

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra farmaceutické technologie
studijní program: farmacie



Transdermální in vitro permeace cyklosporinu III.
Diplomová práce

Hana Krejčová

školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové , květen 2006

Děkuji Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné vedení
a pomoc při vypracování předkládané diplomové práce.

OBSAH:

1. ÚVOD	3
2. CÍL PRÁCE.....	4
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
3.1 Prostup léčiva kůží	5
3.1.1 Transdermálně aplikovatelná léčiva.....	6
3.1.2 Přednosti a nevýhody transdermální aplikace.....	7
3.2. Transdermální náplasti	7
3.2.1 Typy transdermálních náplastí	7
3.3 Látky modifikující transdermální permeaci	10
3.3.1 Pyrrolidony.....	11
3.4 Transdermální testování	12
3.4.1 Využitelné alternativy lidské kůže	12
3.4.2 Modely in vivo	13
3.4.3 Modely in vitro.....	13
3.5 Cyklosporin	14
3.5.1 Struktura cyklosporinu	14
3.5.2 Farmakokinetika cyklosporinu	15
3.5.3 Farmakodynamika cyklosporinu	16
3.5.4 Nežádoucí účinky cyklosporinu	16
3.5.5 Využití cyklosporinu v praxi.....	17
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
4.1 Použité přístroje.....	20
4.2 Použité suroviny	20
4.3 Testované vzorky	21
4.4 Biologický materiál	22
4.5 Výběr akceptorové fáze.....	22
4.6 Uspořádání permeačních pokusů	23
4.7 Provedení strippingu	23
4.8 Stanovení cyklosporinu A	24
4.9 Naměřené údaje z permeačních měření.....	25
5. VÝSLEDKY	26
6. DISKUSE	32
7. ZÁVĚRY	38
8. SOUHRN	39
9. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
10. LITERATURA.....	41

1. ÚVOD

Cyklosporin A po řadu let představuje jednu z nejdůležitějších látek s imunosupresivním účinkem, jehož využití přináší významný pokrok v transplantační medicíně, terapii autoimunitních chorob a v neposlední řadě také v dermatologii. V současnosti je v humánní medicíně používán ve formě perorálních a injekčních léčivých přípravků. Jeho podání per os naráží hlavně na problémy související s vysokým jaterním first-pass efektem, inaktivací vlivem změn pH v gastrointestinálním traktu, přítomností enzymů v lumen trávicí trubice a metabolizací při pasáži buňkami střevní stěny. Injekční aplikace sice obchází gastrointestinální trakt a s ním spojené možnosti inaktivace, avšak cyklosporin má i při této aplikační cestě krátký poločas vlivem rychlé metabolizace játry.

Transdermální podání představuje variantu podání, která by umožňovala lepší kontrolu hladiny cyklosporinu v organismu, což je v případě této látky s nízkým terapeutickým indexem velmi žádoucí. Byly by tak minimalizovány nevýhody spojené s perorální a injekční aplikací. Překážkou ovšem zůstává překonání bariérové funkce kůže vzhledem k poměrně vysoké molekulové hmotnosti a lipofilitě molekuly cyklosporinu A. Intenzivně se tedy studují techniky, které umožňují zvýšení permeace molekuly cyklosporinu kůží. Součástí experimentální části této diplomové práce bylo studium několika enhancerů (urychlovačů) transdermální aplikace. Konkrétně byl hodnocen dodecylazacykloheptanon (laurokapram, Azone[®]), methylpyrrolidon, dodecylpyrrolidon a transkarbam 12, které byly obsaženy v donorových vzorcích aplikovaných na prasečí kůži v in vitro permeačních pokusech.

Výzkum transdermálních permeačních enhancerů spadá do výzkumné oblasti společně řešené na katedře farmaceutické technologie a katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

2. CÍL PRÁCE

1. Podat aktualizovaný přehled informací o cyklosporinu a jeho léčebných aplikacích, včetně externí dermatologické.
2. Provéřit nový protokol pro realizaci permeačních experimentů, zejména s ohledem na vhodnou dobu trvání in vitro permeací.
3. Získat nové údaje o průniku cyklosporinu A z izopropylmyristátu přes kožní membránu z ucha prasečího boltce a orientačně vyhodnotit vliv zadané koncentrace transkarbamu 12, laurokapramu, methylpyrrolidonu a dodecylpyrrolidonu jako čtyř zavedených permeačních enhancerů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Transdermální aplikace léčiv je předmětem výzkumu od poloviny minulého století. Během druhé světové války se výzkum zaměřoval na léčbu anginy pectoris a v 50. letech 20. století byla vyvinuta nitroglycerinová náplast.¹

Možnost přívodu léčiv do systémové cirkulace přes kůži se stala předmětem intenzivního výzkumu od roku 1980, kdy mnohé firmy začaly pracovat na transdermálních lékových formách, protože se již dokázalo, že léčiva procházejí kůží v dostatečném množství, aby mohla vyvolat systémový účinek.²

V roce 1981 byla vyrobena firmou Alza (USA) první transdermální náplast Transderm-Scop. Brzy následovala výroba dalších transdermálních přípravků s různými účinnými látkami.¹

3.1 Prostup léčiva kůží

Léčiva vstupují do kůže transfolikulárně přes vlasové folikuly a potní žlázy, nebo transepidermálně. U transepidermálního transportu můžeme ještě rozlišit vstup *intercelulární* (mezibuněčnými prostory epidermis) a *intracelulární*, *transcelulární* (buňkami epidermis). Největší část léčiv prochází intercelulárně a tento vstup se řídí, stejně jako méně významný vstup transfolikulární, zákony difúze. Léčiva uvolněná z transdermálního přípravku musí nejdříve projít rohovou vrstvou, která představuje nejhůře propustnou část kožní bariéry. Protože je to proces řízený difúzí, je velmi důležitý koncentrační spád, rozdíl mezi koncentrací léčiva nad rohovou vrstvou a pod ní. Koncentrace nad rohovou vrstvou je určena množstvím rozpuštěného nedisociovaného léčiva. Koncentrace pod rohovou vrstvou závisí na tom, zda léčivo má tendenci se hromadit v rohové vrstvě nebo jí pronikat, opouštět kůži jako kompartment a přecházet do systémového oběhu. Koncentrační spád může být časově závislý nebo časově nezávislý; difúzní proces je podle toho pseudostacionární (závislý) nebo stacionární (nezávislý). Stacionární (ustálenou) difúzi můžeme předpokládat při aplikaci suspenzních léčiv obsahujících léčivou látku, která se postupně v základu rozpouští. Koncentrace jeho rozpuštěné formy v přípravku je konstantní. Rozpuštěné léčivo, které přejde do kůže, je okamžitě nahrazeno rozpuštěním dalšího podílu suspendovaného léčiva. Při stacionární difúzi se po určité indukční periodě vytváří ustálený flux (tok) léčiva kůží. Prostup pak odpovídá kinetice nultého řádu. Jestliže se léčivo přítomné v základu vyčerpá, tj. přestoupí do kůže, transport odeznívá a kinetika přestupu se mění na kinetiku prvního řádu.²

Flux léčivé látky roste lineárně s koncentrací jeho rozpuštěné formy. Suspenzní léky však mají nevýhodu, že nejsou fyzikálně zcela stabilní. Během jejich skladování může docházet ke krystalizaci léčiva, čímž se změní rychlost jeho uvolňování. Stabilita léčiva v tomto smyslu může být zvýšena použitím polymerů, které brání vzniku jader krystalů (nukleaci).³

Pseudostacionární difúze je proces, při němž je koncentrační spád časově závislý. Permeace tohoto typu je charakteristická pro přípravky, v nichž je léčivo rozpuštěno. V průběhu aplikace obsah difuzibilní formy léčivé látky trvale klesá o podíl, který přestoupil do kůže. Kinetika pseudostacionární difúze je kinetikou prvního řádu.²

3.1.1 Transdermálně aplikovatelná léčiva

Pokud chceme použít léčivo do transdermálních přípravků, měly by jeho vlastnosti splňovat určitá kritéria. Léčiva vhodná pro transdermální aplikaci mají nízkou *molekulovou hmotnost*, preferována je velikost do 600 Da.⁴ Léčiva s menší molekulou vstupují do kůže ochotněji.² *Difúzní koeficient* by měl být vysoký.⁴

Také *rozpuštěnost* v oleji a vodě by měla být adekvátní. S tím souvisí optimální hodnota *rozdělovacího koeficientu*. Pokud je rozdělovací koeficient příliš velký, může snížit clearance v živé tkáni.⁴ Ideální je hodnota blízká jedné. Znamená to, že příznivý předpoklad pro absorpci mají látky, které jsou rozpustné ve vodě i v olejích.²

Kůže má rovněž schopnost aplikované léčivo metabolizovat. Tato schopnost se dává do souvislosti s poměrně složitou stavbou kůže, ve které jsou jednotlivé vrstvy tvořené vysoce specializovanými typy buněk místy metabolických přeměn léčiv. V rohové vrstvě se nacházejí metabolizující enzymy z bakteriální flóry, další enzymy jsou obsaženy v keratinocytech a epidermálních buňkách, histiocytech, v Langerhansových buňkách, dále v Merkelových buňkách, v mazových a potních žlázách, ve fibroblastech a žírných buňkách, v dermis a podkožních tukových buňkách. Každá z těchto vrstev k metabolismu léčiv při průchodu kůží přispívá. Když se bere v úvahu skutečnost, že skladba kůže a tloušťka jejích vrstev je na jednotlivých částech těla různá, nepřekvapí zjištění, že transdermální absorpce pozorovaná po aplikaci dermatologik na různá místa kůže stejné osoby vykazuje rozdíly třeba i stoprocentní. Při aplikaci zejména malých množství léčiv je proto někdy žádoucí přísada inhibitorů enzymů.²

3.1.2 Přednosti a nevýhody transdermální aplikace

Léčivo se při transdermálním podání vyhne gastrointestinálnímu traktu. Nehrozí tudíž jeho inaktivace enzymy nebo změnami pH a také nepřichází v úvahu interakce s léky, které byly podány per os. Léčivo se dále vyhne jaternímu first-pass efektu, což je spojeno s inaktivací jaterními enzymy. Při jedné transdermální aplikaci je možná vícedenní léčba. Tento typ léčby umožňuje využití léčiv s nízkým terapeutickým indexem, výhodná je i vysoká compliance pacienta. Také je výhodné, že účinek léku může být odstraněním transdermálního systému rychle ukončen. Účinek léčiva s krátkým poločasem může být pomocí transdermální aplikace prodloužen, protože plazmatická koncentrace léčiva je udržována delší dobu.¹

Nevýhodou je možnost senzibilizace pokožky, popř. alergická reakce pokožky, ať už vyvolaná léčivem či další součástí transdermálního systému. Při snímání transdermální náplasti může být porušena rohová vrstva. Pod nalepenou transdermální náplastí může dojít k bloádě potních žlázek a také se zde mohou množit patogenní mikroby.²

3.2. Transdermální náplasti

Transdermální náplasti (Emplastra transcutanea, Transdermal patches) jsou léčivé přípravky aplikované přilepením na zdravou kůži. Obsahují léčiva, která procházejí přes kůži do podkoží ke krevním nebo mízním kapilárám, do nichž se vstřebávají, aby potom působila systémově. Uvolňování léčiva z náplasti má být v principu řízeno vlastnostmi přípravku, nikoli variabilními vlastnostmi kůže. Náplasti jsou uzpůsobené tak, aby v průběhu aplikačního intervalu přiváděly léčivo do organismu konstantní rychlostí. Je-li uvolňování léčiva z náplasti veličinou, která určuje celou farmakokinetiku podaného léčiva, potom se skutečně dosáhne déletrvající, vyrovnané hladiny léčiva v krvi.²

Pro žádané lineární uvolňování léčiva z náplasti je potřebný dostatečný, relativně velký obsah léčiva v jejím zásobníku, matici. Při aplikaci se z léčiva v náplasti přítomného využije jen jeho menší část (10 % až 20 %). To sice výhodné není, avšak pro kinetiku nultého řádu (nebo k této kinetice se blížící) nevyhnutelné. Po odstranění náplasti z kůže klesá hladina léčiva v souladu s distribuční a eliminační kinetikou daného léčiva.²

3.2.1 Typy transdermálních náplasti⁵

Základními součástmi transdermálních náplasti jsou: *krycí vrstva*, která chrání *vrstvu obsahující léčivo*. Krycí vrstva je pro léčivo nepropustná a může být propustná pro plyny.

Další součástí je *ochranná folie*, která se odstraňuje před nalepením náplasti a během skladování chrání formulaci.

Náplast s jednou adhezivní vrstvou s léčivem

Adhezivní vrstva je po přilepení tohoto typu transdermální náplasti v přímém kontaktu s pokožkou. Adhezivní vrstva se nachází pod vrstvou krycí a je rezervoárem jak účinné látky, tak i excipientů.

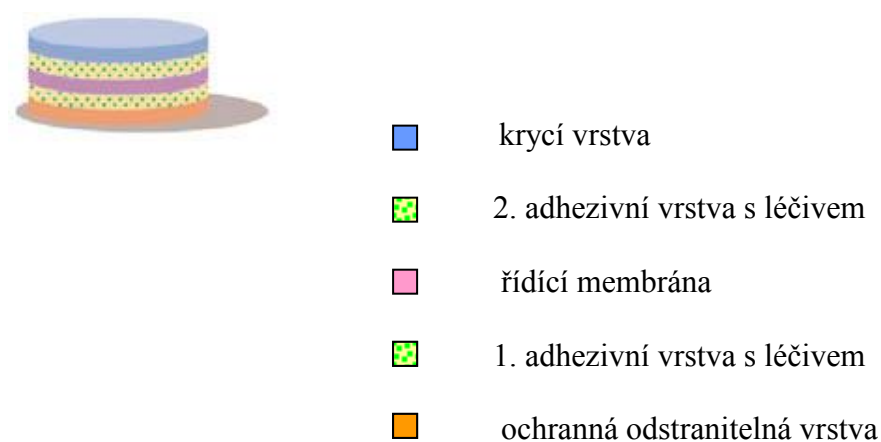
Obr. 1: Náplast s jednou adhezivní vrstvou s léčivem ⁵



Náplast s více adhezivními vrstvami

Adhezivní vrstvy opět obsahují léčivo. První adhezivní vrstva je z jedné strany kryta ochrannou fólií a z druhé strany se nachází řídicí membrána. Nad řídicí membránou se vyskytuje druhá adhezivní vrstva, která je z vrchu chráněna krycí vrstvou. První adhezivní vrstva slouží k uvolnění iniciační dávky léčiva, z druhé vrstvy se pak léčivo uvolňuje kontrolovanou rychlostí díky řídicí membráně.

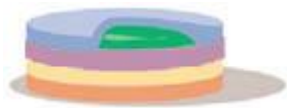
Obr. 2: Náplast s více adhezivními vrstvami ⁵



Rezervoárová transdermální náplast

Rezervoárová transdermální náplast obsahuje, jak již název napovídá, kompartment s roztokem či suspenzí léčiva. Kompartment je od ochranné vrstvy separován semipermeabilní membránou a adhezivní vrstvou. Adhezivní vrstva se může vyskytovat v kontinuální podobě nebo jen koncentricky okolo řídicí membrány.

Obr. 3: Rezervoárová transdermální náplast ⁵

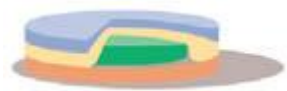


- krycí vrstva
- roztok (suspenze) léčiva
- řídicí membrána
- adhezivní vrstva
- ochranná odstranitelná vrstva

Matricová (periferně adhezivní) transdermální náplast

Polotuhá matrice, která obsahuje roztok nebo suspenzi léčiva, je v přímém kontaktu s ochrannou vrstvou. Adhezivní vrstva se vyskytuje koncentricky okolo matrice.

Obr. 4: Matricová (periferně adhezivní) transdermální náplast ⁵



- krycí vrstva
- adhezivní vrstva
- roztok (suspenze) léčiva
- ochranná odstranitelná vrstva

3.3 Látky modifikující transdermální permeaci

Vzhledem k tomu, že kůže velmi dobře plní bariérovou funkci, je často nutné použít při formulaci transdermálních přípravků tzv. urychlovače absorpce (enhancery, promotory).⁴ Tyto látky usnadňují uvolnění léčiva z přípravku a jeho průnik do spodních vrstev kůže a mohou způsobit vznik rezervoáru léčiva v kůži. Opakem enhancerů jsou retardanty permeace, které mají mnohdy velmi blízkou strukturu s enhancery, avšak oproti nim stabilizují kožní lipidy a snižují permeabilitu. Tyto látky jsou používány v přípravcích, u kterých je žádoucí jen minimální systémová absorpce účinných látek, jako je tomu například u opalovacích prostředků či repelentů.⁷

Je známo několik potenciálních mechanismů účinku enhancerů. Uvádí se možná interakce s intercelulární lipidickou matrix či intracelulárními keratinovými doménami. Některé promotory zvyšují rozpustnost léčiva v kůži, ovlivňují termodynamiku rozpouštění, působí na desmozomální spoje mezi korneocyty nebo mění metabolickou aktivitu v kůži.⁶ Předpokládá se, že látka jedné struktury může vykazovat více mechanismů účinku.⁷

Ideální penetrační enhancer je netoxický, neirituje kůži ani ji nealergizuje. Účinkuje rychle a nemá žádnou farmakologickou aktivitu. Po odeznění jeho účinku se bariérová funkce kůže rychle a zcela obnoví.⁶

Skupina permeačních enhancerů je velice různorodá, proto existuje několik klasifikačních kritérií pro jejich rozdělení (například podle chemického hlediska, či schopnosti urychlit absorpci). Není pravidlem, že enhancer je vhodný pro jakýkoliv druh léčiva. Pro charakterizaci penetračních enhancerů se využívají následující parametry.

Flux, jehož jednotkou je množství léčiva (μg) prošlé plochou kůže 1 cm^2 za jednotku času (1 hodina). Q_{24} je kumulativní množství léčiva (μg), které prošlo jednotkovou plochou kůže (například 1 cm^2) za 24 hodin. *ER (urychlovací poměr, enhancement ratio)* je poměr hodnot fluxu či hodnot Q_{24} u pokusu s enhancerem k hodnotám kontrolního (slepého) pokusu.⁷

Během mnohaletých experimentů byly zjištěny zajímavé informace týkající se penetračních enhancerů:⁶

- a) efekt enhancerů je koncentračně závislý
- b) je obtížné zvolit nejvhodnější enhancer pro daný typ rozpouštědla
- c) urychlení penetrace má daleko lepší výsledky u zvířecí kůže než u kůže lidské
- d) enhancery pracují velmi dobře s rozpouštědly jako je propylenglykol či ethanol
- e) existuje synergismus mezi enhancery

f) závažným nežádoucím účinkem enhancerů jsou jejich dráždivé vlastnosti na kůži

Jako zajímavý enhancer pro aplikaci cyklosporinu se jeví lipidický enhancer 1-oleoyl monoglycerid (monoolein). Po jeho přidání do formulace cyklosporinu A s propylenglykolem se dle koncentrace zvýší buď transdermální nebo topický účinek nebo oba účinky. Při 5% koncentraci monooleinu transdermální účinek roste, při 10% koncentraci jsou patrné oba účinky a při koncentracích 20 % až 70 % monooleinu roste účinek topický a klesá účinek transdermální.²⁶

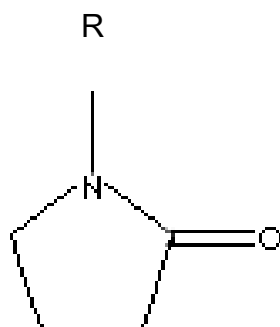
3.3.1 Pyrrolidony

Tato skupina chemických látek patří mezi velmi často používané a dobře prostudované penetrační enhancery. Předmětem mého zájmu byl N-methyl-2-pyrrolidon a N-dodecyl-2-pyrrolidon. Jejich strukturu zaznamenává obr. 5 .

Tato skupina látek vykazuje vyšší urychlovací efekt na hydrofilní permeanty. Mechanismus jejich účinku spočívá ve vmezeření molekuly pyrrolidonu mezi lipidy stratum corneum a zvýšení fluidity lipidické vrstvy.⁸

Z hlediska výzkumu jsou významné molekuly: N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) a 2-pyrrolidon (2P). NMP je polární aprotické rozpouštědlo, které se využívá jako extrakční činidlo. Je to čirá kapalina mísitelná s většinou známých rozpouštědel včetně vody a alkoholů. 2P je též mísitelný s většinou rozpouštědel včetně vody a alkoholů a je tekutý při teplotě nad 25°C. Využívá se jako rozpouštědlo pro cukry, jód a polymery. 2P je meziproduktem při výrobě farmaceutické pomocné látky polyvinylpyrrolidonu. Pyrrolidony jsou jako promotory využívány pro četné hydrofilní i lipofilní molekuly. Pyrrolidony se dobře rozdělují do rohové vrstvy lidské kůže. Mohou účinkovat tak, že upravují rozpustnost membrán a generují tvorbu rezervoáru v membránách kůže. Rezervoárový efekt nabízí potenciál pro tzv. prodloužené uvolňování (sustained release) permeantu z rohové vrstvy. Nežádoucím účinkem pyrrolidonů byla tvorba erytému, který ovšem po krátké době vymizel.⁶

Obr. 5: Molekulová struktura pyrrolidonů ⁹



N-methylpyrrolidon: R= CH₃,

N-dodecylpyrrolidon: R= C₁₂H₂₅

3.4 Transdermální testování

Transdermální testování lze rozlišit na *in vitro* a *in vivo* studie. Tradičně jsou využívány kůže různých zvířat, které mají společné rysy s kůží lidskou. Výhodné je využití lidské kůže (od zemřelých dárců), ale pro většinu badatelů je tento typ kůže z etických důvodů a hlediska zákonů nedosažitelný. ¹

3.4.1 Využitelné alternativy lidské kůže ¹

Depilovaná myší kůže

Její výhodou je ekonomická dostupnost, avšak permeabilita a spektrum lipidů jsou značně odlišné od lidské kůže. V porovnání s lidskou kůží je u myší kůže velmi tenká rohová vrstva a permeabilita je 30-40 krát vyšší než u kůže lidské.

Prasečí kůže

Tento typ kůže je nejbližším modelem ke kůži lidské, co se týče její permeability i spektra lipidů. Jsou zde nepatrné strukturální rozdíly jako jsou štětiny prasečí kůže, více podkožního tuku a méně svaloviny.

Tkáňová kultura keratinocytů

Výhodou jejího využití je eliminace experimentů na zvířatech, dále pak vlastnosti shodné s lidskou kůží. Bylo zjištěno, že spektrum lipidů je shodné u tkáňové kultury i u lidské kůže, ale je zajímavé, že u tkáňové kultury bylo množství lipidů v redukovaném množství. Tyto kultury vykazují velmi rozdílné charakteristiky permeability.

Polymerní membrány

Nevýhodou využití umělých membrán je nedostatek histologických prvků, které se v lidské kůži běžně vyskytují.

3.4.2 Modely in vivo¹

Transdermální studie na zvířatech byly prováděny od 60. let a byly využívány pro výzkum transdermálních přípravků. Zvířecí model poskytuje zajímavé permeabilitní parametry, když není mnoho známo o klinické toxicitě na lidských pacientech. Výběr zvířecích modelů nebo tkáňových kultur je velice složitý, protože není k dispozici model, který se úplně přibližuje lidské kůži z hlediska permeability, histologie a spektra lipidů.

Existují matematické modely, které jsou schopné popsat či předurčit kinetiku léčiva při transdermální aplikaci.

3.4.3 Modely in vitro¹

Aparát pro testování in vitro má tři části. *Donorový kompartment*, kam se aplikuje léčivo. Z tohoto kompartmentu léčivo prochází *permeační membránou (bariérou)* do *akceptorového kompartmentu*, kde je akceptorový roztok. Typickým akceptorovým roztokem je roztok fyziologický či fosfátový pufr, které jsou udržovány při teplotě 37°C, někdy na 32°C, což simuluje teplotu lidské kůže. In vitro modely se dělí na:

Horizontální typ permeačních systémů

Tento typ je široce využíván . Buňka je rozdělena na donorový a akceptorový kompartment o malém objemu (3,5 ml) a membránu o malé ploše (0,64 cm²). Roztok je kontinuálně míchán pomocí malých magnetických míchadel, která rotují rychlostí 600 otáček za minutu. Systém je termostatován.

Franzovy difúzní cely

Cela (buňka) je složena ze dvou kompartmentů- donorového a akceptorového. Akceptorový kompartment má objem 5-12 ml a plocha membrány je 1,0-5,0 cm². Akceptorový roztok je opět míchán magnetickými míchadly rychlostí 600 otáček za minutu a celý systém je též termostatován.

Průtokové difúzní cely

Tento druh cel je využíván u léčiv s nižší rozpustností v akceptorovém roztoku. Tyto cely mohou být plně automatizovány a přímo spojeny s vysokoúčinným kapalinovým chromatografem.

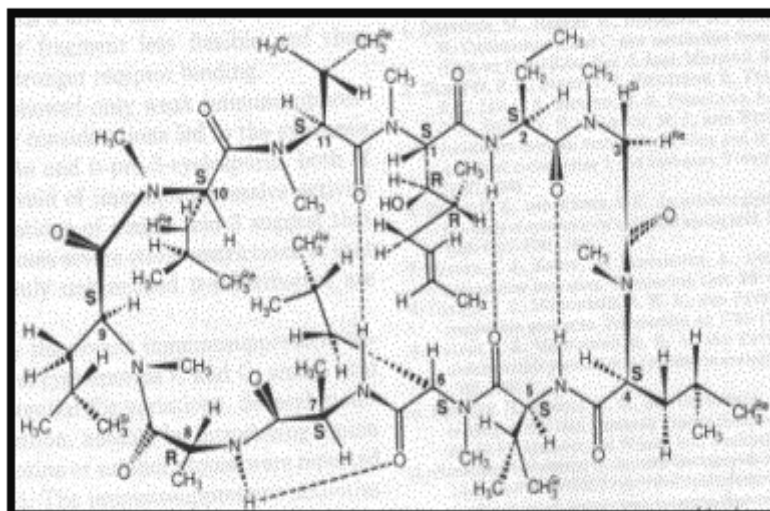
3.5 Cyklosporin

Cyklosporin A (CyA) je cyklický undekapeptid, který představuje první přírodní látku se selektivním imunosupresivním účinkem. Cyklosporiny jsou produkovány vláknitými půdními houbami *Trichoderma reesei*, *Cylindrocarpum lucidum* a dalšími kmeny půdních hub.^{10,11} Nyní se zkoumá produkce cyklosporinu A pomocí imobilizace spor a mycelií druhu *Aspergillus terreus* na kalcium-alginátu.²⁰ Imunosupresivní účinek CyA byl objeven v roce 1972. V prvních letech byl používán při orgánových transplantacích, kde výrazně zlepšil přežívání pacientů i orgánů, které byly pacientům transplantovány. V roce 1974 byl prokázán u CyA i protizánětlivý účinek při léčbě autoimunitních onemocnění.^{10,11}

3.5.1 Struktura cyklosporinu

CyA je cyklický undekapeptid se strukturou cyclo-[MeBmt- α -Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal], kde MeBmt je (2S,3R,4R,6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octová kyselina. Je to bílá, krystalická látka bez chuti a zápachu, s molekulovou hmotností 1201 Da. Na rozdíl od lineárních peptidů nemají cyklosporiny volnou karboxylovou skupinou ani aminoskupinu, a proto se nerozpouští ve vodě, ale jsou rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech. Jsou schopné vystupovat jako ligandy a tvořit komplexy s některými kationty. CyA je velmi stálý a jeho cyklická struktura se rozpadá až za působení silných kyselin a zvýšené teploty. V organických rozpouštědlech za přítomnosti kyselin vznikají izocyklosporiny.¹⁰ Strukturu cyklosporinu ukazuje obr. 6.

Obr. 6: Molekulová struktura cyklosporinu ¹²



3.5.2 Farmakokinetika cyklosporinu

Na hladinu CyA v organismu mají vliv různé faktory. Mezi ně patří hlavně příjem potravy, stav orgánů, změna vstřebávání v gastrointestinálním traktu, porucha vstřebávání lipidů, věk, jaterní onemocnění, vyšší hladiny kreatininu a interakce s ostatními léky. K těmto faktorům se řadí i genetické faktory, jako je např. polymorfismus cytochromu P-450. Absorpce CyA není úplná a vyznačuje se významnou intra- a interindividuální variabilitou. Rozdílná biologická dostupnost, clearance a dávka CyA přináší široké rozmezí koncentrací CyA v krvi u jednotlivých pacientů, které mohou mít za následek rozdílnou odpověď na terapii. Kromě toho po operaci je často nedostatečná nebo variabilní absorpce CyA a monitorování jeho koncentrace je efektivní prostředek, jak předejít většině negativních důsledků. Sledování koncentrace CyA hraje důležitou roli i v monitorování compliance pacientů a ve sledování interakcí s ostatními léky. Na rozdíl od jiných peptidických léčiv je CyA při perorálním podání dostatečně stabilní. V kyselém prostředí žaludku může podléhat reverzibilní konverzi na izocyklosporin A. Množství absorbovaného léčiva je závislé na celkově podaném množství léčiva a na rychlosti, s jakou se léčivo uvolňuje z lékové formy. Pro farmakokinetiku CyA je charakteristická výrazná variabilita biologické dostupnosti, která je u zdravých dobrovolníků průměrně 30 % (od 5 do 70 %). CyA je absorbován především v tenkém střevě, proto je délka tenkého střeva důležitý faktor absorpce a s tím souvisí také potřeba větší dávky CyA u dětí. Variabilita biologické dostupnosti CyA může být způsobena zhoršenou absorpcí. Koncentrace CyA po perorálním podání dosahuje vrcholu u většiny

pacientů za dobu 1-2 hodiny po podání mikroemulzní formy. CyA je metabolizován z 99% (hydroxylace, N-demethylace, tvorba cyklického éteru) hlavně v játrech, dále pak stěnou gastrointestinálního traktu. Vylučován je primárně žlučí. Pouze 6 % z perorální aplikace se vylučuje močí, přičemž pouze 0,1 % je vyloučeno v nezměněné formě. Jeho eliminační poločas je 6-20 hodin, průměr 10 hodin.¹⁰

3.5.3 Farmakodynamika cyklosporinu

Vlastní imunosupresivní působení spočívá v inhibici imunitních reakcí zprostředkovaných buňkami včetně imunity vůči alotransplantátu, dále inhibuje opožděnou kožní přecitlivělost, reakci mezi příjemcem a transplantátem a také tvorbu protilátek závislou na T-buňkách. Cyklosporin A působí na lymfocyty specificky a reverzibilně. Nepůsobí negativně na hemopoézu, neovlivňuje funkci fagocytů. Pacienti léčení cyklosporinem jsou méně náchylní k infekcím než nemocní užívající jiná imunosupresiva. CyA prodlužuje uchycení transplantovaného štěpu, hlavně kůže, srdce, ledvin, pankreatu, kostní dřeně a plic.¹⁵

Aktivační proces T lymfocytů začíná u vazby podnětných faktorů na receptory a pokračuje interakcí vazebných proteinů s kalcineurinem, který svou fosfatázovou aktivitou defosforyluje NF-AT (transkripční cytoplazmový faktor T lymfocytů). Změněný NF-AT se pak přesune do jádra, váže se na geny jun/fos a komplex aktivuje transkripci genů klíčového IL-2. Imunosupresivní aktivita cyklosporinu spočívá v inhibici fosfatázové aktivity kalcineurinu. Cyklosporin tak inhibuje odpovědi T-buněk, produkci a uvolnění lymfokinů.^{13,14}

Nově bylo zjištěno, že cyklosporin a jeho derivát (NIM311) indukují apoptózu maligních melanomových buněk. Tento fakt potvrdily studie in vitro i studie in vivo. Navíc NIM311 po intratumorální aplikaci způsobuje pokles objemu tumoru.²³

Zajímavé je zjištění, že cyklosporin ovlivňuje funkci P-glykoproteinu, což je nedávno objevená effluxní pumpa, která přenáší substráty (např. léčiva) ven z buněk. Mimo jiné se nachází v mozku a při současné aplikaci dopaminového antagonisty a cyklosporinu byl prokázán značně vyšší uptake tohoto léčiva mozkem. Tato skutečnost by mohla být v budoucnu využita i u jiných léčiv.^{24,25}

3.5.4 Nežádoucí účinky cyklosporinu

Léčba CyA (zvláště dlouhodobá a ve vyšších dávkách) ohrožuje nemocné rozvojem nefropatie a hypertenze, jež se spolu s dalšími patogenetickými vlivy podílejí na vážných následcích v centrální a periferní nervové soustavě, na srdci a v cévách (encefalopatie,

neurotoxická, kardiomyopatie, mikroangiopatie). Nemocným hrozí i aktivace některých virů (virus Epsteinovy a Barrovy, cytomegalovirus) vyvolávaných a dalších infekcí. Velmi obtěžuje hyperplastická gingivitida a hirsutismus, vzácnější je hepatotoxicita, kolitida, pneumonitida a ztlustění kůže. V poslední době byly prokázány další závažné nežádoucí následky podávání CyA, vyvolané jeho silným profibrogenním působením. Jím je možné vysvětlit pravidelné fibrotické změny v transplantovaných játrech, plicích a ledvinách, ale také ztlustění a jizevnatění kůže. Už delší dobu bylo zřejmé, že mnoho z nežádoucích účinků CyA není možné připsat na vrub jeho imunopresivnímu působení a pátralo se proto po dalších příčinných mechanismech. Nakonec byly objeveny v poruše sítě cytokinů a v nadměrném množení transformujícího růstového faktoru (TGF) beta. Nejzávažnější komplikací léčby cyklosporinem zůstávají (podobně jako v historickém období imunopresivní léčby před jejich zavedením) různé maligní nádory a lymfoproliferační syndromy.^{13,15} Dalšími nežádoucími účinky cyklosporinu na metabolismus je diabetogenní vliv a vyvolání hyperlipidémie.¹¹ Problém hyperlipidémie by neměl být řešen aplikací statinů, protože hrozí riziko rhabdomyolýzy.²² Neméně významným účinkem je také akcelerace rozvoje aterosklerózy. Rozvoj aterosklerózy je způsoben tím, že při aplikaci cyklosporinu dochází k nitraci specifických proteinů, které se podílejí na likvidaci superoxidového aniontu, který je významným aterogenním činitelem.²¹

3.5.5 Využití cyklosporinu v praxi¹⁵

- 1) Prevence a léčba rejekcí po transplantaci pevných orgánů, reakce mezi příjemcem a transplantátem po transplantaci kostní dřeně.
- 2) Terapie vybraných autoimunitních poruch.
- 3) V dermatologii léčba atopické dermatitidy a psoriázy.
- 4) V oftalmologii.¹⁹ V tomto oboru se jeví jako výhodné použití hydrofilního proléčiva cyklosporinu A (UNIL088), které rychle po aplikaci hydrolyzuje na cyklosporin. Využívá se tak pro topickou oční aplikaci, kde vykazuje oproti cyklosporinu nižší oční dráždivost a nižší výskyt slzení po aplikaci.^{17,18}

Rozpustnost a lékové formy cyklosporinu

Vzhledem k vlastnostem cyklosporinu, které byly popsány v odstavci o struktuře cyklosporinu, je jasné, že ke zvýšení rozpustnosti cyklosporinu je potřebné využití kosolventů, micelizace anebo tvorby komplexů. Jako kosolventy se používají organické sloučeniny, které

jsou mísitelné s vodou. Ve své struktuře mají malé nepolární uhlovodíkové oblasti, které redukují schopnost vodného systému vytlačit nepolární rozpouštěné látky. Příkladem může být ethanol, propylenglykol, tetrahydrofuryl, glycerin aj. Pro tvorbu komplexů se jeví výhodné využití cyklodextrinů, které vytvářejí malé dutiny pro nepolární alifatické části cyklosporinu A.¹⁶ Pro efektivní zvýšení rozpustnosti cyklosporinu lze využít metodu micelizace, kdy je molekula cyklosporinu zabudována do struktury polymerních micel. Využití izotonického micelárního roztoku pro zvýšení rozpustnosti nám také zaručuje kontrolovanou distribuci cyklosporinu v organismu.^{27,28}

Z hlediska vývoje lékových forem cyklosporinu A byla jako první registrovaná léková forma zavedena emulze (typ o/v) s velikostí částic 1 μm (Sandimmun®, Novartis, Švýcarsko). Nověji (asi před 10 lety) byla do terapie zavedena mikroemulze s dispergovanými částicemi menšími než 100 nm (Neoral®, Novartis, Švýcarsko). Výhody zavedení mikroemulzní lékové formy jsou nesporné – došlo ke zvýšení účinnosti, zlepšení biodostupnosti, zlepšení tolerance a snížení farmakokinetické variability u jednotlivých pacientů. Jednou z mnoha dalších možností je zabudování cyklosporinu A do pevných lipidických nanočástic (SLN – solid lipid nanoparticles) s cílem zlepšit biologickou dostupnost. SLN s cyklosporinem A byly připravovány tak, že cyklosporin A byl přidán do směsi kyseliny stearové a Epikuronu 200® a byly společně rozpuštěny při 70°C. Současně byl připraven i horký vodný roztok cholátu sodného, kyseliny máselné, ethanolu a isopropanolu. Tyto dvě rozdílné mikroemulze byly dispergovány ve studené vodě (2-3°C) za stálého míchání. Vznikly sférické nanočástice menší než 300 nm, ze kterých se léčivo uvolňuje pomalu a do budoucna mohou být SLN využívány pro různé cesty podání.¹⁶

Výzkum se v dnešní době stále zabývá zdokonalováním biodostupnosti cyklosporinu, modifikací jeho uvolňování či novými nosiči pro cyklosporin. Zlepšení biodostupnosti lze dosáhnout enkapsulací cyklosporinu do tělísek z umělého oleje. Tato tělíska jsou stabilizována caleosinem, což je látka izolovaná z *Escherichia coli*. Jedná se tedy o enkapsulaci hydrofobního léčiva, čehož lze využít pro perorální formulace cyklosporinu.²⁹ Pro modifikaci uvolňování cyklosporinu A lze využít například polyethylenglykolový hydrogel, který je naplněn roztokem komplexu CyA-cyklodextrin.³¹ Dalším příkladem modifikovaného uvolňování je implantát určený do sklivce, který zajišťuje tzv. sustained release. Zatím byl tento implantát zkoušen na zvířecím modelu.³⁰ Jako nosiče cyklosporinu lze využít mikrosféry. Pro základ mikrosfér se jeví vhodný kopolymer laktidu a epsilon-kaprolaktonu. Z tohoto základu se cyklosporin uvolňuje vysokou a konstantní rychlostí.³²

Dalším perspektivním nosičem je Sophisen®, po jehož smísení s cyklosporinem vznikne vodný roztok, který lze využít pro oční aplikaci.³³

V současnosti se u nás používá cyklosporin ve čtyřech typech lékových forem: perorální roztok (100 mg/ml), měkké želatinové kapsle (25, 50 a 100 mg v jedné kapsli), intravenózní injekce (50 mg/ml) a oční mast pro veterinární účely (3,5 mg/7 g). Přípravky se používají pod těmito obchodními názvy:¹⁵

- CONSUPREN® (por sol, por cps mol)
- CONSUPREN S® (por cps mol)
- EQUORAL® (por sol, por cps mol)
- OPTIMMUNE A.U.V. ® (ung oph)
- SANDIMMUN® (inf cnc sol)
- SANDIMMUN NEORAL® (por sol, por cps)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy	Sartorius, Göttingen
Dávkovací ventil D	Ecom, Praha
Dávkovací ventil Rheodyne model 7125	Cottati, California
Digitální pH-metr BT 120	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod
Digitální váhy	Kern, Albstadt
Vysokotlaké čerpadlo	Ecom, Praha
Lednička s mrazničkou Ardo	Ardo, Itálie
Liberační zařízení	FaF UK, Hradec Králové
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble
UV-VIS detektor V4	Isco, Lincoln
Kolonový termostat LCO 101	Ecom, Praha

4.2 Použité suroviny

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Praha
Azid sodný	Fluka, Buchs
Azone®,(AZ)	Teijin, Tokio
Bílá vazelína	Kulich, Hradec Králové
Cyklosporin A, (CyA) (č.š. 14011CC0042019491)	IVAX/Galena, Opava
1-dodecyl-2-pyrrolidon, (DP)	Aldrich Chemical
Isopropylmyristát, (IPM)	Merk, Schuchardt
Kyselina chlorovodíková 36%	Lachema, Neratovice
1-Methyl-2-pyrrolidon, (MP) (č.š. 294166 1289)	Fluka, Buchs
Propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
Stearan hlinitý	Léčiva, Praha
Tekutý parafin	Fluka, Buchs
Transkarbam 12*, (T12)	FaF UK, Hradec Králové*
TRIS-pufr	Sigma-Aldrich, Praha
Voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové

Uvedené suroviny odpovídaly jakosti podle norem stanovených výrobcem, resp. dodavatelem.

*Transkarbam 12 byl syntetizován doc. PharmDr. Alexandrem Hrabálkem, CSc. na katedře anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové.

4.3 Testované vzorky

In vitro permeační studii byly jako donorové vzorky použity suspenze CyA v isopropylmyristátu (roztoky s mírným přebytkem léčiva). Konkrétně se jednalo o disperze s 10 % obsahem CyA. Tyto disperze byly zvoleny záměrně tak, aby i po průniku části CyA kůží byla donorová fáze neustále nasycena léčivou látkou. Některé vzorky byly dále obohaceny o permeační enhancery v předem zvolených koncentracích.

Složení vzorků:

10% roztok cyklosporinu A v izopropylmyristátu

cyklosporin A	1,0 g
isopropylmyristát	9,0g

10% roztok cyklosporinu A v IPM s 1% obsahem transkarbamu 12

cyklosporin A	1,0g
transkarbam 12	0,1g
isopropylmyristát	8,9g

10% roztok cyklosporinu A v IPM s 5% obsahem azonu

cyklosporin A	1,0g
azone	0,5g
isopropylmyristát	8,5g

10% roztok cyklosporinu A v IPM s 5% obsahem dodecylpyrrolidonu

cyklosporin A	1,0g
dodecylpyrrolidon	0,5g
isopropylmyristát	8,5g

10% roztok cyklosporinu A v IPM s 5% obsahem methylpyrrolidonu

cyklosporin A	1,0g
methylpyrrolidon	0,5g
isopropylmyristát	8,5g

Postup přípravy:

V kádince jsem smísila CyA s isopropylmyristátem, případně také s uvedenými enhancery. Roztok jsem nechala míchat na magnetické míchačce zahřívané na 50°C přibližně 30 minut.

4.4 Biologický materiál

Ve studii jsem použila vzorky prasečí kůže z oblasti zevní strany ušního boltce, které byly odpreparovány pomocí skalpelu. Dále byla kůže depilována, očištěna fyziologickým roztokem a ošetřena roztokem azidu sodného. Vzorky byly zataveny do polyethylenové folie a uchovávány v mrazničce při -20°C.

4.5 Výběr akceptorové fáze

Pro malou rozpustnost cyklosporinu A ve vodě byla zvolena jako akceptorová fáze směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (tromethamolem) v poměru 1:1. Tato fáze měla také další výhodu v tom, že je díky ní zajištěno pH akceptorové fáze vhodné pro působení enhanceru transkarbam 12.

Příprava TRIS-pufru pH 7,1 pro permeační pokusy:

Složení:

- TRIS pufr ($C_4H_{11}NO_3$)	24,00g
- azid sodný	0,02g
- kyselina chlorovodíková 36%	q.s.
- ultračistá voda	975,98g

Postup přípravy:

Po navážení daného množství azidu sodného (konzervační přísada) a TRIS-pufru se obě substance rozpustí v předepsaném množství ultračisté vody za použití magnetické míchačky.

Roztok se ponechá na magnetické míchače a pomocí kalibrovaného pH-metru měříme pH a přidáním 36% kyseliny chlorovodíkové upravíme hodnotu pH na 7,1.

Pufir se uchovává v chladničce při 5°C a před každým použitím se vždy změní a případně upraví jeho pH.

4.6 Uspořádání permeačních pokusů

Jednotlivé vzorky kůže se fixují mezi dvě destičky z plexiskla. Obě destičky mají uprostřed kruhový otvor o ploše přibližně 2 cm². Destička, která je umístěna na vnějším povrchu kůže, je silnější. Do jejího otvoru se aplikuje 0,5 ml testovaného vzorku. Je nutno předem obě destičky namazat adhezivním silikonovým filmem, aby byly dobře utěsněny všechny spoje. Po nanesení vzorku se vrchní destička přikryje krycím sklíčkem. K vrchní destičce se připojí donorová část permeační cely a ke spodní akceptorová část cely. Obě části cely se spojí pomocí gumiček. V pokusech byly použity modifikované permeační cely dle Franze. Akceptorová část buňky se naplní akceptorovou fází (TRIS-pufir o pH 7,1 s obsahem 0,2% azidu sodného a propylenglykol v poměru 1:1). Tato část cely se umístí do vodní lázně, která je pomocí termostatu temperována na 37°C. Akceptorová fáze je kontinuálně míchána pomocí magnetických míchadel.

Pro zjištění množství léčiva prošlého kůží se odebírá akceptorová fáze (dále v textu, tabulkách a grafech značena **P**), ze které byl CyA stanovován.

4.7 Provedení strippingu

Předmětem zájmu bylo také množství léčiva, jaké se deponovalo do jednotlivých vrstev kůže. K tomuto účelu byla použita metoda strippingu. Její konkrétní provedení spočívalo ve využití proužků lepící pásky, které se nalepují na exponovanou plochu kůže, která byla předem odmaštěna pomocí acetonu. Lepící páska se přiloží ke kůži, na ni se položí závaží o hmotnosti 1 kg a po 10 sekundách se závaží odstraní a lepící páska se s kůže strhne pomocí pinzety. Tato činnost byla opakována u každého vzorku dvacetkrát. První dva proužky lepící pásky jsme k hodnocení nevyužili, protože se na ně dostanou pouze látky s povrchu kůže. Pomocí dalších osmi lepících pásek se s kůže odstraní část rohové vrstvy, nazývaná stratum desquamans a část stratum compactum (v dokumentaci permeačních pokusů značena **SC**). Posledních deset proužků lepící pásky slouží ke stržení hlubších vrstev epidermis (v dokumentaci permeačních pokusů značena **E**). Zbylá část kožního vzorku představovala převážně dermis a je značena písmenem **D**.

Z každého vzorku kůže tedy byly získány tři části: prvních osm lepících pásek bylo přeneseno do jedné skleněné lahvičky, dalších deset proužků lepící pásky do druhé a zbytek kůže značený písmenem **D** byl umístěn do třetí lahvičky. Do každé lahvičky bylo přidáno 10,0 ml směsi acetonitrilu a ultračisté vody v poměru 3:1. Po třiceti minutách byly lepící pásky pomocí pinzety vyjmuty, aby se z pásek nevyluhovaly látky, které by následně rušily stanovení CyA. Vzorek dermis byl ve vyluhovací směsi ponechán, protože riziko vyluhování rušivých látek nehrozilo.

4.8 Stanovení cyklosporinu A

Pro stanovení CyA byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s těmito parametry:

Detekce: spektrofotometrická při 220 nm

Kolona: LiChroCART®, s náplní Purospher® STAR RP-18 o velikosti částic 5µm

Předkolona: LiChroCART® (Merck) o průměru 4mm

Mobilní fáze: acetonitril - 0,04M KH₂PO₄ v poměru 3:1

Průtok: 1,5ml/min.

Tlak: 5,8 MPa

Teplota: 70°C

Objem nanášeného vzorku: 200µl (dávkovací smyčka)

Před použitím každé nové mobilní fáze bylo nutno provést odplynění na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

Kalibrace

Pro stanovení CyA z akceptorové fáze či z výluhů získaných po strippingu byla připravena řada kalibračních roztoků a následně proměřena kalibrační křivka.

Příprava kalibračních roztoků:

Základní roztok CyA byl připraven navážením 10,0 mg CyA a jeho rozpuštěním ve 100 ml směsi TRIS-pufry s 0,2% azidu sodného a propylenglykolu v poměru 1:1. Tím jsme získali roztok CyA o koncentraci 10 mg/100ml.

Další roztoky byly připraveny naředěním základního roztoku tak, aby jejich koncentrace byla 5; 2,5; 1 a 0,5 mg/100 ml.

Každý roztok dané koncentrace byl stanovován pomocí HPLC 5krát a výsledky jsou uvedeny v části **5. Výsledky** v **tab. 1**. Z výsledků byla pomocí lineární regrese sestrojena kalibrační přímka (**graf 1** v části **5. Výsledky**).

Byla získána rovnice kalibrační křivky v lineárním tvaru :

$$AUC = 2973 \cdot c$$

kde: AUCplocha pod křivkou píku CyA
c.....koncentrace CyA (mg/100ml)

Příslušný korelační koeficient R lineární regrese činil: $R = 0,9994$

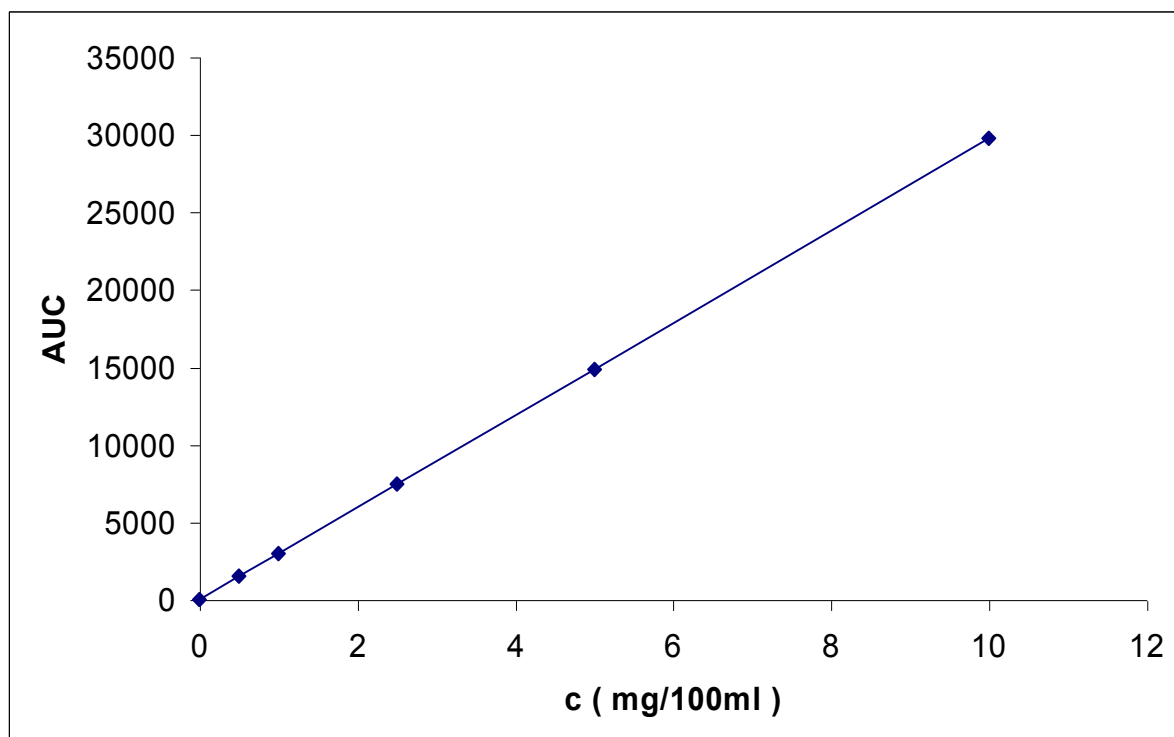
4.9 Naměřené údaje z permeačních měření

Data získaná při stanovení CyA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie z akceptorové fáze a z jednotlivých kompartmentů kůže byla přepočtena pomocí rovnice kalibrační křivky na koncentraci c (mg/100ml). Tyto číselné údaje byly dále přepočteny na množství Q ($\mu\text{g}/10\text{ml}$), které bylo obsaženo v 10,0 ml extrakční směsi acetonitrilu s ultračistou vodou v poměru 3:1. Protože bylo stanovení každého vzorku prováděno třikrát, byly jednotlivé hodnoty Q přepočteny na příslušné průměry a tyto průměrné hodnoty byly přepočteny na relativní procenta. Součet průměrů Q ze stratum desquamans a části stratum compactum (**SC**), hlubších vrstev epidermis (**E**), dermálního kompartmentu (**D**) a akceptorové fáze (**P**) jednotlivých vzorků činil 100 procent. Všechny tyto hodnoty jsou shrnuty v podobě tabulek v části **5. Výsledky**. Hodnoty relativních procent byly pro znázornění distribuce CyA v příslušných kožních etážích využity k sestavení grafů tak, jak jsou prezentovány v části **6. Diskuse**.

1608,216

1575,796

Graf 1: Kalibrační koncentrační závislost CyA v akceptorové fázi



AUCplocha pod křivkou píku CyA

c.....koncentrace CyA (mg/100ml)

Tab. 5. 1: Procentuální distribuce CyA prasečí kůží po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM (bez enhanceru)

	SC	E	D	P
vzorek č.1	32	26	41	0,9
vzorek č. 2	22	32	46	0,3
vzorek č. 3	19	16	58	7
průměr	24,3	24,7	48,3	2,7
SEM	6,8	8,1	8,7	3,7

Tab. č. 5. 2: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 1 % **T12**

	SC	E	D	P
Vzorek č.1	26	10	63	0,6
Vzorek č. 2	23	8	69	0,1
Vzorek č. 3	33	4	63	0,2
průměr	27,3	7,3	65	0,3
SEM	5,1	3,1	3,5	0,3

Tab. 5. 3: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % **AZ**

	SC	E	D	P
vzorek č.1	31	9	53	8
vzorek č.2	19	29	52	0,5
vzorek č.3	23	39	37	0,1
vzorek č.4	23	16	61	0
vzorek č.5	15	6	79	0
průměr	22,2	19,8	56,4	1,7
SEM	5,9	13,9	15,3	3,5

Tab. č. 5. 4: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % **DP**

	SC	E	D	P
vzorek č.1	39	23	38	0,1
vzorek č.2	33	12	53	2
vzorek č.3	25	7	48	21
vzorek č.4	28	9	62	0,2
vzorek č.5	30	7	63	0,1
průměr	31	11,6	52,8	0,6
SEM	5,3	6,7	10,4	0,9

Tab. 5. 5: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % **MP**

	SC	E	D	P
Vzorek č.1	33	13	53	0,9
Vzorek č. 2	13	18	70	2
Vzorek č. 3	33	13	54	0,4
průměr	26,3	14,7	59	1,1
SEM	11,5	2,9	9,5	0,8

Tab. 5.6: Velikost depa **CyA** v jednotlivých vrstvách kůže a jeho množství v akceptorové fázi po 12hodinové expozici

	SC	E	D	P
Bez enhanceru	27,0	29,0	43,5	0,6
T	27,3	7,3	65,0	0,3
A	24,3	25,7	47,3	0,3
MP	26,3	14,7	59,0	1,1
DP	32,3	14,0	46,3	1,1

Vysvětlivky: T ... transkarbam (1%), A ... azone (5%), DP ... dodecylpyrrolidon (5%),
MP ...methylpyrrolidon (5%)

6. DISKUSE

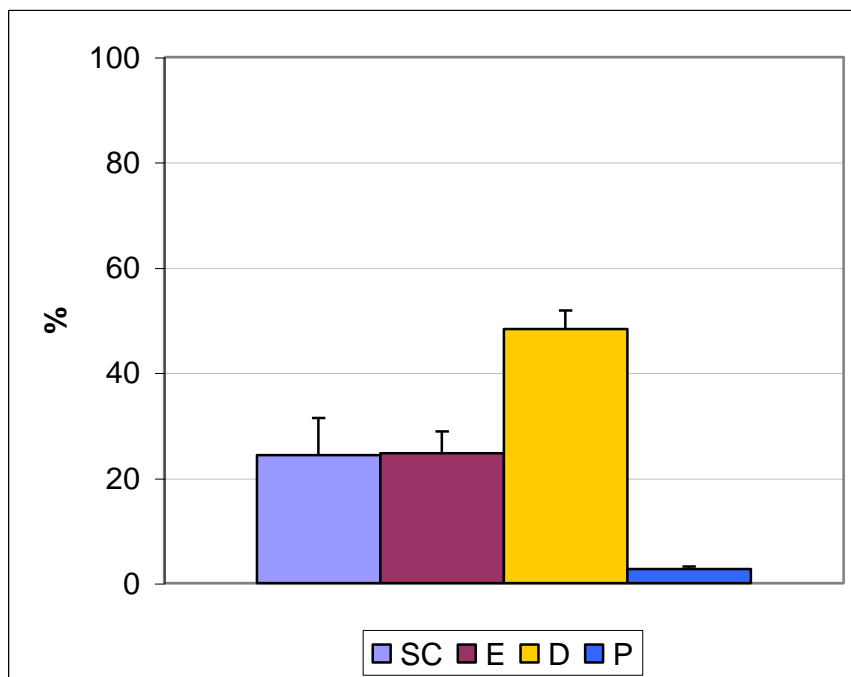
Stanovení CyA v akceptorové fázi permeačních pokusů bylo po konzultaci s analytickým oddělením firmy IVAX/Galena Opava dobře proveditelné a poskytlo kalibrační přímkou v dostatečně širokém pásmu koncentrací. Nejlépe se cyklosporin stanovoval z kalibračních roztoků, odebírané akceptorové fáze permeačních pokusů a z výluhů ze zbytku kůže. Situace, která činila potíže při předcházející práci,¹⁶ tak byla velmi uspokojivě a přitom jednoduše vyřešena. Problematictější bylo stanovování z výluhů z lepících pásek, protože se do eluční kapaliny dostávaly pro stanovení rušivé látky, které jsou součástí lepící pásky. Původně zkoušených 60 minut eluce se neosvědčilo. Daný problém byl částečně vyřešen zkrácením doby extrakce na 30 minut, velikost píků rušivých látek se tak podstatně zmenšila. Během pokusů byly testovány dva druhy lepících pásek. Nejdříve lepící páska značky AERO, která obsahovala dříve zmíněné rušivé látky pro stanovení a dále pak lepící páska Scotch® firmy 3M. S touto lepící páskou bylo dosaženo mnohem lepších výsledků stanovení, protože se na chromatogramu již žádné rušivé píky nevyskytly.

Každý donorový vzorek byl testován paralelně pomocí tří permeačních cel. Získali jsme tak od každého vzorku tři výsledky, které se ale u některých vzorků značně lišily. Proto byly vzorky s nestejnými výsledky testovány ještě pomocí dalších dvou permeačních cel. Získali jsme další dva výsledky, které nám měly usnadnit rozhodnutí o tom, které výsledky lze statisticky vynechat. U všech vzorků nám to ovšem nepomohlo, tudíž jsme se rozhodli ponechat výsledky všechny s tím, že výsledné průměrné hodnoty a příslušné údaje o směrodatných odchylkách budou zahrnovat veškeré proměnné faktory pokusu, včetně variability kůže, na které jsme vzorky testovali.

Z hodnocení naměřených údajů, které jsou v souhrnné podobě tabelárně uvedeny v části **5. Výsledky**, byly získány zajímavé informace. Pro potřeby názornější diskuse budou postupně prezentovány v grafické podobě. Poměrné rozložení CyA v jednotlivých etážích kůže tak ukazují **grafy 6. 1 až 6.5**

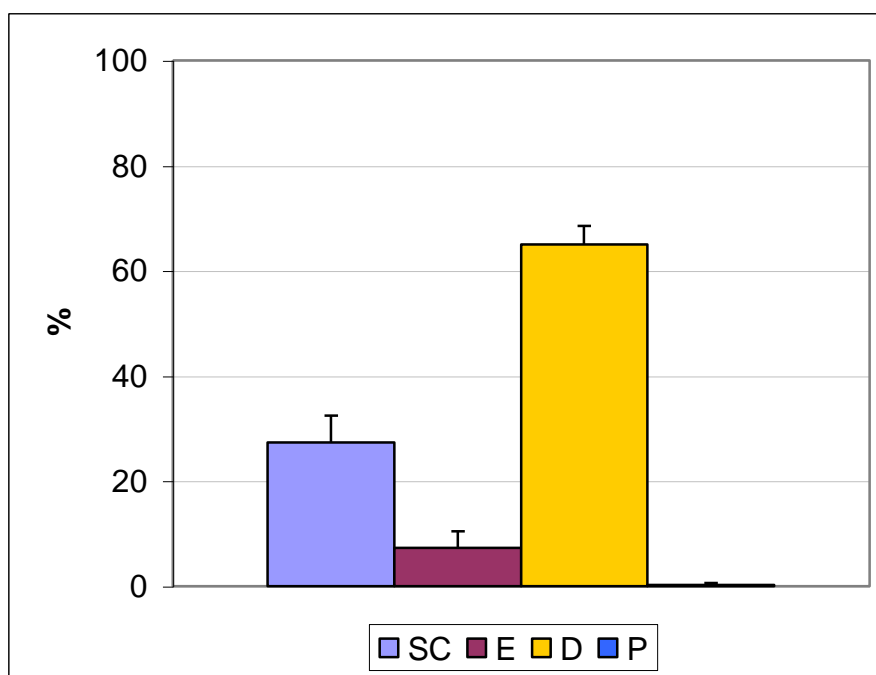
Z **grafu 6. 1.** je patrné, že po 12 hodinové expozici donorovým vzorkem zůstala přibližně jedna čtvrtina CyA zachycena v SC, tedy v odlupující se části rohové vrstvy kůže. Stejný díl zůstal zachycen v epidermálním kompartmentu E a téměř celý zbytek, tedy téměř polovina pronikla do vrstvy D, tedy do dermis. Je zajímavé, že v akceptorové kapalině pod kůží byl nalezen asi 3% podíl z celkově absorbovaného množství léčiva.

Graf 6.1: Procentuální distribuce **CyA** kůži po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM (bez enhanceru)



V grafu 6. 2 je dobře vidět, že při analogické aplikaci CyA z IPM, který ovšem obsahuje přídavek T12, zůstává množství léčiva zachyceného v SC téměř stejné jako v předchozím případě.

Graf 6.2: Procentuální distribuce **CyA** kůži po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 1 % T12

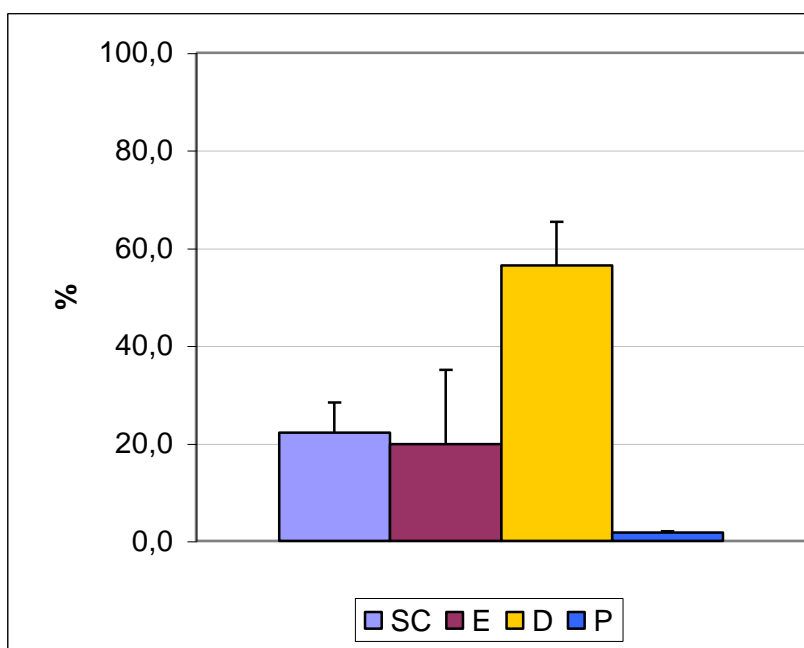


Podstatný rozdíl je ovšem v tom, že daleko větší podíl CyA prochází až do dermis, kde se pravděpodobně shromažďuje, neboť dále již do akceptorové fáze pod kůži neprochází.

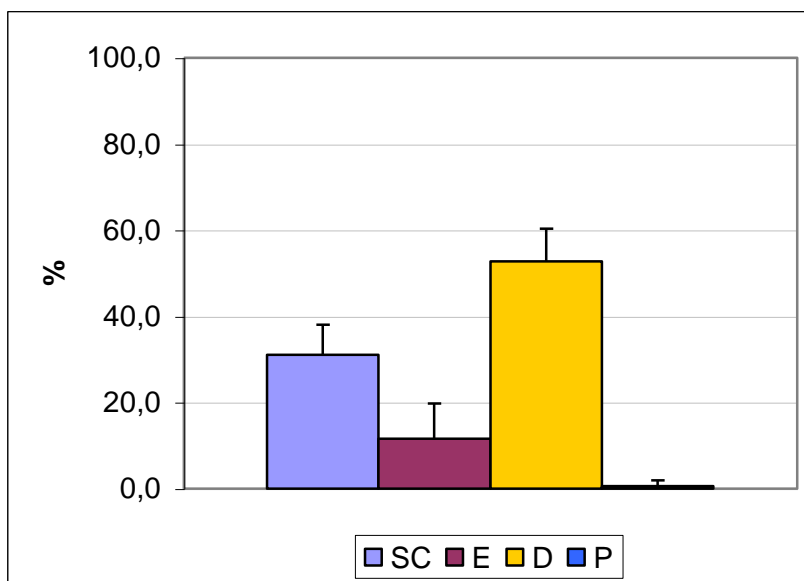
Obsah CyA nalezený v D kompartmentu byl v tomto případě, tedy za použití T12, v rámci provedené studie nejvyšší.

V obou případech stojí pro zvolené IPM vehikulum za povšimnutí poměrně malá variabilita, která není u strippingové metody zcela obvyklá.

Graf 6.3: Procentuální distribuce CyA kůži po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % AZ



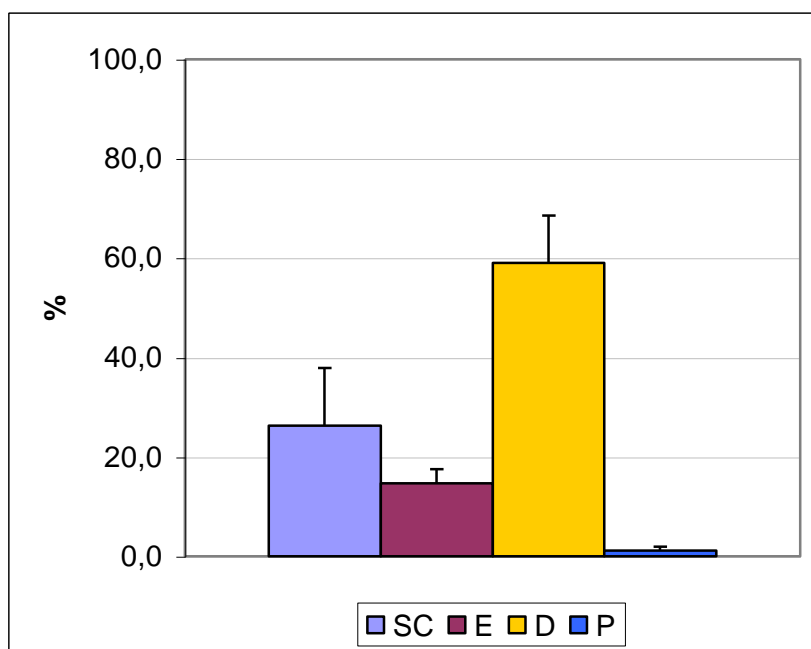
Graf 6.4: Procentuální distribuce CyA kůži po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % DP



Podobnou charakterizaci ovšem neumožňují výsledky získané s IPM vehikulem za přídavku 5 % azonu. V tomto případě je zřejmé (viz **graf 6. 3**), že distribuce CyA v hodnocených etážích kůže je v zásadě shodná, jako při průniku z IPM samotného, bez enhanceru, tedy že v SC a E se zadrží necelá polovina a asi 55 procent CyA přejde do dermis.

Pokud jde o množství CyA v dermálním kompartmentu, poskytují podobné výsledky při 12hodinové expozici také donorové vzorky s obsahem obou použitých pyrrolidonů , jak ukazují **grafy 6. 4 a 6.5**. Rozdíl je ovšem ve vlivu těchto enhancerů na rozložení CyA mezi etáže SC a E. V tomto směru se přibližují efektu T12.

Graf 6.5: Procentuální distribuce CyA kůži po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM s obsahem 5 % MP

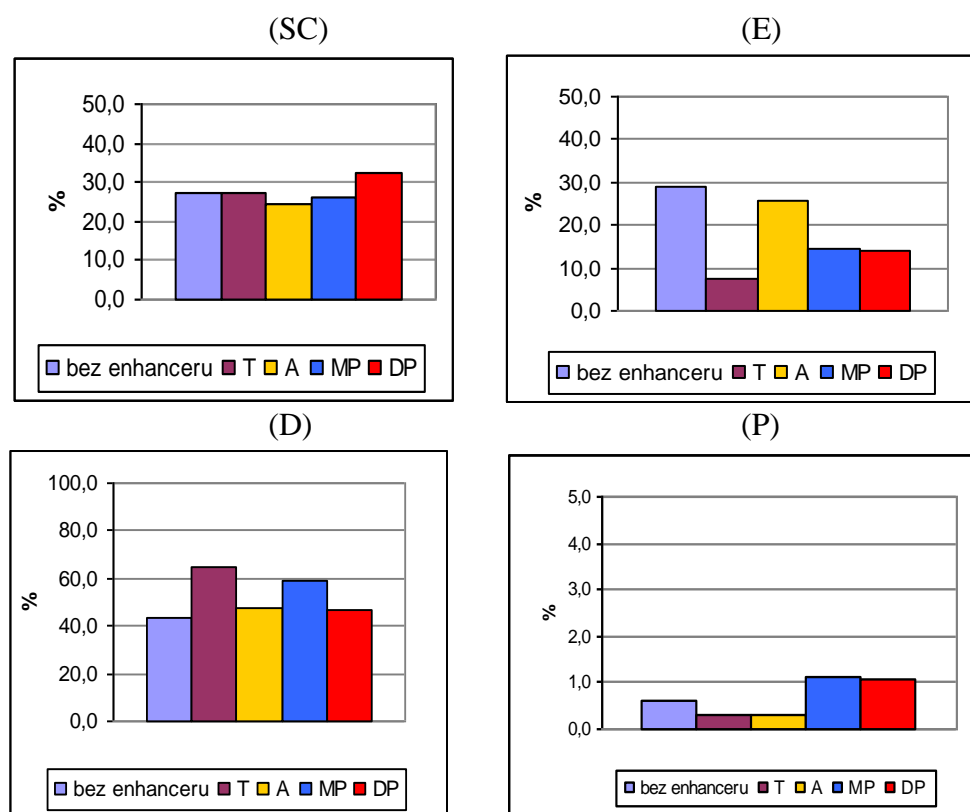


Zaměříme-li se nyní na získané výsledky z jiného pohledu, a to na rozložení efektu enhancerů vůči CyA podle jednotlivých etáží, jsou zřejmá, jak prezentuje kombinovaný **graf 6.6**, další zajímavá srovnání. Aniž by (zatím) bylo použito běžných statistických metod, je možné předběžně odhadnout, že podíl CyA v odlupující se rohové části SC je ve všech případech hodně podobný, zhruba na úrovni 20 až 30 procent.

V kompartmentu E zůstává zachyceno nejvíce CyA u vzorků IPM bez enhancerů. Naopak, zcela jasně nejméně CyA je zachyceno, a tudíž nejvíce proniká hlouběji v případě přídavku s T12. To je patrné z části (D) **grafu 6.6**. Výsledky získané měřením pronikavšího

CyA až do kompartmentu **P** je nutné chápat jako orientační a podpůrné vzhledem k výše uvedeným pozorováním. Pod kůží nalezená kvanta CyA jsou ve všech případech relativně nízká a variabilní. Umožňují konstatovat bezpečně jen tolik, že CyA pronikal ve všech případech celým profilem kůže ze všech donorových vzorků

Graf 6.6: Procentuální distribuce CyA do stratum corneum (**SC**), epidermis (**E**), dermis (**D**) a (**P**) po 12 hodinové permeaci z 10% roztoku v IPM bez enhanceru, s obsahem 1 % transkarbamu 12 (T), obsahem 5 % azonu (A), s obsahem 5 % methylpyrrolidonu (MP), nebo obsahem 5 % dodecylpyrrolidonu (DP)



Obecněji lze říci, že v práci bylo dokázáno, že význam permeačních enhancerů pro průnik CyA kůží a zejména pro tvorbu jeho depa v kůži je značný. Jako zajímavá se jeví tvorba depa CyA v dermis, odkud by se postupně uvolňoval do lymfatického systému. Lymfatický systém by pak zajistil distribuci cyklosporinu v organismu. Depo se hlavně tvořilo v dermální vrstvě kůže (pracovně označené symbolem **D**).

Pokud bychom porovnali výsledky průniku z donorových vzorků, které neobsahovaly enhancer, s výsledky vzorků obsahujících enhancer, pak je zřejmé, že procentuálně nejmenší byla tvorba depa u vzorků bez enhancerů (asi 44 %). Z permeačních enhancerů se pro tvorbu

depa zdá být nejlepším transkarbam 12 (65%), dále methylpyrrolidon (59%), azone (47,3%) a dodecylpyrrolidon (46,3%).

Pokud jde o stanovení cyklosporinu v akceptorové fázi, bylo zjištěno, že methylpyrrolidon a dodecylpyrrolidon zvýšily průnik cyklosporinu přes kůži. Naopak výsledky stanovení cyklosporinu z akceptorové fáze vzorků s přídavkem azonu a transkarbamu 12 byly nižší než u vzorků bez enhanceru.

Výše uvedené pokusy byly hodnoceny po 12hodinovém intervalu. Zajímavé je, zda a jakým způsobem ovlivňuje doba expozice (penetrace a permeace) výsledky analogických strippingových a permeačních pokusů. Tomuto tématu bude věnována některá z dalších prací.

7. ZÁVĚRY

1. Stanovení cyklosporinu v nově doporučené permeační akceptorové fázi je velmi dobře použitelné. Mobilní fáze o složení acetonitril - 0,04M KH_2PO_4 v poměru 3:1 umožňuje zlepšení ostrosti píku CyA a jeho oddělení od píku azidu sodného.
2. Pro metodu strippingu lze doporučit lepicí pásku Scotch® firmy 3M, neboť do elučního činidla pro stanovení CyA v sejmutých vrstvách neuvolňuje žádné látky, které by na chromatogramu rušivě interferovaly s léčivem.
3. Cyklosporin A z testovaných vzorků za daných pokusných podmínek kůží proniká, přičemž permeuje na úrovni spolehlivě analyticky měřitelných hodnot.
4. Vliv testovaných permeačních enhancerů na průnik CyA do kůže a na tvorbu jeho depa v kůži je značný.
5. Z hodnocených permeačních enhancerů se pro tvorbu depa zdá být neúčinnějším transkarbam 12, dále methylpyrrolidon, azone i dodecylpyrrolidon.
6. Methylpyrrolidon a dodecylpyrrolidon zvýšily průnik cyklosporinu kůží. Naopak výsledky stanovení cyklosporinu z akceptorové fáze vzorků s přidavkem azonu a transkarbamu 12 byly nižší než u vzorků bez enhanceru, komplementárně ke zvýšené depozici v dermis.

8. SOUHRN

Teoretická část práce podává stručný přehled informací o transdermálním podání léčiv včetně využití transdermálních enhancerů. Část týkající se CyA zahrnuje poznatky o jeho struktuře, farmakologických účincích včetně účinků nežádoucích, jeho využití v terapii a aplikačních možnostech.

Experimentální část přináší výsledky in vitro permeačních pokusů na prasečí kůži. Akceptorová fáze byla tvořena propylenglykolem a TRIS-pufrem o pH 7,1 v poměru 1:1. Stanovení permeantu bylo prováděno pomocí HPLC s UV detekcí při 220 nm. Bylo potvrzeno, že volba akceptorové i mobilní fáze byla vhodná.

Jako donorové vzorky byly použity přesycené soustavy CyA bez enhanceru, dále pak s 5% přídatkem azonu nebo methylpyrrolidonu či dodecylpyrrolidonu, nebo s 1 % transkarbam 12. Všechny enhancery v použitých koncentracích tvorbu depa v kůži zvyšují, transkarbam 12 v použité nejnižší koncentraci nejvíce.

9. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

CyA	cyklosporin A
MP, NMP	methylpyrrolidon, (N-methyl-2-pyrrolidon)
DP	dodecylpyrrolidon
2P	2-pyrrolidon
T12, T	transkarbam 12
AZ, A	azone
SC	stratum corneum
E	epidermis
D	dermis
P	akceptorová fáze
SEM	směrodatná odchylka průměru

10. LITERATURA

- 1 El-Kattan, A.: Transdermal testing: practical aspects and methods, Pharm. Sci. Technol. Today, 3, 2000, s. 426-430
- 2 Chalabala, M. a kol.: Technologie léků, 2. vydání, Galén, Praha 2001, s. 184-186
- 3 Hadgraft, J.: Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery, Int. J. Pharm., 184, 1999, s. 1-6
- 4 Barry, B.W.: Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery, Eur. J. Pharm. Sci., 14, 2001, s. 101-114
- 5 http://www.3m.com/us/healthcare/manufacturers/dds/jhtml/patch_anatomy.jhtml
- 6 Williams, A. C., Barry, B. W.: Penetration enhancers, Adv. Drug Deliv. Rev., 56, 2004, s. 603-618
- 7 Asbill, Ch. S., Michniak, B. B.: Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity, Pharm. Sci. Technol. Today, 3, 2000, s. 36-41
- 8 Chong-Kook Kim, Myo-Sook Hong, Yang-Bae Kim, Seok-Kyu Han: Effect of penetration enhancers (pyrrolidone derivatives) on multilamellar liposomes of stratum corneum lipid: a study by UV spectroscopy and differential scanning calorimetry, Int. J. Pharm., 95, 1993, s. 43-50
- 9 <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/N-METHYL-2-PYRROLIDONE.htm>
- 10 <http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/boskaal.htm>
- 11 Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Praha 2002, s. 518-519
- 12 http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/Harriet_Upton/Harriet_Upton.htm
- 13 http://www.zdrava-rodina.cz/med/med999/med999_33.html
- 14 https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1445.html
- 15 Automatizovaný informační systém léčivých přípravků (AISLP), verze 2006.1 k 1.1.2006

16 Myslivečková J., Transdermální in vitro permeace cyklosporinu. II. (Diplomová práce), Hradec Králové 2005, Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 62 s.

17 Lallemand, F., Perottet, P., Felt-Baeyens, O., Kloeti, W., Philippoz, F., Marfurt, J., Besseghir, K., Gurny, R.: A water-soluble prodrug of cyclosporine A for ocular application: a stability study, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26, 2005, s. 124-129

18 Lallemand, F., Furrer, P., Felt-Baeyens, O., Gex-Fabry, M., Dumont, J-M., Besseghir, K., Gurny, R.: A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics, *Int. J. Pharm.*, 295, 2005, s. 7-14

19 Barber, L. D., Pflugfelder, S. C., Tauber, J., Foulks, G. N: Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years, *Ophthalmology*, 112, 2005, s. 1790-1794

20 Barber, L. D., Pflugfelder, S. C., Tauber, J., Foulks, G. N: Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years, *Ophthalmology*, 51, 2005, s. 1790-1794

21 Redondo-Horcajo, M., Lamas, S.: Oxidative and nitrosative stress in kidney disease: A case for cyclosporine A, *J. Nephrology*, 18, 2005, s. 453-457

22 Tong, J., Laport, G., Lowsky, R.: Rhabdomyolysis after concomitant use of cyclosporine and simvastatin in a patient transplanted for multiple myeloma, *Bone Mar. Transpl.*, 36, 2005, s. 739-740

23 Ciechomska, I., Legat, M., Golab, J., Wesolowska, A., Kurzaj, Z., Mackiewicz, A., Kaminska, B.: Cyclosporine A and its non-immunosuppressive derivative NIM811 induce apoptosis of malignant melanoma cells in in vitro and in vivo studies, *Int. J. Cancer.*, 117, 2005, s. 59-67

24 de Vries, E. F J, Kortekaas, R., van Waarde, A., Dijkstra, D., Elsinga, P. H., Vaalburg, Willem.: Synthesis and Evaluation of Dopamine D3 Receptor Antagonist 11C-GR218231 as PET Tracer for P-Glycoprotein, *J. Nuclear Med.*, 46, 2005, s. 1384-1392

25 Sasongko, L., Link, J., M; Muzi, M., Mankoff, D. A., Yang, X., Collier, A. C., Shoner, S. C., Unadkat, J. D.: Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 77, 2005, s. 503-514

26 Lopes, L. B., Collett, J. H., Bentley, M V. L B: Topical delivery of cyclosporin A: an in vitro study using monoolein as a penetration enhancer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60, 2005, s. 25-30

- 27 Aliabadi, Hamidreza Montazeri, M. A., Sharifabadi, A. D., Lavasanifar, A.: Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A, *J. Control. Rel.*, 104, 2005, s. 301-311
- 28 Aliabadi, Hamidreza Montazeri; Brocks, Dion R.; Lavasanifar, Afsaneh: Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution, *Biomaterials*, 26, 2005, s. 7251-7259
- 29 Chen, Miles C M; Wang, Jui-Ling, Tzen; Jason T C: Elevating bioavailability of cyclosporine a via encapsulation in artificial oil bodies stabilized by caleosin, *Biotechnol. Progr.*, 21, 2005, s. 1297-1301
- 30 Dong, Xiao-guang; Xu, Yu-mei; Yuan, Gong-qiang; Shi, Wei-yun; Xie, Li-xin; Wang, Shen-guo: Intraocular implantation of cyclosporine A drug delivery system in the treatment of experimental uveitis, *Chin. J. Ophthalmol.*, 41, 2005, s. 636-641
- 31 Kanjickal, D., Lopina, S., Evancho-Chapman, M M., Schmidt, S., Donovan, D.: Improving delivery of hydrophobic drugs from hydrogels through cyclodextrins, *J. Biomed. Mater. Res.*, 74, 2005, s. 454-460
- 32 Li, Y., Zhu, K J., Zhang, J X., Jiang, H L., Liu, J H., Hao, Y L., Yasuda, H., Ichimaru, A., Yamamoto, K.: In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and epsilon-caprolactone: comparison with conventional PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.*, 295, 2005, s. 67-76
- 33 Quintana-Hau, J D., Cruz-Olmos, E., López-Sánchez, M I., Sánchez-Castellanos, V., Baiza-Durán, L., González, J R., Tornero-Montaño, Mondragón-Flores, R., Hernández-Santoyo, A.: Characterization of the novel ophthalmic drug carrier Sophisen in two of its derivatives: 3A Ofteno and Modusik-A Ofteno, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31, 2005, s. 263-269

