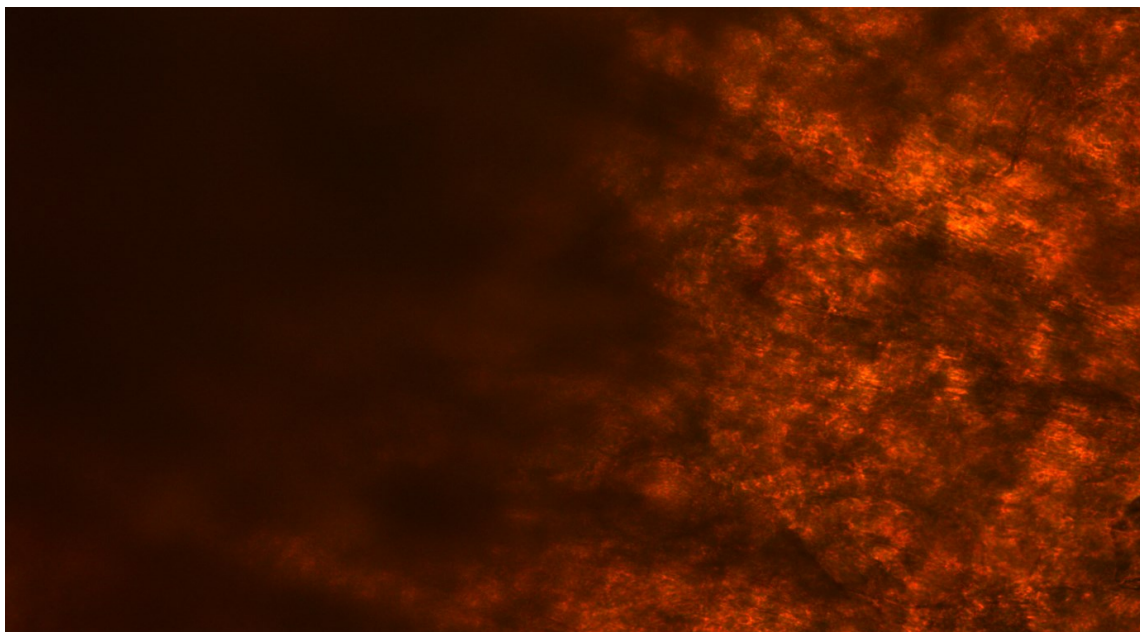
**Obr. 5.11:** P2 vzorek **P2 - 21** (koncentrovaný, čerstvá SL membrána), pohled shora.



*Popis: 10x, ISO 200, Exp. 100ms, WIB, VIS – OFF (P), zvětšení 100x.*

V pozorovaném preparátu blíž středu **Obr. 5.10** nebyly pozorovány žádné nanočástice, zespoda byly přítomny nanočástice jen u okrajů vzorků. Na **Obr. 5.11** byla membrána sledována shora, bylo možné vidět shluk nanočástic.

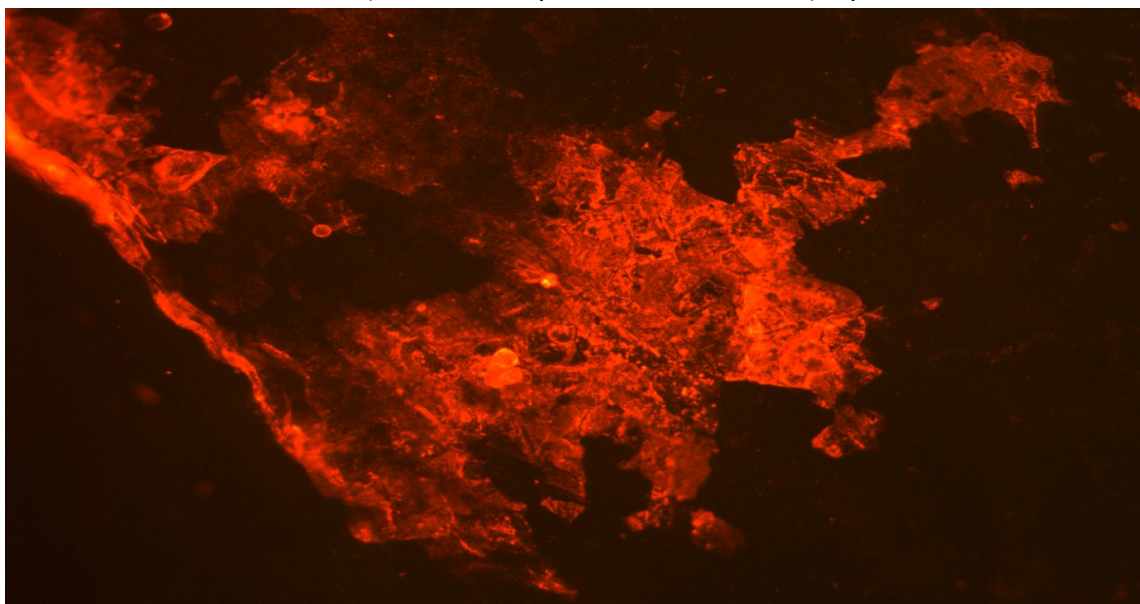
**Obr. 5.12: P2 vzorek P2-27 (donor ředěný, čerstvá membrána) – pozorován ze spodní strany okraj vzorku.**



*Popis: 10x, VIS ON (P), WIB, IS 200, Exp 20ms, zvětšení 100x.*

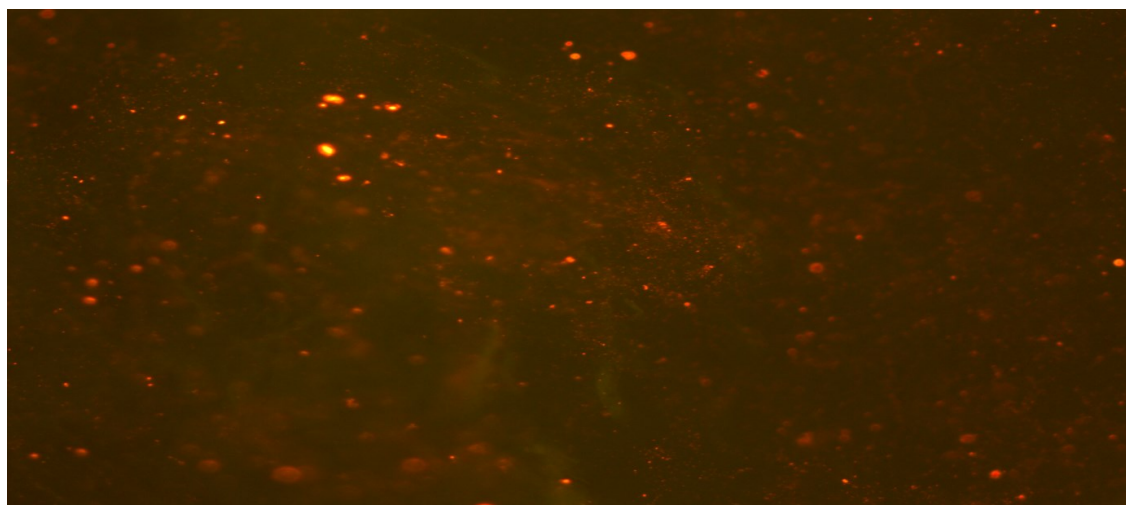
Nebyly viditelné žádné nanočástice ze spodní strany okraje vzorku, ale byla viditelná struktura membrány. Zatímco při pohledu z horní strany vzorku 5. 13. byly viditelné shluky nanočástic. Možná, že tyto agregáty nanočástic mohly snížit průchodnost membrány.

**Obr. 5.13: P2 vzorek P2-27 (donor ředěný, čerstvá membrána) – pozorování shora.**



*Popis: 10x, VIS- OFF, WIB, ISO200, Exp 50ms, zvětšení 100x.*

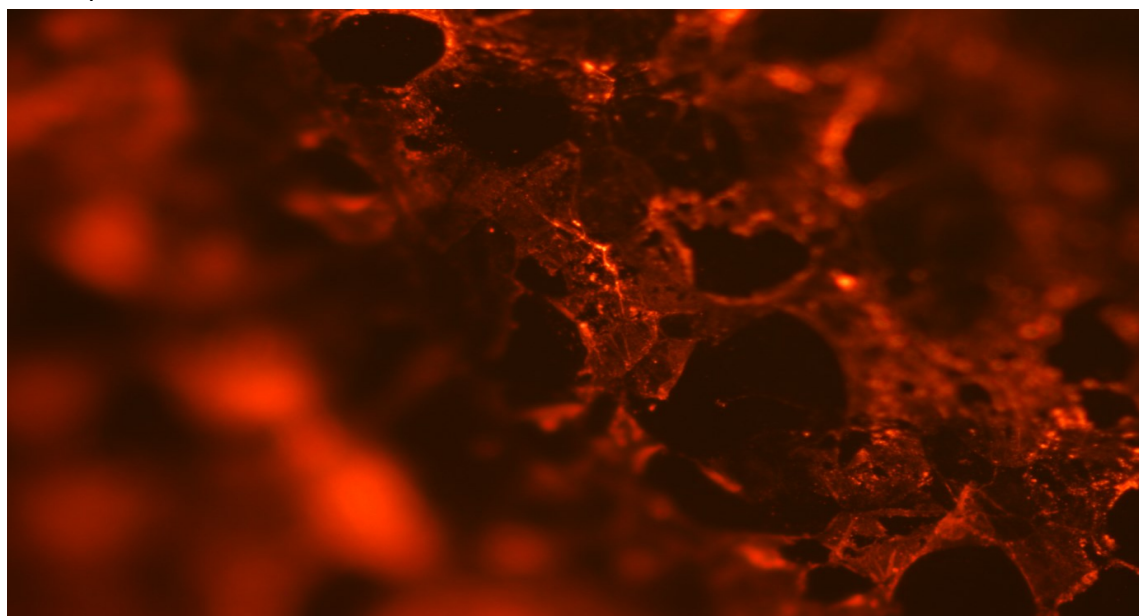
**Obr. 5.14: P2 vzorek P2-33** (donor koncentrovaný, membrána zmrazená v kapalném dusíku ), pohled shora, okraj vzorku.



*Popis: 10x, VIS – ON (4), WIB, ISO 200, Exp.16,6ms (Auto SFL), zvětšení 100x.*

Na obrázku jsou viditelné nanočástice, jež jsou při okraji vzorku, kde byla nanášena donorová fáze. Nanočástice byly i za okrajem vzorku, unikaly i do strany pod plexisklo, pravděpodobně nikoli až do akceptorového oddílu, tomu by mělo bránit oblepení membrány akrylátovým lepidlem.

**Obr. 5.15: P2 vzorek P2-39** (donor ředěný, membrána zmrazená kapalným dusíkem), shora pozorován střed vzorku



*Popis: 20x, VIS – OFF, ISO 200, Exp. 200ms, zvětšení 200x.*

Na obrázcích jsme mohli vidět rozložení nanočástic Chromeon 470 na membráně a v její struktuře.

## 6 ZÁVĚRY

1. Metodou DLS byla změřena velikost a distribuce hydrodynamických rozměrů nanočástic PD-Chromeonu 470 dispergovaných v Sørensenově pufru pH 6,8, pH 7,4 a ve vodě na injekci. Naměřené hodnoty velikosti na úrovni **40 nm** ve všech použitých kapalinách odpovídaly údajům dodavatele o velikosti částic v suchém stavu. Hodnota **pH** disperze nanočástic PD-Chromeon 470 od dodavatele činila **6,65**.
2. Čerstvé sublingvální membrány měly přibližně pětikrát vyšší hodnoty transmembránové impedance než membrány dlouhodobě zmrazené, konzervované azidem sodným nebo zmrazená týden při  $-18^{\circ}\text{C}$  a následně zmrazená dusíkem, zmrazené týden při  $-18^{\circ}\text{C}$  nebo zmrazená kapalným dusíkem.

Impedance v pokusu **P1 před začátkem** permeace, membrána dlouhodobě zmrazená, konzervovaná azidem sodným: **průměr  $Z = 535 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P1 po 24 hodinách** permeace, membrána dlouhodobě zmrazená, konzervovaná azidem sodným:

**průměr  $Z = 299 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P2 před začátkem** permeace, **čerstvá** membrána:

**průměr  $Z = 2574 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P2 po 24 hodinách** permeace, **čerstvá** membrána:

**průměr  $Z = 1825 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P2 před začátkem** permeace, membrána zmrazená v kapalném dusíku:

**průměr  $Z = 1562 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P2 po 24 hodinách** permeace, membrána zmrazená v kapalném dusíku:

**průměr  $Z = 1290 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P3 před začátkem** permeace, membrána zmrazená týden při  $-18^{\circ}\text{C}$  a následně zmrazená tekutým dusíkem:

**průměr  $Z = 912 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P3 po 24 hodinách** permeace, membrána zmrazená týden při  $-18^{\circ}\text{C}$  a následně zmrazená tekutým dusíkem:

**průměr  $Z = 879 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**



Impedance v pokusu **P3 před začátkem** permeace, membrána zmrazená týden při minus 18°C: **průměr Z = 1171  $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Impedance v pokusu **P3 po 24 hodinách** permeace, membrána zmrazená týden při minus 18°C: **průměr Z = 569  $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  (n=12)**

Nejnižší impedance tedy měly membrány konzervované azidem sodným, které byly dlouhodobě zmrazeny při -18°C.

Rychlé zmrazení kapalným dusíkem membrány z hlediska impedance zřejmě nepoškozuje.

3. Nanočástice **PD-Chromeon 470** byly schopny průniku, i když malého, **přes všechny** různým postupem zpracované prasečí sublingvální membrány.
4. Podíly nanočástic PD-Chromeon 470 z jejich celkového množství v donorovém vzorku, které pronikly přes prasečí sublingvální membránu (1cm<sup>2</sup>) do akceptorové fáze **po 24 hodinách** činily:

**P1** přes membránu konzervovanou azidem sodným a dlouhodobě zmrazenou při minus 18°C: Koncentrované vzorky **průměr 1,19% (n=6)**

Zředěné vzorky **průměr 6,67% (n=6)**

**P2** přes čerstvou membránu:

Koncentrované vzorky **průměr 0,77% (n=6)**

Zředěné vzorky **průměr 4,07% (n=6)**

**P2** přes membránu zmrazenou v kapalném dusíku:

Koncentrované vzorky **průměr 1,07% (n=6)**

Zředěné vzorky **průměr 3,23% (n=6)**

**P2** přes membránu zmrazenou týden při -18°C a dodatečně zmrazenou v kapalném dusíku: Koncentrované vzorky **průměr 0,85% (n=6)**

Zředěné vzorky **průměr 4,02% (n=6)**

**P3** přes týden zmrazenou membránu při -18°C:

Koncentrované vzorky **průměr 0,83% (n=6)**

Zředěné vzorky **průměr 3,87% (n=6)**

5. Nejvíce pronikaly nanočástice přes membránu konzervovanou azidem sodným následně dlouhodobě zmrazenou při  $-18^{\circ}\text{C}$ . Průniky nanočástic přes ostatní membrány byl vždy nižší a navzájem hodně vyrovnané.
6. Při permeaci **P1** byl dle  $Q_t$  hodnot za 24 hodin větší průnik nanočástic zaznamenán při použití ředěných donorových vzorků. Naopak u permeací **P2** a **P3**, byl zaznamenán vyšší průnik z koncentrovaných než ředěných vzorků.
7. Podle procentuálního vyjádření podílu nanočástic PD-Chromeon 470 prošlých do akceptorové fáze po 24 hodinách z celkového množství v donorovém vzorku (činilo  $500\ \mu\text{g}$  pro neředěné vzorky,  $100\ \mu\text{g}$  pro ředěné vzorky), lze s opatrností říci, že nejnáze pronikaly nanočástice PD-Chromeon 470 sestupně přes:
  - a) dlouhodobě zmrazenou (při  $-18^{\circ}\text{C}$ ) membránu konzervovanou azidem sodným,
  - b) přes týden zmrazenou a znovu zmraženou tekutým dusíkem,
  - c) čerstvou membránu,
  - d) poté přes čerstvou nekonzervovanou membránu zmrazenou týden a
  - e) nejpomaleji přes zmrazenou membránu kapalným dusíkem.

Mezi posledními čtyřmi jmenovanými membránami jsou jen malé rozdíly.

8. Celkově nejnižší hodnoty impedance a nejvyšší hodnoty průniku nanočástic naměřené u permeací přes sublingvální membrány dlouhodobě zmrazené při  $-18^{\circ}\text{C}$  naznačují, že právě dlouhodobé uchování sublingválních membrán (až několik měsíců) vede k jejich poškození. Naopak čerstvě vypreparované ale také vypreparované a následně kapalným dusíkem zmražené membrány jsou pro permeační pokusy tohoto typu kvalitativně rovnocenné.

## 7 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

<b>P1 – P3</b>	První až třetí série permeačních měření
<b>t [h]</b>	Čas
<b>Q<sub>t</sub> [μg]</b>	Množství permeantu prošlého membránou v čase <b>t</b>
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering, laserová difrakce
<b>ISO</b>	Citlivost – fluorescenční mikroskop
<b>WIB</b>	Filtr – fluorescenční mikroskop
<b>SL membrána</b>	Sublingvální membrána
<b>Mr</b>	Relativní molekulová hmotnost
<b>NČ</b>	Nanočástice
<b>SD</b>	Směrodatná odchylka
<b>SEM</b>	Střední chyba průměru, směrodatná odchylka výběrových průměrů
<b>Imp, Z</b>	Impedance
<b>Z-Average</b>	Střední vážená hydrodynamická velikost částic měřených DLS
<b>EGFR</b>	Receptor epidermálního růstového faktoru
<b>TEER</b>	Transepidermální elektrický odpor

## 8 LITERATURA

---

- <sup>1</sup> Rabišková M. Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia* 2008; 18: pp. 89 – 97.
- <sup>2</sup> Rabišková M. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia* 2007; 17: pp. 495 - 501.
- <sup>3</sup> <http://www.nanocastice.cz/> (22. 4. 2018)
- <sup>4</sup> Filipová Z., Kukutschová J., Mašláň M. Rizika nanomateriálů, 1st-ed; Univerzita Palackého v Olomouci, 2012: pp. 10,34, 68.
- <sup>5</sup> Hoshyar N et al. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*. 2016, 11(6): 673–692.
- <sup>6</sup> [https://www.wikiskripta.eu/w/P%C5%99%C3%ADvodn%C3%AD\\_cesty\\_l%C3%A9k%C4%8Diva\\_do\\_organismu](https://www.wikiskripta.eu/w/P%C5%99%C3%ADvodn%C3%AD_cesty_l%C3%A9k%C4%8Diva_do_organismu) (18. 1. 2018)
- <sup>7</sup> <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/C8790/um/31610507/Farm06.pdf> (18. 1. 2018)
- <sup>8</sup> Vašířová Z. Faktory ovlivňující biologickou dostupnost léčiv. *Remedia* 2017; 27: 299–302.
- <sup>9</sup> Lincová, D.; Farghali, H.; et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2nd-ed.; Galén: Praha, CZ, 2007; pp. 37-39.
- <sup>10</sup> Hess L.; Málek J. *Netradiční způsob aplikace anestetik: Možnosti jejich využití v urgentní medicíně a medicíně katastrof*, 1st-ed.; Univerzita Karlova v Praze, 2016, pp. 26-31.
- <sup>11</sup> Gajdziok J.; Vetchý D.; Dutina ústní jako aplikační místo pro přívod léčiva do organismu, Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. *Praktické lékárenství*. 2016; 12(2): 63–65.
- <sup>12</sup> Kraan H.; et al. Buccal and sublingual vaccine delivery, *Journal of Controlled Release* 190. 2014: pp. 580 – 592.
- <sup>13</sup> Martínek J.; Vacek Z. *Histologický atlas*, 1st-ed.; Grada: Praha, CZ, 2009, pp. 39 – 40.
- <sup>14</sup> Amir H. Shojaei; Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery. *J Pharm Pharmaceut Sci* 1 (1):15-30, 1998.

- 
- <sup>15</sup> Mohammed S.; Ossama M. S.; Majella E. L. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. *International Journal of Pharmaceutics* 471. 2014: pp. 498 – 506.
- <sup>16</sup> Xia B.; Yang Z.; Zhou H.; Lukacova V.; Zhu W.; Milewski M.; Kesisoglou F. Development of a Novel Oral Cavity Compartmental Absorption and Transit Model for Sublingual Administration: Illustration with Zolpidem. *AAPS J.* 2015;17(3): pp. 631-642.
- <sup>17</sup> Trojan S.; Langmeier M.; et al. *Lékařská fyziologie*, 4th-ed: Grada: Praha, CZ, 2003: pp. 28 – 33, 321 – 327.
- <sup>18</sup> Martínková, J.; et al. *Farmakologie: pro studenty zdravotnických oborů*; Grada: Praha, CZ, 2007; pp. 34 – 37.
- <sup>19</sup> Chalabala, M.; Rabišková, M.; Chalupová, Z.; Komárek, P.; et al. Léky jako aplikační systémy. In *Technologie léků*, 2nd-ed.; Galén: Praha, CZ, 2006, pp. 199 – 315.
- <sup>20</sup> Hearnden, V.; Sankar, V.; Hull, K.; Juras, D. V.; Greenberg, M.; Kerr, A. R.; Lockhart, P. B.; Patton, L. L.; Porter, S.; Thornhill, M. H. New Developments and Opportunities in Oral Mucosal Drug Delivery for Local and Systemic Disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 64 (1), pp. 16 – 28.
- <sup>21</sup> Lüllman H.; Mohr K.; Hein L. *Barevný atlas farmakologie*. 4th-ed. Grada, Praha, CZ, 2012, pp.
- <sup>22</sup> Silbernagl S.; Despopoulos A. *Atlas fyziologie člověka*. 8th-ed., Grada, Praha, CZ, 2016. pp. 20 – 25.
- <sup>23</sup> Patel V. F.; Liu F.; Brown M., B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2011, 153, pp. 106 – 116.
- <sup>24</sup> Chaves PD.; Ourique AF.; Frank LA.; Pohlmann AR.; Guterres SS.; Beck RC. Carvedilo-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017, 114, pp. 88-95.
- <sup>25</sup> Zhang H.; Zhang J.; Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet.* 2002, 41 (9): pp. 661 – 680.
- <sup>26</sup> Bensky MJ.; Ayalon-Dangur R.; Naamany E.; Gafter-Gvili A.; Koren G.; Shiber S. Comparison of sublingual vs. intramuscular administration of vitamin B12 for the treatment of patients with vitamin B12 deficiency. *Drug Deliv Transl Res.* 2019.

- 
- <sup>27</sup> Solari S.; Cancino A.; Wolff R.; et al. Sublingual tacrolimus administration provides similar drug exposure to per-oral route employing lower doses in liver transplantation: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017. 45 (9), pp. 1225 – 1231.
- <sup>28</sup> Genedy S.; Khames A.; Hussein A.; Sarhan H. Hydralazine HCl rapidly disintegrating sublingual tablets: simple dosage form of higher bioavailability and enhanced clinical efficacy for potential rapid control on hypertensive pre-eclampsia. *Drug Des Devel Ther.* 2018. 12, pp. 3753 – 3766.
- <sup>29</sup> Vimbela V G.; Ngo M S.; Frazee C.; Yang L.; Stout A D. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: pp. 3941 – 3965.
- <sup>30</sup> Wang J.; Zhou Y.; Guo S.; Wang Y.; et al. Cetuximab conjugated and doxorubicin loaded silica nanoparticles for tumor-targeting and tumor microenvironment responsive Binary drug delivery of liver cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C, Elsevier, Volume 76,* 2017, pp. 994 – 950.
- <sup>31</sup> Sverre Grimnes, Ørjan G Martinsen, *Bioimpedance and Bioelectricity Basics,* Academic Press (Imprint of Elsevier), Amsterdam 2015, 584 pp. ISBN 978-0-12-411470-8, doi: doi.org/10.1016/C2012-0-06951-7
- <sup>32</sup> Katharina Guth , Monika Schäfer-Korting , Eric Fabian , Robert Landsiedel, Ben van Ravenzwaay: Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro *Toxicol. in Vitro,* 29 (2015), pp. 113–123, doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.007
- <sup>33</sup> M. Kopečná, M. Macháček, E. Prchalová, P. Štěpánek, P. Drasar, M. Katora, K. Vávrová: Galactosyl pentadecene reversibly enhances transdermal and topical drug delivery *Pharm. Res.,* 34 (2017), pp. 2097-2108. doi 10.1007/s11095-017-2214-3
- <sup>34</sup> Qian Zhang, Michael Murawsky, Terri LaCount, Gerald B. Kasting, and S. Kevin Li: Transepidermal water loss and skin conductance as barrier integrity tests. *Toxicol. In Vitro,* 51(2018) 129–135 doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.009
- <sup>35</sup> JANEČKA, Josef. Sublingvální aplikace léčiv 6. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- <sup>36</sup> SPURNÁ, Martina. Průnik nanočástic sublingvální membránou 1. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

---

<sup>37</sup> DVOŘÁKOVÁ, Pavlína. Průnik nanočástic sublingvální membránou 2. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

<sup>38</sup> <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/fluorescent-microparticles.html>