

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra farmaceutické technologie



Transdermální in vitro permeace metoxytakrinu IV.

Rigorozní práce

Eva Režňáková

školitel: **doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.**
Hradec Králové, září 2006

1. ÚVOD

V posledních letech byla věnovaná zvýšená pozornost použití transdermálních terapeutických systémů. Tento zájem o transdermální přípravky je přisuzován výhodám, které přináší sama transdermální cesta podání.

V roce 1981 byla vyvinuta první transdermální náplast, Transderm-Scop. Záhy ji následovala Transderm-Nitro. Během 80-tých let bylo vyvinuto mnoho dalších transdermálních terapeutických systémů, včetně Nitro-Disc a Catapress-TTS. Další náplasti byly světu představeny v 90-tých letech, např. Estraderm, Duragesic, Testoderm, Deponit, Nitrocine, Minitran a nikotinové náplasti.¹

Léčiva z transdermálních terapeutických systémů převážně permeují přes rohovou vrstvu transcelulárně a intercelulárně a použitá vehikula, rozpouštědla a tenzidy mohou ovlivňovat permeaci léčiva přes - rozdělovací koeficient kůže/vehikulum (afinita k léčivu, permeace rozpouštědla)

- difuzní koeficienty (osmotické vlastnosti, extrakce komponentů kůže)²

Provádí se řada experimentů v oblasti transdermálních terapeutických systémů (TTS). Mimo jiné se zkoumá vliv vehikula TTS na permeaci léčiva. Jako příklad uvedme rezervoárový TTS s testosteronem, který byl vyvinut za použití vehikula etanol/voda (70:30) a u něhož se zkoumala rychlost permeace testosteronu přes etylen-vinyl-acetátovou (EVA) membránu.³Dále se zkoumala difuze nikotinu ze směsi etanol/voda EVA membránou⁴a permeabilita etinylestradiolu EVA kopolymerní membránou s rezervoárem obsahujícím polyetylen glykol a salinická rozpouštědla.⁵

V současné době je na trhu řada transdermálních náplastí, které obsahují EVA matrix. Jsou to např. Durogesic, Estraderm TTS, Oesclim nebo Estragest TTS.

V tomto kontextu se jeví studium permeace 7-metoxytakinu z hydrofilního prostředí jako oprávněné. Představuje potenciální rozšíření aplikace této původní látky domácího původu, mimo jiné z pracovišť katedry toxikologie dnešní FVZ UO v Hradci Králové. Předkládaná práce navazuje na pilotní experimenty provedené na katedře farmaceutické technologie UK-FaF v Hradci Králové již v rámci předchozích kvalifikačních prací. Využívá přitom konsultační spolupráce s doc. MUDr. Jiřím Bajgarem DrSc. a Mgr. J. Bartošovou z výše zmíněného toxikologického pracoviště.

2. CÍL PRÁCE

1. V teoretické části zpracovat informace o Alzheimerově nemoci a léčivech používaných k terapii a možné cesty přechodu léčiv kůží a k tomu se vztahující stavbu kůže.

2. V experimentální části bylo hlavním úkolem rozšířit permeační výsledky, které byly získány na katedře farmaceutické technologie v předchozích letech a navázat na předešlou diplomovou práci Transdermální in vitro permeace metoxytakrinu III.

Dílčí úkoly, které byly zadány:

- a) ověřit permeaci metoxytakrinu z prostředí propylenglykolu a TRIS-pufry;
- b) ověřit vliv přísadky 5% arlasolvu, 5% metylpyrrolidonu, 5% transcutolu a 1% transkarbamu 12;
- c) porovnat výsledky permeace 7-metoxytakrinu z hydrofilního prostředí a permeace z lipofilního prostředí, která byla provedena v rámci mé předcházející diplomové práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Transdermální podání léčiv

Mluvíme-li o transdermálním podání léčiv, je nutné zmínit se o stavbě kůže a možných cestách přechodu látek přes kůži.⁶

3.1.1. Stavba kůže

Kůže (cutis) je rozsáhlý plošný orgán tvořící zevní povrch organismu a tím i bariéru organismu vůči okolí. Představuje účinnou ochranu vůči fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým noxám z okolí a termoregulační systém. Kůže se účastní látkové výměny, jednak tím, že se účastní dýchání, jednak tím, že svými potními a mazovými žlázami představuje orgán exkreční. Kůže se též podílí na funkcích imunitního systému organismu. Vlivem světla se v kůži z prekursoru (ergosterolu) vytváří vitamin D. Kůže obličej, ovládaná mimickými svaly, je též významným prostředníkem psychiky jedince.

Kůže dospělého člověka dosahuje plochy téměř 2 m², tloušťka činí od 0,5 mm do 4 mm (podle krajiny těla). Hmotnost kůže dosahuje 3 kg - je-li však kůže ztluštěná tukovým polštářem, může její hmotnost v extrémních případech dosáhnout až 20 kg.

Kůže má dvě hlavní vrstvy.

Epidermis - pokožka je povrchová vrstva tvořená epitelem ektodermového původu, je to epitel vrstevnatý dlaždicový. Mimo základní buňky – keratinocyty – v různém stadiu jejich vývoje obsahuje i další buňky: melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.

Vrstevnatý epitel, jehož buňky od lamina basalis do určité výše tvoří stratum germinativum, což je vrstva zárodečná, jejíž bazální buňky se mitoticky množí, se směrem k povrchu diferencuje a mění se ve stratum corneum – rohovou vrstvu, která je nositelem bariérové funkce kůže.

K pokožce patří i útvary, které z ní vznikají – deriváty epidermis – chlupy, nehty a kožní žlázy.

Dermis (corium) – škára je fibroelastické kolagenní vazivo se dvěma vrstvami: stratum papillare – povrchová vrstva – přilehlá k epidermis, proti které vybíhá ve vyvýšené papily; stratum reticulare – hlubší, hustší vrstva – dává kůži mechanickou pevnost.

Dermis je septy připoutána k další vrstvě vaziva; je to tela subcutanea – podkožní vazivo.

Epidermis

Buňky epidermis vytvářejí vrstvy:

- Stratum germinativum - je vrstva zárodečná; rozlišují se v ní další dvě vrstvy:
 - stratum basale (cylindricum) – jedna vrstva vyšších buněk při bazální membráně, v níž jedině probíhá buněčné dělení a vznik nových buněk;
 - stratum spinosum – navazuje na stratum basale; buňky se v něm ve 2–5 vrstvách směrem k povrchu oplošťují do tvaru, který je na kolmém řezu kopinatý nebo polyedrický.
- Stratum granulosum - obsahují 1-3 vrstvy buněk, kde se v buňkách začínají vytvářet zrna keratohyalinu; buňky postupují k povrchu, diferencují se a pak podléhají buněčné smrti; po ztrátě jádra se mění ve stratum lucidum, což je tenká vrstva jejíž buňky obsahují eleidin; stratum lucidum přechází přesnou hranicí ve
- Stratum corneum - tato vrstva je složena z plně zrohovatělých buněk; jsou to bezjaderné keratinocyty (někdy označované jako rohové buňky – korneocyty); v kůži jsou pevně sestaveny v 15-25 vrstvách a jsou to vlastně odumřelé buňky. Nejpovrchovější vrstva těchto bezjaderných keratinocytů se průběžně rozděluje v jednotlivé zbytky buněk (stratum disjunctum) a ty se pak postupně odlučují a odpadávají. Keratin, jímž jsou buňky ve stratum corneum vyplněny, je vláknitá bílkovina, specifický produkt keratinocytů. V intercelulárních prostorech je pak tmelová substance, která spojuje stratum corneum v jednotnou lamelu a při tom zabraňuje průniku mnoha látek skrze epidermis.

Rohové deriváty epidermis

- Chlupy - keratinové útvary, které vyrůstají cyklicky a nepravidelně z vchlípenin epidermis, označovaných jako vlasové folikuly.
- Nehty (Unguis) – rohové ploténky na dorsální straně všech konečných článků prstů rukou i nohou.
- Kožní žlázy - deriváty epidermis; dělí se na dvě hlavní skupiny – mazové žlázy a potní žlázy, jichž je více typů a skupin.

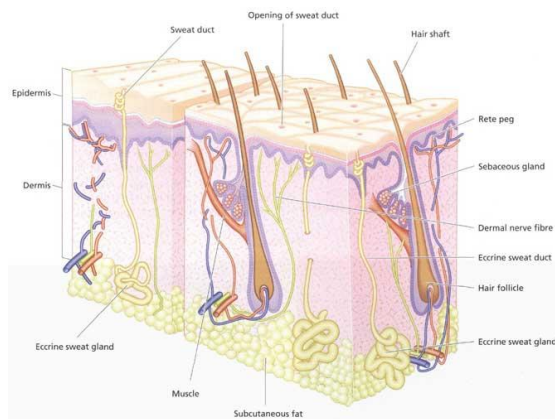
Dermis

Je složená z vaziva se zvlněnými kolagenními a elastickými vlákny; vlákna jsou spojena ve snopce, které jsou plst'ovitě propletené. Tloušťka škóry činí 0,5-2,5 mm. Vrstvy škóry jsou dvě:

- Stratum papillare – povrchová vrstva – obsahuje kromě sítí vláken i větší množství vazivových buněk a je protkaná sítí kapilár.
- Stratum reticulare – hlubší vrstva – obsahuje méně buněk a husté svazky kolagenních fibril, méně fibril elastických.

Tela subcutanea

Podkožní vazivo spojuje kůži; tj. dermis s povrchovou fascií nebo s periostem.⁷



Obrázek 1: Stavba kůže⁸

3.1.2. Cesty přechodu látek přes kůži

Vstup léčiva do kůže

Léčiva vstupují do kůže transadnexálně (přes potní žlázy a přes vlasové folikuly spojené s mazovými žlázami) nebo transepidermálně. (viz. obr. č. 2)

U transadnexálního transportu se obchází cesta penetrace přes stratum corneum. Ačkoliv tyto cesty nabízí vyšší propustnost, jsou považovány za minoritní, protože mají relativně malý povrch, přibližně 0,1 % z celé kůže. Tato cesta je výhodná pro ionty a velké polární molekuly, které velmi těžce permeují skrz stratum corneum.⁹

U transepidermálního transportu je možné navíc rozlišit vstup intercelulární (mezibuněčnými prostory epidermis) a intracelulární, transcelulární (buňkami epidermis). Největší část léčiv prochází intercelulárně a tento vstup řídí – stejně jako méně významný vstup transfolikulární – zákony difúze. Vehikula topických léků se dostávají z povrchu kůže jen do nejsvrchnějších vrstev kůže, do trhlin a šupin rohové vrstvy. Hluběji se dostává jen léčivo uvolněné ze základu, který ho nese.

U transdermálních léků se vytváří předpoklad, aby léčivo, které obsahují, snadno a rychle difundovalo na rozhraní s kůží, přešlo rohovou vrstvou, folikuly chlupů, mazovými a potními žlázami, překonalo ostatní vrstvy kůže a dostalo se ke krevním a lymfatickým kapilárám.¹⁰

Rovnovážný stav fluxu léčiva (angl. steady-state flux) je popsán 1. Fickovým zákonem difúze:⁹

$$J = \frac{KD}{h}(c_0 - c_i)$$

kde J - flux na jednotku plochy

K_p - rozdělovací koeficient látky

D - difuzní koeficient

h - tloušťka membrány

c₀ - koncentrace látky aplikované na povrch kůže

c_i - koncentrace látky uvnitř kůže⁹

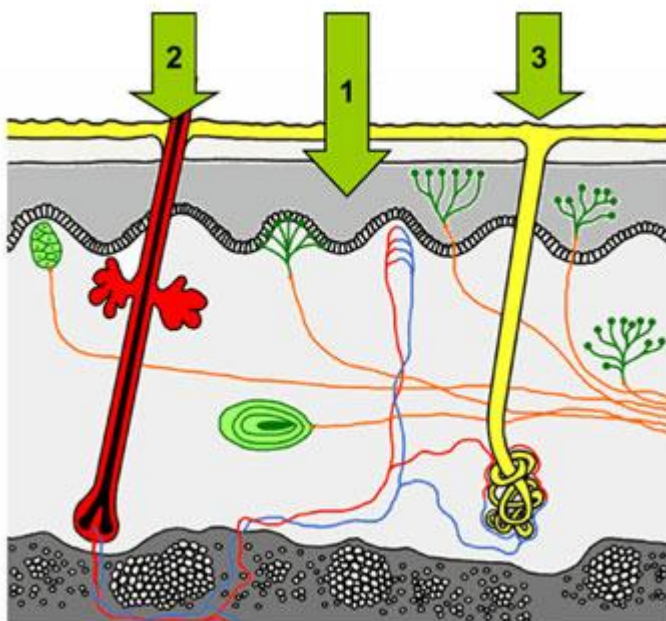
Ustálený (steady) flux se dá vyhodnotit jako úhrnné množství¹¹ difuzní látky permeující danou plochou kůže za časovou jednotku. Flux je typicky vyjádřen jako μg na cm² za hodinu.¹²

Je možné odvodit ideální vlastnosti molekuly dobře penetrující rohovou vrstvou. Těmito ideálními vlastnostmi jsou:

- malá molekulová hmotnost, preferuje se méně než 600, kdy se difuzní koeficient zvyšuje;

- adekvátní rozpustnost v oleji a ve vodě – takže membránový koncentrační gradient (řídící síla difúze) může být vyšší; saturovaný roztok (nebo suspenze mající tu samou maximální termodynamickou aktivitu) podněcuje maximální flux v rovnovážném systému;
- vysoký, ale vyrovnaný (optimální) rozdělovací koeficient (pokud by byl příliš vysoký, mohl by inhibovat clearance životaschopné tkáně);
- nízký bod tání, který koreluje s dobrou rozpustností jaká je předpovězena ideální teorií rozpustnosti.

Rozdělovací koeficient je významný při ustanovení vysoké inicializační koncentrace penetrantu v nejsvrchnější vrstvě stratum corneum. Pokud agens nemá správné fyzikálně-chemické vlastnosti (obvykle je rozdělovací koeficient příliš nízký), vhodná proléčiva mohou mít optimální rozdělovací koeficient a po vstupu do životaschopné tkáně enzymy tyto proléčiva aktivují.¹¹



Obrázek 2: Možné cesty penetrace přes kůži (1) přes neporušenou rohovou vrstvu, (2) přes vlasové folikuly spojené s mazovými žlázami nebo (3) přes potní žlázy (dle ref 9)

Mezi další parametry, které jsou charakteristické pro permeační experimenty kromě výše jmenovaného fluxu, patří Q_{24} , což je úhrnné množství léčiva na jednotku plochy kůže, které projde kůží za 24 hodin. Je vyjádřen jako μg na cm^2 . Jednotlivé údaje z experimentů s akceleranty jsou vyjádřeny pomocí akceleračních poměrů. Akcelerační poměr pro daný akcelerant je vypočítán jako poměr množství penetrující z upraveného vzorku ku množství z kontrolního vzorku.¹³

3.2 Alzheimerova nemoc a její terapie

3.2.1 Demence

Demence jsou závažné stavy charakterizované dominujícími mnestickými a intelektovými poruchami a výrazným úpadkem osobnosti. Kolem dvou třetin demencí tvoří Alzheimerova nemoc, kolem jedné pětiny vaskulární demence, zbytek méně časté příčiny demence.¹⁴

Podle specifických znaků můžeme průběh demence rozdělit do tří stádií na demenci mírnou, středně těžkou a těžkou.

Stadium mírné je charakterizováno poklesem paměti, což se projeví obtížemi při vykonávání běžných denních činností a těžším zapamatováním nových informací. V této fázi je však pacient schopen vést soběstačný život bez potřeby pomoci zvenčí.

Středně těžká demence se vyznačuje značným porušením paměti ve všech jejích složkách, které ovlivňuje schopnost samostatného vykonávání smysluplné činnosti.

Při demenci těžké jsou všechny složky paměti poškozeny natolik, že postižení nejsou schopni vykonávat rutinní činnosti a jsou plně odkázáni na péči okolí.¹⁵

3.2.2. Alzheimerova nemoc

Onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1907 neurologem Aloisem Alzheimerem.¹⁶

Alzheimerova nemoc je nejčastější příčinou demence (70 %). Patří do skupiny atroficko-degenerativních chorob. Některé formy mají familiární výskyt. Presenilní forma

začíná před 65. rokem, senilní forma po této hranici. Postižena je zejména cholinergní transmise z oblasti bazálních částí mozku do kůry a hippocampu, postiženy jsou i neurony produkující CRF či somatostatin.¹⁷

Alzheimerova nemoc se projevuje progredující poruchou paměti, prostorové orientace, ztrátou intelektuálních a sociálních dovedností s emocionální labilitou projevující se agitovaností, úzkostí, depresí nebo agresivitou, je narušen cyklus spánek-bdění.¹⁸

3.2.3. Epidemiologie

Rizikové vlivy

Incidence i prevalence Alzheimerovy nemoci roste s věkem. Ve vysokém věku jsou ženy ohroženější než muži. Incidence presenilní Alzheimerovy nemoci ve věkové skupině 40-60 let kolísá 2,4/100 000 osob/rok, zatímco incidence pozdní formy této nemoci se pohybuje kolem 120-130/100 000 osob/rok¹⁹

Obě formy Alzheimerovy nemoci, raná i pozdní, se s vyšší četností vyskytují v některých rodinách, vykazují tedy familiární agregaci. Předpokládá se, že familiární agregace případů nemoci spjatá s vysokým relativním rizikem je podmíněna kombinací vlivů genetických s vlivy zevního prostředí.²⁰ Rizikovým faktorem pro pozdní formu Alzheimerovy nemoci je nosičství alely ϵ -4 genu pro apolipoprotein E, locus na 12. chromozomu a snad i mutace mitochondriální DNA. Rizikem pro rané formy Alzheimerovy nemoci jsou genové mutace na chromozomech 21, 14 a 1.

Vztah mezi Alzheimerovou nemocí, kouřením cigaret, hliníkem, zinkem a protizánětlivě působícími léky není vyjasněn. Vztah mezi nižším výskytem Alzheimerovy nemoci a vyšší hladinou estrogenů u žen užívající náhradní hormonální terapii v postmenopauzálním období života je předmětem výzkumu.¹⁸

3.2.4. Neurobiologické změny při Alzheimerově nemoci

Průběh nemoci charakterizuje celá řada změn v mozkové oblasti. Projevuje se úbytkem mozkové tkáně - atrofii, mozková kůra může být ztenčená, dutý systém mozku se naopak rozšiřuje. Dochází k zániku mozkových buněk, zejména pak nervových buněk

cholinergního systému, který hraje důležitou roli pro funkci paměti. U postižených Alzheimerovou chorobou se v mozku objevují usazeniny beta-amyloidu, bílkoviny, která tvoří krystalická jádra tzv. Alzheimerových plaků. V těchto ložiscích, umístěných v mozkové kůře následně dochází k odumírání nervových buněk. V nervových buňkách přeměnou TAU proteinu vznikají tzv. neuronální uzlíčky, které vedou k jejich zániku. Nemoc je provázána řadou dalších změn a degenerativních dějů, které nejsou specifické pouze pro její vývoj. Snižuje se mozkový metabolismus glukózy, vzniká nadměrné množství volných kyslíkových radikálů, které již organismus není schopen v dostatečné míře likvidovat. Dochází k úbytku hormonů ovlivňujících reparační procesy v mozku, dále k nadměrnému uvolňování cytokinů, které opět poškozují nervové buňky a v neposlední řadě k zvýšenému otevírání tzv. kalciových kanálů a vstupu přílišného množství kalcia do nervových buněk, v následku čehož jsou ovlivněny přenašeče nervového vzruchu neboli neurotransmitery.²¹

3.2.5. Příznaky Alzheimerovy nemoci

Příznaky Alzheimerovy nemoci, která je nejčastěji nemocí stáří, se vyvíjejí plíživě. Rozlišení od příznaků doprovázejících klinicky normální stárnutí nemusí být zpočátku jednoduché.²² Nejčastěji se uvádí, že prvním příznakem bývají poruchy recentní epizodické paměti s charakteristickým zapomínáním každodenních událostí. ("Co jsme měli k obědu?"). Ve stupni vývoje nemoci, jenž se označuje jako mírný, se typicky objevuje porucha vybavování čerstvě uložených paměťových dat a porucha konfrontačního pojmenování.

Jazyk je při vývoji Alzheimerovy nemoci zpočátku rovněž uchován, chování nemocných se proto pojmenovává sociální fasádou. Řeč je sice plynulá, nicméně je obsahově prázdná; význam slovních spojení je nutné hledat, nemocní sami často hledají slova. Pravidelně se projevují i poruchy vizuospeciálních funkcí. Nemocní začnou bloudit, nenalézají cestu domů, zapomínají, jak se jde do míst, která navštěvovali desítky let, například na poštu nebo do obchodu. Některé nemocné postihnou i poruchy exekutivních funkcí vázaných na čelní laloky: přestanou být schopni plánovat i velmi jednoduché činnosti, což se projevuje vynecháváním a záměnami pořadí akcí v průběhu běžných domácích prací. Přibližně u 40% nemocných se začnou projevovat poruchy ne-kognitivních funkcí, například deprese, halucinace a agresivita.

Alzheimerova nemoc obvykle probíhá 3-8 let. Muži na tuto chorobu umírají dříve než ženy.

V pokročilé fázi onemocnění klesá schopnost pacientů komunikovat s okolím. Nemocní bývají apatičtí, přestávají poznávat přátele i příbuzné. Nakonec přijdou i o schopnost udržet oční kontakt s lidmi, kteří o ně pečují. Nejsou s to udržet se vsedě. Jsou inkontinentní a němí.¹⁸

3.2.6. Terapie Alzheimerovy nemoci

Alzheimerovu chorobu v současnosti vyléčit nelze.¹⁵ Není ještě zcela známa etiopatogeneze této nemoci.¹⁸ Včasné zahájení léčby nabízí však možnost průběh onemocnění značně zpomalit.¹⁵

Terapie Alzheimerovy nemoci má být komplexní. Zahrnuje farmakoterapii, psychosocioterapii (především kognitivní trénink a další behaviorální postupy), léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci tělesných funkcí a v neposlední míře i práci s rodinou a dalšími pečovateli nemocného.¹⁸

Farmakoterapii Alzheimerovy nemoci můžeme rozdělit zhruba do dvou skupin: A) Kognitivní farmakoterapie, B) Nekognitivní, symptomatická farmakoterapie.

1. Kognitivní farmakoterapie Alzheimerovy nemoci

Porucha některých neurotransmitérových systémů

U Alzheimerovy nemoci je postižen nejvíce mozkový anticholinergní systém. Postižen je především presynaptický oddíl neuronu, zatímco postsynaptická část zůstává poměrně intaktní. Přesto však zůstává schopnost syntézy a uvolnění acetylcholinu do jisté míry zachovaná.

A/ Substitute prekursorů acetylcholinu

Substituce samotným acetylcholinem není možná – acetylcholin má velmi krátký poločas. Cholin se neosvědčil mj. pro své depresogenní efekty. Nejužívanější jsou stále lecitiny (deriváty glycerolu se substituovaným fosfatidylcholinem a mastnými kyselinami). Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu.

B/ Použití inhibitorů acetylcholinesterázy:

Acetylcholinesteráza je enzym odbourávající acetylcholin v CNS. Zablokováním tohoto odbourávajícího enzymu zvýšíme množství acetylcholinu schopného vazby na své receptory. Používají se především přípravky z následujících skupin:

- Karbamáty – rivastigmin
- Piperidinové přípravky – donepezil
- Akridinové přípravky – takrin, u něhož byla zjištěna určitá hepatotoxicita. Jiné deriváty takrinu jsou např. velnakrin, suronakrin nebo u nás vyvinutý **7-metoxytakrin**
- Deriváty organofosfátů – metrifonat
- Alkaloidy – galantamin, huperzin A

C/ Použití agonistů muskarinových i nikotinových acetylcholinergních receptorů:

Jako účinný postup ke zlepšení kognitivních funkcí se ukázala především stimulace muskarinových receptorů typu M1. Ze specifických inhibitorů M1 je klinicky zkoušen např. xanomelin a milamelin.

D/ Ovlivnění acetylcholinergního systému pomocí jiných neurotransmitérových systémů

Acetylcholinergní systém je pod vlivem tonické inhibice GABAergního systému. Hledají se látky, které by parciálně inhibovaly GABA-receptory tak, aby došlo k odblokování této tonické inhibice. Mezi perspektivní látky náleží např. některá farmaka ze skupiny β -karbolinů. Obdobně zvyšuje výkonnost acetylcholinergního systému inhibice sérotonergních receptorů typu 5₃, což působí např. ondasetron.

E/ Jiné způsoby ovlivnění acetylcholinergního systému

Některá farmaka, např. indeloxazin, zvyšují uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení. Acetyl-L-karnitin zlepšuje příjem prekurzorů acetylcholinu do neuronu.¹⁸

U Alzheimerovy nemoci jsou také popisovány deficity jiných neurotransmiterů a neuromediátorů než je acetylcholin. Konstantně je popisován deficit somatostatinu. Tato látka má velmi krátký poločas, proto jsou vyvíjeny deriváty s retardovaným účinkem. Deficit serotoninu není popisován konstantně. Přesto podávání selektivních inhibitorů reuptake serotoninu (fluoxetin) může u Alzheimerovy nemoci přinést určitý benefit.²³

Tvorba patologických proteinů

Tvorba a ukládání β -amyloidu je u Alzheimerovy nemoci základní neurodegenerativní změnou. Při současném stavu vědění však není možné tento proces ovlivnit. Podání kognitiv určitým způsobem mírní proces amyloidogeneze.

Další patologický protein, který se uplatňuje v patogenezi Alzheimerovy nemoci, je degenerovaný τ -protein tvořící neuronální klubka. Degeneraci τ -proteinu zatím rovněž nedovedeme ovlivnit, experimentuje se s určitými proteázami.¹⁸

Látky zlepšující mozkový metabolismus

U demencí bývá zjišťován defekt oxidativního mozkového metabolismu. Proto se používají tzv. zvyšovače mozkového metabolismu jako jsou dihydrované námelové alkaloidy (dihydroergotoxin), ale především nootropní farmaka²⁴ a to zejména jako součást kombinované farmakoterapie. Jedná se o látky - piracetam, deriváty piracetamu (aniracetam a pramiracetam), pyritinol, meklofenoxat, naftidrofuryl, směs nicergolin, extractum ginkgo biloba.¹⁸

Látky likvidující volné kyslíkové radikály

Používají se látky označované obvykle jako scavengery (= zametači) volných kyslíkových radikálů. Náleží zde např. α -tokoferol, kyselina askorbová, retinol, melatonin, některá nootropní farmaka a tzv. lazaroidy, látky odvozené od steroidních hormonů s 21 uhlíky (např. tirilazad).

Inhibitor monoaminoxidázy B-typu selegilin snižují tvorbu volných radikálů tím, že zamezuje biodegradaci dopaminu. Toto použití je ale spíše empirické.¹⁸

Parciální nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů

Glutamátergní systém je taktéž u Alzheimerovy nemoci poškozen. Nadměrným uvolněním excitačních aminokyselin (glutamat, aspartát aj.) dochází k postižení jednoho ze základních mechanismů paměti - dlouhodobé potenciace. Tento mechanismus se odehrává na tzv.

NMDA ionotropním receptoru excitačních aminokyselin. Klinicky je používán zatím jediný přípravek a to memantin.²⁵

Nesteroidní antirevmatika

U Alzheimerovy nemoci jsou ověřovány účinky nesteroidních antirevmatik včetně kyseliny acetylsalicylové, dosavadní efekty však nejsou dostatečné.²⁴

Další přístupy

Byla zkoušena řada dalších farmakoterapeutických přístupů, ale ani jeden z nich neprokázal klinicky dostatečnou účinnost. Jedná se například o použití prekurzorů nervových růstových hormonů (prekurzoru nervových růstových faktorů cerebrolysinu). Estrogenní stimulace postklimakterických žen se rovněž ukázala neúčinná v terapii Alzheimerovy choroby. Rovněž výsledky terapie statiny nejsou dostatečné.

Očekávané přístupy v blízké budoucnosti

Jako perspektivní metoda je zkoušena vakcinace beta-amyloidem, ale klinické studie byly pozastaveny pro výskyt postvakcinačních encefalitid. Jsou vyvíjeny inhibitory beta- a gama sekretáz, zamezující tvorbu degenerativního proteinu beta-amyloidu. Zkoušeny jsou inhibitory enzymu glykogenu syntáza kináza 3 beta (GSK-3 beta), rovněž zamezující tvorbě beta-amyloidu, i další postupy. Žádný z nich však není v současnosti používán klinicky.²⁵

2. Nekognitivní farmakoterapie

Tento typ farmakoterapie se používá k léčbě přidružených, nekognitivních symptomů Alzheimerovy nemoci. Mezi takovéto příznaky náleží např. paranoidně halucinatorní syndromy, stavy neklidu, poruchy spánku, depresivní nebo úzkostné stavy.

Nebiologické terapeutické přístupy

Terapie Alzheimerovy nemoci má být komplexní. Je tedy nezbytná psychosocioterapie. Základní je správný psychologický přístup k pacientovi trpícímu demencí.¹⁸

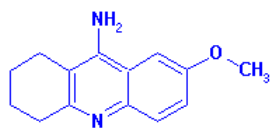
3.3 7-metoxytakrin

Synonymem je 9-amino-7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin a jeho strukturní vzorec je zobrazen na obr.č.3.

7-metoxytakrin je originální českou cholinergní látkou, která byla vyvinuta v laboratořích Vojenské lékařské akademie v Hradci Králové.²⁶ 7-metoxytakrin je derivátem takrinu s nižší toxicitou. Takrin nebo-li tetrahydroakridin¹⁷ patří do skupiny první generace inhibitorů acetylcholinesterázy. Jako první byl uznán americkou organizací FDA (US Food and Drug Administration) lékem pro symptomatickou léčbu pacientů s mírnou až středně těžkou formou Alzheimerovy demence. Mezi nejdůležitější nežádoucí účinky patří jeho (asymptomatická a přechodná) hepatotoxicita, dále nauzea a zvracení, anorexie a průjem. Je možné genetickými metodami najít pacienty s lepší odpovědí na takrin ještě před začátkem léčby.²⁷

7-metoxytakrin je novým reverzibilním inhibitorem acetylcholinesterázy.²⁸ Má vliv na léčbu onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, v níž redukuje cholinergní neurotransmisi.²⁹ Další z možných indikací 7-metoxytakrinu v klinické praxi je léčba tarditivní dyskineze²⁶, neuroleptické hypertermie³⁰, abstinenčního syndromu, při předávkování látkami s anticholinergním působením³¹ a má příznivé působení na neuropsychiatrické poruchy vyskytující se u Parkinsonovy choroby.³²

In vitro studiemi na laboratorních potkanech byla zjištěna biotransformace této anticholinergní látky 9-amino-7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinu. Hlavními identifikovanými metabolity ve zvířecí moči byly 9-amino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin a jeho konjugát s kyselinou glukuronovou a sírovou, stejně tak jako 9-amino-1-hydroxy-7-metoxy -1,2,3,4-tetrahydroakridin a 9-amino-2-hydroxy-7-metoxy -1,2,3,4-tetrahydroakridin.³³



Obrázek 3: 7-metoxytakrin³⁴

7-metoxytakrin se zatím v klinické praxi podává v injekční a perorální formě. V předkládané diplomové práci je snaha ověřit permeační potenciál této látky s malou molekulou a lipofilní povahou, která má tudíž výborné předpoklady k transdermální aplikaci. Navazuje na předchozí práce prováděné s bází 7-metoxytakrinu jako takovou nebo společně s různými akceleranty transdermální penetrace.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy	Sartorius, Göttingen
Autosampler AS 10	Ecom, Praha
Digitální pH-metr BT 120	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod
Digitální váhy	Kern, Albstadt
Kolonový termostat LCO 102	Ecom, Praha
Liberační zařízení	UK - FaF, Hradec Králové
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha
Lednička s mrazničkou	Ardo, Itálie
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble
UV detektor LCD 2040	Ecom, Praha
Vysokotlaké čerpadlo HPP 5001	Ecom, Praha

4.2 Použité suroviny

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Praha
Arlasolve	
Azid sodný p.a.	Fluka, Buchs
Etanol 96%	Kulich, Hradec Králové
Chloroform	Lachema, Neratovice
Kyselina chlorovodíková 36%	Lachema, Neratovice
1-metyl-2-pyrrolidon	Fluka, Buchs
7-metoxytakriniumchlorid laktát	FVZ UO, Hradec Králové
Metanol pro HPLC	Sigma-Aldrich, Praha
Propylenglykol	Kulich, Hradec Králové

Transcutol

Transkarbam 12	UK - FaF, Hradec Králové
Triethylamin	Merck, Schuchardt
TRIS-pufr	Sigma-Aldrich, Praha
Voda čištěná	UK - FaF, Hradec Králové

Uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti podle daných norem výrobců, resp. dodavatelů. Transkarbam 12 o čistotě vyšší než 99 % byl syntetizován Doc. PharmDr. A. Hrabálkem, CSc. na katedře anorganické a organické chemie UK - FaF v Hradci Králové.

4.3 Biologický materiál

Pro permeační pokusy byla použita kůže z uší prasnic. Ucho se nejdříve pečlivě omylo pod tekoucí vodou, aby se zbavilo nečistot. Poté se oholily štětiny z vnější strany ucha. Celá kůže se pak skalpelem odřezala od chrupavky a ponořila do roztoku 0,9 % chloridu sodného a poté do roztoku 0,02 % azidu sodného. Tato kůže o plné tloušťce byla následně uložena do sáčků z polyethylenové folie a po evakuaci a zatavení sáčků uchována v mrazničce při teplotě - 20°C.

4.4 Příprava akceptorové fáze

Pro experiment jsem využila poznatky z mé diplomové práce.³⁵

Použila jsem akceptorovou fázi složenou ze dvou dílů etanolu 96 % a 8 dílů tlumivého roztoku TRIS-pufu o pH 7,1.

Příprava TRIS-pufu (pH=7,1) pro permeační pokusy:

Složení: TRIS-pufr (C ₄ H ₁₁ NO ₃).....	24g
Azid sodný.....	0,02g
Kyselina chlorovodíková 36%.....	q.s.
Voda čištěná.....	ad 1000g

Postup přípravy TRIS-pufru:

Po navážení potřebného množství TRIS-pufru a azidu sodného (konzervační přísada) se látky rozpustily po doplnění vodou na 1000 g za použití magnetické míchačky.

Za stálého míchání na magnetické míchačce bylo změřeno pH na kalibrovaném pH-metru a pomocí kyseliny chlorovodíkové 36 % bylo upraveno na hodnotu 7,1. Takto připravený TRIS-pufř se uchovával v lednici při teplotě 5°C.

Připravený tlumivý roztok TRIS-pufru byl smísen s etanolem 96 % v poměru 8:2. Získaná akceptorová fáze byla také uchovávána v lednici při teplotě 5°C, a v průběhu permeačních pokusů byla umístěna v termostatované vodní lázni temperované na 37°C.

4.5 Příprava vzorků

7-metoxytakrin laktát byl v potřebném množství navážen a převeden do formy suspenze v propylenglykolu a TRIS-pufru v poměru 1:1 na magnetické míchačce za teploty 40°C tak, aby výsledné pH suspenze bylo 7,05.

V případě, že se do takto připravené suspenze přidával akcelerant, bylo jeho potřebné množství přidáno a homogenizováno za stejných podmínek. Připravené vzorky byly uchovávány v termostatu při teplotě 32°C.

4.6 Věcná náplň permeačních pokusů

Permeační experiment

Bylo připraveno 20 ml 0,5% suspenze 7-metoxytakrin laktátu v propylenglykolu a TRIS-pufru v poměru 1:1 (pH = 7,05).

Do 3 ml takto připravené suspenze byl přidán 1-metyl-2-pyrrolidon tak, aby jeho výsledná koncentrace činila 5%. Do dalších 3 ml suspenze byl přidán transcitol tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 5%. Do 3 ml suspenze byl přidán arlasolve tak, aby jeho výsledná koncentrace činila 5% a do stejného množství suspenze byl přidán transkarbam 12 tak, aby jeho koncentrace činila 1%.

Každá z připravených suspenzí byla vnášena do tří liberačních buněk.

4.7 Uspořádání permeačních pokusů

Pro experiment byly použity Franzovy - difúzní cely, které byly umístěny v termostátované vodní lázni temperované na teplotu 37°C.

Franzova - difúzní cela se skládala z donorové fáze, permeační bariéry, kterou představovala prasečí kůže, a akceptorové fáze.

Jednotlivé vzorky kůže byly fixovány mezi dvě destičky z plexiskla s otvorem o ploše zhruba 2 cm², které byly utěsněny silikonovým adhezivem. Na vnější stranu kůže byla vnášena donorová fáze, kterou představovala suspenze 7-metoxytakrinu s nebo bez akceleraantu, v množství 400 µl. Tato byla překryta sklíčkem, aby se nevypařovala. Pod bariérou byl kompartment naplněn akceptorovou fází s magnetickým míchadlem. Objem plněné akceptorové fáze činil 20 ml a ten, který se zde už nevešel, byl odečten s přesností na 0,1 ml.

V časových intervalech po 3; 6; 9; 12; 24; 27; 30 a 33 hodinách byly odebírány vzorky z akceptorové fáze ke stanovení 7-metoxytakrinu v objemu 0,8 ml. Stejný objem čisté akceptorové fáze temperovaný na teplotu 37°C byl následně doplněn. Pokud byl úbytek akceptorové fáze větší v důsledku vypařování, daný objem byl doplněn a při zpracování získaných koncentračních dat byl vždy uvažován při závěrečných výpočtech.

4.8 Analytická metodika

4.8.1 Podmínky HPLC stanovení 7-metoxytakrinu

Množství 7-metoxytakrinu ve vzorcích akceptorového média bylo stanovováno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Mobilní fázi tvořila směs acetonitrilu, metanolu, triethylaminu a vody v poměrech 20:25:1:55.

Tato směs byla vždy před naplněním do chromatografické soustavy odplyněna na ultrazvukové lázni po dobu 10 až 15 minut. Průtok mobilní fáze činil 1,6 ml/min.

Stacionární fázi tvořila kolona LiChroCART® (Merck) o průměru 4mm, délce 250 mm, s náplní Lichrospher 60 Rp-select B o velikosti částic 5µm.

Detekce byla prováděna UV-spektrofotometricky při vlnové délce 348 nm.

Kolona byla uložena v termostatu při teplotě 50°C.

Objem vzorku dávkovaného autosamplerem na kolonu byl vždy 100 µl, přičemž každé stanovení bylo provedeno dvakrát.

4.8.2. Příprava kalibračních roztoků

Základní roztok 7-metoxytakrinu byl připraven navážením 10,0 mg báze 7-metoxytakrinu a jeho rozpuštěním ve 100 ml akceptorové fáze (TRIS-pufr o pH 7,1 a etanol 96% v poměru 8:2) v odměrné baňce.

Ze základního roztoku a čisté akceptorové fáze byly ředěním připraveny další pracovní kalibrační roztoky o koncentracích 1; 0,5; 0,3; a 0,1 mg na 100 ml.

Přesná koncentrace ve vzorcích 7-metoxytakrinu byla stanovována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Každý kalibrační roztok byl změřen nejméně sedmkrát.

Z výsledků měření byla následně sestrojena kalibrační křivka pomocí lineární regrese. Výpočet koncentrace kalibračním přepočtem ploch píků byl proveden pomocí softwaru, který je k dispozici na katedře farmaceutické technologie.

Byla získána následující rovnice přímky:

$$\text{Plocha píku} = 70,4 \cdot C_{nk} + 1,2$$

Závislost y na x byla prokázána se spolehlivostí 99,9 %, hodnota korelačního koeficientu r byla 0,968.

4.9 Výsledky měření

První experimentální data byla získána při HPLC stanovení 7-metoxytakrinu v jednotlivých odběrech akceptorové fáze, která byla dále přepočítána na odpovídající koncentrační údaje, jako nekorigovaná koncentrace c_{nk} [mg/100 ml] a po korelaci

zohledňující průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze jako korigovaná koncentrace 7-metoxytakrinu c_k [mg/100 ml]. Takto získané údaje jsou pro jednotlivé donorové vzorky obsaženy ve vybraných protokolech části **5. Dokumentace permeačních pokusů**. Tyto protokoly obsahují v tabulkové a grafické formě všechna získaná data.

Další postup přepočtu koncentračních dat spočíval v zohlednění rozdílnosti objemů akceptorové tekutiny v jednotlivých buňkách a tím, aby byly získány údaje o skutečném množství 7-metoxytakrinu prošlého kožní membránou Q_t [mg] a množství 7-metoxytakrinu prošlého 2 cm^2 kožní membrány Q_t [mg/cm²]. Tyto výsledky jsou graficky znázorněny v příslušných protokolech pomocí lineární regrese. Hodnoty směrnice k , které jsou číselně shodné s hodnotami fluxů J [μg/cm².h⁻¹], jsou společně s hodnotami r (korelační koeficient) a hodnotami q (absolutní člen) uvedeny v dokumentaci permeačních pokusů.

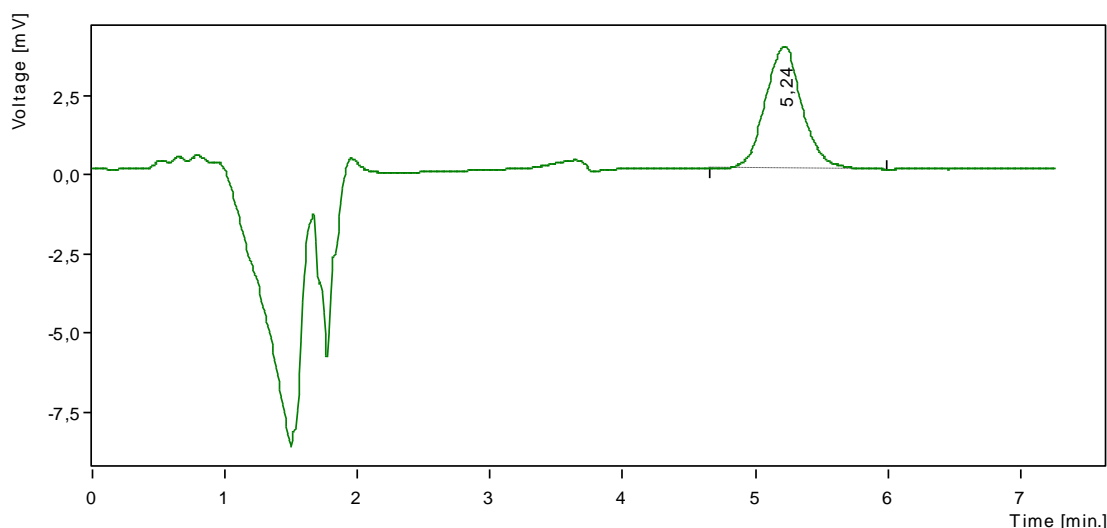
5. DOKUMENTACE PERMEAČNÍCH POKUSŮ

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro provedení permeačních experimentů jsem zvolila akceptorové médium, které se již osvědčilo v mé diplomové práci. Akceptorové médium bylo složeno ze dvou dílů etanolu 96% a osmi dílů TRIS-pufro o pH 7,1. Uvedené pH vyhovovalo testovanému léčivu, kožním štěpům i akceleračním. Zároveň byl splněn požadavek, aby akceptorové médium neinterferovalo se stanovením 7-metoxytakrinu v UV oblasti.

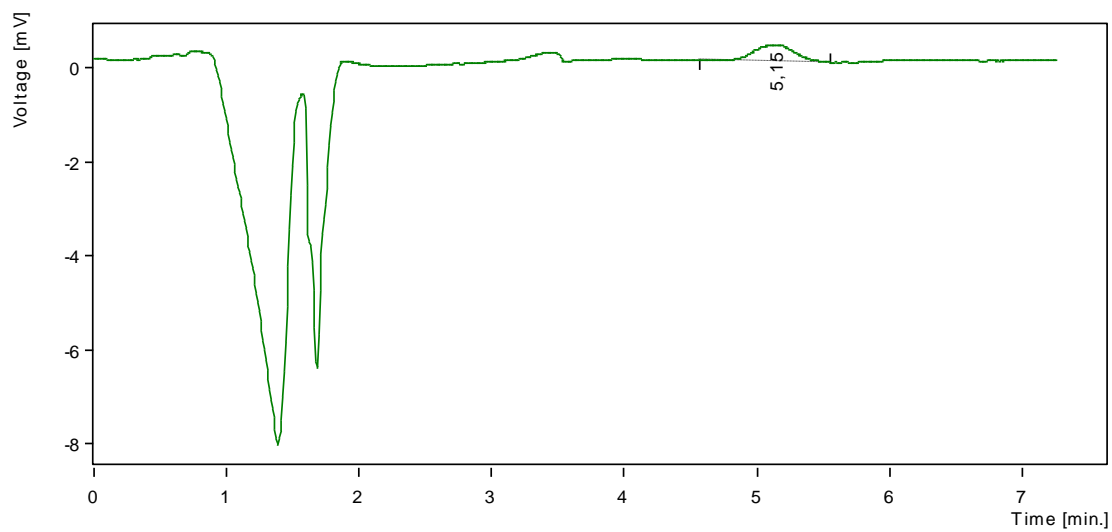
V již předchozích experimentech provedených na katedře farmaceutické technologie bylo zjištěno, že využitá analytická metodika, kterou jsem použila pro stanovení 7-metoxytakrinu v akceptorové fázi permeačních pokusů, byla dostatečně citlivá a pro daný účel zcela vyhovující. Mobilní fázi tvořila směs metanol : acetonitril : triethylamin : voda v poměrech 25:20:1:55. Tyto chromatografické podmínky zajistily dobrou separaci píků v retenčních časech okolo 5,5 minut (viz **graf 1**). Ovšem někdy se vyskytly retenční časy delší v důsledku poruchy detektoru.

Graf 1: Chromatogram standardu 1mg/100 ml 7-metoxytakrinu v akceptorové fázi

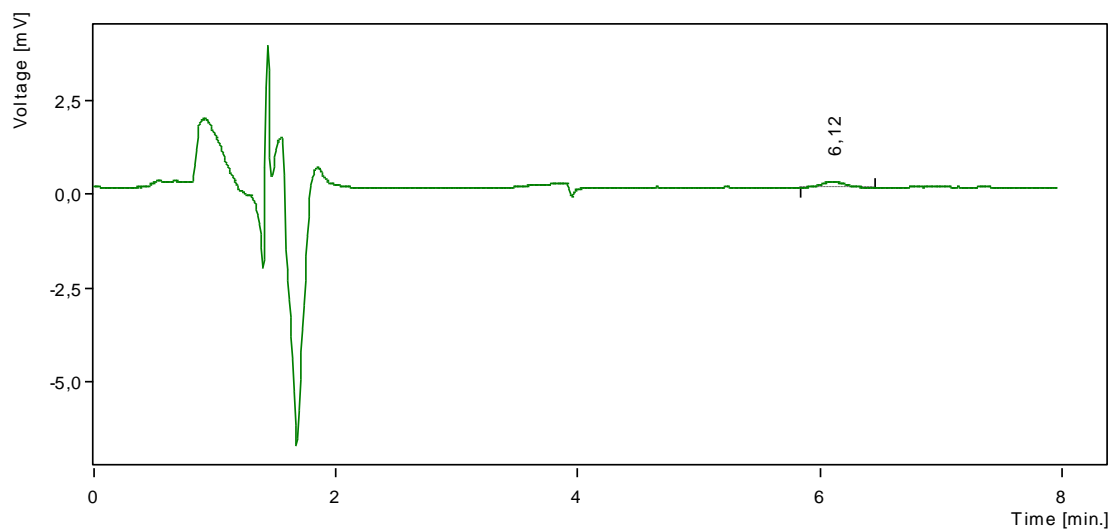


O vhodnosti podmínek HPLC stanovení svědčí porovnání chromatografických záznamů ze stanovení standardů 7-metoxytakrinu (viz **graf 2**) a také z měření vzorků z permeačních pokusů, jak je zřejmé z **grafů č. 3 a 4**.

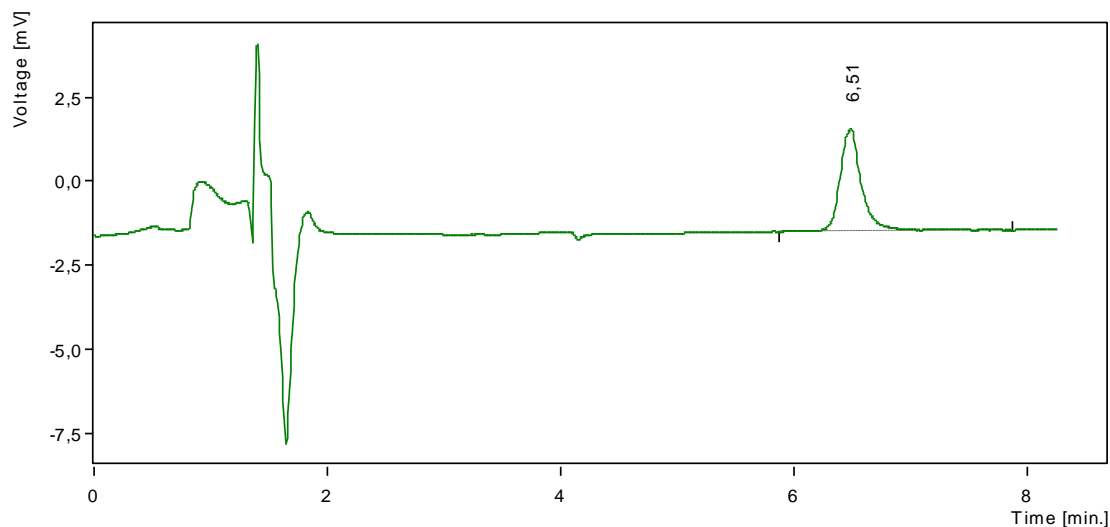
Graf 2: Chromatogram standardu 0,1mg/100ml 7-metoxytakrinu v akceptorové fázi



Graf 3: Chromatogram vzorku permeace 7-metoxytakrinu ze suspenze v propylenglykolu a TRIS-puftru bez přidavku akcelarantu v akceptorové fázi po 12 h permeace

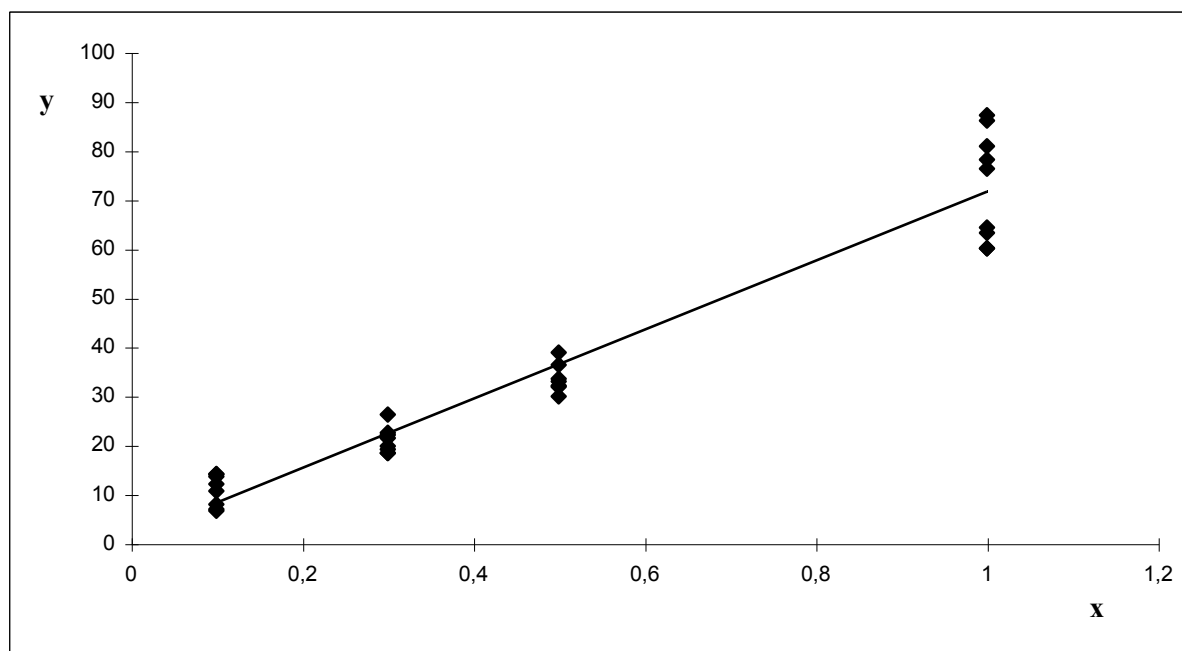


Graf 4: Chromatogram vzorku permeace 7-metoxytakrinu ze suspenze v propylenglykolu a TRIS-puftru s přidavkem 1% transkarbamu 12 v akceptorové fázi po 33 h permeace



Dobré hodnocení i velmi nízkých koncentrací léčiva, které se vyskytovaly převážně v raném začátku přechodu do akceptorového média, umožňovala získaná kalibrační závislost (viz **graf č.5**). Tato byla pro účely pokusu dostatečně jednoznačná.

Graf 5: Kalibrační závislost 7-metoxytakrinu



V předchozích experimentech provedených na katedře farmaceutické technologie byl zkoušený donorový vzorek vždy v lipofilní formě, kdy testované léčivo bylo suspendováno v izopropylmyristátu. Léčivo bylo také předem upraveno převedením z formy soli na bazi.

V mém experimentu jsem vyzkoušela použít pro permeaci samotnou sůl 7-metoxytakrin laktát, kterou jsem suspendovala za zvýšené teploty 40°C v hydrofilním médiu. Hydrofilní médium představovala směs propylenglykolu a TRIS-pufry v poměru 1:1 tak, aby výsledné pH této vodné fáze činilo 7,05. Bylo tedy nutné vytvořit alkalické prostředí pro permeaci léčiva.

Všechny výsledky byly získány s paralelní kontrolou stability 7-metoxytakrinu za podmínek permeace.

Ze zpracovaných údajů, jak jsou v úplnosti uvedeny v předcházející dokumentační části **5. Dokumentace permeačních pokusů** této práce v **protokolech č.1 až 16**, je zřejmé, že se jedná o výsledky věrohodné, dobře hodnotitelné a konzistentní.

Hlavním sledovaným parametrem permeačních pokusů byla hodnota fluxů **J** [$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$] léčiva. Jednalo se o postup zajišťující co největší standardizaci odečtu steady state permeační fáze. Pro každou kumulativní závislost koncentrace na době trvání pokusu byl vyhledán úsek, kterým bylo možné proložit přímkou. U některých průběhů jsou vynechány při grafickém znázornění jako odlehlé ty body, které neodpovídají těmto požadavkům.

U permeací 1P1 až 1P8 na prasečím uchu 1 (PU1), které bylo silnější, znamenaly hodnoty naměřené po 30 a 33 hodinách raný začátek průběhu permeace. Hodnoty jsou zde velmi nízké, na hranici detekovatelnosti a navíc značně nestálé.

U permeací 1P9 až 1P16, na tenčím prasečím uchu 2 (PU2), byly vynechány první 3 body, tedy hodnoty po 6, 9 a 12 hodinách. A to z toho důvodu, abychom se k náběhové větvi dostali dříve.

Za první zmínku k průběhu permeací stojí, že ačkoliv byly vzorky měřeny již po 3 hodinách permeace, první interval, v němž byl 7-metoxytakrin detekován v akceptorové fázi byl po 6 hodinách. Množství permeovaného 7-metoxytakrinu narůstalo pravidelně. Plynulý koncentrační nárůst trval prakticky déle než 30 hodin.

Hlavním sledovaným parametrem byla tedy hodnota fluxů. Všechny relevantní hodnoty fluxů, tedy takové, které odpovídaly všem nárokům na správnost odečtu hodnot i s přihlédnutím k celkovému charakteru permeačních křivek, jsou uvedeny v **tabulkách č. 1 a 2**.

Tab. 1: Souhrnné výsledky permeací 7-metoxytakrinu ze suspenze propylenglykolu a TRIS-pufu (prasečí ucho 1)

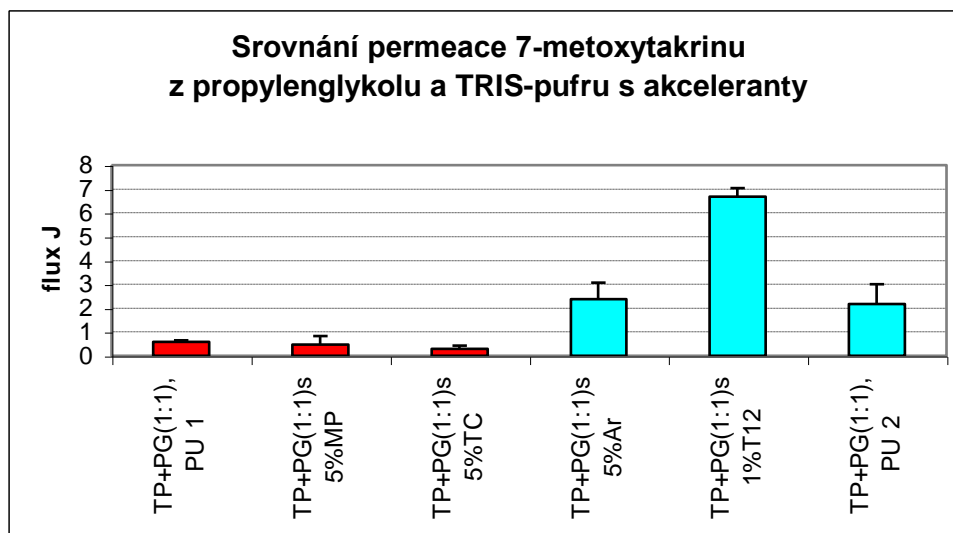
Kód donoru	Kód permeace	Korelační koeficient <i>r</i>	Počet hodnot <i>n</i>	Flux <i>J</i> [μg/cm ² .h ⁻¹]	Průměr <i>J</i>	<i>sd</i>
TRISpufu 7,1+PG	1P1	0,814285	7	0,54		
TRISpufu 7,1+PG	1P2	0,919553	7	0,63	0,59	0,07
TRISpufu 7,1+PG+5%MP	1P3	0,880341	6	0,36		
TRISpufu 7,1+PG+5%MP	1P4	0,852773	7	0,87		
TRISpufu 7,1+PG+5%MP	1P5	0,563875	6	0,21	0,48	0,35
TRISpufu 7,1+PG+5%TC	1P6	0,695692	7	0,33		
TRISpufu 7,1+PG+5%TC	1P7	0,985029	7	0,13		
TRISpufu 7,1+PG+5%TC	1P8	0,821401	7	0,41	0,29	0,14

Tab. 2: Souhrnné výsledky permeací 7-metoxytakrinu ze suspenze propylenglykolu a TRIS-pufru (prasečí ucho 2)

Kód donoru	Kód permeace	Korelační koeficient r	Počet hodnot n	Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$]	Průměr J	sd
TRIS-pufr 7,1+PG+5% Ar	1P9	0,982447	4	3,14		
TRIS-pufr 7,1+PG+5% Ar	1P10	0,994759	3	2,17		
TRIS-pufr 7,1+PG+5% Ar	1P11	0,918058	3	1,80	2,37	0,69
TRIS-pufr 7,1+PG+1% T12	1P12	0,994146	4	6,29		
TRIS-pufr 7,1+PG+1% T12	1P13	0,999196	4	7,01		
TRIS-pufr 7,1+PG+1% T12	1P14	0,99257	4	6,76	6,68	0,36
TRIS-pufr 7,1+PG	1P15	0,966472	4	2,77		
TRIS-pufr 7,1+PG	1P16	0,631711	4	1,60	2,18	0,83

Naměřené průměrné hodnoty fluxů J [$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$] 7-metoxytakrinu jsou pro celkové porovnání výsledků ilustrovány na **grafu č. 6**.

Graf č. 6: Souhrnné hodnoty J fluxů [$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$] 7-metoxytakrinu ze suspenzí v propylenglykolu a TRIS-pufru s jednotlivými akceleranty



Z tohoto grafického zobrazení, v němž jsou ke každé průměrné hodnotě fluxu vyznačeny také příslušné směrodatné odchylky (těchto průměrných hodnot) se ukazuje to, že rychlost, respektive mohutnost permeace, je pro donorové vzorky relativně nízká a velmi různorodá.

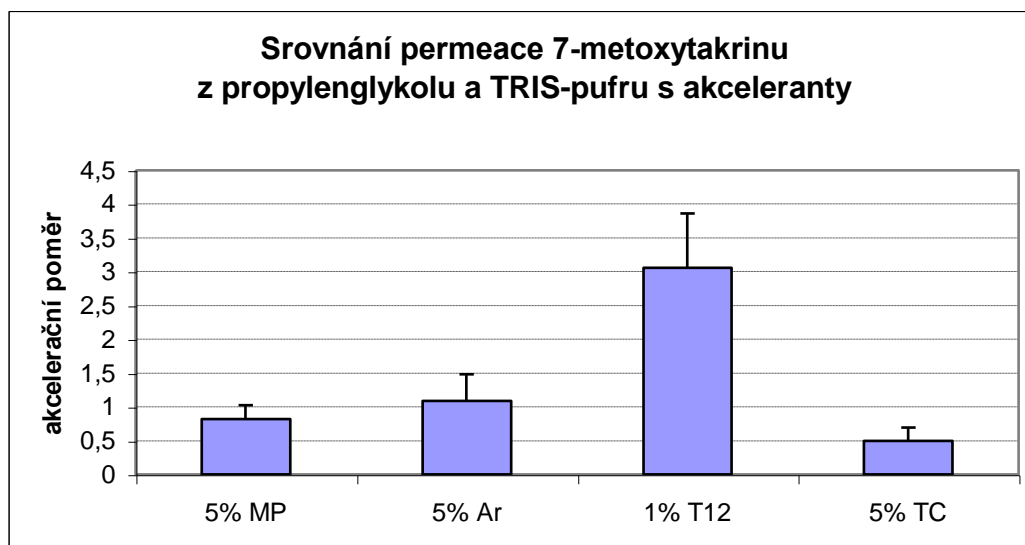
Velmi rozdílné hodnoty fluxů J donorových vzorků v **tabulce 1** a v **tabulce 2** jsou způsobeny rozdílnou tloušťkou kůže prasečích boltců. Z **grafu č. 6** je patrné, že kůže z prasečího boltce PU2 byla výrazně tenčí než kůže PU1. A tedy i hodnoty fluxů J jsou odlišné, což je možné nejlépe posoudit porovnáním permeací donorových vzorků 7-metoxytakrinu z TRIS-pufu a propylenglykolu bez přídavku akceleračního pufru na jednotlivých prasečích uších (PU1 a PU2). Průměrná hodnota fluxu J permeace 7-metoxytakrinu z TRIS-pufu a propylenglykolu na PU1 byla $0,59 \text{ } [\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}]$, kdežto na PU2, které bylo výrazně tenčí, byla hodnota fluxu J $2,18 \text{ } [\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}]$. Ovšem odlišnost tloušťky prasečích boltců je patrná i na donorových vzorcích s přídavkem akceleračních pufrů arlasolvu a transkarbamu 12, které vykazovaly mohutnější permeaci než vzorky s akceleračními puframi transcutol a 1-metyl-2-pyrrolidon.

Proto byl k dalšímu komentáři využit jiný parametr permeace, a to **akcelerační poměr**. Akcelerační poměr je vyjádřen jako poměr toku vehikula s akceleračním pufrům ku donorovému vzorku bez akceleračního pufru. Výpočtem tohoto parametru se podařilo odstranit rozdíly ve výsledcích mohutnosti permeace jednotlivých vzorků způsobené odlišnou silou kůže prasečího boltce a porovnat mohutnosti permeace donorových vzorků s akceleračními puframi. Vypočtené akcelerační poměry pro jednotlivé vzorky jsou znázorněny v **tabulce č. 3** a graficky znázorněny v **grafu č. 7**.

Tab. 3: Souhrnné výsledky akceleračních poměrů permeace donorových vzorků 7-metoxytakrinu z propylenglykolu a TRIS-pufu s přidanými akceleračními puframi

Kód donoru	Akcelerační poměr
TRIS-pufr+PG+5%MP	0,82
TRIS-pufr+PG+5%TC	0,50
TRIS-pufr+PG+5%Ar	1,09
TRIS-pufr+PG+1%T12	3,06

Graf č. 7: Srovnání akceleračních poměrů permeace donorových vzorků 7-metoxytakrinu z propylenglykolu a TRIS-pufrou s akceleranty



Z **grafu č. 7** vyplývá, že nejmohutněji permeovalo léčivo z donorového vzorku s přídávkem 1% transkarbamu 12. Hodnota jeho akceleračního poměru byla 3,06. Naopak nejméně permeovalo léčivo s 5% transcutolem s hodnotou akceleračního poměru 0,5.

Tudíž jako nejvhodnější akcelerant permeace 7-metoxytakrinu z hydrofilního prostředí se jeví 1% transkarbam 12. Bylo by tedy vhodné studovat tento akcelerant v různých koncentracích. Naopak jako nevhodný urychlovač permeace se jeví transcitol a metylpyrrolidon, oba testované v 5% koncentraci.

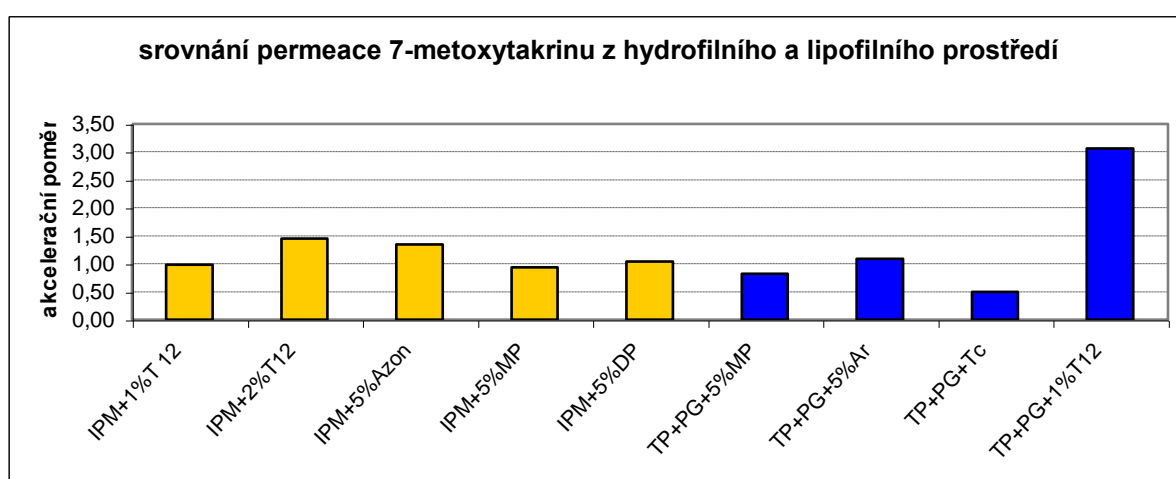
V následující **tabulce č. 4** a **grafu č. 8** je srovnán vliv jednotlivých akceleračních poměrů na permeaci 7-metoxytakrinu ze dvou odlišných prostředí. A to z hydrofilního prostředí, které bylo složeno z propylenglykolu a TRIS-pufrou a z lipofilního prostředí izopropylmyristátu. Vlivu jednotlivých akceleračních poměrů na permeaci 7-metoxytakrinu z izopropylmyristátu jsem se věnovala v mé předcházející diplomové práci. Jednalo se o tyto akcelerační poměry: transkarbam 12 ve dvou koncentracích 1% a 2%, 5% 1-metyl-2-pyrrolidon, 5% 1-dodecyl-2-pyrrolidon a 5% azon. Slibné výsledky pro zvýšení kožního průniku 7-metoxytakrinu přineslo použití 2% přídávku transkarbamu 12. Rovněž přídavek 5% azonu do donorových vzorků v izopropylmyristátu vykazoval zvýšené průměrné hodnoty fluxu J oproti standardu. Naopak

5% přídavky metylpyrrolidonu a dodecylpyrrolidonu se na permeačním fluxu 7-metoxytakrinu neprojevíly.

Tabulka 4: Porovnání permeace 7-metoxytakrinu z prostředí hydrofilního a lipofilního s přidanými akceleranty

donorový vzorek 7-metoxytakrin +	akcelerační poměr
IPM+1%T 12	0,98
IPM+2%T12	1,45
IPM+5%Azon	1,35
IPM+5%MP	0,94
IPM+5%DP	1,03
TRIS-pufr+PG+5%MP	0,82
TRIS-pufr+PG+5%Ar	1,09
TRIS-pufr+PG+5%Tc	0,50
TRIS-pufr+PG+1%T12	3,06

Graf č. 8: Srovnání permeace 7-metoxytakrinu z hydrofilního a lipofilního prostředí



Graf č. 8 ukazuje, že většina vzorků má obdobný akcelerační poměr, který se pohybuje okolo hodnoty 1. Výrazně nižší akcelerační poměr je u donorového vzorku s přídavkem 5% transcitolu, který permeuje z hydrofilního vehikula - propylenglykolu a TRIS-puftru. Jeho hodnota činí pouze 0,5. Kdežto donorový vzorek s 1% transkarbamem 12, který permeuje taktéž z hydrofilního prostředí, vykazuje nejvyšší akcelerační poměr a to 3,06.

Ze vzorků, které permeují z lipofilního vehikula, prokazuje nejmohutnější permeaci vzorek s přídavkem 2% transkarbamu 12 (akcelerační poměr 1,45) a také vzorek s přídavkem 5% azonu (akcelerační poměr 1,35). Nejméně se projevuje akcelerační vliv metylpyrrolidonu a dodecylpyrrolidonu.

Bylo by prospěšné studovat transdermální podání 7-metoxytakrinu z hlediska možného urychlovacího efektu transkarbamu 12 a to jak z hydrofilního tak i z lipofilního vehikula a to v různých koncentracích. Naopak použití akceleračních látek ze skupiny pyrrolidonů by v tomto případě bylo bez adekvátní odezvy. Proto nejsou vhodné k dalšímu testování na lidské kůži.

Z hlediska prostředí, z něhož léčivo permeuje, se jednoznačně jeví jako vhodnější lipofilní prostředí. V lipofilním prostředí jsou průměrné hodnoty fluxů J standardu na úrovni $15 [\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}]$, kdežto v hydrofilním prostředí jsou okolo hodnoty $2 [\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}]$.

7. ZÁVĚRY

1. Permeace 7-metoxytakrinu v pokusech in vitro za použití kožní membrány z boltce prasečího ucha z hydrofilního prostředí (propylenglykolu a TRIS-pufu) s přídavkem 1% transkarbamu 12 byla relativně pravidelná s hodnotou akceleračního poměru 3.

2. Naopak přídavek 4% transcutolu a 5% metylpyrrolidonu se na permeaci 7-metoxytakrinu z hydrofilního prostředí příliš neprojevil.

3. Vliv na urychlení permeace vzorku 7-metoxytakrinu z hydrofilního i lipofilního prostředí s přídavkem pyrrolidonů se příliš neprojevil.

4. Lépe permeoval standard 7-metoxytakrinu z lipofilního prostředí izopropylmyristátu s průměrnou hodnotou fluxu J asi 16 než z hydrofilního prostředí propylenglykolu a TRIS-pufu.

5. Pro případné pilotní pokusy s lidskou kůží lze doporučit testování rozdílných koncentrací transkarbamu 12 a to z obou typů prostředí.

8. SOUHRN

V teoretické části je podán souhrn informací o Alzheimerově nemoci a léčivech používaných k terapii. Dále o možných cestách přechodu léčiv kůží a o struktuře kůže.

In vitro permeační experimenty s využitím excidovaných vzorků kůže z boltců prasačích uší ukázaly, že při testování vzorků 7-metoxytakrinu v TRIS-pufu a propylenglykolu byly průměrné hodnoty fluxů výrazně nižší než při permeaci 7-metoxytakrinu z prostředí izopropylmyristátu.

Dále byl prokázán akcelerační vliv transkarbamu 12 a to jak z hydrofilního, tak z lipofilního prostředí. Ovšem akcelerační vliv pyrrolidonů nebyl téměř prokázán.

Jako perspektivní se jeví využití azonu a transkarbamu 12 při permeaci z izopropylmyristátu. V případě permeace z prostředí TRIS-pufu a propylenglykolu se jeví vhodným akceleračním činidlem transkarbam 12.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ar	arlasolve
C_k [mg/100 ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_{nk} [mg/100 ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
DP	1-dodecyl-2-pyrrolidon
IPM	izopropylmyristát
J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	flux permeantu
\bar{J} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	průměrný flux permeantu
MP	1-metyl-2-pyrrolidon
n	počet naměřených bodů
PG	propylenglykol
PU	prasečí ucho
q [mg/cm^2]	absolutní člen
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého kožní membránou
Q_t [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	množství permeantu prošlého přes 1cm^2 kožní membrány
r	koeficient korelace
s	směrodatná odchylka
t [hod]	čas
T 12	transkarbam 12

TC	transcutol
TP	TRIS-pufr
V_{dop} [ml]	množství doplňovaného média
V_o [ml]	celkové množství akceptorového média

10. LITERATURA

-
- ¹ El-Kattan A., Asbill Ch. S., Haidar S.: Transdermal testing: practical aspects and methods, Elsevier Science, 3(12), December 2000
- ² Žabka, M., Müller, H.R., Hildebrand, E: Moderní lékové formy ve farmaceutické technologii, 1. vyd., SAP, 2001, s.133-153
- ³ Kim, M., Zhao, H., Lee, Ch. et al.: Formulation of reservoir-type testosterone transdermal delivery system, Int.J. Pharm., 219(1-2), May 2001, s.51-59
- ⁴ Rafferty, D.W., Koenig, J.L.: FTIR imaging for the characterization of controlled-release drug delivery applications, J. Cont. Rel., 83(1), September 2000, s. 29-39
- ⁵ Shin, S., Byun, S.: Controlled release of ethinylestradiol from ethylene-vinyl acetate membrane, Int. J. Pharm., 137(1), June 1996, s.95-102
- ⁶ Hrabálek, A., Doležal, P., et al.: Akceleranty transdermální penetrace, Chemické listy VŠCHT 1999, 2, s.108-117
- ⁷ Čihák, R.: Anatomie 3, Praha, Grada, 1997, s.559-574
- ⁸ <http://gerstner.felk.cvut.cz/biolab/bionika2004/cepek/ArtificialSkin.html>
- ⁹ http://www.scf-online.com/english/37_e/skinpenetration37_e.htm
- ¹⁰ Chalabala, M., et al.: Technologie léků, Galén, 1.vyd., 1997, s.315-322
- ¹¹ Barry, B.W.: Novel mechanism and device to enable successful transdermal drug delivery. Eur. J. Pharm. Sci., 14, 2001, s.101-114
- ¹² Asbill, Ch.S., Michniak, B. B.: Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity, 3(1), leden 2000
- ¹³ Hadgrafta, J., Peckb, J., Williams, D.G., Pugh W.J., et al.: Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone analogues. Int. J. Pharm., 141(1-2), September 1996, s. 17-25
- ¹⁴ www.internimedica.cz/pdfs/int/2001/11/16.pdf
- ¹⁵ http://www.pharmanews.cz/2005_05/alzheimer.htm
- ¹⁶ www.anamneza.cz/moduly/nemoc_tisk.php3?ID=19
- ¹⁷ Vokurka, M., Hugo, J., et al.: Velký lékařský slovník, Maxdorf, 4. vyd., 2004
- ¹⁸ Koukolík, F., Jirák, R.: Alzheimerova nemoc a další demence, Grada, 1998, s.213-229

¹⁹ Rocca, W.A., Amaducci, L.A., Schoenberg, B.S.: Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 19, 1986, s.415-424

²⁰ Duijn, C.M., Farrer, L.A., Cupples, L.A., Hofman, A.: Genetic transmission of Alzheimer's disease among families in a Dutch population based study. *J. Med. Genet.* 30, 1993, s. 640-646

²¹ Jiráček, R., Obenberger, J., Preiss, M.: Alzheimerova choroba, Maxdorf, 1998

²² Bayles, K.A., Kaszniak, A.W.: Communication and cognition in normal aging and dementia. Little Brown, Boston, Mass, 1987

²³ Gauthier, S., et al.: Clinical diagnosis and management of Alzheimer's disease. Martin Dunitz, London, 1996

²⁴ www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/kff_04_05.pdf

²⁵ www.ceskapsychiatrie.cz/download/demence.pdf

²⁶

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=8191251&query_hl=3

²⁷ *Drugs* 2001, 61, (1), 41-52, Odborné fórum lékařů a farmaceutů roč. VII, číslo 2, *Remedia Compendium-třetí vydání (1999)*

²⁸

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1800389&query_hl=3

²⁹ Bajgar, J., Bisso, G.M., Michalek, H.: Differential inhibition of rat brain acetylcholinesterase molecular forms by 7-methoxytacrine in vitro, *Vojenská lékařská akademie, Hradec Králové*, 1995

³⁰ Harms, H., Tůma, I., Fusek, J., Patočka, J.: Treatment of tardive dyskinesias with 7-methoxytacrine. I. *Sbor.věd.prac. LFUK v Hradci Králové, Supp.*, 36(1-2), 1993, s.37-45

³¹ Patočka, J.: Acetylcholinesterase activity of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine and some derivatives and analogues. *Sbor.věd.prac. VLDÚ Hradec Králové*.102, 1986, s.123-140

³² Feldman, R.S., Meyer, J.S., Quenzer, L.F.: Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Sinauer Assoc. Inc., 1997, s.903-905

³³

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=2070431&query_hl=3

³⁴

<http://ctd.mdibl.org/voc.go?jsessionid=49F75424C9B030D544E9258268572A43?voc=chem&termUI=7-methoxytacrine>

³⁵ Režňáková, E.: Diplomová práce, Transdermální in vitro permeace metoxytakrinu III., UK-FaF, Hradec Králové, 2006