

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Stanovení permeace vybraných látek přes kůži in vitro s využitím
statických cel Franzova typu**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Odborný konzultant: RNDr. Alžběta Kračmarová

Hradec Králové, 2015

Tereza Dvořáková

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

Hradec Králové, 2015

Tereza Dvořáková

Ráda bych touto cestou poděkovala paní RNDr. Alžbětě Kračmarové za odborné vedení při provedení experimentu, za informace, názory a připomínky při zpracování diplomové práce. Také chci poděkovat paní doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za poskytnuté rady při zpracování této diplomové práce a panu Mgr. Aleši Bezroukovi, Ph.D za pomoc při výpočtech.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Stavba kůže	10
2.1.1 Anatomie.....	10
2.1.2 Fyziologie	12
2.2 Transdermální absorpce	14
2.2.1 Akceleranty transdermální permeace	16
2.3 Testování transdermální permeace <i>in vitro</i>	17
2.3.1 Franzova difúzní cela	17
2.4 Alzheimerova choroba	19
2.4.1 Symptomy	20
2.4.2 Diagnóza.....	20
2.5 Současná léčba AD s ohledem na možnosti transdermálního podání ...	21
2.5.1 Memantin	21
2.5.2 Inhibitory acetylcholinesterázy.....	22
2.5.2.1 Donepezil.....	23
2.5.2.2 Rivastigmin	24
2.5.2.3 Galantamin	25
2.6 Takrin.....	26

2.7	7-methoxytakrin.....	28
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1	Princip stanovení permeace <i>in vitro</i>	29
3.2	Použitý materiál	29
3.3	Použité chemikálie	29
3.4	Metodika	30
3.5	Provedení experimentu	30
3.6	Použití HPLC metodiky – analytické stanovení.....	32
3.7	Přehled experimentů	32
3.8	Hodnocení.....	33
4.	VÝSLEDKY	35
4.1	Permeační profily.....	36
4.1.1	Permeační profily takrinu	36
4.1.2	Permeační profily 7-MEOTA.....	40
4.2	Distribuce do jednotlivých vrstev kůže.....	45
4.2.1	Distribuce takrin	45
4.2.2	Distribuce 7-MEOTA	48
4.3	Procentuální vyjádření.....	52
5.	DISKUZE.....	55
6.	ZÁVĚR.....	60
	POUŽITÁ LITERATURA.....	61

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Studentka: Tereza Dvořáková

Název diplomové práce: STANOVENÍ PERMEACE VYBRANÝCH LÁTEK PŘES KŮŽI IN VITRO S VYUŽITÍM STATICKÝCH CEL FRANZOVA TYPU

Práce se zaměřuje na testování transdermální permeace vybraných látek - takrinu a 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Takrin je inhibitor acetylcholinesterázy schválený pro terapii Alzheimerovy choroby. Pro svou hepatotoxicitu a vedlejší nežádoucí účinky se dnes již nepoužívá. Transdermální podání by mohlo být vhodnou alternativou k omezení těchto nežádoucích účinků. 7-MEOTA je derivát takrinu, který v dosavadních *in vitro* testech prokazuje ve srovnání s takrinem nižší toxicitu.

Cílem práce bylo objasnit, zda a v jaké míře mají takrin a 7-MEOTA schopnost transdermální permeace.

Experimenty byly provedeny *in vitro* s využitím statických cel Franzova typu. Jako receptorová tekutina byl pro látku takrin použit fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem a pro 7-MEOTA se jednalo o fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem pro jednu část pokusů a pro druhou část o vodu. Látky byly aplikovány infinite dose ve vodném roztoku na povrch prasečí kůže, která byla dermatována na tloušťku 500 μm a 1000 μm . Část pokusů byla provedena v zakrytém uspořádání pomocí parafínového filmu a část v uspořádání nezakrytém. Byly vytvořeny permeační profily obou látek a stanovena jejich distribuce do jednotlivých vrstev kůže. Výsledky byly porovnány s dříve sledovanou standardní látkou kofeinem.

Ukázala se poměrně nízká schopnost samovolné permeace do receptorové tekutiny pro takrin i 7-MEOTA. Nejvyšší koncentrace látek byla stanovena ve vrstvě stratum corneum.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Inorganic & Organic Chemistry

Student: Tereza Dvořáková

Title of diploma thesis: EVALUATION OF THE IN VITRO SKIN PERMEATION OF SELECTED COMPOUNDS USING STATIC FRANZ DIFFUSION CELLS

The work focuses testing the transdermal permeation of selected substances - tacrine and 7-methoxytacrine (7-Meota). Tacrine is an acetylcholinesterase inhibitor approved for the treatment of Alzheimer's disease. For its hepatotoxicity and side-effects is no longer used today. Transdermal administration could be a good alternative to reduce those side effects. 7-Meota is tacrine derivative, which in previous *in vitro* testing demonstrated lower toxicity in comparison with tacrine.

The aim of this thesis was to clarify if and to what extent has tacrine and 7-Meota ability for transdermal permeation.

Experiments were performed *in vitro* by using Franz diffusions cells. As receptor fluid was used for tacrine a phosphate buffer solution and for 7-Meota was a phosphate buffer solution for one part of the trial and for a second part was water. Substances were applied in an infinite dose in aqueous solution onto the surface of pig skin, which was cut to a thickness of 500 μm and 1000 μm . For the comparison was part of the experiments conducted in a closed configuration with paraffin film on the part of the donor and part uncovered. Permeation profiles have been created for both substances and provided for distribution to distinguishing individual skin layers. The results were compared with previously monitored standard substance caffeine.

Tacrine and 7-Meota pointed the relatively low ability to self permeation into the receptor fluid. The highest concentration of the substances was determined in the part of stratum corneum.

SEZNAM ZKRATEK

7-MEOTA – 7-methoxytakrin

AD – Alzheimerova choroba

ACH – acetylcholin

ACHE - acetylcholinesteráza

ACHEI – inhibitor acetylcholinesterázy

AK - aminokyselina

ALT – alaninaminotransferáza

BZ – 3-chinuklidylbenzilát

CNS – centrální nervová soustava

CYP – cytochrom P₄₅₀

GIT – gastrointestinální trakt

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPMC – hypermethylcelulóza

i.v. - intravenózní

MK – mastná kyselina

NMDA - N-methyl D-aspartát

PBS – fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem

p.o. - perorální

SC – stratum corneum

TD – transdermální

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). Léčba příčiny nemoci není známá, proto je možné pouze mírnění symptomů. Inhibitory acetylcholinesterázy (ACHEI) jsou nejdůležitější skupinou látek v symptomatické terapii. Schválenými látkami v terapii AD jsou donepezil, rivastigmin, galantamin a memantin.

Takrin byl první látkou schválenou pro terapii AD, ale pro svou hepatotoxicitu a další vedlejší nežádoucí účinky se dnes již nepoužívá. 7-MEOTA je syntetický derivát takrinu připravený jako potenciální léčivo pro terapii AD s nižší toxicitou.

Transdermální podání by mohlo být jednou z alternativ podání takrinu a omezení tak nežádoucích účinků, které vykazoval po perorálním podání (p.o.).

Cílem práce je na *in vitro* experimentálním modelu – statických difuzních tzv. Franzových celách s použitím prasečí kůže - objasnit, zda a v jaké míře mají takrin a 7-MEOTA schopnost transdermální permeace. Experimentální část se zaměřuje na sledování permeačních profilů zájmových látek za různých podmínek a stanovení, jaká frakce látek aplikovaných na povrch kůže zůstává v jednotlivých vrstvách kůže, konkrétně ve stratum corneum (SC), epidermis a dermis, jako nevstřebatelné množství.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stavba kůže

Kůže (lat. *integumentum comunne*) je jedním z největších a nejtěžších orgánů lidského těla. Plocha kůže dospělého člověka je 1,5 - 2 m² a hmotnost okolo 1/6 - 1/7 váhy těla, v průměru 18 - 20 kg, z čehož největší podíl připadá na podkoží. V průběhu vývoje vzniká část z ektodermu, konkrétně epidermis a část z mezodermu, zde se jedná o dermis, podkožní tuk, cévy a nervy. ^{1, 2}

2.1.1 Anatomie:

Kůže se skládá ze tří částí (Obr. 1.):

- pokožka (lat. *epidermis*)
- škára (lat. *dermis*)
- podkoží (lat. *tela subcutanea*) ³

Epidermis je nejtenčí část kůže (0,3 – 1,5 mm) tvořená keratinocyty – ploché buňky vyplněné keratinem, které procházejí směrem od bazální vrstvy po stratum corneum vývojem v korneocyty, dále se zde nacházejí melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. ³ Z histologického hlediska rozlišujeme od spodiny k povrchu 5 vrstev – stratum basale, spinosum, granulosum, lucidum a stratum corneum.

- ***Stratum basale*** je nejspodnější vrstva epidermis, která se pomocí svých cylindrických keratinocytů, palisádově řazených, připojuje na bazální membránu. Ta odděluje epidermis od dermis. Mezi jednotlivými keratinocyty můžeme najít i světlejší melanocyty, které tvoří asi 2 % vrstvy. ¹
- ***Stratum spinosum*** je vrstva tvořená polyedrickými keratinocyty většího objemu než buňky bazální vrstvy. Jednotlivé buňky jsou mezi sebou spojeny desmozomy. ⁴ Stratum basale a spinosum je také nazýváno Stratum

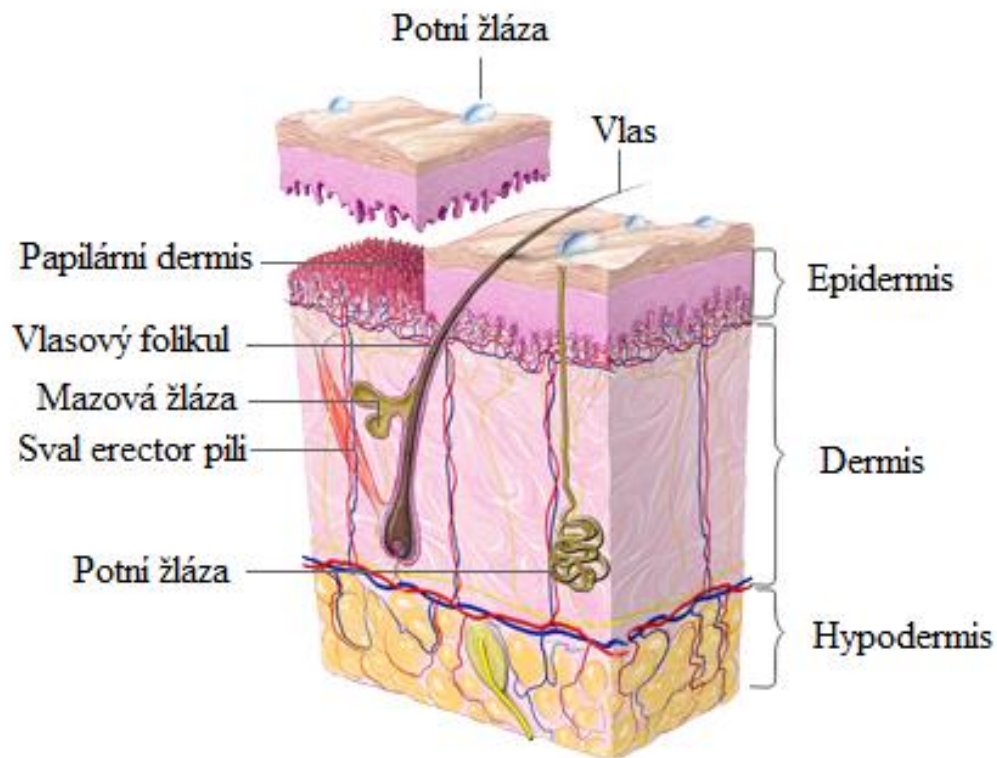
germinativum díky dělící se schopnosti buněk. V horní části vrstvy dochází k přeměně keratinocytů na výsledný kožní produkt - keratin. ³

- Stratum granulosum je vrstva tvořená typicky oploštělými buňkami s obsahem granul keratohyalinu, prekursoru keratinu. ³ Buňky z této vrstvy mohou migrovat k povrchu, kde se diferencují a následně dochází k jejich apoptóze. ⁴
- Stratum lucidum je přechodná vrstva mezi stratum corneum a zbytkem celé epidermis. ³
- Stratum corneum má největší význam pro průnik látek z okolního prostředí do organismu. ¹ Tvoří ji korneocyty, buňky bezjaderné, ploché a zrohovatělé, sestavené do 15 - 25 vrstev. ⁴

Dermis je střední vrstva kůže o tloušťce 0,6 – 3 mm. Vyskytují se zde 3 druhy buněk – fibroblasty, histiocyty a mastocyty. Jedná se o strukturu vláknitou, tvořenou kolagenními, elastickými a retikulárními vlákny, která je bohatě zásobena kapilárami. Z epidermis do dermis a naopak zasahují kožní adnexa – vlasy, nehty, potní a mazové žlázy. ¹

- Fibroblasty jsou důležité pro syntézu vaziva.
- Histiocyty vznikají z monocytů, které se sem dostávají krví. Jejich aktivní formou jsou makrofágy, které hrají důležitou roli v imunitním systému.
- Mastocyty jsou velké buňky obsahující celou řadu mediátorů jako serotonin, heparin nebo histamin, které se uvolňují při zánětlivé nebo imunologické reakci. ³

Tela subcutanea je nejspodnější vrstva kůže. Je tvořena tukovými buňkami (lipocyty), cévami a fibrózními trácemi. ¹ Tuková vrstva se svojí šířkou na jednotlivých částech těla liší. Nejtenčí je na víčkách a naopak nejsilnější se nachází na břiše či hýždích. ³ Její význam z hlediska transdermální permeace je oproti ostatním vrstvám minimální. ¹



Struktura kůže

Obr. 1. Stavba kůže. ⁵

2.1.2 Fyziologie:

Kůže odděluje vnitřní a vnější prostředí. Jednou z jejích nejvýznamnější funkcí je tedy bariérová, dále sekreční, metabolická, regulační, sensorická, imunologická, depotní a psychosociální.

- Bariérová funkce kůže se může dělit na fyzikální, chemickou a biologickou. Fyzikální = mechanickou ochranu zajišťuje především

rohová vrstva. SC je tvořeno ze 75-80 % proteiny, 5-15 % zastupují lipidy a zbytek připadá na organické sloučeniny. ¹

- Sekreční funkce kůže spočívá v produkci keratinu, melaninu, potu a mazu.
- Metabolická funkce při srovnání představuje kožní metabolismus asi 1/3 aktivity jater. Pro udržování a regeneraci struktur zde dochází k metabolismu cukrů, tuků a bílkovin.
- Regulační funkce je ovlivněna stavem kůže, především její rohové vrstvy a jejího případného porušení. Kůže se podílí zejména na termoregulaci.
- Senzorická funkce je zprostředkována pomocí tělísek, které reagují na teplo, chlad, dotek či bolest.
- Na Imunologické funkci se podílejí zejména keratinocyty, Langerhansovy buňky, makrofágy a mastocyty.
- Depotní funkce spočívá především ve vlastnosti tvoření velkého rezervoáru vody.
- Psychosociální funkce je důležitá pro postavení jedince ve společnosti. Vzhled můžeme ovlivnit společenský i profesní úspěch/neúspěch. ³

2.2 Transdermální absorpce

Transdermální absorpce je jako způsob aplikace léčiv studována z důvodu alternativního podání k perorálnímu a injekčnímu.

Léčiva přes kůži pronikají do cévního řečiště organismu pěti způsoby:

- transcelulární cestou – přes korneocyty a keratinocyty
- intercelulární cestou
- vlasovými folikuly
- mazovými žlázami
- vývody potních žláz ²

Průnik látek se děje pomocí pasivní difúze a nejvíce intercelulární, v menší míře transcelulární cestou. Je to několikastupňový proces, který lze dělit na penetraci – vstup látky pouze do rohové vrstvy a permeaci – přestup do spodnějších vrstev a do cévního řečiště. ⁶ Intercelulární cestou vstupu se nejčastěji myslí vlasové folikuly a potní žlázy. Transcelulární vstup můžeme rozdělit na intercelulární = mezibuněčnými prostory epidermis, nebo intracelulární = buňkami epidermis. ⁷

Transdermální podání léčiv má mnoho výhod:

- obchází first-pass efekt v játrech
- vyšší biologickou dostupnost
- nepodporuje non-compliance pacienta
- plazmatické hladiny léčiv jsou stabilnější
- aplikace je poměrně snadná ⁸

S transdermální aplikací se pojí i několik nevýhod, z nichž největší je průnik pouze omezeného množství léčiva, možné lokální dráždění a také interindividuální rozdíly mezi pacienty.

Ne všechna léčiva budou touto cestou prostupovat, musejí splňovat několik kritérií.

- $M \leq 400$ g/mol
- logP musí být mezi -1-4
- teplota tání ≤ 200 °C
- neionizovaná molekula

Intercelulární prostor SC je tvořen směsí lipidů a vody. Lipidové lamely jsou tvořeny z 50 % ceramidy, 25 % cholesterolem, 10 % volnými MK a zbytek tvoří estery cholesterolu, glukosylceramidy a cholesterol sulfát. Nejdůležitější částí, která má vliv na penetraci, jsou ceramidy tvořené sfingosinem, fytosfingosinem nebo 6-hydroxysfingosinem připojené amidickou vazbou k MK a délce okolo 20-24 uhlíků. ⁸

K testování přenosu chemických látek lze použít metody *in vivo* a *in vitro* a to jak na kůži lidské a zvířecí, tak na uměle vytvořené. Alternativou mohou být membrány jiné než kůže nebo testování absorpce *in silico*. ²

2.2.1 Akceleranty transdermální permeace

Urychlení absorpce je možné několika způsoby. Největší progresi dnes zažívají tzv. urychlovače (akceleranty) transdermální permeace, usnadňující přestup látek přes kůži tím, že dočasně snižují bariérovou funkci kůže a umožňují tak léčivu snadnější vstup do systémové cirkulace. ⁶

Na akceleranty jsou kladené vysoké nároky:

- nesmějí být toxické, dráždivé a alergizující
- jsou bez vlastního farmakologického účinku
- musí vykazovat rychlý nástup účinku a předvídatelnou dobu působení
- musí usnadňovat přestup léčiva pouze v jednom směru
- nesmí ovlivňovat ostatní složky přípravku – léčivé a pomocné látky
- po odstranění akcelerantu by mělo dojít k rychlé obnově bariérové funkce kůže ^{6,9}

Je známo několik cest, jimiž mohou akceleranty působit. U řady z nich však ještě nebyl mechanismus zcela objasněn. Patrně je založen na interakci akcelerantu s jednotlivými strukturami kůže v SC nebo optimalizaci rozdělovacího koeficientu. ^{6,10}

Z chemického hlediska jsou velmi nesourodou skupinou. Zatím žádná skupina akcelerantů se nejeví jako ideální a pro jejich použití se vychází z poměru terapeutického přínosu a rizika výskytu nežádoucích účinků. ⁶

Akceleranty mohou být testovány *in vitro* ve Franzových celách s použitím lidské nebo prasečí kůže a jejich účinnost je vyjadřována pomocí tzv. akceleračního profilu (AP), což je poměr množství prošlé látky s akcelerantem a množství prošlé látky bez akcelerantu. ¹¹

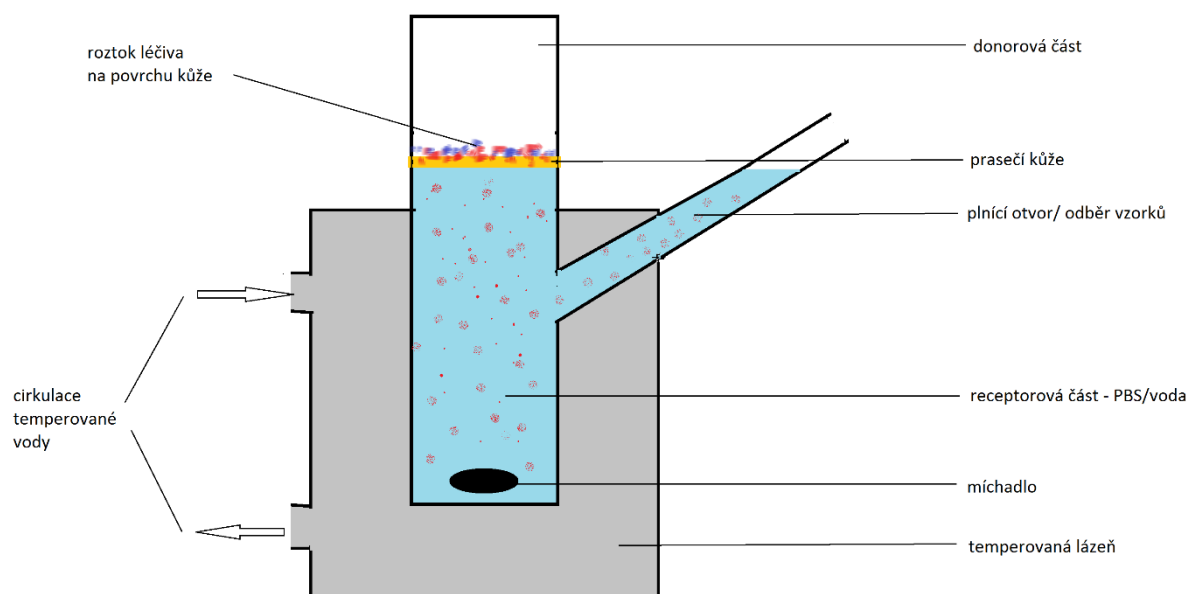
2.3 Testování transdermální permeace *in vitro*

Při testování transdermální absorpce *in vitro* se nejčastěji používají difúzní cely. Lze využít permeaci jak ve směru vertikálním, tak horizontálním. V praxi našel využití především směr vertikální. ²

Cely dělíme na dva základní typy:

- statická vertikální tzv. Franzova cely
- průtoková vertikální cely

2.3.1 Franzova difúzní cely



Obr. 2. Schéma Franzovy cely

Franzova difúzní cela je vyráběna z inertního materiálu, nejčastěji skla. Skládá se ze dvou částí – horní (donorová) a dolní (receptorová). Mezi tyto dvě části se napíná vzorek kůže, spodní vrstvou na receptorovou část, opatrně aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin na hladině receptorové tekutiny. Plocha pokožky je nejčastěji okolo 0,3 – 5 cm². Aplikovaná látka je na celu fixována víčkem o stejném průměru, jako má povrch cely, a speciální svorkou, která brání úniku látky do okolí. ²

Na pokožku je nanášeno definované množství testované látky tak, aby došlo k jejímu rovnoměrnému rozprostření po celé šíři. Buďto jako tzv. finite dose („konečná dávka“) nebo infinite dose („nekonečná dávka“). ² Povrch kůže může zůstat odkrytý, tak bude docházet k pozvolnému odpařování látky a jedná se o tzv. unoccluded, nebo dojde k zakrytí např. parafínovým filmem a zde se jedná o tzv. occluded experiment.

Do spodní části je napipetována receptorová tekutina, která nesmí nijak ovlivňovat vlastnosti kůže a znehodnocovat tak celý experiment. Po celou dobu je míchána. Při testování hydrofilních látek se nejčastěji jedná o fyziologický roztok s pH okolo 7,4, u lipofilních se přidává ještě sérový albumin nebo některá organická rozpouštědla. ²

V průběhu experimentu je udržována stálá teplota pokud možno odpovídající teplotě povrchu těla.

Odběr vzorků je prováděn pomocí plnicí/odběrové části cely. Na odběru velice záleží, je nutné, aby nedošlo k odebrání pouze vrchní kapaliny s nedostatečně rozmíchanou sledovanou látkou.

2.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní porucha CNS související s progresivní ztrátou kognitivních funkcí, zejména paměti. V prvních stádiích se jedná o ztrátu paměti krátkodobé. V mozku se nacházejí dvě patologické léze – intracelulární neurofibrilární klubka a extracelulární amyloidní usazeniny v senilních placích.¹² Typickým znakem AD jako neurodegenerativního onemocnění je úbytek mozkové hmoty. V důsledku ukládání beta-amyloidu okolo nervových vláken dochází k poškození nervových buněk a spojů a následnému úbytku acetylcholinu, hlavního neurotransmiteru na synapsích nervových buněk. Rozsáhlé ztráty neuronů a synaptické změny v mozkové kůře a hippocampu jsou zásadní pro kognitivní a paměťové funkce. Depozita amyloidu mohou způsobit smrt nervových buněk pomocí několika možných mechanismů jako je oxidativní stres, vyčerpání energie, zánět a apoptóza. V místě plaků současně dochází k hromadění excitačních aminokyselin. Etiologie nemoci stále není úplně známá. Od prvních příznaků do úmrtí uplyne přibližně 7-10 let.¹³

Nemoc byla poprvé popsána roku 1907 německým lékařem Aloisem Alzheimerem jako vzácná, ale v dnešní době se odhaduje výskyt choroby u 7 mil. obyvatel pouze Evropy. Ze současných poznatků je zřejmé, že počet nemocných se každým rokem zvyšuje.¹⁴

Velkou roli v patogenezi nemoci hraje věk. U lidí starších 85 let se odhaduje prevalence demence až ¼, na čemž se AD podílí z 60%. S vyšším věkem stoupá pravděpodobnost a riziko výskytu nemoci, ale nelze AD nazývat nemocí stáří, protože výskyt u mladších věkových kategorií má také vzestupný trend.¹⁵

Na základě věku rozlišujeme 2 formy choroby – tzv. „early-onset“ a „late-onset“. Early-onset forma postihuje lidi, kteří ještě nedosáhli 65 let věku, přičemž nejvíce nemocných je ve věkové kategorii 40-ti a 50-ti let. Diagnóza tohoto typu AD je poněkud složitější než diagnóza late-onset, protože se obvykle nepředpokládá, že postižený trpí právě AD. Early-onset není o nic méně zákeřná a probíhá stejně jako demence ve věku pozdějším.¹⁶

Současná medicína prozatím nedospěla ke kauzální léčbě nemoci jako takové, ale pouze mírnění jejích příznaků a oddalování jednotlivých stadií a to jak přístupy farmakologickými tak nefarmakologickými.

2.4.1 Symptomy

Zprvu jsou symptomy poněkud těžko postřehnutelné a s tím také často souvisí pozdní diagnóza choroby. Nemoc se projevuje obtížným zapamatováním nově naučených informací, protože AD typicky začíná v části mozku, která má vliv na učení. Dlouhodobá paměť funguje o dost lépe než krátkodobá. Jak nemoc postupuje, tak se objevují stále závažnější příznaky, jako je dezorientace v prostoru a času, změny nálady a chování, pocity zmatku, podezřívání lidí v okolí. Pokročilejší stádium nemoci vyústí v obtížné mluvení, polykání a poruchy chůze.¹⁷ S poruchou kognitivní funkce také může souviset problém s čichem.¹⁸

2.4.2 Diagnóza

Velký význam má především včasná diagnóza choroby a zahájení její léčby.

Nejčastěji používaný je tzv. MMSE (Mini Mental State Examination) – krátký orientační test kognitivních funkcí. Na základě počtu získaných bodů jsou pacienti zařazováni do skupin bez demence, s lehkou, středně těžkou až těžkou demencí.¹⁹

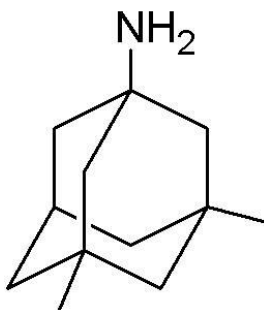
Dále je to magnetická rezonance mozku a nověji s využitím tzv. CAD (computer aided diagnosis) – diagnóza s podporou počítačové techniky. Jedná se o zobrazovací techniku, která lékařům pomáhá odhalit včasná stádia AD. Postupně dochází k progresi této metody a jejímu většímu uplatnění.²⁰

Další z diagnostických metod je také vyšetření mozkomíšního moku – detekce beta-amyloidu a tau proteinu.²¹

2.5 Současná léčba AD s ohledem na možnosti transdermálního podání

Dle Medicíny založené na důkazech (angl. Evidence based medicine – EBM) se používají v terapii choroby ACHEI – donepezil, rivastigmin, galantamin. U středně těžkých a těžkých forem našel své využití inhibitor NMDA (N-methyl D-aspartát) receptorů – memantin. ²²

2.5.1 Memantin



3,5-dimethyladamantan-1-amin

Memantin je parciální inhibitor NMDA receptorů. Látka je schválená pro léčbu středně těžké až těžké AD. V oblasti plaků dochází k nadměrnému uvolňování excitačních AK glutamátu a aspartátu, které se váží na NMDA receptory. Pomocí této vazby dochází k otevření Ca^{2+} kanálů a influxu iontů do neuronů. Pomocí kaskádové aktivace řady enzymů dojde k postupnému zániku neuronů. Inhibicí NMDA receptorů lze popsanému ději zabránit. ²¹

Memantin je podáván v počáteční dávce 10 mg/den a může dojít k postupnému zvýšení 20 mg/den. Současně s memantinem může být pacient léčen pomocí ACHEI. ²³

2.5.2 Inhibitory acetylcholinesterázy

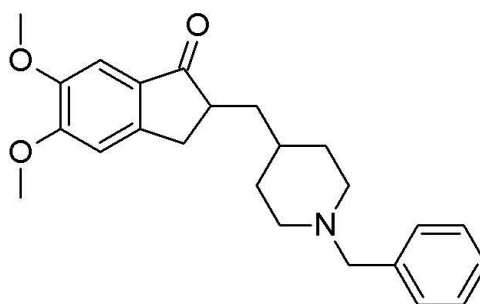
Mechanismus účinku ACHEI spočívá ve zpomalení odbourávání acetylcholinu (ACH), které se děje právě pomocí enzymů – esteráz. Tím se zvyšuje koncentrace ACH v synaptické štěrbině a dochází k cholinergnímu přenosu na synapsích v CNS. ACHEI jsou látky, které relativně snadno prostupují přes hematoencefalickou bariéru. Dochází ke zpomalení průběhu demence a oddálení těžkých stádií.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky ACHEI patří nauzea, zvracení, průjem, bolest břicha a nechutenství v závislosti na zvýšené cholinergní aktivitě v gastrointestinálním traktu. Perorálně se proto doporučují léčiva podávat po jídle. Dalšími popsányými NÚ jsou bradykardie, svalové křeče, nespavost, zvýšené pocení či bronchokonstrikce v důsledku zvýšené cholinergní aktivity v ostatních orgánech.²⁴

Vzhledem k vysokému výskytu gastrointestinálních nežádoucích účinků p.o. podávaných lékových forem by výhodnou alternativou k perorálnímu podání léčiv na AD mohlo být podání transdermální cestou. Výhodou by byla zejména možnost udržovat trvalou terapeutickou plazmatickou koncentraci léčiva, snadná aplikace a snížení systémových nežádoucích účinků.²⁵

Možnostmi transdermálního podání jednotlivých ACHEI se podrobněji zabývají následující odstavce.

2.5.2.1 Donepezil



(R,S)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxyindan-1-on

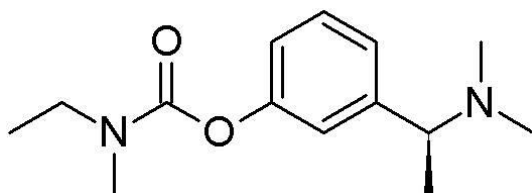
Donepezil je nejčastěji používaná látka pro léčbu AD v České republice, schválená r. 1996, s dávkou v začátku terapie 5 mg jedenkrát denně a postupným zvýšením na 10 mg jedenkrát denně, s biologickým poločasem 70 - 80 h. Je to látka poměrně dobře tolerovaná. Metabolismus donepezilu probíhá pomocí CYP 3A4 a 2D6, v důsledku čehož je velká pravděpodobnost lékových interakcí. Jeho největší výhodou jsou minimální vedlejší účinky, dlouhý biologický poločas, antioxidační a neuroprotektivní účinky. ²¹

Donepezil je schválený pro terapii AD ve formě p.o. tablet s dávkou 5 mg nebo 10 mg a p.o. tablet s postupným uvolňováním s dávkou 23 mg. Při p.o. podání dochází ke značnému kolísání hladin, proto by vyvinutí transdermální (TD) formy mohlo nabídnout značné výhody. Nyní je TD podání donepezilu stále ve fázi výzkumu. ²⁴

Nejblíže k registraci měl přípravek Aricept® transdermální náplasti. Tento přípravek je již registrován jako perorální forma. Byla testována donepezilová náplast s dávkou na 21 dní podávaná ve 3 x 7-denních cyklech. Přípravek byl zamítnut pro vysokou lokální dráždivost v r. 2009, ve druhé fázi klinického výzkumu. ²⁶

Jedna z novějších studií zabývající se TD podáním donepezilu byla provedena *in vitro* s použitím krysí kůže a enhanceru Tween-80. Náplast byla tvořena Eudragitem S -100, Eudragitem E -100 a HPMC jako matrice s použitím glycerinu jako změkčovadla. Bylo dokázáno, že 89 % látky prošlo přes kůži během 72 h. Závěrem studie bylo, že TD náplast může prodloužit uvolňování donepezilu po mnoho hodin, zajistit lepší biologickou dostupnost a obejít first-pass efekt. ²⁷

2.5.2.2 Rivastigmin



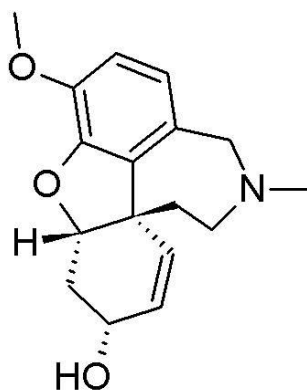
(S)-3-[1-(dimethylamino)ethyl]fenyl-N-ethyl-N-methylkarbamát

Další látkou z této skupiny je rivastigmin (zaveden pro léčbu r. 2000), který se vzhledem ke svému krátkému poločasů rozpadu (1,5 h) podává dvakrát denně. Používá se ve formě soli - tartrát. Začíná se na 3 mg a postupně se dávka zvyšuje na 6 – 12 mg/den. Je podáván p.o. nebo TD náplastí v dávce 4,6 mg nebo 9,5 mg za 24 h. TD podání se ukazuje jako velice výhodné, protože dochází k minimalizaci vedlejších nežádoucích účinků, především nevolnosti a zvracení po p.o. podání, které jsou u rivastigminu nejvýraznější. Obrovskou výhodou rivastigminu je také jeho metabolismus. Je metabolizován přímo acetylcholinesterázou, tudíž dochází k minimálním lékovým interakcím, což je vítáno především u starších pacientů s polypragmazií. ²⁴

Rivastigmin je jediná látka aktivně v praxi podávaná transdermálně. Výhoda TD podání rivastigminu je značně patrná především u pacientů s intolerancí p.o. forem nebo s poruchou polykací funkce. Nicméně stále nebyla zcela objasněna farmakokinetika TD podání rivastigminu a to především z hlediska faktorů prostředí jako jsou febrilní stavy, oděrky nebo slzy. ²⁸

TD podání rivastigminu zajišťuje plynulé dodávání léčiva do organismu. Jako relativně malá hydrofilně-lipofilní molekula se chemicky nejlépe hodí pro TD podání. Na základě randomizované studie bylo prokázáno stejná účinnost TD podaného rivastigminu v dávce 9,5 mg/den (náplast o průměru 3,5 cm a ploše 10 cm²) jako nejvyšší možná podaná dávka p.o. v kapsli 12 mg/den. Při TD podání bylo zaznamenáno až 3 x méně zpráv o GIT nevolnosti. ²⁹

2.5.2.3 Galantamin

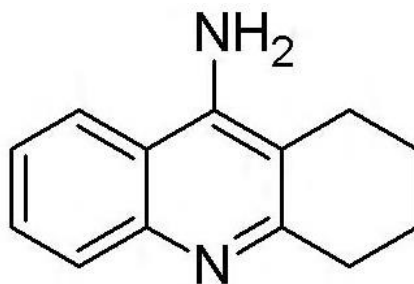


(4aS,6R,8aS)-3-methoxy-11-methyl-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-6H-benzofuro[3a,3,2-ef]benzazepin-6-ol

Galantamin s metabolickým poločasem 7 h se podává dvakrát denně v dávkách 16 – 24 mg. Metabolismus probíhá pomocí CYP 3A4 a 2D6. Pro léčbu v ČR byl zaveden r. 2001 a jeho velkou výhodou je dobré vstřebávání po perorálním podání.²⁴

Existuje pouze velmi málo studií o transdermálním podání galantaminu. Jednou z nejznámějších je studie provedená r. 2007 Small and Dubois, která prokázala teoretickou možnost podávání galantaminu transdermálně s vysokou účinností a snášenlivostí. Studie byla provedena *in vitro* a *in vivo*. Stabilita náplasti *in vitro* byla vyhodnocena při 40°C a to po dobu 28 dnů. *In vivo* galantaminové náplasti vykazovaly až 80 % absolutní biologickou dostupnost. Výsledky naznačují, že transdermální aplikace galantaminu v náplasti by mohla být dobrá alternativní léková forma, mající dobrou účinnost a snášenlivost pro léčbu AD.³⁰

2.6 Takrin



1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin

Takrin byl první schválený inhibitor acetylcholinesterázy pro léčbu AD a to roku 1993 Food and Drug Administration (FDA).^{31, 32} V praxi byl používán jako přípravek COGNEX. Pro svou hepatotoxicitu byl z klinického užívání v ČR stažen roku 1998.^{31, 33} Ve Spojených státech amerických byl však přípravek COGNEX dostupný na lékařský předpis až do května 2012.³⁴

Mechanismus účinku spočívá v nekompetitivní, reversibilní inhibici acetylcholinesterázy pomocí vazby na anionické místo enzymu^{35, 33}, dále ve zvýšeném uvolňování a syntéze acetylcholinu, zvýšení hladiny monoaminových metabolitů a zvyšování počtu nikotinových receptorů. Reverzibilní vazbou na muskarinové receptory inhibuje vychytávání a zvyšuje uvolňování noradrenalinu, dopaminu a serotoninu v mozku. Blokuje sodno-draselné iontové kanály a může rovněž inhibovat aktivitu monoaminoxidáz.³⁶

Při dávce 80 - 200 mg/den je biologická dostupnost po p.o. podání asi 17 - 24 % s dosaženou plazmatickou koncentrací po 2 h 20 - 60 ug/l. Takrin je v těle široce distribuován s nejvyššími naměřenými koncentracemi v ledvinách, játrech a mozku. Jednotliví pacienti však vykazovali velké interindividuální rozdíly. Především u žen se projevovala až dvojnásobně větší plazmatická koncentrace.³⁷

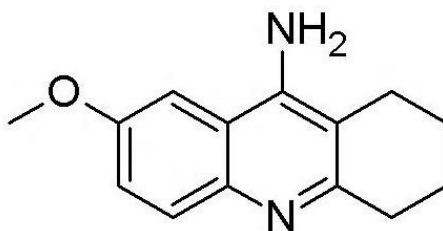
Takrin je metabolizován v játrech zejména pomocí CYP, isoformou 1A2. Eliminační poločas byl 2,9 - 3,6 h pro perorální dávku 40 - 150 mg/den. Při i.v.

(intravenózní) podání dávky 15 - 30 mg byla zjištěna plazmatická clearance 144 - 168 l/h. ^{36, 38} Inhibiční aktivita byla naměřena $IC_{50} = 0,5 \mu M$. ³⁹

Hepatotoxicita se v klinických studiích projevovala jako zvýšení ALT nad horní tolerovaný limit a to v několika případech i trojnásobně, obvykle po 6 – 8 týdnech od zahájení léčby. Při podání léčiva bylo tudíž nutné současně monitorovat hladiny jaterních enzymů. ³² Pokud se hladina zvedla právě o trojnásobek, došlo k okamžitému přerušení léčby. ⁴⁰ Kromě toxického účinku v játrech byly pozorovány i další nežádoucí vedlejší efekty jako dyspepsie, nevolnost, zvracení, průjem, nechutenství či alergická vyrážka. ^{36, 41} Zvýšení hladiny jaterních enzymů bylo pozorováno více u ženské populace. ³⁷

Právě pro nízkou a vysoce variabilní biodostupnost, která je způsobena jaterním firstpass efektem, krátkým biologickým poločasem, kvůli kterému byl takrin podáván ve čtyřech dílčích denních dávkách v šesti hodinových intervalech ³², gastrointestinálními vedlejšími účinky a na dávce závislé hepatotoxicitě, je prováděn výzkum alternativních cest podání a vývoj nových derivátů takrinu. Jednou z potenciálních možností by mohlo být právě TD podání, kterým by došlo k omezení jaterního firstpass efektu. ⁴²

2.7 7-methoxytakrin



1,2,3,4-tetrahydro-7-methoxyoakridin-9-amin

7-MEOTA je derivát takrinu, který byl syntetizován v České republice na Katedře toxikologie (Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzita obrany) se záměrem nalézt takovou obměnu, pomocí níž by došlo především k omezení toxického účinku na játra. Jako potenciální kandidát na léčbu AD se 7-MEOTA potvrdila nižší hepatotoxicitou v důsledku rozdílné metabolické degradace.³⁹

Metabolismus 7-MEOTA neprobíhá jako u takrinu pomocí CYP, ale dochází v játrech k demethylaci na 7-hydroxytakrin, konjugaci s kyselinou glukuronovou a následnému vyloučení močí.⁴³ Nižší hepatotoxicita je přisuzována zejména nižší ACHE inhibiční aktivitě 7-MEOTA na periférii.³⁷

7-MEOTA *in vitro* i *in vivo* vykazuje nižší toxicitu, lepší antioxidační vlastnosti, má o něco nižší inhibiční potenciál (IC_{50} 7-MEOTA byl stanoven 15,0 μ M) než takrin. Na druhou stranu byly u této látky pozorovány o něco horší farmakokinetické parametry – horší biologická dostupnost po p.o. podání a pomalejší dosažení měřitelné koncentrace v plazmě. Maximální plazmatická koncentrace (C_{max}) 7-MEOTA byla naměřena v čase 27 min, zatímco u takrinu ve stejné studii v čase 35 min, C_{max} byla 52 μ g/ml (takrin 184 μ g/ml).³⁹

Jako potenciální léčivo na AD se 7-MEOTA prezentuje svými výsledky jako velice nadějně. Její klinické testování prozatím kompletně neproběhlo z finančních důvodů.³⁷

Kromě potenciálního léčiva na AD je 7-MEOTA zkoumána jako antidotum proti látce BZ, což je psychicky zneschopňující substance využívaná ve vojenství.⁴⁴

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Princip stanovení permeace *in vitro*

S využitím Franzových difúzních cel bylo testováno pronikání konkrétní látky – takrin a 7-MEOTA přes přesným průměrem stanovený terčik prasečí kůže. Byla zkoumána permeace směrem vertikálním do receptorové tekutiny za přísně stanovených podmínek. Naměřená koncentrace prošlé látky byla stanovena analytickou metodou – HPLC.

3.2 Použitý materiál

Pro experiment byla použita kůže z břicha prasete domácího (lat. *Sus scrofa domestica*), protože je svými vlastnostmi nejvíce podobná kůži lidské. Prasata byla dodána z chovu Vemas, a.s., Žamberk. Po dodání se kůže nechaly zmrazit při teplotě -20 °C a to nejdéle po dobu 6 měsíců. K vlastnímu experimentu je použita ta část kůže, která je bez viditelného poškození, jako je tetování, výrazná změna v ochlupení, začervenání či atopické červené tečky.

V experimentu byla použita kůže z břicha. Po jejím očištění a opatrném odstranění štětín byly nachystány pásy o velikosti přibližně 30 x 5 cm, které byly použity k nařezání jednotlivých vzorků.

3.3 Použité chemikálie

- **fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem, pH 7,4** (Sigma-Aldrich - Schnelldorf, SRN) – látka nejvíce podobná vnitřnímu prostředí těla, připraven rozpuštěním 1 tablety ve 200 ml destilované vody
- **takrin hydrochlorid (M = 114,79 g/mol)** (Sigma-Aldrich-Schnelldorf, SRN) – roztok připraven navážením 0,250 g do 10 ml destilované vody

- **7 – methoxytakrin laktát (M = 298,21 g/mol)**, syntetizovaný na Katedře toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany – roztok připraven stejně jako v případě takrinu
- **Mobilní fáze pro HPLC** – poměr octan amonný : acetonitril = 1 : 4
 - **octan amonný (M = 77,08 g/mol)** (Sigma-Aldrich-Schnelldorf, SRN) – připraven 0,1 M roztok a upraven na pH 5,5 pomocí kyseliny octové (Fluka Analytical-St. Gallen, Švýcarsko)
 - **acetonitril (M = 41,05 g/mol) pro HPLC** (Fluka Analytical-St. Gallen, Švýcarsko)

3.4 Metodika

Pro testování prostupu látek přes kůži byla použita metoda vypracovaná a optimalizovaná pro kofein, jako standardní látku pro transdermální permeaci hydrofilních látek, Lucií Ostrovskou v diplomové práci: STANOVENÍ PERMEACE KOFEINU PŘES KŮŽI IN VITRO S VYUŽITÍM STATICKÝCH DIFÚZNÍCH CEL FRANZOVA TYPU⁴⁵. Ve své práci jsem vycházela z její standardizované metodiky.

Samotný experiment byl proveden v průběhu 24 h a následovalo měření výsledků s využitím HPLC metody, které trvalo několik následujících dní.

3.5 Provedení experimentu

V první řadě se ráno v den experimentu nechala kůže rozmrazit, aby bylo možné její nařezání. Pomocí Dermatому Humeca D42 (Humeca BV, Enschede, Nizozemí) bylo nařezáno osmnáct terčků kůže o rozměru 3 x 3 cm, což je přibližná plocha Franzovy difúzní cely, pro naše difúzní cely se jednalo o plochu 1,76 cm², za působení stejného tlaku a dodržování totožného úhlu. Pro experiment č.1 o tloušťce 500 μm (tzv. dělená tloušťka) a pro exp. č.2 1000 μm (tzv. nedělená = plná tloušťka). Tloušťka byla zvolena na základě doporučení danými směrnici Vědeckého výboru pro spotřebitelské produkty při Evropské komisi.⁴⁶

Bylo spuštěno temperování Franzových cel na 37 °C – simulace teploty lidského těla. Testování probíhalo na 18 celách, přičemž na 6 z nich byl testován takrin a na 12 dalších 7-MEOTA.

Do každé cely bylo napipetováno 14 ml receptorové tekutiny:

- a. pro 6 cel ke stanovení permeace takrinu – PBS
- b. pro 6 pro testování 7-MEOTY – PBS
- c. posledních 6 cel pro 7-MEOTU – destilovaná a deionizovaná voda

Poté byla vložena magnetická míchadla.

Nařezané kůže se napnuly na vrchní část Franzovy cely tak, aby nedošlo k vytvoření bublinek vzduchu pod kůží v receptorové tekutině a jednotlivé terčíky byly upevněny pomocí víčka a svorky. Cely se zpočátku nechaly temperovat 30 minut.

První došlo k odebrání vzorku o objemu 500 µl ze všech 18 cel a jeho označení jako vzorek 0. Poté byly cely doplněny 500 µl PBS nebo vody, které byly po celou dobu temperovány v termostatu na teplotu 37 °C. Roztok takrinu resp. 7-MEOTA o objemu 500 µl byl aplikován na povrch a v závislosti na prováděném pokusu byly donorové cely zakryty parafínovým filmem nebo ponechány odkryté. Další vzorky byly odebírány v hodinových intervalech po dobu 24 h. Po této době byly kůže sejmuty. Každá byla opláchnuta 2 x 1 ml destilované vody a 8 x 1 ml methanolu.

Do 18 x 2 velkých 10 ml zkumavek byly napipetovány 4 ml methanolu a pomocí lepicí pásky URGO Film™ (φ = 25 mm; Urgo, Francie) se z každé kůže celkem 8 x získaly jednotlivé stripy. Po zatížení přelepeného terčíku kůže olověným závažím na 5 s došlo ke sloupnutí pásky a ponoření do methanolu ve zkumavce. Do každé byly umístěny 4 stripy – vzorky S1-4 a S5-8. Touto metodou „tape-stripping“ byly získány vzorky k analýze množství, které zůstalo zadrženo ve vrstvě stratum corneum.

Další vrstvy kůže – epidermis a dermis od sebe byly odděleny tepelně, po krátkém (několik s) ponoření do deionizované vody, zahřáté v kádince na 80 °C. Jejich oddělení bylo provedeno pomocí pinzety a skalpelu. Obě vrstvy byly nastříhány na malé kousky z důvodu zvětšení extrakční plochy a převedeny do zkumavky se 2 ml methanolu – vznikly vzorky E a D.

Zkumavky se vzorky S, D a E se nechaly 24 h třepat při laboratorní teplotě. Po 24 h třepání byly vloženy na 15 min do ultrazvukové lázně, hluboce zmrazeny při teplotě -80 °C a uchovány tak pro následné měření metodou HPLC.

3.6 Použití HPLC metodiky – analytické stanovení

Pomocí této metody došlo ke zjištění příslušné koncentrace sledované látky ve vzorku receptorové tekutiny v průběhu 24 h a v methanolových extraktech v jednotlivých vrstvách kůže. Těsně před měřením se nechaly vzorky rozmrazit a případně přefiltrovaly.

Použita byla kolona Phenomenex Luna PFP 150 x 4,6 mm (Torrance, Kalifornie), velikost částic 5 μ m s předkolonou PFP 4 x 3,0 mm. Průtok mobilní fáze (směs acetonitrilu a octanu amonného) byl nastaven na 0,9 ml/min. Pro hodnocení byla použita fluorescenční detekce ve vlnových délkách $\lambda_{ex}=240$ nm a $\lambda_{em}=360$ nm. Měření proběhlo pod tlakem 50 bar a při teplotě 35 °C. Pro analýzu vzorků receptorové tekutiny odebraných v časech 0 - 9 h byl objem nástřiku 20 μ l, pro vzorky receptorové tekutiny odebrané v časech 20 - 24 h a extrakty z jednotlivých vrstev kůže 5 μ l.

Následovalo vyhodnocení pomocí programu Microsoft Excel.

3.7 Přehled experimentů

Byly provedeny celkem 4 dílčí experimenty. Pro první testovanou látku – takrin bylo provedeno testování celkem 4 x vždy na šesti celách. Další 4 pokusy byly provedeny pro 7-MEOTA na 12 celách, kde na prvních šesti byla stanovována permeace s receptorovou tekutinou PBS a na další šesti s receptorovou tekutinou vodou.

1. occluded split thickness = zakryté uspořádání s tloušťkou kůže 500 μ m
2. occluded full thickness = zakryté uspořádání s tloušťkou kůže 1000 μ m
3. unoccluded split thickness = nezakryté uspořádání s tloušťkou kůže 500 μ m
4. unoccluded full thickness = nezakryté uspořádání s tloušťkou kůže 1000 μ m

U každého experimentu byl nanášen roztok sledované látky o stejném objemu - 500 μ l na povrch terčiku kůže. Z každého dílčího experimentu byly získány jednotlivé frakce pro každou celu. Testovaná látka byla nanášena na 6 cel Franzova typu. Z každé cely byly získány tyto frakce:

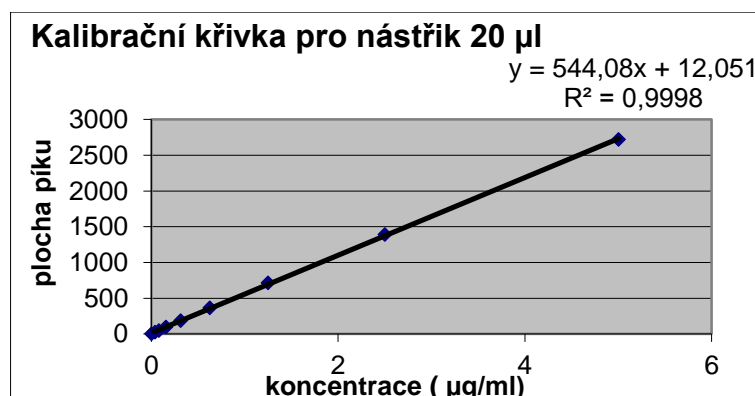
- Vzorek 0: 1 zkumavka/cela
- Vzorek 1-8: odebrání receptorové tekutiny v 1. - 8. hodině – 8 zkumavek/cela
- Vzorek 20-24: odebrání receptorové tekutiny ve 20. - 24., hodině – 5 zkumavek/cela
- Vzorek S 1-4 a S 5-8: z každého terčiku provedeny 2 x 4 stripy a přeneseny do zkumavky s methanolem – 2 zkumavky/cela
- Vzorek E: získaná epidermis – 1 zkumavka/cela
- Vzorek D: získaná dermis – 1 zkumavka/cela

3.8 Hodnocení

Pomocí HPLC byla metodou kalibrační křivky stanovena koncentrace látek v jednotlivých vzorcích a vztažením k celkovému objemu receptorové kapaliny (14 ml) vypočítáno množství látky (v μ g), které prostoupilo přes kůži (plocha 1,76cm²) do receptorového kompartmentu.

Hodnocení výsledků proběhlo v programu Microsoft Excel. Data byla porovnáвана statisticky pomocí Studentova t-testu. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

Metoda kalibrační křivky:



Obr. 2. Ukázka hodnocení metodou kalibrační křivky pro takrin

Kromě hodnocení permeace do receptorové tekutiny byly stanoveny i koncentrace zkoumaných látek v jednotlivých vrstvách kůže – epidermis, dermis a stratum corneum. Z jednotlivých měření byl stanoven průměr, vždy ze šesti dílčích cel, prošlé množství vyjádřeno v μg a poté souhrn procentuálně.

Na kůži byla aplikována dávka infinity dose – zdánlivě nevyčerpatelné množství, což obvykle znamená více než $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. V našem případě se jednalo o 25 mg/ml vztaženo na plochu $1,76 \text{ cm}^2$ a jednalo se o roztok nasycený. Aplikováno bylo 500 μl roztoku o koncentraci 0,025 g/ml. Množství je tedy chápáno jako nevyčerpatelné a dochází ke kontinuálnímu prostupu látky přes kůži. Pro srovnání, jaké množství aplikovaného roztoku se zkoumanou látkou se může samovolně odpařovat, byly provedeny pokusy s celami zakrytými parafilmem. Cílem bylo zjistit, jaké množství látky je schopné projít do receptorové tekutiny, a podíl frakcí v jednotlivých vrstvách kůže.

U každé látky byl vypočítán průměrný flux v ustáleném stavu (J_{ss}), průměrný lag time a permeační koeficient (K_p). Lag time a flux v ustáleném stavu byly spočítány pomocí SAMPA software (Mgr. Aleš Bezrouk, Ph.D., Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, dosud nepublikováno).

4. VÝSLEDKY

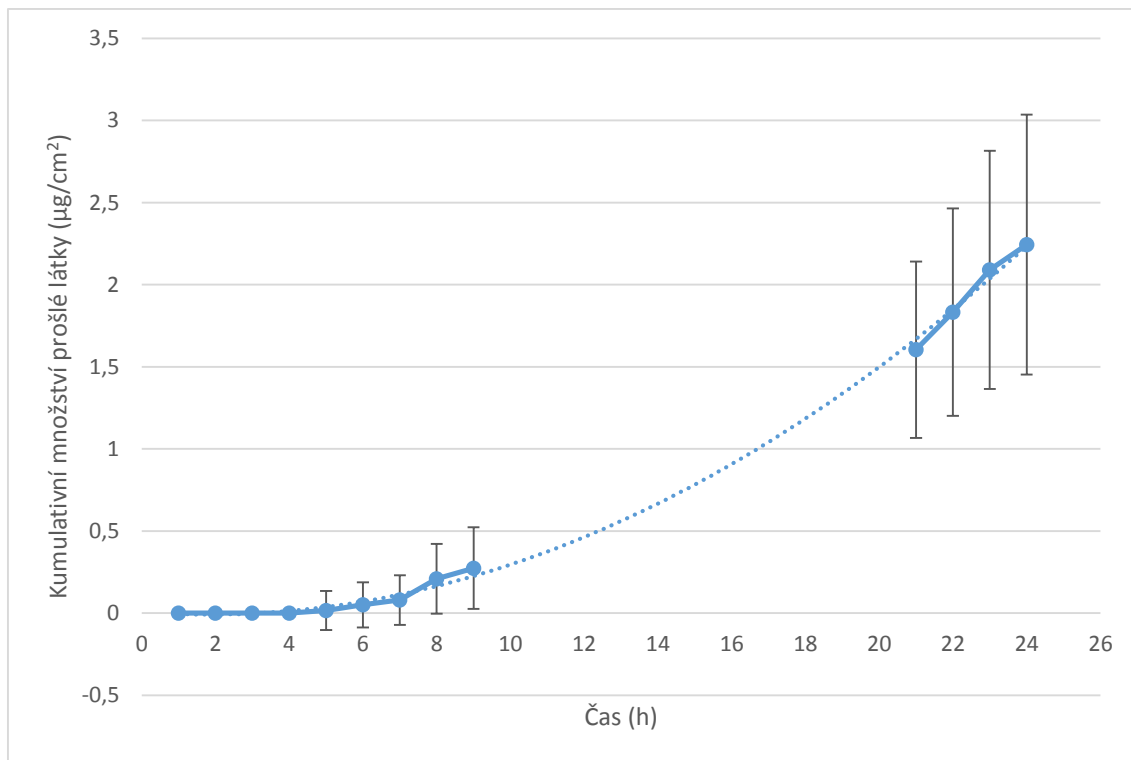
Experimenty byly provedeny celkem 4. Pro látku takrin se jednalo o stanovení permeace v zakrytém a nezakrytém uspořádání a u každého o dělenou tloušťku (500 μm) a nedělenou (1000 μm). Stejně pokusy byly provedeny pro 7-methoxytakrin laktát. U obou látek se zkoumal průchod do receptorové tekutiny. U každého roztoku sledované látky byly stanoveny permeační profily a distribuce do jednotlivých vrstev kůže.

Permeační profily látek byly vytvořeny na základě odběrů z receptorové tekutiny v jednotlivých časových intervalech od 0 h – 8 h a následně od 20 h – 24 h (hodiny odběrů se pro pokusy trochu lišily dle časových možností). Jednotlivé koncentrace byly stanovené metodou HPLC a vypočtené pomocí kalibrační křivky. Permeační profily byly vytvořeny pro každý pokus zvlášť a vyneseny grafy vždy se směrodatnou odchylkou. Jedná se o závislost kumulativního množství prošlé látky v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ na čase v h. Takto bylo sestaveno celkem 8 permeačních křivek. V době, kdy nebyly prováděny odběry – pauza v noci – bylo místo proloženo křivkou jako simulace přibližného pronikání látky do receptorové tekutiny.

4.1 Permeační profily

4.1.1 Permeační profily takrinu

Tloušťka 500 μm:



Obr. 3. Permeační profil takrinu přes prasečí kůži o tloušťce 500 μm v zakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách se směrodatnou odchylkou.

$$J_{SS} = 0,54 \pm 0,26 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

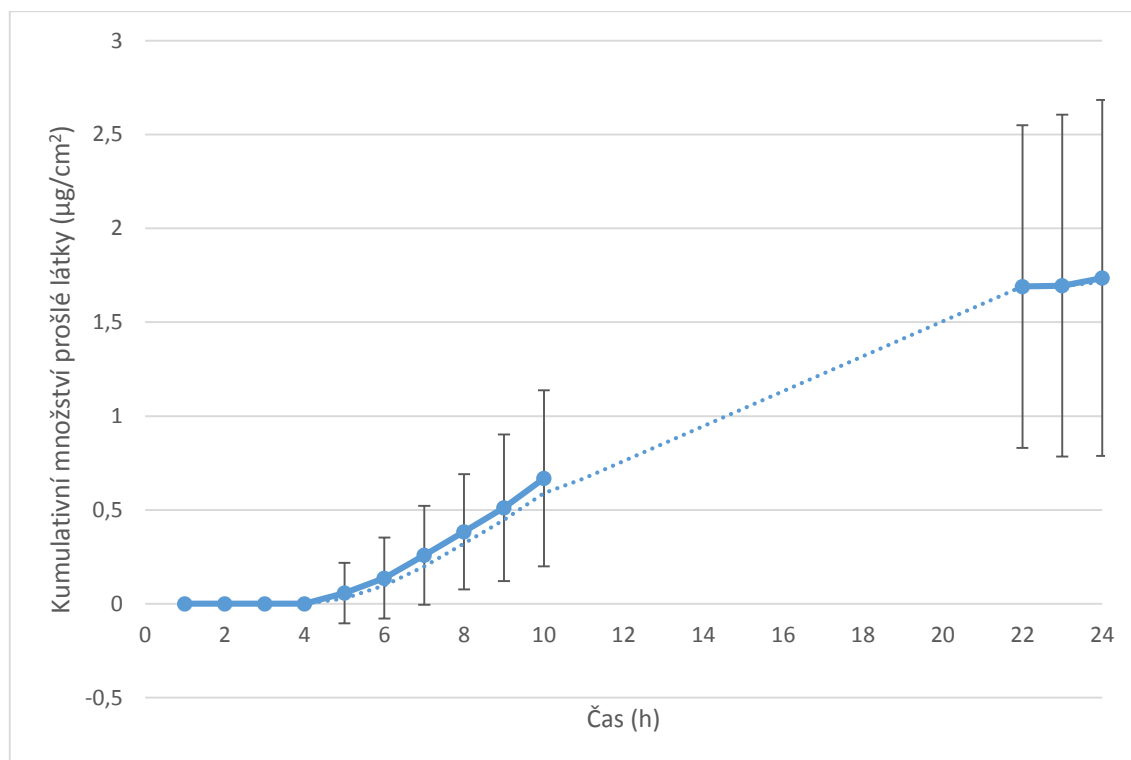
$$\text{lag time} = 11,09 \pm 4,03 \text{ h}$$

$$K_p = 1,26\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

Z grafu je patrné, že se jednalo o aplikaci dávky infinite dose. Jedná se o zdánlivě nevyčerpatelnou dávku, a proto dochází v donorovém kompartmentu k zanedbatelnému úbytku aplikovaného roztoku. Po dosažení ustálené rychlosti prostupu, narůstá množství látky v receptorové tekutině lineárně, aniž by byl patrný úbytek látky v donorovém kompartmentu.

Experiment byl proveden s celami zataženými parafilmem, proto nelze předpokládat samovolné vypaření aplikovaného roztoku.

Množství roste i v průběhu 21. – 24. h, což nám dokazuje, že aplikovaný roztok zkoumané látky je stále na povrchu kůže a průnik do receptorové tekutiny může vzestupnou tendencí pokračovat.



Obr. 4. Permeační profil tacrinu přes prasečí kůži o tloušťce 500 µm v nezakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách se směrodatnou odchylkou.

$$J_{SS} = 0,35 \pm 0,07 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

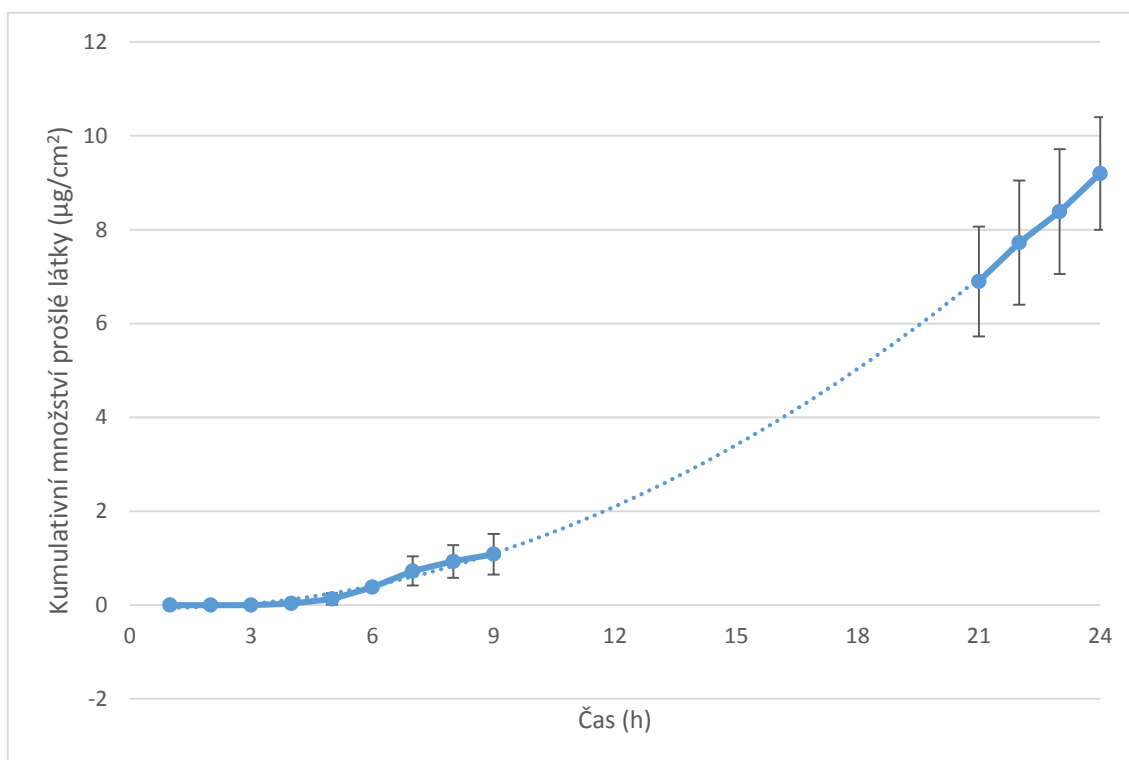
$$\text{lag time} = 4,87 \pm 1,21 \text{ h}$$

$$K_p = 8,29\text{E-}05 \text{ cm/h}$$

Pro srovnání byl proveden totožný pokus se stejnou tloušťkou kůže, avšak cela zůstala odkrytá, s cílem dokázat, zda bude mít odpařování roztoku v donorové části celý vliv na průběh permeace.

V průběhu 21. – 24. h dochází ke značnému zpomalení permeace a kumulativní množství v receptorové tekutině je téměř konstantní. Průměrné hodnoty permeace pro takrin v zakrytém uspořádání po 24 h jsou sice vyšší než v uspořádání nezakrytém, ale rozdíl není statisticky významný ($p > 0,05$).

Tloušťka 1000 μm :



Obr. 5. Permeační profil takrinu přes prasečí kůži o tloušťce 1000 μm v zakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách se směrodatnou odchylkou.

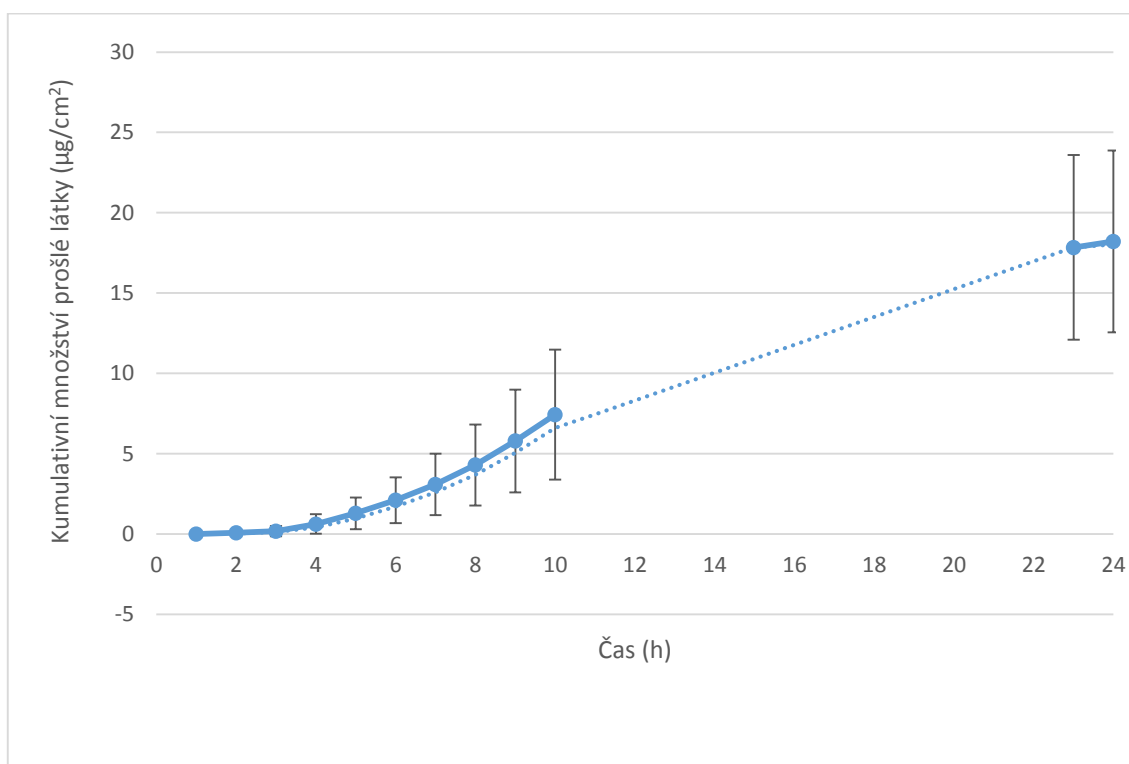
$$J_{SS} = 9,46 \pm 1,31 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 14,83 \pm 4,23 \text{ h}$$

$$K_p = 2,22\text{E-}03 \text{ cm}/\text{h}$$

Experiment byl proveden za stejných podmínek jako u dělené tloušťky, pouze byla použita kůže o tloušťce 1000 μm . Větší tloušťka kůže neměla na permeaci významný vliv, z čehož lze usoudit, že rychlost průniku látky přes kůži závisí především na její schopnosti proniknout přes svrchní vrstvy kůže – stratum corneum a

epidermis. Naproti tomu dermis už permeaci látky neovlivňuje v takové míře. Při srovnání tloušťky 500 μm a 1000 μm v zakrytém uspořádání je množství statisticky významně vyšší pro tloušťku 1000 μm ($p < 0,05$).



Obr. 6. Permeační profil takrinu přes prasečí kůži o tloušťce 1000 μm v nezakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách se směrodatnou odchylkou.

$$J_{ss} = 6,17 \pm 3,46 \text{ nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$$

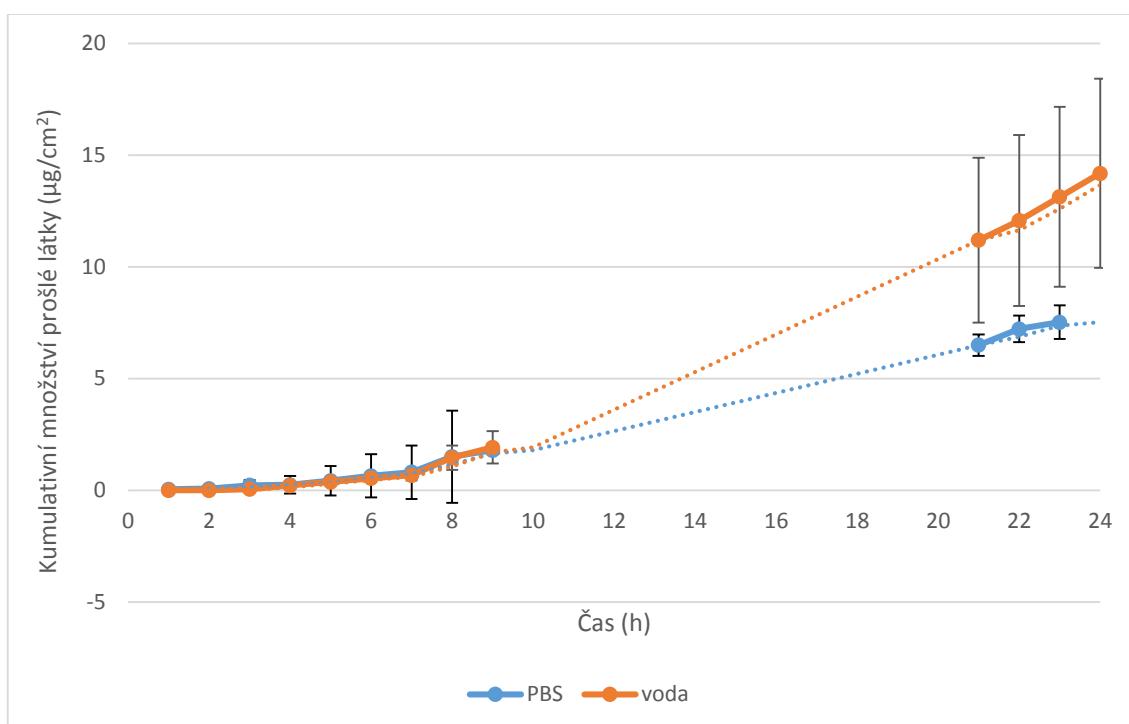
$$\text{lag time} = 4,42 \pm 1,03 \text{ h}$$

$$K_p = 1,45\text{E-}03 \text{ cm}/\text{h}$$

Pro srovnání byl opět proveden pokus v nezakrytém uspořádání a stejně jako v přechodném experimentu s tloušťkou 500 μm docházelo k odpaření aplikovaného roztoku z povrchu kůže a od 22. – 24. h můžeme pozorovat téměř konstantní kumulativní množství prošlé látky v receptorové tekutině. Průměrné hodnoty permeace pro takrin v nezakrytém uspořádání, tloušťkou 1000 μm po 24 h jsou sice vyšší než v uspořádání zakrytém, ale rozdíl není statisticky významný ($p > 0,05$).

4.1.2 Permeační profily 7-MEOTA

Tloušťka 500 μm :



Obr. 7. Permeační profil 7-MEOTA přes prasečí kůži o tloušťce 500 μm v zakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách pro receptorovou tekutinu PBS a na šesti celách pro receptorovou tekutinu vodu, vždy se směrodatnou odchylkou.

PBS

$$J_{SS} = 10,85 \pm 0,73 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 12,08 \pm 2,02 \text{ h}$$

$$K_p = 3,45\text{E-}03 \text{ cm/h}$$

VODA

$$J_{SS} = 2,19 \pm 0,68 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

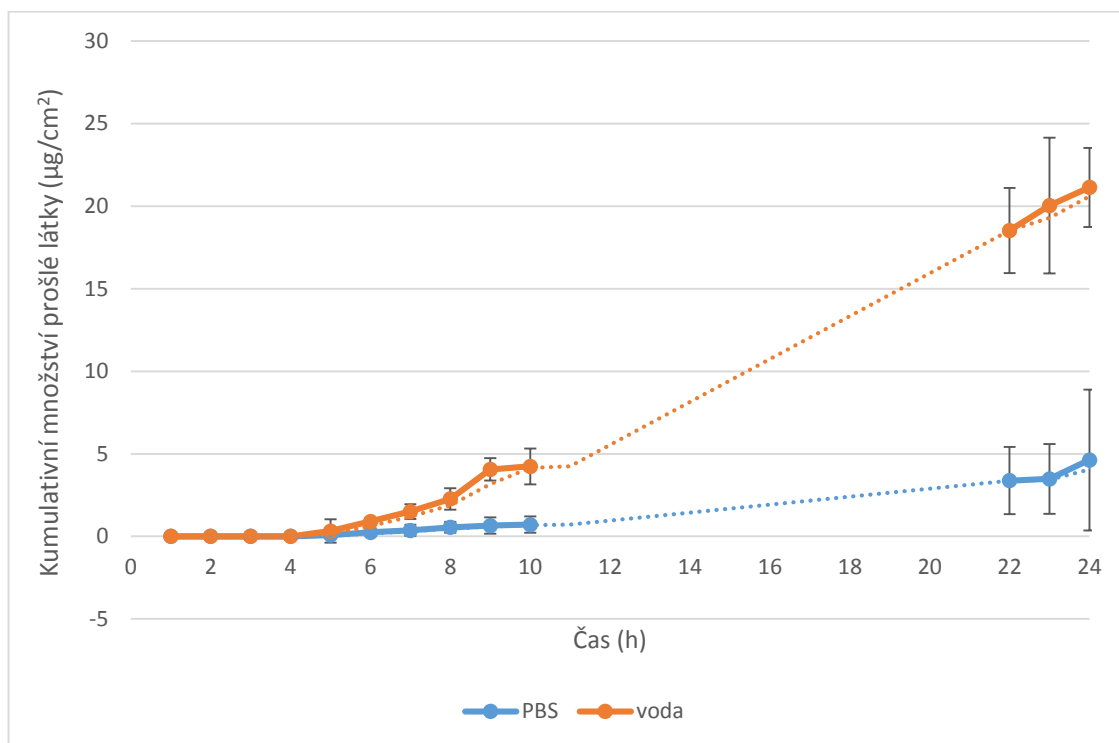
$$\text{lag time} = 9,99 \pm 2,45 \text{ h}$$

$$K_p = 6,95\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

Pro 7-MEOTA byly provedeny stejné pokusy, pouze s rozdílem v receptorové tekutině, kde pro polovinu cel (6 z 12) byla použita deionizovaná voda z důvodu špatné rozpustnosti 7-MEOTA v pufrch.

Experiment potvrdil, že 7-MEOTA proniká do vody, jako receptorové tekutiny, rychleji a ve větším množství než do pufru. Průnik látky přes kůži do PBS může být

ovlivněn omezenou rozpustností v receptorové tekutině. Naměřená koncentrace v akceptorové fázi je po 24 h experimentu nižší pro PBS jako receptorovou tekutinu. Rozdíl však není statisticky významný a je zatížen příliš velkou chybou díky vysoké variabilitě jednotlivých naměřených hodnot.



Obr. 8. Permeační profil 7-MEOTA přes prasečí kůži o tloušťce 500 µm v nezakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách pro receptorovou tekutinu PBS a na šesti celách pro receptorovou tekutinu vodu, vždy se směrodatnou odchylkou.

PBS

$$J_{SS} = 0,37 \pm 0,17 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 4,55 \pm 2,35 \text{ h}$$

$$K_p = 1,19\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

VODA

$$J_{SS} = 2,79 \pm 0,46 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 6,82 \pm 1,30 \text{ h}$$

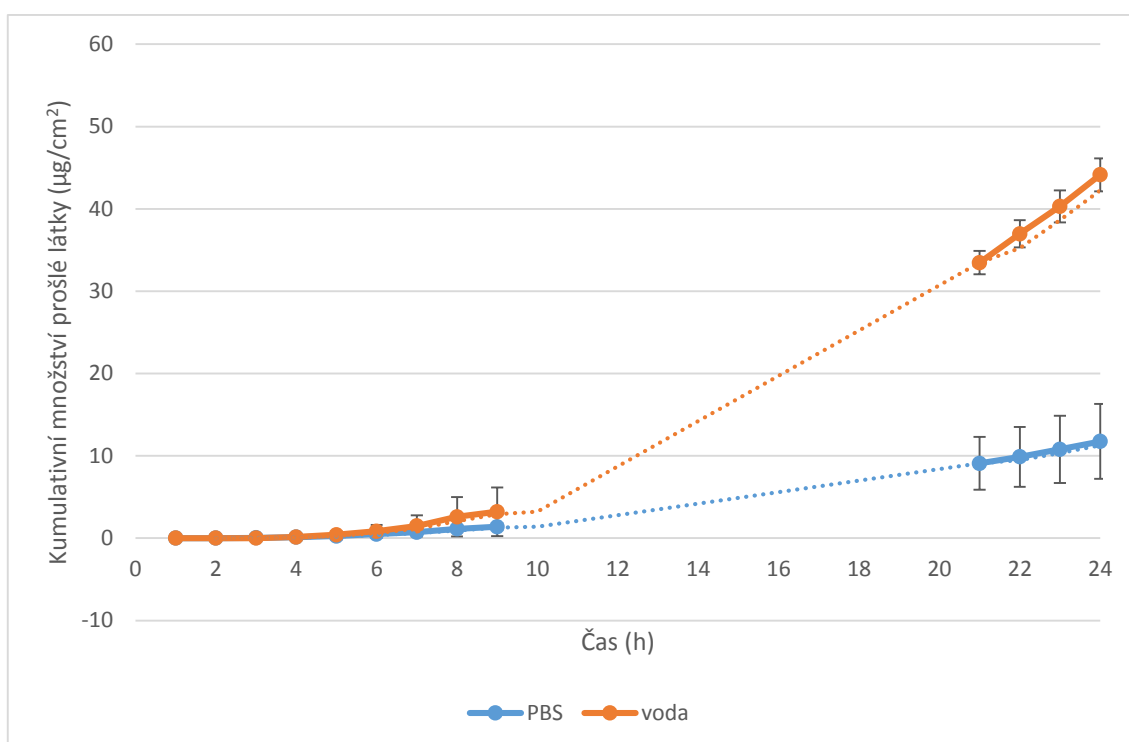
$$K_p = 8,88\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

Pro srovnání byl proveden experiment v nezakrytém uspořádání. 7-MEOTA opět vykazovala ochotnější permeaci do vody jako receptorové tekutiny.

V tomto experimentálním uspořádání nedošlo k tak výraznému zbrždění permeace vlivem odpařování rozpouštědla z donorového kompartmentu jako

v ostatních pokusech. Naměřená koncentrace v akceptorové fázi je po 24 h experimentu nižší pro PBS jako receptorové tekutiny. Hodnota však není statisticky významná a je zatížena příliš velkou chybou díky vysoké variabilitě jednotlivých naměřených hodnot. Při srovnání tloušťky 500 μm v rozdílném uspořádání je průměrné kumulativní množství naměřené ve vodě s nezakrytou donorovou celou vyšší než s celou zakrytou, ale hodnoty nejsou statisticky významné ($p > 0,05$).

Tloušťka 1000 μm :



Obr. 9. Permeační profil 7-MEOTA přes prasečí kůži o tloušťce 1000 μm v zakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách pro receptorovou tekutinu PBS a na šesti celách pro receptorovou tekutinu vodu, vždy se směrodatnou odchylkou.

PBS

$$J_{SS} = 2,64 \pm 1,04 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 16,7 \pm 3,66 \text{ h}$$

$$K_p = 8,41\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

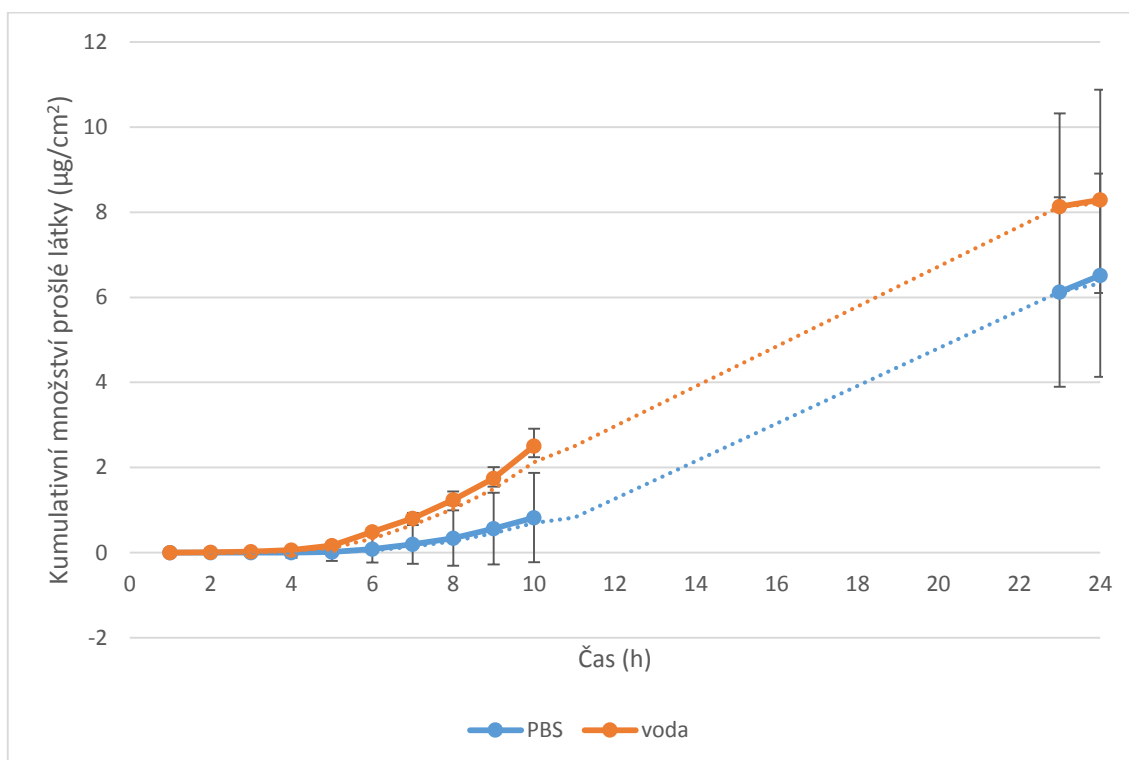
VODA

$$J_{SS} = 8,80 \pm 0,87 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 13,83 \pm 2,56 \text{ h}$$

$$K_p = 2,80\text{E-}03 \text{ cm/h}$$

V případě plné tloušťky proniklo do vody, jako receptorové tekutiny, více než trojnásobné množství ve srovnání s pufrem a zároveň je patrný rychlejší vzestup prošlého množství. Ovšem díky významné variabilitě naměřených hodnot není množství statisticky významně vyšší. Množství prošlé do obou receptorových tekutin v zakrytém uspořádání je v případě 1000 μm tloušťky vyšší než 500 μm tloušťky, ale ani pro jednu receptorovou tekutinu se nejedná o statisticky významný rozdíl.



Obr. 10. Permeační profil 7-MEOTA přes prasečí kůži o tloušťce 1000 μm v nezakrytém uspořádání. Data jsou prezentována jako průměr měření na šesti celách pro receptorovou tekutinu PBS a na šesti celách pro receptorovou tekutinu vodu, vždy se směrodatnou odchylkou.

PBS

$$J_{ss} = 1,12 \pm 0,33 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 5,49 \pm 0,99 \text{ h}$$

$$K_p = 3,55\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

VODA

$$J_{ss} = 0,95 \pm 0,32 \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$$

$$\text{lag time} = 8,78 \pm 0,31 \text{ h}$$

$$K_p = 3,02\text{E-}04 \text{ cm/h}$$

Při srovnávacím pokusu s nezakrytou donorovou celou jsme opět pozorovali zpomalení průniku v důsledku odpařování rozpouštědla z donorové části, podobně jako u takrinu. Celkově se jednalo o průnik menšího kumulativního množství než v případě experimentu v zakrytém uspořádání. Množství není statisticky významně nižší.

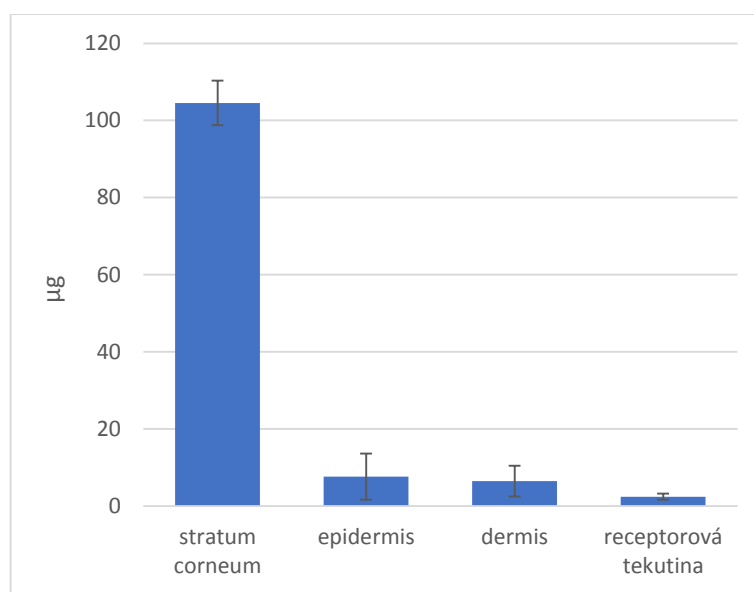
Při srovnání prošlého kumulativního množství v nezakrytém uspořádání do akceptorové fáze vody, je toto prošlé množství vyšší po 24 h než do PBS, výsledek je statisticky významně vyšší.

4.2 Distribuce do jednotlivých vrstev kůže

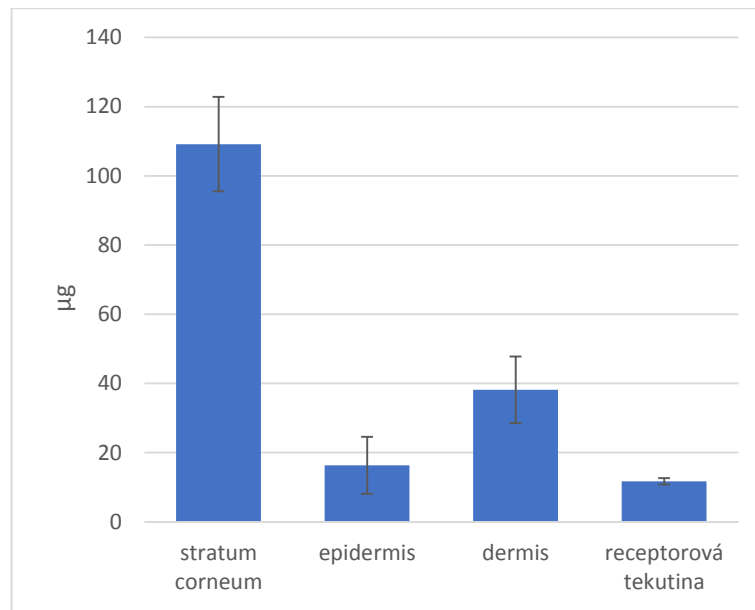
Z extraktů z jednotlivých vrstev kůže jsme získali informaci, jaké množství sledované látky zůstalo po skončení experimentu zadržené v epidermis, dermis a stratum corneum. Toto množství bylo porovnáno s množstvím látky, které proniklo do receptorové tekutiny. Získaná data byla vyhodnocena vždy jako průměr z měření na šesti celách a vyjádřena v μg absolutního množství a poté byl proveden souhrn v procentech vždy z celkového množství látky ve všech vrstvách kůže a v receptorové tekutině.

4.2.1 Distribuce takrin

Tloušťka 500 μm :



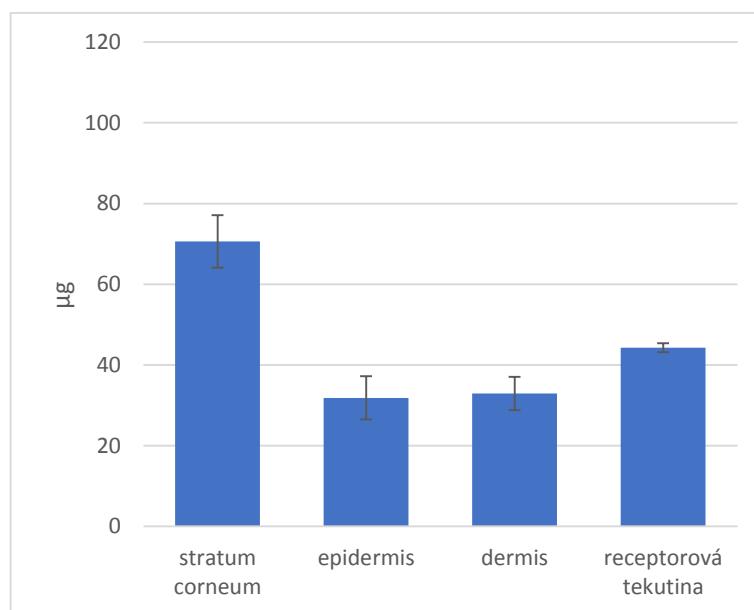
Obr. 11. Distribuce takrinu v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 500 μm , experiment proveden v zakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.



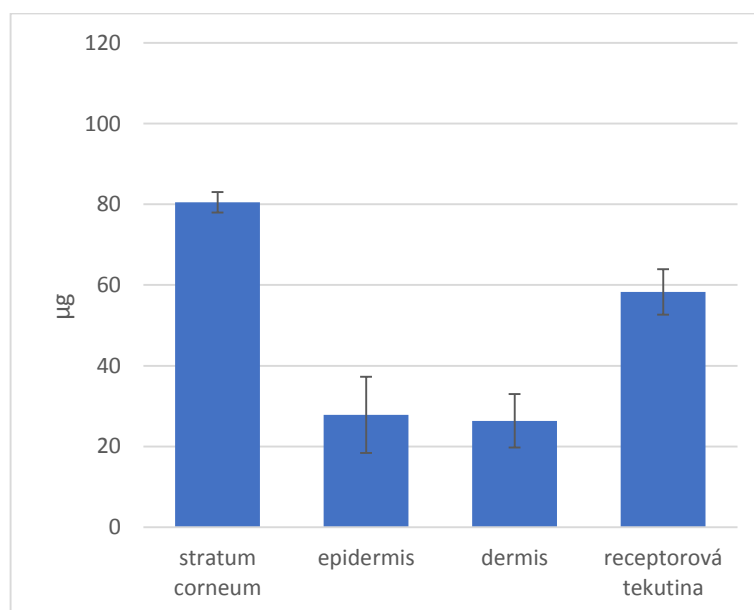
Obr. 12. Distribuce takrinu v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže $500\ \mu\text{m}$, experiment proveden v nezakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

Z hodnocení distribuce do jednotlivých vrstev kůže nám vyplývá, že největší množství látky je zadrženo v SC. Nejmenší procento látky nacházíme v případě takrinu s dělenou tloušťkou v receptorové tekutině. Větší význam na permeaci má i epidermis, i když v této části kůže není zadrženo množství tak významné jako v případě SC. Na základě průměrů absorbovaného takrinu do SC s ohledem na směrodatnou odchylku je v této vrstvě větší množství v měření s nezakrytou celou než s celou zakrytou. Tento rozdíl však není statisticky významný.

Tloušťka 1000 μm :



Obr. 13. Distribuce takrinu v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 1000 μm , experiment proveden v zakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

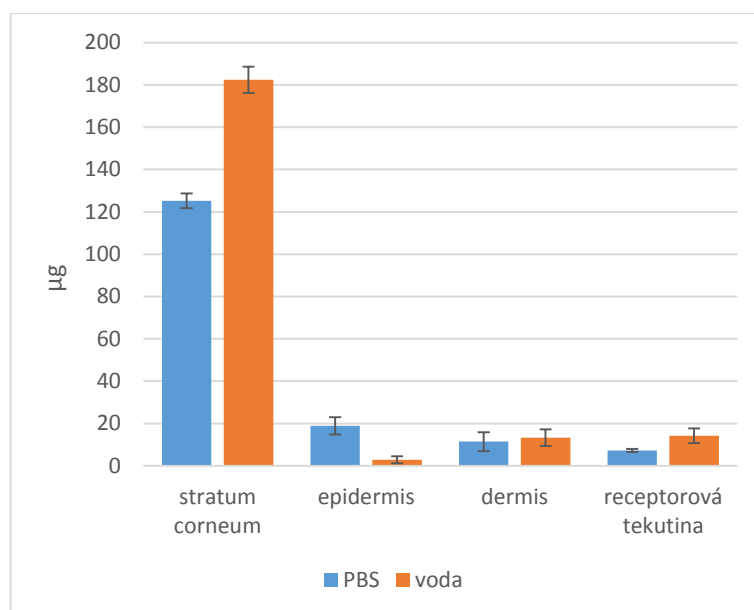


Obr. 14. Distribuce takrinu v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 1000 μm , experiment proveden v nezakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

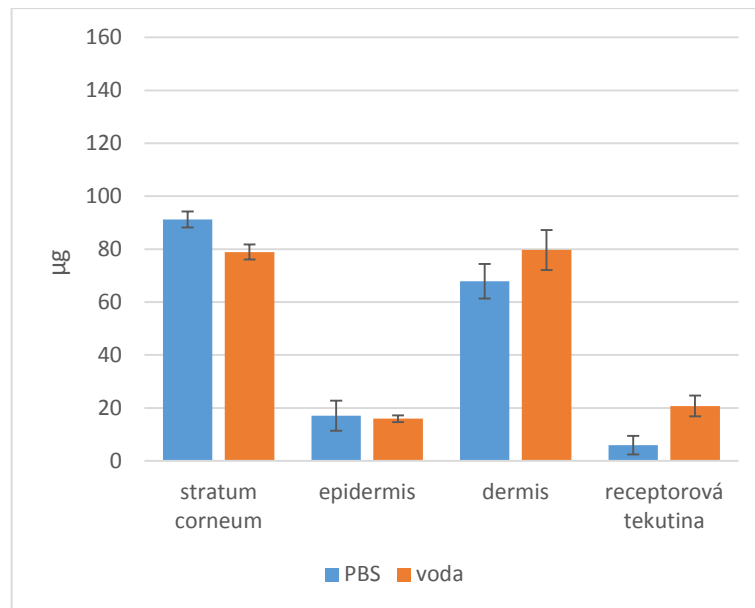
V případě nedělené tloušťky se nám množství rovnoměrně rozprostírá do všech vrstev kůže, s největší absorpcí opět do SC. Můžeme pozorovat i výraznější permeaci do receptorové tekutiny, což nám potvrzuje hypotézu, že na permeaci látek přes kůži mají významnější vliv svrchní části kůže a dermis nehraje tak důležitou roli. Větší množství látky zadržené v dermis oproti experimentům provedených na kůži dermatomované na 500 μm odpovídá očekávání, tato vrstva má totiž dvojnásobnou mocnost a pojme tudíž více látky. Průměrné množství v SC je větší v případě pokusu s nezakrytou donorovou celou než se zakrytou, opět však rozdíl není statisticky významný.

4.2.2 Distribuce 7-MEOTA

Tloušťka 500 μm :



Obr. 15. Distribuce 7-MEOTA v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 500 μm , experiment proveden v zakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

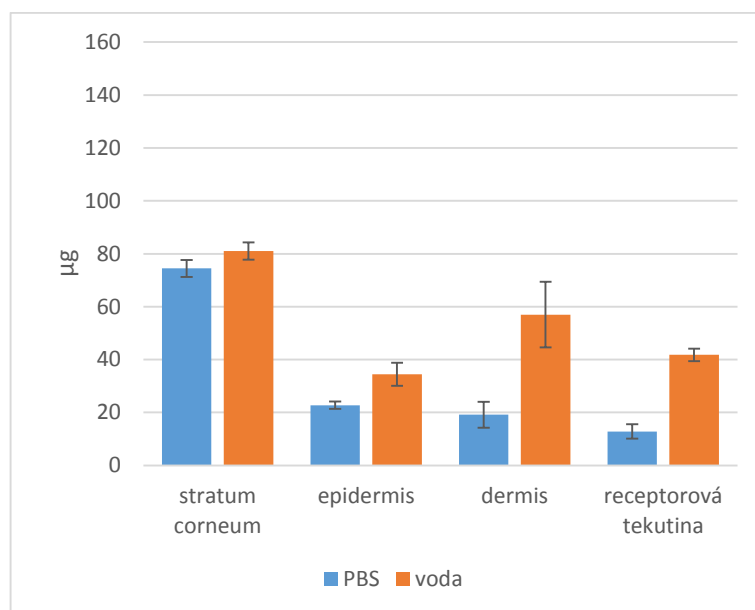


Obr. 16. Distribuce 7-MEOTA v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v µg s tloušťkou kůže 500 µm, experiment proveden v nezakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

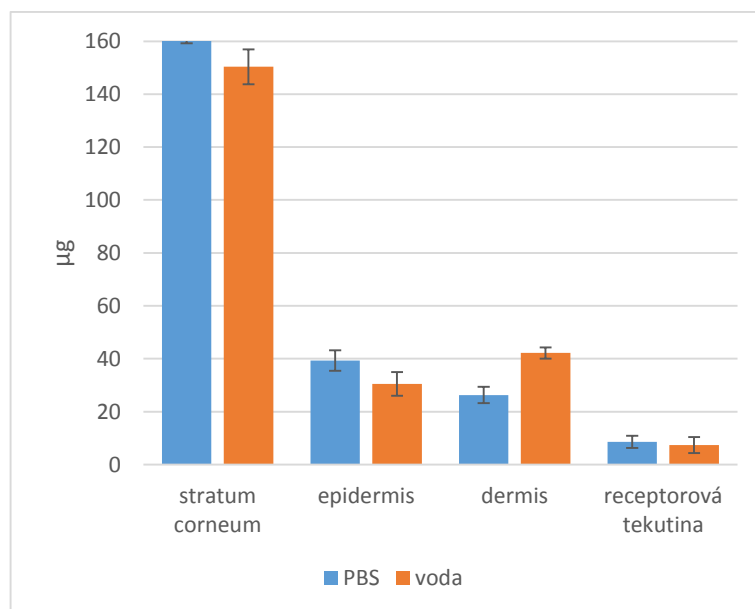
V případě 7-MEOTA je nápadně vyšší množství látky ve vrstvách i v receptorové tekutině v případě použití vody než PBS, jako receptorové tekutiny. Množství je statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) pro absorpci do vrstvy SC.

Na kůžích, které byly testovány s vodou jako receptorovou tekutinou, byly také pozorovány výrazné změny v konzistenci. Kůže se zdála být více vláčná a ztrácela svoji pružnost. Z toho usuzujeme, že ač se voda zdá jako vhodnější akceptorová fáze z hlediska rozpustnosti 7-MEOTA, tak má i nesporné nevýhody.

Tloušťka 1000 μm :



Obr. 17. Distribuce 7-MEOTA v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 1000 μm , experiment proveden v zakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

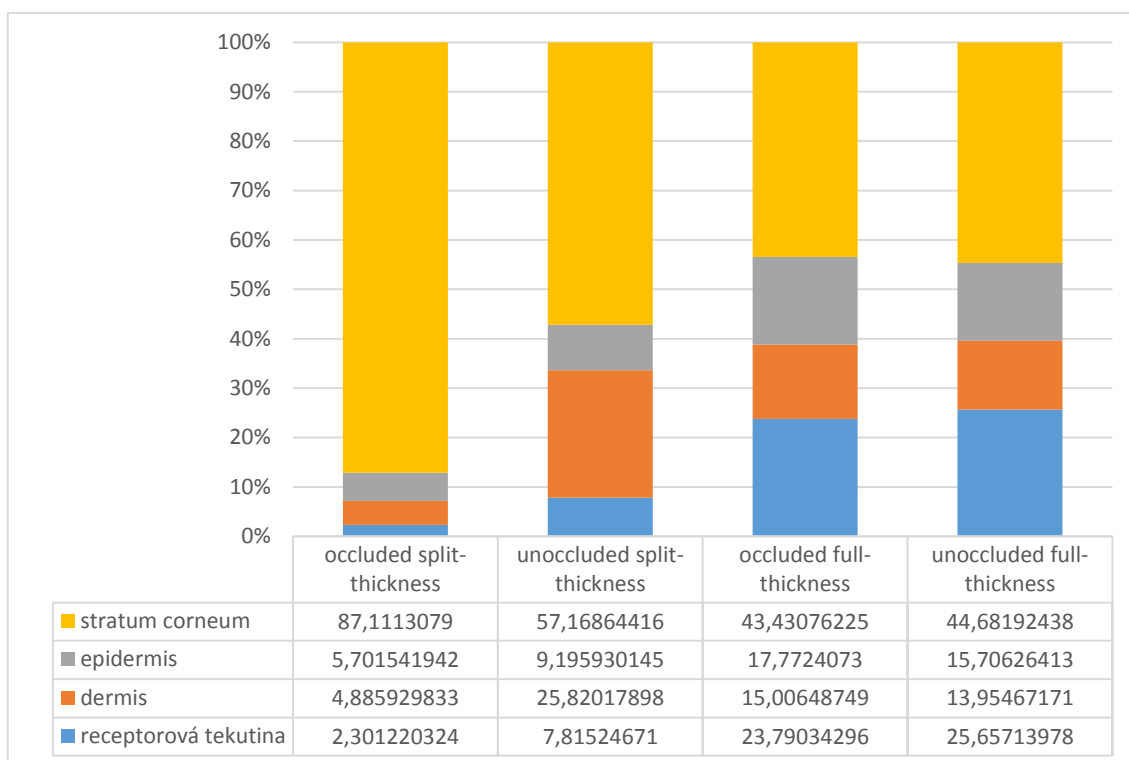


Obr. 18. Distribuce 7-MEOTA v jednotlivých vrstvách kůže vyjádřená v μg s tloušťkou kůže 1000 μm , experiment proveden v nezakrytém uspořádání a je zde zahrnuta směrodatná odchylka. Jedná se o absolutní množství.

Opět pozorujeme největší množství v SC. V případě experimentu s nezakrytou donorovou celou vidíme mizivý podíl v receptorové tekutině, což v případě tloušťky 1000 μm přisuzujeme příliš rychlému odpaření naneseného roztoku s testovanou látkou z povrchu a látka nemá permeační schopnost tak rychlou, aby se dostala přes vrstvy do akceptorové fáze. Množství absorbované v SC s nezakrytou celou není statisticky významně vyšší než s celou zakrytou.

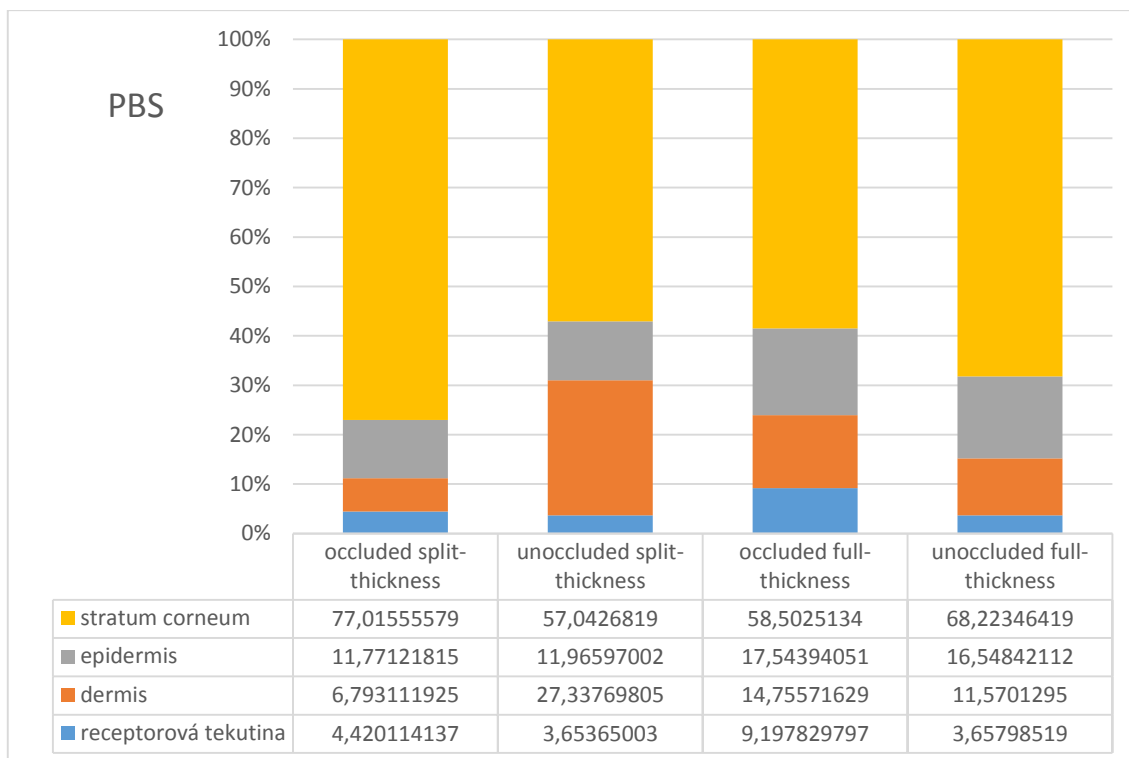
4.3 Procentuální vyjádření

Pomocí následujících grafů je vyjádřena permeace v procentech do jednotlivých kompartmentů na ploše 1,76 cm². Zvlášť byl vynesena graf pro experimenty takrinu a 7-MEOTA byla rozdělena dle akceptorové fáze.



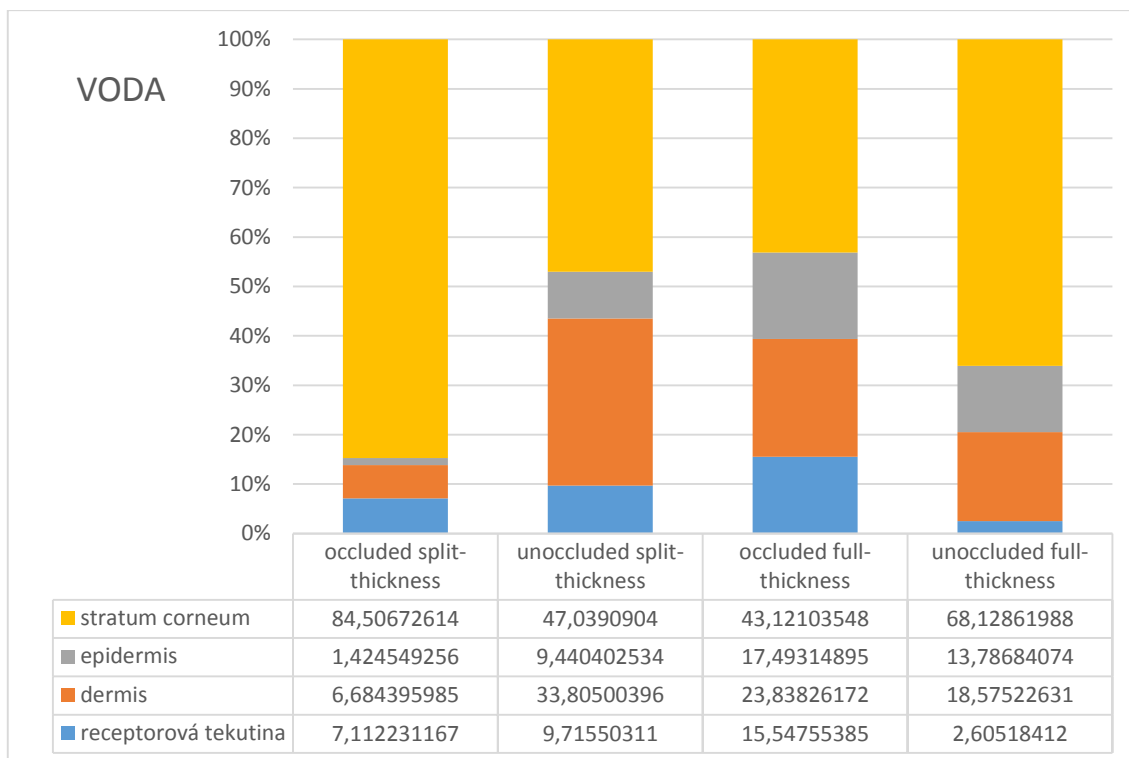
Obr. 19. **Takrin** % permeace do jednotlivých kompartmentů na ploše 1,76 cm²

Z procentuálního vyjádření jednotlivých kompartmentů zaujímá největší část SC a to v rozmezí 43,43 % a více. V případě plné tloušťky pozorujeme významnější zastoupení v receptorové tekutině.



Obr. 20. 7-MEOTA % permeace do jednotlivých kompartmentů na ploše 1,76 cm²

Pro receptorovou tekutinu PBS hodnotíme velice malý procentuální podíl prošlé frakce. Dle toho lze usuzovat, že PBS je pro simulaci transdermální permeace 7-MEOTA nevhodná receptorová tekutina. Největší absorpce je opět v kompartmentu SC a epidermis.



Obr. 21. 7-MEOTA % permeace do jednotlivých kompartmentů na ploše 1,76 cm²

V případě vody hodnotíme permeaci o trochu lépe, ale jsou zde patrné výrazné rozdíly. Největší absorbované množství je opět v kompartmentu SC, který se na transdermální permeaci podílí nejvýrazněji a to až z 84,51 %.

5. DISKUZE

Takrin se dnes již nepoužívá pro svou výraznou toxicitu po p.o. podání. TD podání by mohlo být vhodnou alternativou k p.o. podání s omezením těchto nežádoucích účinků.³¹ Takrin se nikdy nepodával jinou než p.o. cestou a dosud žádná studie na téma TD podání takrinu nebyla publikována. Jako jedním z alternativních způsobů podání bylo testováno podání intranasální cestou. Jednalo se o výzkum na dvou univerzitách v Itálii a studie byla uveřejněna v roce 2011. Takrin byl podán vázaný na nanočástice albuminu doplněné o dva cyklodextrinové deriváty. Albumin byl získán z hovězího sérového albuminu za použití koacervační metody. Po jeho tepelném zesítnění byly nanočástice naplněny roztokem takrinu a lyofilizovány. Výhodou intranasálního podání je velká absorpční plocha, rychlé dosažení cílových hladin a obejití jaterního first-pass metabolismu. Testování proběhlo *in vitro*, které ukázalo, že takrin se z nanočástice neuvolňuje ihned, ale dochází ke zpoždění uvolňování. *In vivo* testování na nosní sliznici ovce dokázalo, že takrin se z nanočástice 100 % uvolňuje do 100 min. Studií bylo zjištěno, že takrin má dobrou schopnost pronikat v místě aplikace při použití vhodného albuminového nosiče s cyklodextriny. Další studie, prokazující tuto účinnost, jsou prováděny na zvířecích modelech a výsledky dosud nejsou zveřejněny.⁴² 7-MEOTA nikdy nebyla terapeuticky použita v žádné formě, pouze bylo provedeno několik testů *in vitro* a *in vivo* na potkanech.³⁹

Látky vhodné pro TD podání musí splňovat několik kritérií. Měly by mít molární hmotnost menší než $M \leq 400$ g/mol, logP mezi -1-4, teplotu tání ≤ 200 °C, mělo by se jednat o neionizovanou molekulu a z farmakokinetického hlediska by měla být jejich denní dávka v řádu μg .⁴⁷ Což naše testované látky takrin i 7-MEOTA splňují. Pouze u 7-MEOTA není známa její denní terapeutická dávka, protože zatím nikdy nebyla použita.

Derivát takrinu, 7-MEOTA, vykazoval velmi nízkou permeační schopnost do akceptorové fáze, kterou tvořil fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem. Obecně je 7-MEOTA špatně rozpustná v pufrech. Proto byl proveden srovnávací pokus, kde akceptorovou fází tvořila deionizovaná voda. Ve vodě má 7-MEOTA dobrou rozpustnost – přibližně stejnou jako takrin (rozpustnost ve vodě 25 mg/ml).

Dle OECD směrnice o testování transdermální absorpce *in vitro* se dává přednost použití fyziologického roztoku jako receptorové tekutiny, i když jiné kapaliny mohou být také použity za předpokladu, že je jejich použití odůvodněné.⁴⁸ V našem případě je nerozpustnost látky v pufru odůvodněným použitím jiné receptorové tekutiny než doporučené. Voda byla použita především jako velmi dobré rozpouštědlo pro 7-MEOTA, ale přes tuto výhodu měla i nevýhody. Konkrétně se zdálo, že dost výrazně mění konzistenci kůže. Ta se stávala vláčnější, bělejší a celkově měkčí. PBS je pro TD testování vhodnější už z důvodu lepší simulace vnitřního prostředí lidského těla. Zde se tedy nabízí experimentální možnost pro nalezení vhodnější receptorové tekutiny pro testování 7-MEOTA *in vitro*.

Prošlá frakce kumulativního množství v $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ vykazovala výrazné rozdíly. To přisuzujeme především rozdílům jednotlivých kůží, které byly pro pokus použity, ačkoliv byla snaha vybrat vzorky kůže co nejpečlivěji, bez viditelných poškození a pigmentových skvrn. Množství, které prošlo do receptorové tekutiny během 24 hodinového experimentu z celkového množství látky, které proniklo do kůže, se pro takrin pohybovalo mezi 2,3 – 25,7 %. Pro 7-MEOTA s receptorovou tekutinou PBS se pohybovalo okolo 3,7 – 9,2 %, což hodnotíme jako nižší při srovnání s takrinem. Pro receptorovou tekutinu vodu se pohybovala mezi 2,6 – 15,6 %, opět s výraznými individuálními rozdíly. Celková schopnost permeace do receptorové tekutiny byla shledána jako nižší než v případě takrinu. Zde se nabízí možnost použití akcelantu transdermální permeace. Největší vliv na TD podání měla, podle předpokladu, vrstva SC, ve které docházelo k zadržení takrinu mezi 44 - 87 %. 7-MEOTA je derivát s téměř totožnou hydrofilitou jako takrin, tudíž je zde také patrný rozdíl v polaritě, který brání lepšímu průniku přes vrstvy kůže. Absorpce do SC pro experimenty s akceptorovou fází PBS se pohybovala mezi 57 – 77 % a pro akceptorovou fází vodu mezi 43 – 85 %. Jsou patrné individuální rozdíly v TD testování *in vitro*.

Jednotlivé pokusy byly provedeny s rozdílnou tloušťkou kůže, konkrétně dermatované buď jako dělená tloušťka 500 μm nebo jako plná 1000 μm s důvodem prokázat, jak výrazný vliv bude mít větší tloušťka kůže na rychlost permeace. Množství zadržené v dermis se příliš nelišilo v případě dělené tloušťky od plné. Nicméně farmakokinetickými výpočty se nám jednotlivé rozdíly ukázaly konkrétněji.

U každého experimentu byl vypočítán průměrný flux v ustáleném stavu (J_{ss}), což je jeden ze základních farmakokinetických parametrů. Tento parametr byl stanoven na základě jednotlivých permeačních profilů. Jedná se o množství látky, které prostoupí za určitý čas přes určitou plochu do akceptorové fáze. Při porovnání fluxů pro takrin i 7-MEOTA v obou receptorových tekutinách nejsou hodnoty statisticky významné. Důvodem je malý soubor dat a velké rozdíly v jednotlivých měřeních. Ani jedno srovnání na základě t-testu nedosáhlo statistické významnosti $p < 0,05$.

Dále byl vypočítán lag time, což je doba nutná k dosažení ustálené rychlosti pronikání látky do receptorové tekutiny. Je to hodnota, která je závislá na tloušťce kůže.² Použití kůže v plné tloušťce vedlo k výraznému nárůstu lag time. Toto pozorování je v plném souladu s očekáváním, neboť v případě použití dělené tloušťky zabere nasycení kůže testovanou látkou kratší čas. Experimenty s použitím kůže v plné tloušťce lépe simulují reálnou situaci při transdermální podání léčiva, lze podle nich tedy lépe odhadnout, jak dlouho bude trvat, než léčivo začne pronikat do systému stálou rychlostí. Značný vliv na lag time měla v případě 7-MEOTA i použitá receptorová tekutina.

Při porovnání takrinu a 7-MEOTA hodnotíme celkově kratší potřebný čas pro ustálenou rychlost pronikání látky do receptorové tekutiny pro takrin, i když jsou opět patrné značné individuální rozdíly.

Pro porovnání lze vybrat některé z výsledků získaných v diplomové práci Lucie Ostrovské, jejíž experimenty byly provedené na standardní látce kofeinu v téže laboratoři s použitím téže metodiky v nezakrytém uspořádání, na prasečí kůži z břicha. U kůže s dělenou tloušťkou dosáhla hodnota lag time kofeinu 1,82 h⁴⁵ a pro plnou tloušťku 1,88 h⁴⁵. Což jsou tedy výrazně kratší časy než hodnoty získané z experimentů pro takrin - 4,87 h, 7-MEOTA s PBS - 4,55 h a s vodou - 6,82 h (dělená tloušťka) a takrin - 4,42 h, 7-MEOTA s PBS - 5,49 h a s vodou - 8,78 h (plná tloušťka). Takrin i 7-MEOTA dosahují ustálené rychlosti pronikání do receptorové tekutiny za podstatně delší čas. Takto dlouhý lag time je důvod, který by mohl bránit úspěšnému terapeutickému podání. Zde se nabízí možnost použití akcelerantu TD permeace, které lag time na základě svých fyzikálně-chemických vlastností zkracují.⁴⁹

Při porovnání lag time pro takrin i 7-MEOTA v obou receptorových tekutinách nejsou hodnoty statisticky významné. Důvodem je malý soubor dat a velké rozdíly v jednotlivých měřeních. Ani jedno srovnání na základě t-testu nedosáhlo statistické významnosti $p < 0,05$.

Vůbec nejdůležitější k popisu permeace pro jednotlivé látky je její permeační koeficient (K_p). Jedná se o konstantu, která znázorňuje tok látky v ustáleném stavu vzhledem ke koncentraci jejího roztoku aplikovaného na povrch kůže. K_p je důležitý parametr především pro srovnání jednotlivých experimentů i v rozdílných laboratořích.⁵⁰

Pro takrin na kůži s tloušťkou 500 μm a nezakrytou donorovou částí cely byl spočítán K_p $8,29 \times 10^{-5}$ cm/h, pro 7-MEOTA s PBS jako receptorovou tekutinou $1,19 \times 10^{-4}$ cm/h a s vodou $8,88 \times 10^{-4}$ cm/h a pro kofein $3,18 \times 10^{-4}$ cm/h⁴⁵, což jsou hodnoty řádově srovnatelné.

Při tloušťce 1000 μm a nezakrytou donorovou částí se jednalo o hodnoty K_p pro takrin $1,45 \times 10^{-3}$ cm/h, pro 7-MEOTA s PBS jako receptorovou tekutinou $3,55 \times 10^{-4}$ cm/h a s vodou $3,02 \times 10^{-4}$ cm/h a pro kofein $3,80 \times 10^{-3}$ cm/h⁴⁵, což jsou řádově porovnatelné hodnoty pouze pro takrin.

S kofeinem nám chybí srovnání v zakrytém uspořádání, proto lze pouze porovnat jednotlivé látky mezi sebou. Takrin dělená tloušťka s hodnotou K_p $1,26 \times 10^{-4}$, pro 7-MEOTA s PBS jako receptorovou tekutinou $3,45 \times 10^{-3}$ cm/h a s vodou $6,95 \times 10^{-4}$ cm/h. Řádově porovnatelný je takrin a 7-MEOTA s akceptorovou fází vodou.

Pro plnou tloušťku se jedná o hodnoty K_p pro takrin $2,22 \times 10^{-3}$ cm/h, pro 7-MEOTA, s receptorovou tekutinou puřem $8,41 \times 10^{-4}$ cm/h a s receptorovou tekutinou vodou $2,80 \times 10^{-3}$ cm/h. Opět je zde možné srovnání takrinu se 7-MEOTA s akceptorovou fází vodou.

Srovnání K_p hodnot takrinu ani 7-MEOTA z jiných laboratoří není možné, protože tyto experimenty byly provedeny vůbec prvně nebo nikdy nebyly výsledky jiných testů zveřejněny. Metodika byla ovšem ověřená pro kofein a zde bylo dosaženo výsledků porovnatelných s jinými laboratořemi.⁴⁵

Byla prokázána schopnost takrinu i 7-MEOTA pronikat přes kůži do receptorového kompartmentu. Schopnost permeace takrinu celkově hodnotíme jako ne příliš vysokou, zejména vzhledem k dlouhému lag time. Výrazného zlepšení by bylo možné dosáhnout použitím vhodného akcelerantu transdermální permeace, které dočasně snižují bariérovou funkci kůže. ⁶ Pro 7-MEOTA se schopnost permeace ukázala větší do vody, jako receptorové tekutiny. Zde se nabízí možnost experimentálního nalezení vhodnější receptorové tekutiny pro 7-MEOTA pro *in vitro* testování transdermální permeace. Nastavení jednotlivých odběrů (s noční pauzou mezi 8 a 20 h pokusu) není úplně vhodné a další pokusy by bylo dobré nastavit jinak, aby bylo více hodnot k lepšímu a přesnějšímu vyhodnocení a dosáhnout tak statistické významnosti. Případně měření ještě prodloužit, aby se dal dobře spočítat flux. Ideální je délka trvání pokusu 3 x hodnota lag time.

6. ZÁVĚR

V této práci byla studována permeace látky takrin a 7-methoxytakrin přes kůži *in vitro* s využitím statických cel Franzova typu. Použita byla kůže prasečí a akceptorovou fází tvořil pufr nebo voda.

Byly provedeny celkem 4 dílčí experimenty trvající 24 h pro každou látku na šesti celách. U 2 z nich byla použita kůže o tloušťce 500 μm a pro další 2 se jednalo o tloušťku 1000 μm , seříznutých dermatomem, s aplikovanou dávkou infinite dose na povrch kůže. V receptorové tekutině bylo stanoveno kumulativní množství prošlé látky. Byly vytvořeny permeační profily pro jednotlivá uspořádání experimentů a vypočítán lag time, flux v ustáleném stavu a permeační koeficient. Dále bylo stanoveno množství sledovaných látek zadržené v jednotlivých vrstvách kůže.

Získané výsledky byly porovnány s dříve provedeným testováním permeace kofeinu, jakožto standardu pro hydrofilní látky.

Transdermální permeace byla pro obě látky shledána jako značně pomalá. Pro případné transdermální podání studovaných léčiv je diskutována možnost použití akceleratoru a nebo vhodnějšího nastavení odběrů bez noční pauzy, či prodloužení trvání pokusů.

POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ K. Pizinger. Dermatovenerologie. *Euroverlag, s.r.o.* 2012. [ISBN 978-80-7177-985-8]. Stránky 4-10.
- ² L. Kotingová, L. Borská, Z. Fiala. Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. *Chemické Listy* 103, 2009. Stránky 533-539.
- ³ J. Štorch et al. Dermatovenerologie. *Galén*, 2013. [ISBN: 978-80-7262-898-8]. Stránky 1-12.
- ⁴ R. Čihák. Anatomie 3. *Grada Publishing, a.s.* 2004. [ISBN: 978-80-247-1132-4]. Stránky 559-564.
- ⁵ z https://www.mojemedicina.cz/files/moje-nemoc/obrazky/zh_nadory_kuze/o1_struktura_kuze.png?h=d84 ze dne 1.4. 2015
- ⁶ A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Šklubalová, O. Farsa, A. Krebs. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické Listy* 93, 1999. Stránky 107-119.
- ⁷ P. Komárek, M. Rabišková et al. Technologie léků. *Galén*, 2006. [ISBN: 198-80-726-2423-7]. Stránky 275 – 310.
- ⁸ A. Hrabálek, K. Vávrová. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*, 2005, Sv. 1. Stránky 8-10.
- ⁹ A. C. Williams, B. W. Barry. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. Stránky 603-618.
- ¹⁰ B. W. Barry. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release*, 1987, Sv. 6. Strana 85.
- ¹¹ A. Hrabálek, P. Doležal, K. Vávrová. Historie a současný stav ve vývoji akceleraantů transdermální permeace na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové – od esterů 6-aminohexanové kyseliny k transkarbamům (I. část). *Praktické lékařství*, 2007, Sv. 2. Stránky 90 – 92.
- ¹² Alzheimer's disease education and referral center. Dostupné z <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/topics/alzheimers-basics> ze dne 15.1. 2015

- ¹³ M. S. Parihar, T. Hemnani. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2004. Stránky 456-467.
- ¹⁴ Česká Alzheimerovská Společnost. Výskyt demence. Dostupné z <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/> ze dne 15.1. 2015
- ¹⁵ Alzheimer center. Alzheimerovo onemocnění. Dostupné z <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/> ze dne 15.1. 2015
- ¹⁶ Alzheimer's association. Younger/Early Onset Alzheimer's & Dementia. Dostupné z http://www.alz.org/alzheimers_disease_early_onset.asp ze dne 30.3. 2015
- ¹⁷ Alzheimer's association. What Is Alzheimer's? Dostupné z http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp ze dne 30.3. 2015
- ¹⁸ Alzheimer's disease education and referral center. Alzheimer's Disease Fact Sheet. Dostupné z <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-fact-sheet#symptoms> ze dne 30.3. 2015
- ¹⁹ P. Rössner. Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 2004, č. 1.
- ²⁰ Segovia, Fermín, et al. A comparative study of feature extraction methods for the diagnosis of Alzheimer's disease using the ADNI database. *Neurocomputing* 75.1, 2012. Stránky 64-71.
- ²¹ R. Jiráček. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, č. 4. Stránky 240–244.
- ²² R. Jiráček. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2002, č. 2. Stránky 101-105.
- ²³ L. Ghezzi, E. Scarpini, D. Galimberti. Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Drug design, development and therapy*, 7, 2013. Stránky 1471-1479.
- ²⁴ I. Tilšer. Léčba demencí (Kognitiva, Antidementia) 2013. Přednáška z farmakologie stažena z <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/> podzim 2013

- ²⁵ A. Chan, Y. Chien, S. Jin Lin. Transdermal delivery of treatment for Alzheimer's disease: development, clinical performance and future prospects. *Drugs Aging*, 2008, No. 9. Stránky 761-775.
- ²⁶ P. Sozio, L. Cerasa, L. Marinelli, A. Di Stefano. Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Disease and Treatment*, 2012, No. 8. Stránky 361-368.
- ²⁷ J. Madan, N. Argade, K. Dua. Formulation and Evaluation of Transdermal Patches of Donepezil. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2014. Stránky 95-103.
- ²⁸ D. Guay. Rivastigmine transdermal patch: role in the management of Alzheimer's disease. *American Society of Consultant Pharmacists*, 2008, No. 8. Stránky 598-609.
- ²⁹ B. Winblad, J. Machado. Use of rivastigmine transdermal patch in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2008, Vol. 5, No. 12. Stránky 1377-1386.
- ³⁰ C. W. Park, et al. Investigation of formulation factors affecting in vitro and in vivo characteristics of a galantamine transdermal system. *International journal of pharmaceutics*, 2012. Stránky 32-40.
- ³¹ M. Doležal, V. Opletalová, M. Miletín, P. Zimčík, M. Kučerová. Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém. *Karolinum*, 2009. [ISBN: 978-80-246-1633-9]. Stránky 64-66.
- ³² K. L. Davis, P. Powchik. Tacrine. *Lancet*, 1995, 345. [ISSN: 0140-6736]. Stránky 625-630
- ³³ W. K. Summers. Tacrine, and Alzheimer's treatments. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2006, No. 9. Stránky 439-445.
- ³⁴ z <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/tacrine-oral-route/description/drg-20066186> ze dne 16. 4. 2015
- ³⁵ M. Pohanka. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, 2011, vol. 155, No. 3. [ISSN: 1213-8118]. Stránky 219-223.

- ³⁶ A. J. Wagstaff, D. McTavish. Tacrine. *Drugs & aging*, 1994, 4(6). Stránky 510-540.
- ³⁷ J. Patočka a kol. Vojenská toxikologie. *Grada*, 2004. Stránky 67-69.
- ³⁸ z <http://www.scbt.com/datasheet-200172.html> ze dne 10.4. 2015
- ³⁹ O. Soukup, D. Jun, J. Zdarova-Karsova, J. Patočka, K. Musilek, J. Korabecny, J. Krusek, M. Kaniakova, V. Sepsova, J. Mandikova, F. Trejtnar, M. Pohanka, L. Drtinova, M. Pavlik, G. Tobin, K. Kuca. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Current Alzheimer Research*, 2013, vol. 10, no. 8. [ISSN: 1875-5828]. Stránky 893–906.
- ⁴⁰ Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease. *Australian Prescriber an independent Review*. Dostupné z <http://www.australianprescriber.com/magazine/19/1/14/7> ze dne 5.4. 2015
- ⁴¹ z <http://www.livertox.nih.gov/Tacrine.htm> ze dne 10.4. 2015
- ⁴² B. Luppi, F. Bigucci, G. Corace, A. Delucca, T. Cerchiara, M. Sorrenti, L. Catenacci, A. M. Di Pietra, V. Zecchi. Albumin nanoparticles carrying cyclodextrines for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. Sv. 44. Stránky 559-565.
- ⁴³ L. Dejmek. 7-meota. *Drugs of the future*, 1990, No. 15. Stránky 126-129.
- ⁴⁴ R. C. Gupta. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. *Academic Press*, 2009. Dostupné na <https://books.google.cz/books?id=MXKDBAAAQBAJ&pg=PA155&lpg=PA155&dq=7-meota+derivatives&source=bl&ots=L-ttwCjol6&sig=alMBbpAf173R6vJ5Rga4D6Jc6JA&hl=cs&sa=X&ei=N4QvVfyLHoehyAPyp4CoCw&ved=0CFMQ6AEwBg#v=onepage&q=7-meota%20derivatives&f=false> přístoupeno dne 5.3.2015. Stránky 155-157.
- ⁴⁵ L. Ostrovská, diplomová práce: STANOVENÍ PERMEACE KOFEINU PŘES KŮŽI IN VITRO S VYUŽITÍM STATICKÝCH DIFÚZNÍCH CEL FRANZOVA TYPU. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.

⁴⁶ SCCP, 2006. Opinion on basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. Adopted March 2006.

⁴⁷ N. S. Chandrashekar, R. H. Shobha Rani. Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters in Drug Selection and Loading for Transdermal Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. Stránky 94–96.

⁴⁸ OECD guideline for testing of chemicals. Skin Absorption: *in vitro* Method. Guideline 428, adopted April 2004. Stránky 1-8.

⁴⁹ D. Prasanthi, P. K. Lakshmi. Effect of chemical enhancers in transdermal permeation of alfuzosin hydrochloride. *International Scholarly Research Notices*, 2012, dostupný na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316394>

⁵⁰ T. S. Poet, J. N. McDougal. Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-biological interactions*, 2002. Stránky 19-34.