

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 12
Nanofibre membranes as drug carriers 12**

Mgr. Veronika Houdková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, květen 2016

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne

10.5.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za veškerý čas, který mi věnoval při vypracování rigorózní práce, za jeho pomoc, ochotu a rady. Také děkuji Mgr. Pavlu Berkovi za získání dat a pomoc.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
2. ZADÁNÍ PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 Slizniční povrchy dutiny ústní.....	11
3.2 Sublingvální sliznice jako aplikační bariéra.....	13
3.3 Sliny a mukus	13
3.3.1 Fyzikálně-chemická struktura slin.....	15
3.3.2 Trojrozměrná struktura slin	16
3.4 Bioadheze	18
3.4.1 Mukoadheziva	19
3.4.2 Vybrané sublingvální přípravky.....	20
3.5 Současný stav a další vývoj.....	22
3.5.1 Studie u člověka a lidské modely tkání	23
3.5.2 Modely se sliznicí prasete	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
4.1 Použité látky	26
4.2 Přístroje	27
4.3 Postupy a metody	27
4.3.1 Příprava mobilní fáze pro HPLC (HEPES pufr dle www.enco.co.il/protocol)	27

4.3.2 Chromatografické podmínky	28
4.3.3 Příprava akceptorové fáze	28
4.3.4 Příprava donorových kapalin.....	28
4.3.5 Příprava kalibrační roztoků pro stanovení FITC-BSA	29
4.3.6 Úprava nanovláknenných membrán	29
4.3.7 Příprava 16-ti a 32-ti vrstevných nosičů.....	29
4.3.8. Příprava permeačních komůrek	31
5. DOKUMENTACE	32
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	46
7. ZÁVĚRY	51
8. Použité zkratky a symboly.....	52
9. LITERATURA	53

ABSTRAKT

Hlavní výhody systémového sublingválního podání léčiv lze spojovat s bohatým krevním zásobením a velmi malou tloušťkou dané biologické membrány neobsahující buňky zrohovatělého slizničního epitelu. Teoretická část práce dílčím způsobem koriguje skutečnost, že dosud málo pojednanou problematikou sublingvální aplikační cesty je její souvislost s vlivem slin a mukosálních povlaků.

Stěžejním úkolem experimentu bylo ověření možnosti využití albuminu (BSA) jako součásti potenciálního nosiče léčiv v nanovlákných membránách pro sublingvální aplikaci. Sublingvální membrány byly získány preparací z jazyka prasete domácího (*Sus scrofa*) s následným rychlým zmrazením v kapalném dusíku a dalším uchováváním při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V in vitro pokusech zahrnujících i využití slin jako média zprostředkujícího kontakt léčiv s epitelu sublingvální sliznice byl hodnocen průnik fluorescenčně značeného hovězího sérového albuminu (FITC-BSA o molekulové hmotnosti asi 68 000). Jeho aplikace v podobě 32vrstevných a 16vrstevných nanovlákných nosičů s obsahem na úrovni 30 procent hmotnostních a srovnání s permeací z koncentračně ekvivalentního roztoku lyofilizovaného BSA přineslo tato zjištění:

1. FITC-BSA sublingvální membránou pronikal vždy, a to na úrovni fluxů J v řádu jednotek $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$
2. Nebyla zaznamenána snížená permeace FITC-BSA z donorového prostředí citranfosforečnanového pufru pH 6,8 s obsahem slin (1:1)

ABSTRACT

The main advantages of sublingual systemic administration of drugs can be linked with a rich blood supply and very small thickness of the non-cornified biological sublingual epithelium. The theoretical part partially corrects the fact that the hitherto little addressed issue of sublingual administration route is connected with the influence of saliva and mucosal coating.

The goal of the experiment was to verify the possibility of using albumin (BSA) as a part of potential drug carriers in the nanofiber membranes for sublingual administration.

Sublingual membranes were obtained by dissection of porcine tongue (*Sus scrofa*) followed by rapid freezing in liquid nitrogen and further storage at -20°C .

In vitro experiments involved the use of saliva as a medium of intermediate contact of drugs with the sublingual mucosa epithelium. Permeation of fluorescently labelled bovine serum albumin (FITC-BSA molecular weight of about 68.000) was evaluated. Its application in the form 32-layered and 16-layered nanofiber carriers with the content of 30 percent FITC-BSA by weight was compared to permeation of the solutions of equivalent concentrations of lyophilized FITC-BSA and yielded the following findings:

1. FITC-BSA penetrated sublingual porcine membrane always by the flux J in the order of $10^1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$
2. No reduction was observed at permeation of FITC-BSA from the donor medium containing a saliva and citrate-phosphate buffer pH 6.8 mixture (1 : 1)

1. ÚVOD

Jedním z úkolů současné farmaceutické technologie je výzkum a vývoj lékových forem nových typů („generací“), které odrážejí požadavky klinické praxe na soustavy s řízeným transportem a uvolňováním léčiva, čímž umožňují kompenzovat některé nevyhovující vlastnosti jinak potenciálně zajímavých léčivých (účinných) látek. K tomuto účelu se také znovu zkoumají nejen dosud opomíjené cesty podání léčivých látek, ale i nové fyzikálně-chemické struktury nosičů léčiv. V tomto kontextu byly již od počátku 60. let minulého století cíleně vyvíjeny léčivé přípravky pro sublingvální podání účinných látek a od konce 70. let také lékové formy založené na mukoadhezi.

Relativně nově k nim patří také nanovláčenné soustavy vytvořené jako nosiče léčiv pro sublingvální aplikaci, které byly vyvíjeny na katedře farmaceutické technologie FaF UK ve spolupráci s firmou Elmarco s.r.o., Liberec. Membrány byly vyrobeny a předány Ing. Denisou Stránskou, zástupcem průmyslového partnera.

Vzhledem k tomu, že v předkládané práci je studováno chování nově vyvíjených medikovaných nanovláčenných membrán v prostředí imitujícím poměry při sublingvální aplikaci, je jednou z interakcí nosičové soustavy nejen uvolňování léčiva a bioadheze, ale také výsledný průnik léčiva kompletním biologickým prostředím, tj. přes vrstvu slin s následným průnikem sublingvální membránou. Kromě souhrnu podstatných informací o sublingvální aplikační cestě jsou proto věnovány některé odstavce teoretické části složení a vlastnostem slin.

Hlavním účelem experimentů předkládané práce bylo pilotní studium chování nanovláčenných membrán s vysokým obsahem albuminu za *in vitro* biomimetických podmínek.

2. ZADÁNÍ PRÁCE

1. **Zpracování literární rešerše** zaměřit na sublingvální aplikační bariéru s detailnějším souhrnem informací o slinné kapalině jako rozpouštěcím vehikulu a potenciální bariéře průniku sublingválně podaných účinných látek.
2. **Provedení in vitro permeačních pokusů** se sublingvální membránou získanou z prasete domácího jako permeační bariérou.
Úkolem je získat prvotní údaje o permeaci vysokomolekulární látky z prostředí obsahujícího lidskou slinu.
Konkrétně se zaměřit na in vitro průnik fluorescenčně značeného hovězího sérového albuminu (FITC-BSA), resp. hovězího sérového albuminu (BSA) z vícenásobně vrstveného nanovlákněného polymerního nosiče s obsahem hydroxypropylmethylcelulosity, polyvinylalkoholu, polyethylenoxidu a 30 % albuminu s přísadou chloridu sodného (HPMC/PVA/PEO/NaCl/albumin) při porovnání s průnikem FITC-BSA z roztoku ekvivalentního množství značeného albuminu a celkového albuminu za aplikačních stejných podmínek.
3. **Vyhodnocení experimentálních dat** HPLC stanovení FITC-BSA ponechat v zodpovědnosti pracovníků s erudiicí v dané analytické metodice.
K následnému vyhodnocení primárních permeačních dat přednostně využít postupů zavedených v příslušné katedrální laboratoři, aby bylo možné pokus dobře reprodukovat a výsledky interpretovat i v relacích s jinými pracemi.
4. **Zpracování kompletního prvpisu** Pro formulaci závěrů využít vlastních zkušeností z předchozí diplomové práce a konzultací s paralelně probíhající další rigorózní prací Mgr. Martiny Urbanové.
5. **Vypracování finální podoby práce a příprava prezentace** pro obhajobu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Perorální podání představuje nejpřirozenější a také nejčastěji používanou cestu aplikace léků. Přesto má především pro systémovou aplikaci účinných látek do systémového krevního nebo lymfatického oběhu některé významné limity. Tyto limity jsou v zásadě dány anatomicko-fyziologickými poměry v gastrointestinálním traktu (GIT), v němž jsou účinné látky (léčivo) ještě před absorpcí vystaveny značně agresivnímu prostředí. To zahrnuje drastickou změnu pH od hodnot 1 až 2 v žaludku po hodnoty kolem 7,4 v distálním úseku střeva, časově dosti nepředvídatelný transit, přítomnost četných trávicích enzymů a také činnost střevní mikroflóry. Pro řadu důležitých léčivých látek je tak prostředí v různých částech GIT nevhodné z hlediska nejen jejich stability, ale také z hlediska požadavků na jejich potřebnou absorpci v jednotlivých úsecích různě komplikované stěny GIT.^{1,2}

S přihlédnutím k fyzikálně-chemickým vlastnostem účinných látek i ekonomickým parametrům není možné převést všechny léčivé látky do všech typů lékových forem, které jsou teoreticky k dispozici. U řady léčivých látek jsou perorální lékové formy stále jedinou možnou dostupnou a přitom zcela vyhovující formou, u řady jiných léčivých látek, například charakteru peptidů a proteinů, není naopak systémová perorální aplikace dosud použitelná prakticky vůbec. Pro léčiva, která při klasické perorální aplikaci vykazují nízkou biologickou dostupnost, se nabízí využití pouze určitých částí sliznice GIT, ale také využití sliznice nosní, plicní i vaginální.

Většinou se tedy jedná o aplikační cesty vyžadující složitější postupy z hlediska vývoje a výroby příslušných léčivých přípravků (resp. lékových forem), takže bývají časově a finančně náročné. V případě využití injekčních preparátů je samozřejmým požadavkem jejich sterilita, jejich aplikace je do jisté míry vždy bolestivá a spojená s rizikem mikrobiální kontaminace organismu v místě vpichu. U rektální, dermální a bukové aplikační cesty je problémem různá a proměnlivá, často nedostatečná míra vstřebání z míst absorpce, například i v důsledku kolísavosti místního prokrvení. Nevýhody nasálního podání spočívají v malém objemu dutiny nosní, a možném narušení fyziologických funkcí nosní dutiny.^{3,4} Dlouhodobé podávání léků v nosní sliznici může způsobit nevratné poškození nosních řasinek, omezující využití při chronických onemocněních.⁵

Sliznice oční, ušní nemají pro systémové podání praktický význam, jsou využívány jen pro lokální aplikaci léčiv.

Mezi zmíněnými alternativními cestami podání léčiva se jako velmi vhodná jeví sliznice ústní dutiny, která má nejlepší aplikační přístupnost, je relativně imobilní a dobře prokrvená, s přímým přestupem látek do systémového oběhu, tedy bez předchozího průchodu játry (především cestou *vena jugularis*). Mezi její další výhody patří také nízká citlivost na alergizující a dráždivé látky, dostatečně vysoká hydratace prostředí pro rychlý průnik léčiva, nižší enzymatická aktivita v sublingválním prostoru včetně samotné biologické bariéry.⁶ Z hlediska compliance pacienta je kromě zlepšeného komfortu aplikace nebo zjednodušení aplikačního schématu důležité také to, že se jedná o typ bezbolestné aplikace umožňující případné snadné ukončení.

3.1 Slizniční povrchy dutiny ústní

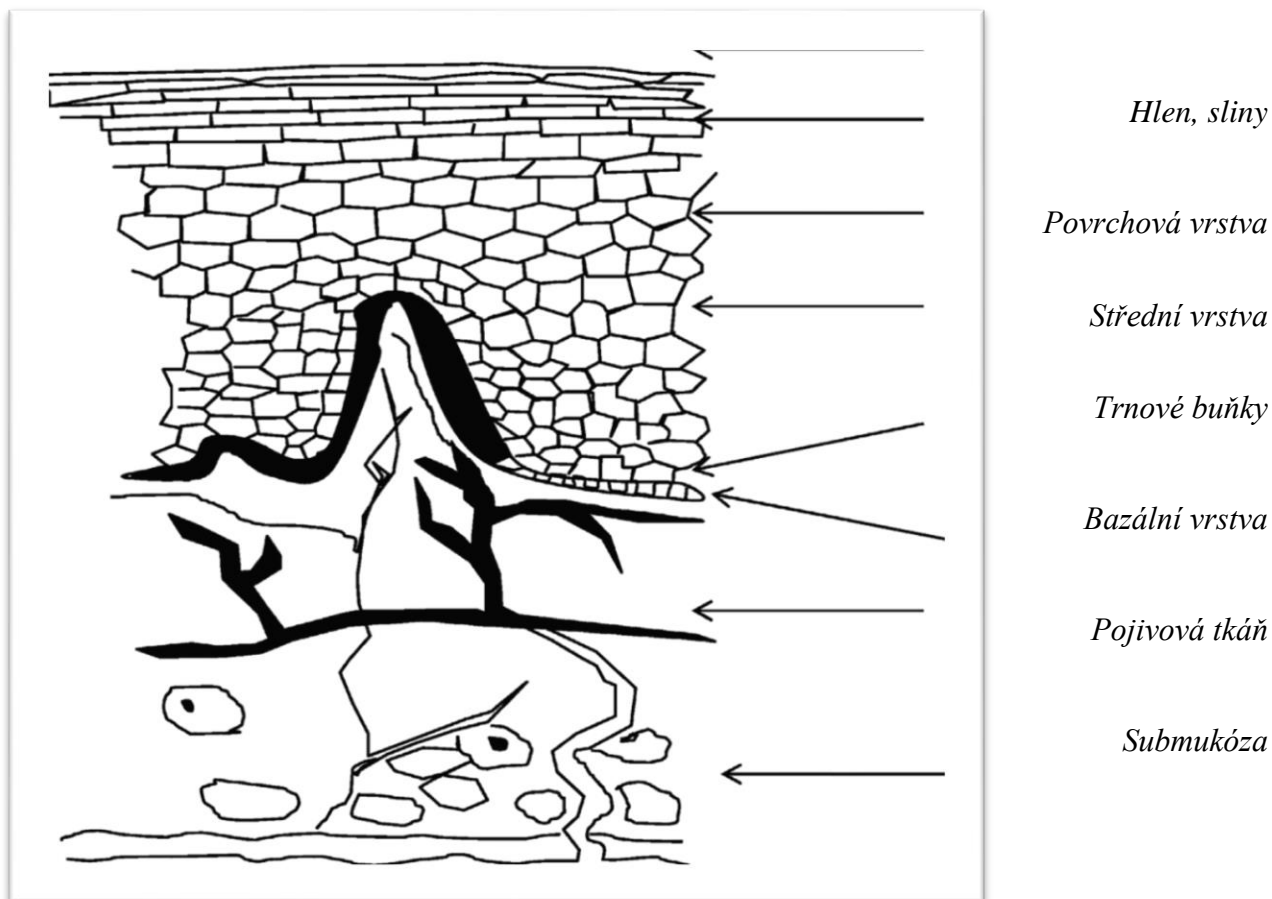
Ústní dutina (*cavitas oris*) je prostor oddělený patrem od nosní dutiny a rty a tvářemi ohraničený zvenčí. Spodinu ústní dutiny tvoří jazyk, připojený svaly k dolní čelisti. Komunikaci s vnějškem zprostředkuje ústní štěrbina a vzadu komunikuje ústní dutina s hltanem. Zubní oblouk horní a dolní čelisti rozdělují ústní dutinu na předšní ústní dutiny a na vlastní ústní dutinu. Vnější stěny předšně i vlastní ústní dutiny tvoří tváře (*buccae*) a rty (*labia*).

Stavba tváří i rtů je v podstatě stejná, a jejich základ tvoří mimické a žvýkací svaly, podkožní vazivo a sliznice vystylající ústní dutinu a její předšně. Sliznice předšně přechází na okraj rtů, kde jí prosvítá náplň krevních cév, tzv. červeň rtů. Rty a tváře se účastní příjmu a mechanické úpravy *potravy*.⁷

Sliznice jsou vlhké povrchy, lemující stěny různých tělních dutin, zejména trávicího a dýchacího traktu. Skládají se z pojivové tkáně (*lamina propria*), na kterou nasedá vrstva epitelálních buněk, které jsou na povrchu zvlhčeny, zpravidla slizničním hlenem (sliz, mukus, *mucus*). Epiteliální buňky mohou být v jedné vrstvě (např. žaludek, tenké střevo, tlusté střevo, průdušky), a pak je hlen sekretován pohárkovými buňkami přímo na povrch sliznice. U vícevrstvých epitelů (např. ústní dutina, jícn, vagina, oční rohovka) je sliznice spojena se žlázami, které na povrch sliznice secernují hlen. V případě dutiny ústní tvoří mukus vrstvu přiléhající k povrchu sliznice, v případě střeva je také rozpuštěn, případně suspendován v lumen GIT. Tloušťka slizové vrstvy sliznic se různí od 1 μm v ústní dutině po 450 μm v žaludku.⁸

Úroveň keratinizace ústní sliznice není tak vysoká jako u kožní bariéry, která je kompletně pokryta relativně vysokou rohovou vrstvou (*stratum corneum*). Uvádí se, že ústní

sliznice je asi 4 až 4000 krát propustnější než lidská kůže.⁹ Sliznice dutiny ústní je složena z 40 až 50 vrstev různě diferencovaného dlaždicového epitelu, u sublingvální sliznice je těchto vrstev poněkud méně. Pod nimi leží mitoticky aktivní bazální membrána složená z vysoce se množících bazálních keratinocytů. Tyto se směrem k zevnímu povrchu neustále doplňují, dále se diferencující povrchnější epitelové vrstvy buněk, které nakonec vytvářejí vrstvy oploštělých nejsvrchnějších buněk (**Obr. 3.1**).



Obr. 3.1 Struktura bukální sliznice (http://www.szs-tabor.cz/Projekt/projekt/som/Obrazovy_pruvodce/tema/t10/1014.jpg)

Právě tato epitelální vrstva je hlavní překážkou pro průnik látek ústní sliznicí. Její nepropustnost zodpovídá za ochranu organismu před vstupem exogenních a endogenních látek přes ústní sliznici do organismu a v opačném směru zabraňuje ztrátě tekutin z podkladových tkání do zevního prostředí. Nerohovatější sublingvální a bukální sliznice

ústní dutiny jsou relativně permeabilní, s bohatým krevním zásobením, je ovšem také odolná a vykazuje krátkou dobu pro zotavení po stresu nebo poškození.^{10,11,12}

Nedostatek Langerhansových buněk činí tuto sliznici tolerantní k potenciálním alergenům.¹³

3.2 Sublingvální sliznice jako aplikační bariéra

Ústní sliznici lze rozčlenit na část sublingvální, gingivální, bukální a sliznici měkkého patra. Konvenční a bukální sublingvální léčivé přípravky mají obvykle značně omezenou kontaktní plochu ústní sliznice. Existují značné rozdíly v propustnosti mezi různými regiony ústní dutiny, a to z důvodu různých struktur a funkcí orální sliznice.

Obecně platí, že propustnost ústní sliznice klesá v pořadí sublingvální (největší) bukální, palatinální.¹⁴ Důvodem je především rozdílná relativní tloušťka a stupeň keratinizace. Sublingvální sliznice je relativně tenká a nezrohovatělá, bukální je silnější a také nezrohovatělá a tloušťka palatinální sliznice je někde uprostřed, ale je zrohovatělá.

Nejsvrchnější buněčná bariéra se po chemické stránce skládá převážně z lipidů horní vrstvy epitelu. Suprabazální buňky jsou totiž silně diferencovány, vytvářejí silná mezibuněčná desmosomální spojení a u svého apikálního povrchu obsahují také vesikuly (granule), které uvolňují do mezibuněčných prostor lipofilní materiál.^{15,16} Přispívají tak celkové soudržnosti epitelu. Lipofilní materiál přitom zpomaluje průchod hydrofilních látek tímto epitelem.¹⁷

Složky granulí v zrohovatělém a nezrohovatělém epitelu se však liší.¹⁸ U zrohovatělého epitelu jsou složeny z lamelárních lipidických sloupců s obsahem sfingomyelinu, glukosylceramidů, ceramidů a dalších nepolárních lipidů, zatímco nekeratinizovaný epitel je pokryt lipidy, které lamely netvoří, například estery cholesterolu, cholesterolem a glykosfingolipidy.^{19,20,21}

Vzhledem k celkově vysoké hydrataci pojivové tkáně byla také vyslovena hypotéza, že určitou roli v propustnosti bariéry mohou hrát tzv. tight junctions,²² tyto útvary však nebyly spolehlivě prokázány nebo se běžně v epitelu ústní dutiny nevyskytují.

3.3 Sliny a mukus

Epiteliální povrch dutiny ústní je potažen slinami. Obvykle se uvádí, že hlavní součástí slin je voda (99 %), obsah organických látek ve slinách činí asi 0,7 %. Zjednodušeně lze říci, že hlavní organickou součástí slin je především mucin (hlen, sliz), který je složen převážně z glykoproteinů, jsou zde obsaženy také lipidy, anorganické soli a dále enzym amyláza.

Glykoproteiny jsou rozhodující, jak pro charakteristiku gelové struktury slizu, tak pro jeho kohezivní a adhezivní vlastnosti. Slinná amyláza štěpí škroby na jednoduché cukry. Neústrojných látek je ve slinách asi 0,3 %. Jde o vápenaté, sodné, draselné a fosforečné soli, které se mimo jiné podílejí na vzniku zubního kamene. Sliny obalují a slepují rozmělněnou potravu a zvlhčováním ústní dutiny zabraňují poranění sliznice ostrými a suchými úlomky potravy. Sliny se tvoří a vylučují, stejně jako ostatní trávicí šťávy, především pod vlivem nervových a humorálních (látkových) podnětů vznikajících drážděním chuťových a čichových čidel ústní a nosní dutiny. Kromě tohoto mechanismu, který předpokládá přímý styk potravy nebo její vůně s příslušnými receptory, vznikají u člověka složité reflexní spoje mezi žlázami trávicí trubice a různými oblastmi centrálního nervového systému. Tyto spoje umožňují produkci slin i dalších trávicích šťáv, pouze na základě představ o chuti a vzhledu potravy vytvořených v mozkové kůře podle předchozích zkušeností.²³

Vzhledem k významu slin při sublingválním podání účinných látek bude v dalších odstavcích uvedena řada potenciálně důležitých podrobnějších informací ke složení a vlastnostem slin.

Rychlost tvorby slin u zdravého dospělého člověka se pohybuje v rozmezí od 0,3 ml do 7 ml za minutu²⁴ a objemově tak činí asi 0,5 litru až 1,5 litru vyloučených sliz za den.²⁵ Hodnota pH slin kolísá v rozmezí od 6,2 do 7,4, s vyššími hodnotami pH při zvýšené sekreci. Sliny se tvoří v postranních velkých příušních žlázách, submandibulárních a sublingválních žlázách a drobných slinných žlázkách přítomných sliznici jazyka (Von Ebnerovy žlázy), ale také tváře, rtů a patra.²⁶

Slinné žlázy se odlišují typem sekretu, který produkují, což je souvisí s poměrem serózní mukózní složky produktu žlázových buněk. Serózní buňky, které lze nalézt v příušních, submandibulárních, palatálních a lingválních žlázkách vylučujících vodnatou tekutinu téměř bez obsahu hleny. Hlen je syntetizován ve specializovaných pohárkových buňkách jako součást slin. Až 70% z celkového množství mucinu nalezeného ve slinách je tvořeno v menších slinných žlázkách.

Hodnota pH v lidských slinách je uváděna v širokém rozsahu 5,3-7,8 v závislosti na tom, jedná-li se o slinu vyprodukovanou na základě nějakého stimulujícího impulsu (tzv. stimulovaná slina) nebo nikoli.²⁷

Při fyziologickém pH, hlenová síť nese negativní náboj (s ohledem na kyselinu sialovou a přítomnost sulfátových zbytků), který hraje roli v adhezi ke sliznici. Při

fyzilogickém pH může hlen tvořit velmi kohezní gelové struktury, které se váží na epiteliální povrch buněk.²⁸

Tato sekrece je silně závislá na aktivaci nějakým stimulem. Slizniční buňky přítomné v submandibulární, sublingvální, retní, patrové a jazykových žlázách produkují sliny bohaté na viskózní mukus. Ten vykazuje více či méně elastické vlastnosti. Kompletní slina je tedy převážně výměškem slinných žláz, obsahuje však někdy také zbytky krve,²⁹ epitelů ústní tkáně,³⁰ mikroorganismy,^{31,32} případně zbytky potravy. Stimuly pro nárůst tvorby slin zahrnují nejen přítomnost potravy nebo dráždivých látek v ústech, ale také zrakové a čichové vjemy.³³ Při studiu sekrece slin v reakci na vůni bylo zjištěno, že jsou sliny produkovány podčelistními, ale nikoli příušními žlázami.³⁴

Množství a složení secernovaných lidských slin závisí na mnoha faktorech, typu a velikosti slinných žláz^{35,36} a fyziologickém stavu,³⁷ cirkadiálním rytmu,^{38,39,40,41} délce trvání a typu stimulu, na stravě, podávaných lécích, věku, pohlaví a krevní skupině.^{42,43} V současné době se předpokládá, že propustnost bariéry v ústní sliznici je dána mezibuněčným materiálem pocházejícím z vesikul (granulí). Doba obnovy buňkálního epitelu se odhaduje na 5-6 dnů, což platí i pro další části ústní sliznice.

3.3.1 Fyzikálně-chemická struktura slin

Již počátkem 20. století bylo zřejmé, že sliny nemohou být považovány za jednoduché pravé roztoky, protože obsahují vláknité elastické struktury. Do 80. let minulého století se uvádělo, že sliny jsou vícefázové soustavy obsahující fázi kapalnou, plynnou (bubliny) a trojrozměrně zesítenou (gelovitou).⁴⁴ Reologicky byly sliny charakterizovány jako nízkoviskózní gely.⁴⁵ Později byly sliny klasifikovány jako tkáňové tekutiny a byl navržen složitější strukturální model slin,⁴⁶ podle kterého slina obsahuje čtyři úrovně organizace fází:

- a) kontinuální fázi složenou z roztoku elektrolytů ve vodě,
- b) kontinuální fázi zesítené struktury podobné lešení,
- c) ve vodě málo rozpustné proteiny, slinné micely anebo jiné slinné kulovité struktury uvnitř vláknenné sítě,
- d) lipoidní materiál, bakteriální a epitelové buňky.

Trojrozměrná síť je tvořena převážně vysokomolekulárními glykoproteiny a zodpovídá za existenci adhezivního filmu sliny na ústních površích.

Analýza struktury slin byla většinou prováděna skenovací a transmisní elektronovou mikroskopií (SEM a TEM).^{47,48} Konkrétně TEM je zvláště výhodná pro stanovení velikosti nanočástic, jakými jsou například kulovité struktury (100 nm až 200 nm) uvnitř slinné sítě.

Pro studium větších struktur ve slinách se dává přednost použití konfokální laserové skenovací mikroskopie (CSLM). Výhodou CSLM oproti elektronové mikroskopii je to, že vzorky mohou být studovány bez předchozí evakuace, sušení nebo zmrazování, což vždy může vyvolávat vznik strukturálních artefaktů. Na druhé straně, při CSLM nemůže být dosaženo tak vysokého zvětšení, jako pomocí TEM.⁴⁹

3.3.2 Trojrozměrná struktura slin

Struktura trojrozměrné sítě velkoobjemové frakce slin, stejně jako podílu adheujícího na ústních površích má charakteristiky gelu, ale je propustná pro makromolekuly o poměrně velkém hydrodynamickém průměru.⁵⁰ Hlavní komponentou gelové matrice je vysokomolekulární mucin (MUC5B) zodpovědný za adhezi a gelovou strukturu hlenové vrstvy.^{51,52,53}

Vlastnosti gelu jsou většinou přičítány vzájemné interakci z molekul mucinu.^{54,55} Navrhované mechanismy zahrnují hydrofobní interakce,⁵⁶ sacharidové interakce a vápníkem zprostředkované vazby.⁵⁷ Meziřetězcové hydrofobní interakce jsou příčinou agregace mucinu. Bylo navrženo, že vzhledem k této agregaci hlenová vrstva může být považována za systém mikrofází, tedy oddělených domén bohatých na vodu a domén bohatých na agregovaný mucin.⁵⁸ Bylo sice navrženo, že muciny mohou ve fyziologických koncentracích tvořit kapalnou krystalickou fázi, ale spontánní asociace v důsledku hydrofobních nebo oligosacharidových nebo jiných interakcí ve zředěných roztocích mucinů nebyla potvrzena.

Dále se ukázalo, že ani koncentrované roztoky čištěného MUC5B nenapodobují zcela dobře vlastnosti slin. Zato byl demonstrován výrazný účinek vápníku na tvorbu gelu ze slinných mucinů. Účinky vápníku byly aplikací EDTA eliminovány a tato reverzibilita byla specifická pouze pro vápník, žádné podobné účinky EDTA nebyly pozorovány vůči NaCl, MgCl₂, MnCl₂ ani ZnCl₂. Takové výsledky naznačují, že intermolekulární příčné vazby mezi muciny MUC5B jsou zprostředkovány vápenatými ionty, což je v souladu s poklesem viskozity po přidavku EDTA k tzv. stimulované slině.⁵⁹ Ukazuje se, že interakce, ke kterým ve slinách dochází, nejsou dosud plně vysvětleny.

Kromě MUC5B byly v gelové matrix slin nalezeny také četné další proteiny, jako glykoprotein MUC7, imunogenní IgA (inhibuje bioadhezi), IgM a IgG (zvyšují fagocytózu),

laktoferin (působí proti G^+ i G^- bakteriím), lysozym s nízkou molekulovou hmotností (působí proti G^- bakteriím), histatiny (působí antibakteriálně a antifungálně), cystatiny (mají antivirotické působení), ve slinách z příušní žlázy také aglutinin (agregace různých mikroorganismů).^{60,61} Enzym α -amyláza a cystatiny nebyly v gelové matrix identifikovány, ale bylo zjištěno, že se nacházejí ve vrstvičce slin těsně adherující k epitelialním buňkám sliznice.

Všechny uvedené proteiny tvoří homotypické komplexy (mezi podobnými molekulami) nebo heterotypické komplexy (z odlišných molekul). Studium role amylázy, mucinu, IgA a albuminu na pufrovací kapacitu slin ukázala, že tato pufrací kapacita velmi pozitivně koreluje s koncentrací celkového proteinu, amylázy a IgA. Slabá korelace byla pozorována pro albumin a mucin jednotlivě, amyláza přispěla k pufrací kapacitě proteinů v rozmezí pH 4 až 5 asi 35 procenty.⁶²

Zmíněný MUC5B má vazebná místa pro histatin, statherin a hydrofobní ligandy.^{63,64} Statherin, secernovaný příušní a podjazykovou žlázou (protein kódovaný genem STATH) zabraňuje srážení fosforečnanu vápenatého ve slinách a udržuje tak vysoký obsah vápenatých iontů ve slinách.

Je zřejmé, že nejdůležitější organickou součástí hleny jsou glykoproteiny, které jsou zodpovědné za jeho gelovou strukturu, soudržnost a antiadhezivní vlastnosti.^{65, 66} Přes odlišnost mukusu z různých tělesných lokalit mají glykoproteiny obvykle dost podobnou strukturu. Jedná se o vysoce glykosylované proteinové molekuly s molekulovou hmotností 5 000 až 105 000.⁶⁷ Glykoproteiny tvoří rozvětvenou trojrozměrnou síť s velkým počtem smyček.⁶⁸ Jejich polypeptidický řetězec se skládá z 800 až 4500 aminokyselinových zbytků a je charakterizován dvěma typy oblastí: silně glykosylované a naopak prakticky neglykosylované oblasti téměř postrádající sacharidové postranní řetězce. Terminální domény glykoproteinu ($-C$ a $-N$) jsou oblastmi zodpovědnými za tvorbu velkých mucinů a oligomerů v důsledku tvorby disulfidových vazeb.⁶⁹

Z hlediska sublingvální aplikace léčiv je významné to, že glykoproteiny hleny mohou tvořit fyzikální a fyzikálně chemické komplexy s funkčními skupinami dalších polymerů nebo nízkomolekulárních léčiv. Tím se může vytvořit komplex, který podporuje jejich absorpci zvýšením retenční doby v místě kontaktu se sliznicí.⁷⁰

Další podrobný popis slinných proteinů a jejich komplexů přesahuje rámec tohoto přehledu. Výše uvedené informace by ale měly být brány v potaz při podrobnějších studiích sublingválně podávaných účinných látek.

3.4 Bioadheze

Termín bioadheze je společným označením pro jakýkoliv druh adheze, při kterém jedna nebo více ze zúčastněných fází jsou součástí živého organismu. Takto pojatá definice se liší od technického vymezení adheze vhodného pro průmyslové obory. Z praktického hlediska je při bioadhezi vždy podstatná přítomnost vody, která je naopak pro řadu většinu technických adheziv problémem buď při vytváření samotného spojení nebo z hlediska jeho trvanlivosti.⁷¹

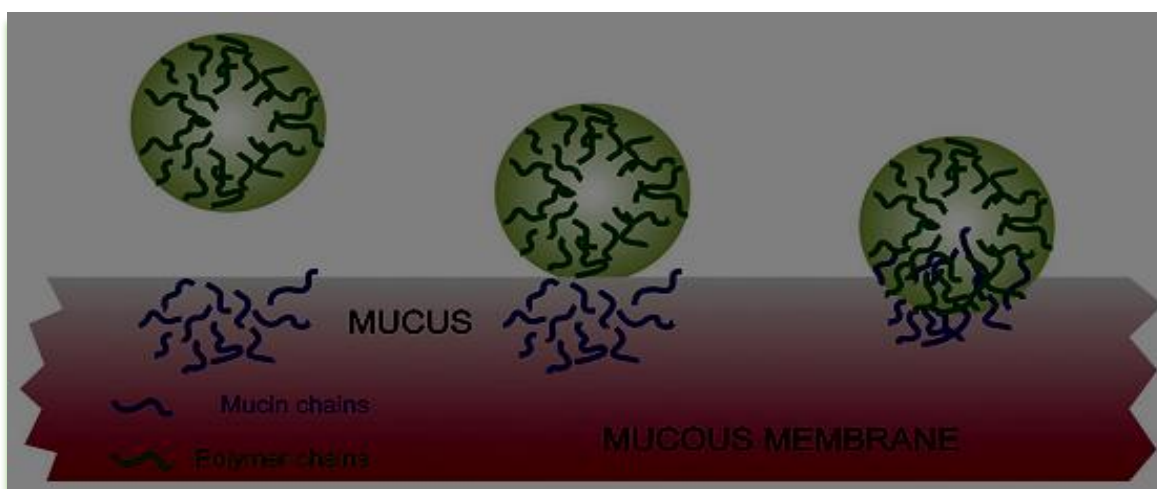
Adheze ke sliznici, tedy bioadheze nemá být zaměňována s mukoadhezí, která je pouze jejím speciálním případem. Při bioadhezi není skutečným substrátem vrstva hlenu, ale zevní povrch epiteliálních buněk. Bioadheze mikroorganismů schopných přichytit se na téměř jakýkoli vlhký povrch je jedním z předpokladů patogenity bakterií. V oblasti intraorálních mikroorganismů je významná jejich adheze na zuby nebo zubní implantáty.^{72,73}

Myšlenka využití bioadheze pro farmaceutické účely se objevila již kolem roku 1980.⁷⁴ Záměrem byla především fixace léčivého přípravku na požadovaném místě pomocí různých mukoadhezivních polymerů. Jednalo se o přípravky schopné fixace na slizničním epitelu oka,⁷⁵ nosu,⁷⁶ vaginy,⁷⁷ nebo GIT, včetně sliznice ústní.

Tento druh bioadheze je nověji již nahrazován významově užším pojmem mukoadheze, který znamená "adhezi sliznice s mukusem",⁷⁸ neboť všechny zmíněné tělní epitely jsou pokryty více či méně vyvinutou vrstvou slizu či hlenu.⁷⁹

Důvody k využití mukoadheze jsou v zásadě dva. První z nich spočívá v tom, že adheze léčivého přípravku umožňuje prodlouženou dobu kontaktu účinné látky s povrchem v tzv. absorpčním okně. Ve výsledku tak umožňuje prodloužit interval mezi jednotlivými aplikacemi. Druhým důvodem je to, že těsný a trvalejší kontakt léčivého přípravku s hlenem na absorpční ploše generuje strmější koncentrační gradient, čímž by se měla míra absorpce léčivé látky také zvyšovat. **(Obrázek 3.2)**. Tento přístup je považován jako celek za naději, že se jím podaří vyřešit biologickou dostupnost peptidových léčiv.^{80,81,82}

Mukoadheze přináší další možnosti řízeného uvolňování léčivých látek ve smyslu optimalizace lokálního nebo systémového účinku. Umožňuje snížit celkovou dávku podaného léčiva a tím omezit nežádoucí vedlejší účinky léčiva, zlepšit compliance pacienta a tak celkově zvýšit efektivitu léčby. Je však nutné zmínit jednu potenciální nevýhodu takto vymezené aplikace. Tato nevýhoda spočívá v tom, že vyšší koncentrace léčiva na relativně malé ploše sliznice může vést k podráždění nebo poškození sliznice, což rozsah podání léčivé látky přeci jen limituje.



Obr. 3.2 Mukoadheze (<http://www.pharmatutor.org/articles/oral-mucoadhesive-drug-delivery-systems-review>)

Využití mukoadheze rovněž otevřelo cestu nejen pro použití inhibitorů enzymů, enhancerů penetrace, reverzibilní chemické modifikace léčiv, ale také nových lékových forem, kterými jsou například mukoadhezivní tablety⁸³ nebo také nověji formulované sublingvální přípravky typu sprejů nebo medikovaných filmů.

3.4.1 Mukoadheziva

Jedná se zejména o látky polymerní povahy, které vykazují schopnost adheze ke slizničnímu povrchu a při kontaktu s vodou vytváří adhezivní hydrokoloidy, případně hydrogely. Nejčastěji používané jsou syntetické polymery, ale v mukoadhezivních léčivých přípravcích mají zastoupení i polymery přírodní a polosyntetické, u kterých se umělým zásahem do přírodních makromolekul ovlivňují nedostatečně vyjádřené vlastnosti přírodních polymerů, zejména stupeň polymerizace nebo stupeň substituce. Ve stručném výčtu k nim patří například tyto:⁸⁴

- Syntetické polymery: kyseliny akrylové, hydroxyethylmethylakrylátu, ethylenoxidu, vinylpyrrolidonu, vinylalkoholu.
- Polosyntetické polymery: deriváty celulosy, chitosanu a alginany.
- Přírodní polymery: tragant, kyselina alginová, karajový sliz, guar, xantanová guma, lektiny, škroby, želatina, pektiny, chitosan, tamarindový sliz, psyllium (ispaghula).

Polymery se využívají buď samostatně, nebo v kombinacích. Kombinace umožňují kompenzaci nevýhodných vlastností konkrétního použitého polymeru a dosažení požadovaného uvolňování účinné látky z léčivého přípravku. Při použití polymeru se bere na zřetel jeho původ, chemické složení, fyzikálně-chemické vlastnosti, biodegradabilita, chemická stabilita i jeho mechanické vlastnosti. Výběr vhodného polymeru dále do značné míry závisí na požadované rychlosti a čase uvolňování léčiva, fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva a místě aplikace.⁸⁵ Problematika mukoadhezivních polymerů byla nedávno přístupně pojednána⁸⁶ a proto jí zde nebude věnováno více pozornosti.

3.4.2 Vybrané sublingvální přípravky

Aplikace léčiv přímo z prostředí dutiny ústní je dosud relativně málo využívaným způsobem podávání léčivých látek. Na rozdíl od vysokého počtu účinných látek, které působí v dutině ústní lokálně, je počet léčiv podávaných bukální nebo sublingvální cestou do systémového oběhu poměrně malý. Podání léku ústní sliznicí je k dispozici přibližně od roku 1960. Terminologie těchto přípravků se teprve stabilizuje, používá se například označení zkratkou (OTDD z anglického oral transmucosal drug delivery). Vzhledem k výhodám uvedených přípravků ve srovnání s běžným perorálním podáváním léků to je poněkud překvapivé.⁸⁷

Příklady komerčně dostupných OTDD přípravků jsou uvedeny v tabulce z nedávno publikovaného přehledu.⁸⁸ V **tabulce 3.1** je uvedena konkrétní účinná látka, její výrobce spolu s komerčním názvem a léková forma, ve které je přípravek dostupný. Pod **tabulkou 3.1** je připojen komentář převzatý z citovaného přehledu.

Bukální a sublingvální tablety jsou formovány za použití obvyklých tabletovacích pomocných látek plniv, pufrovacích činidel, dezintegračních látek, sladidel). Provedení těchto přípravků je velice různorodé.

Tabulka 3.1: Vybrané v praxi používané sublingvální přípravky

Léčiva	Značka a výrobce	Léková forma
Asenapin maleát	Sycrest (Lundbeck)	Sublingvální tablety
Buprenorfin HCl	Subutex (Reckitt Benckiser)	Sublingvální tablety
Buprenorfin HCl	Suboxone (Reckitt Benckiser)	Sublingvální tablety
Naloxon HCl dihydrát	Suboxone (Reckitt Benckiser)	Sublingvální film
Delta-9-THC	Sativex (GW Pharma)	Oramukózní sprej
Fentanyl citrát	Abstral (ProStrakan)	Sublingvální tablety
	Actiq (Cephalon)	Pastilky
	Effentora (Cephalon)	Tablety
	Onsolis	Rozpustný film
Glycerol trinitrát	Glytrin I (Sanofi)	Aerosol sprej
	Nitrolingual (Merck Serono)	Aerosol sprej
Midazolam HCl	Buccolam (ViroPharma)	Oromukózní roztok
Nicotine	Nicorette	Žvýkačky, pastilky, sprej
Prochlorperazin maleát	Buccastem M (Alliance Pharma)	Tablety
Testosteron	Striant (Columbia Laboratories)	Tablety

Effentora je rozpustná tableta s fentanylním citrátem jako účinnou látkou. *Striant* a některé další přípravky obsahují mukoadhezivní polymery, jako hypromelosa a polykarbofil. Rychlá dezintegrační činidla, jako jsou sodná sůl kroskarmelosy a sodné soli glykolátu škrobu, jsou použity v *Abstralu* a *Effentore*. *Buccolam* je jednoduchý pufrovaný vodný roztok midazolamu hydrochloridu. Sprejové formy, jako *Nitrolingual* obsahují ethanol, propylenglykol, pufrovací přísady, korigencia chuti. Nikotinové žvýkačky *Nicorette* jsou k dispozici již mnoho let. *Onsolis*, dostupný jako v Evropě jako *Breakyl*, má podobu rozpustné dvojvrstvy s vrstvičkou adheziva obsahujícího fentanylní citrát, aplikuje se na bukalní sliznici. Polymery použitými pro přípravu aktivní adhezivní vrstvy jsou sodná sůl karmelosy,

hydroxyethylcelulosa, hydroxypropylcelulosa a polykarbofil. Podkladová vrstva omezuje eluci účinné látky do slin. *Suboxone* obsahuje buprenorfin a naloxon hydrochlorid v podobě tenkého filmu.

3.5 Současný stav a další vývoj

Výše uvedené příklady ukazují odlišnou složitost a variabilitu možných provedení ODDT. K nejnovějším patří léková forma v podobě tenkého filmu označované zkratkou TFT podle termínu technologie tenkého filmu (thin film technology).⁸⁷

Oromukosální TFT přípravky se dnes nejčastěji vyrábějí litím nebo extruzí za tepla. Polymery použité pro vytvoření filmů jsou vybírány v závislosti na požadované tloušťce vrstvy a kompatibility s léčivem.⁸⁹

TFT přípravky by teoreticky mohly být ideální kontaktní platformou pro bukální nebo sublingvální podání léčiv. Přesto je v současnosti takto v podobě OTDD k dispozici pouze omezené množství účinných látek. Nanočástice insulínu byly zpracovány do TFT jako přípravek MidaForm™-Insulin-PharmFilm®. Z pozitivních výsledků fáze I klinického hodnocení vyplynulo, že transbukální přenos insulínu u zdravých dobrovolníků je možný, bezpečný nevyvolává žádné nežádoucí účinky nebo další problémy. Insulin byl absorbován rychleji než po subkutánní injekci. Fáze II a klinické studie byla zahájena v červnu 2015 a data jsou očekávána ve druhém kvartálu roku 2016. Firma deklaruje rozšíření TFT pro další účinné látky.⁹⁰

Společnost zabývající se problematikou transbukálních přípravků je také Generex, která oznámila dokončení fáze III klinické studie se sprejovou formou rekombinantního lidského insulínu (*Oral-Lyn*) pro bukální aplikaci v roce 2013. Dávkovací sprej se používá k odměření dávky a umožňuje podat potřebné množství inzulínu do ústní dutiny. Vlastní aplikovaná soustava je založena na patentované technologii (RapidMist), kdy je účinná látka v roztoku v kombinaci s prostředky podporujícími absorpci a dalšími pomocnými GRAS látkami. *Oral-Lyn* významně snížil hladiny HbA1c za 6 týdnů a po 12 týdnech ve srovnání s výchozími hodnotami ($p < 0,05$), zatímco injekční lidský inzulín nijak výrazně nesnížil hodnoty HbA1c ani po 12 týdnech. Hodnoty hemoglobinu A1C (glykosylovaný hemoglobin) odpovídají počtu molekul glukosy, který červené krvinky v krevním řečišti přepravují. Tento parametr je možné ze vzorků krve analyzovat a vypočítávat průměrné hodnoty. Po 6 týdnech podávání vytváří transbukální forma výrazně nižší hodnoty HbA1c než injekčně podávaný

inzulin ($p < 0,05$). Po 12 týdnech HbA1c byly u obou skupin nalezeny statisticky srovnatelné. V současnosti je přípravek Generex Oral-lyn™ prvním neinjekčním bukálním insulinem schváleným pro použití v Indii pro oba typy diabetes a ve fázi III klinických studií po celém světě.^{91,92}

3.5.1 Studie u člověka a lidské modely tkání

Test orální absorpce, známý také jako "swirl and spit" test, byl vyvinut Beckettem a Triggsem v roce 1967.⁹² Provádí se promícháváním známého objemu léčiva známé konkrétní koncentrace po určitou dobu v uzavřených ústech bez polykání. Testovací osoby (dobrovolníci) poté vyplivnou roztok léčiva a vypláchnou si ústa známým objemem pufru. Předpokládá se, že množství účinné látky absorbované ústní sliznicí je rozdílem mezi počátečním a konečným množstvím léčiva v roztoku. V letech 1960 až 1970 vznikla za použití této metody řada prací zaměřených na prokázání bukální absorpce a vlivu pH na absorpci řady léčiv.⁹³

Omezením této metody je možné ředění roztoku léčiva slinami, jejichž tvorby může být při pokusu stimulována, a neúmyslným ztrátám v důsledku polykání. Dalším problémem metody je, že absorpce probíhá ve všech oblastech dutiny ústní. Úbytek látky v ústní dutině nemusí být nutně výsledkem jejího úplného převedení do systémového oběhu.

Některá omezení původní orální absorpční metody byla překonána pomocí perfúze buněk bukálních tkání. Průnik látek tak probíhá přes izolované oblasti, při známém konstantním objemu, pH a teplotě perfuzantu.⁹⁴ Tento model byl použit pro studium lidské bukální absorpce nikotinu.⁹⁵

V posledních letech bylo zavedeno použití Ramanovy sondy, která umožňuje hloubkové profilování bukálního epitelu. Tato sonda je in vivo připojena na Ramanův spektrometr se třemi výstupními otvory, z nichž jeden směřuje laserový paprsek do sondy. Jedná se o metodu vhodnou pro identifikaci látek, při určování jejich složení a struktury. Používá se při analýze pevných látek, kapalin, plynů, dále též při analýze povrchů (např. sorbenty, elektrody, senzory) či při analýze biologických systémů (od biomolekul až po organismy). Své uplatnění nachází Ramanova spektroskopie od mineralogie a geochemie přes chemický a farmaceutický průmysl až po biologii a lékařství.⁹⁶ Umožňuje také provádět detailní analýzy průchodu léčiva přes bukální sliznici.

V předkládané rigorózní práci byl proveden pokus s permeací albuminu jako vysokomolekulární látky přes sublingvální sliznici jazyka prasete. Proto jsou dále citovány výsledky práce, která se podobnou problematikou nedávno podrobně zabývala. V práci byly zmiňovány pokusy na celé řadě modelů. Pro naši práci jsou důležité výsledky dosažené na vzorcích prasečích membrán.

3.5.2 Modely se sliznicí prasete

Prasečí bukální sliznice má podobný histologický charakter jako lidská. Uvádí se, že propustnost vody prasečí bukální sliznicí není významně odlišná od lidské bukální sliznice, jen sliznice patro v ústech je u lidí propustnější.

Srovnání čerstvých prasečích tkáňových vzorků se vzorky uloženými při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ neodhalilo žádný významný vliv na permeabilitu. Absorpce prasečí bukální sliznicí je pro širokou škálu molekul léčiv srovnatelná s lidskou jak *in vitro*, tak *in vivo*. *In vivo* studie popsané v literatuře zahrnují aplikaci účinných látek ve formě roztoku, gelu nebo komplexů na bukální sliznici prasat s následnými odběry vzorků plasmy.⁹⁷

Byly zkoumány účinky různých *in vitro* podmínek na permeaci kofeinu a estradiolu jako modelových látek s hydrofilní a lipofilní molekulou. Prostupnost účinné látky přes bukální sliznici byla studována pomocí modifikované komůrky dle Ussinga nebo Franze. Srovnávací permeační studie byly prováděny na epitelálních tkáních z čerstvé a zmrazené tkáně. Propustnost přes bukální epitel byla 1,8-krát vyšší pro kofein a 16,7-krát vyšší u estradiolu. Flux hodnoty pro obě sloučeniny byl srovnatelný pro čerstvé a zmrazené ústní epitely.⁹⁶

Dále byly prověřovány vlastnosti epitelu a pojivové tkáně vzhledem k bariérovým vlastnostem prasečí bukální tkáně. *In vitro* byly provedeny studie propustnosti u fenazonu, bupivakainu, kofeinu.⁹⁸

Rovněž byl zkoumán vliv řady biologických a experimentálních proměnných na propustnostní parametry skupiny modelových permeantů přes bukální sliznici prasat. Je příznačné, že u tenčích oblastí (170 μm až 220 μm) byla pozorována vyšší propustnost ve srovnání s oblastí tlustší (250 μm až 280 μm). Prasečí bukální sliznice udržela integritu v prostředí hydrogenuhličitanu sodného při 4°C po dobu 24 hodin. Tepelné oddělení epitelu od základní pojivové tkáně nemělo nepříznivý vliv na jeho prostupnost a integritu ve srovnání s chirurgickým oddělením. Absorpce prasečí bukální sliznice byla studována pro širokou škálu molekul jak *in vitro*, tak *in vivo*.⁹⁹

Oromukosální aplikace nadále přitahuje odbornou pozornost. Jedním z problémů se zdá být omezená možnost charakterizace permeability jednotlivých oblastí v ústní dutině, například ve srovnání s kůží nebo sliznicemi nosních cest. Využití ústní dutiny je limitováno omezeně dostupnou plochou v této oblasti a také produkcí a obsahem slin. Počet látek zkoumaných pro dodání touto aplikační cestou v modelech in vitro je sice značný, ale výsledky některých studií ukazují, že v řadě případů prakticky nelze dosáhnout dostatečně vysokých, klinicky účinných dávek. Integrita tkáně v modelech in vitro je časově omezená a dosud nebyla ani detailněji prozkoumána metabolizace léčiv ve sliznici.¹⁰⁰

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité látky

<i>Použité látky</i>	<i>Výrobce</i>
4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1 ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma Aldrich, Praha
Albumin hovězí, lyofilizovaný (No. A 9647); BSA	Sigma Aldrich, Praha
Albumin, FITC, hovězí (No. A 9771); FICT-BSA	Sigma Aldrich, Praha
Dihydrogen fosforečnan sodný (ČL 2009)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydroxid sodný (ČL 2009)	Penta, Praha
Voda čištěná (ČL 2009)	FaF UK, Hradec Králové
Voda pro HPLC ultračistá	FaF UK, Hradec Králové

Všechny suroviny byly podle deklarácí výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravný na FaF UK a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

Testované nanovlákněné membrány byly získány od firmy Elmarco s.r.o., se sídlem v Liberci, s touto charakterizací: HPMC/PVA/PEO/NaCl/albumin 30%, 2,2842 g albuminu v 50g roztoku (sušina 5,2 g), 14 g/m².

4.2 Přístroje

<i>Přístroj</i>	<i>Výrobce</i>
Analytické váhy Kern 440-45N	Kern Sohn, Německo
Digitální pH metr Gryf 209 L	Gryf HB s.r.o., Česká Republika
Elektronická míchačka Variomag	Labortechnik, Německo
HPLC sestava HP 1200 series	Agilent Technologies, USA
Magnetické míchadlo, Telesystem	Labortechnik, Německo
Ultrazvuková lázeň VČ 300259	Tesla, Vráble
Vodní lázeň, Grant JB5	Grant Instruments, Velká Británie
Termostat BT50	Laboratorní přístroje, Česká Republika
Sestava HPLC Agilent Technologies1200	Agilent Technologies, USA

Sestava HPLC Agilent Technologies1200 se skládala z isokratického čerpadla Iso Pump G1310A, fluorescenční detektor Agilent, předkolona Agilent Bio SEC-3 150 A, 3 µm, 4.6 x 50 mm, kolona Agilent Bio SEC-3 150 A, 3 µm, 4.6 x 150 mm software: ChemStation 1.22.

Další pomůcky:

Permeační komůrky, standardní skleněné vialky o objemu 1,5 až 2,0 ml, vialky objemu 5 ml a 10 ml a další běžné laboratorní sklo, teploměry, mikropipety, injekční stříkačky, hliníková folie (pro zamezení vniknutí světla), permeační komůrky, výsečník, nůžky, skalpely, exsikátor.

4.3 Postupy a metody

4.3.1 Příprava mobilní fáze pro HPLC (HEPES pufr dle ¹⁰¹www.enco.co.il/protocol)

Složení:

Hydroxid sodný 1M	0,02 l
HEPES	11,90 g
Dihydrogenfosforečnan sodný R	4,80 g
Voda pro HPLC	1,00 l

Postup:

Připravíme 4,845 g fosforečnanu ve 100 ml vody. Vezmeme 500 ml vody, přidáme 11,9 g HEPES a za stálého míchání postupně přiléváme roztok hydroxidu sodného. Po dosažení pH 7,4 pod pH-metrickou kontrolou roztok doplníme vodou do 1000 ml.

4.3.2 Chromatografické podmínky

Nástřík vzorku byl na autoinjektoru nastaven na 20 μ l, průtok mobilní fáze činil 0,8 ml/min, teplota kolony byla nastavena na 30°C, doba separace byla omezena na 7,5 min, vlnové délky Ex = 495nm, Em = 203 nm.

4.3.3 Příprava akceptorové fáze

HEPES pufr izotonizovaný dle www.enco.co.il/protocol¹⁰¹

Složení:

Chlorid sodný	16,40 g
Hydroxid sodný 1M	0,02 l
HEPES	11,90 g
Dihydrogenfosforečnan sodný R	4,80 g
Voda pro HPLC	1,00 l

Postup:

Připravíme koncentrovaný roztok 4,845 g dihydrogenfosforečnanu rozpustíme ve 100ml vody. Vezmeme 0,5 l vody, přidáme 11,9 g HEPES, 16,4 g chloridu sodného a postupně přiléváme roztok dihydrogenfosforečnanu sodného. Pro dosažení pH 7,4 použijeme 20 ml 1M roztok hydroxidu sodného. Doplníme vodou do 1,0 l.

4.3.4 Příprava donorových kapalin

Citrát-fosfátový pufr o pH 6,8 (Pharmaceutical Handbook str. 240)¹⁰²

Složení:

Dihydrogenfosforečnan sodný R	55,30 g
Kyselina citronová	4,80 g
Voda pro HPLC	add 1,00 l

Postup:

Kyselinu citronovou 5,53 g rozpustíme v 50 ml čištěné vody, pomocí roztoku 0,48 g dihydrogenfosforečnanu sodného upravíme pH na 6,8 a dolijeme vodou na 100 ml.

Slinná kapalina: Do kalibrované zkumavky odebereme 1 ml sliny (vlastní) a naředíme ji stejným objemem fosfátového pufru pH 6,8

4.3.5 Příprava kalibrační roztoků pro stanovení FITC-BSA

Pro sestavení koncentrační řady FITC-BSA v prostředí o pH 7,4 jsme použili práškový lyofilizovaný FITC-BSA.

Roztok: 5 mg albuminu v 50 ml HEPES	(10 mg%)
Roztok: 10ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(2mg/%)
Roztok: 5ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(1mg/%)
Roztok: 2,5ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(0,5mg/%)
Roztok: 0,5ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(0,1mg/%)
Roztok: 0,25ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(0,05mg/%)
Roztok: 0,1ml 10mg/% albuminu do 50 ml HEPES	(0,02mg/%)

4.3.6 Úprava nanovláknenných membrán

K dispozici jsou nanovláknenné membrány o koncentraci albuminu 30%. Membrány byly nastříhány na čtverečky o velikosti 5 x 5 cm a pro sjednocení obsahu vlhkosti na noc umístěny do exikátoru nad silikagel. Z přířezů byly vytvořeny 16-ti a 32-ti vrstvé nosiče.

4.3.7 Příprava 16-ti a 32-ti vrstevých nosičů

Čtverce o rozměru 5 x 5 cm překládáme vždy na polovinu, až do vzniku požadovaného počtu vrstev:

U 16-ti vrstev podle schématu č. 1 jsme provedli celkem čtyři přeložení (překlady):

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16

U 32-ti vrstev podle schématu č. 2 jsme provedli celkem pět přeložení (překladů):

1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32

Po složení membrán na malé čtverce o potřebném počtu vrstev jsme vyrazily kruhové terčíky pomocí kruhového výsečnicku. Vzniknou kruhové mnohvrstevné terčíky nanovláknenného nosiče, které drží pohromadě. Poté se na analytických vahách zaznamenají přesné navážky jednotlivých terčků.

V následujících **tabulkách** jsou uvedeny přesné navážky použitých nanovláknenných membrán.

Tabulka 4.1 Navážky nanovláknenných terčků pro první permeační pokus

HPMC/PVA/PEO/ NaCl/albumin 30%	
n1/32 = 0,038 g	n1/16 = 0,020 g
n2/32 = 0,034 g	n2/16 = 0,020 g
n3/32 = 0,036 g	n3/16 = 0,020 g
n4/32 = 0,038 g	n4/16 = 0,017 g

Tabulka 4.2 Navážky nanovláknenných terčků pro druhý permeační pokus

HPMC/PVA/PEO/ NaCl/albumin 30%
n1/32 = 0,039 g
n2/32 = 0,035g
n3/32 = 0,036g
n4 = prášek

4.3.8. Příprava permeačních komůrek

Pro sledování permeace účinné látky se sestaví permeační komůrky s vloženou sublingvální membránou. Konkrétně byl použit preparát membrány z jazyka prasete domácího, který byl po zpracování (7. 2. 2013) zmrazen v nádobě s tekutým dusíkem a poté uložen do mrazáku (při teplotě – 18 až – 20°C. Po rozmražení byl zvlhčen HEPES pufrem a z něj pečlivě vybrány vhodné části s minimem svaloviny a připraveny díly o velikosti 1,5 x 2,0 cm.

Komůrky se po sestavení umístí do lázně vytemperované na 37 °C, jejich spodní část se bočním trubičkovým raménkem naplní HEPES pufrem pH 7,4 (simulace krevního oběhu). Přímo na membránu z jazyka prasete domácího se vloží terčík vytvořený z nanovlákněné membrány a poté zakápně citrátovým-fosforečnanovým pufrem (CFP 6,8) nebo jeho směsí se slinou (6,8/slina). V této chvíli začíná eluce léčiva a odpočítává se čas. Podle časového rozpisu se odebírají 0,6 ml vzorků ze spodní (akceptorové) části permeační sestavy.

Odebrané vzorky byly vždy přeneseny do předem označených chromatografických vialek a dále podrobeny stanovení FITC-BSA který prošel sublingvální membránou.

Veškerou analytickou část za použití HPLC (Agilent Technologies 1200), zpracování chromatografických záznamů v příslušném přístrojovém software a export dat pro následné zpracování permeačních výsledků realizoval Mgr. Pavel Berka (FaF UK v Hradci Králové, katedra farmaceutické technologie).

5. DOKUMENTACE

Údaje získané z permeačních pokusů byly zpracovány formalizovaným postupem standardně používaným v příslušné laboratoři na katedře farmaceutické technologie UK FaF v Hradci Králové.

Stručně vyjádřeno, byly sestaveny časové průběhy koncentrace analytu v jednotlivých buňkách (permeačních průběhů) pro příslušné donorové vzorky nanovlákných membrán a roztoků s FICT-BSA.

Jednalo se konkrétně o závislost permeovaného BSA-FITC v akceptorové fázi na čase. Tyto závislosti byly vyjádřeny graficky.

Ze sestavené závislosti bylo možno odečíst přímkovou část průběhu permeace FITC-BSA a vypočítat směrnici tohoto úseku. Tím byly zároveň vyčísleny hodnoty fluxů J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] FICT-BSA, případně hodnoty J jako příslušných průměrných hodnot.

Vzhledem k tomu, že součástí zkoumaných nanovlákných membrán byla směs FICT-BSA a nezačteného BSA, byla ve výsledném grafu a konečném hodnocení považována za hlavní parametr dvojnásobná hodnota, tedy flux J celkového albuminu.

Protokol	1								
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	
$Q_t ALB$	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	

$V_o = 16,6$

Membr.: SL N2LED

Donor: nano32H

CFP 6.8

Měření: FITC BSA

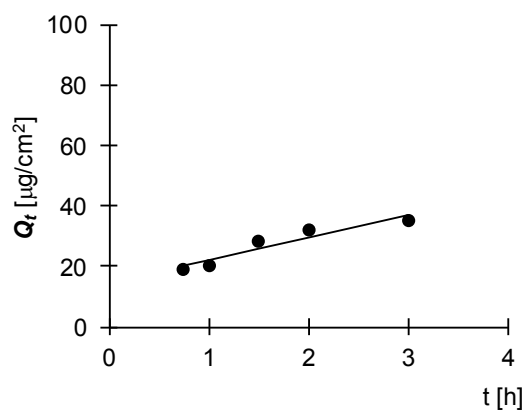
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	$Q_t BSA$
0,75	0,057	0,6	0,057	9,5	38,1
1	0,059	0,6	0,062	10,2	40,9
1,5	0,082	0,6	0,086	14,3	57,1
2	0,089	0,6	0,096	15,9	63,5
3	0,096	0,6	0,106	17,6	70,6
24	0,375	0,6	0,389	64,6	258,2

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,75	19,1	20,3
1	20,4	22,1
1,5	28,5	25,9
2	31,8	29,6
3	35,3	37,2

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 7,5$
Abs. člen	$q = 14,6$
Korelační koef.	$r = 0,950$



Protokol	2						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	
$Q_{t\ ALB}$	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	

$V_o = 19$

Membr.: SL N2LED

Donor: nano32H
CFP 6.8

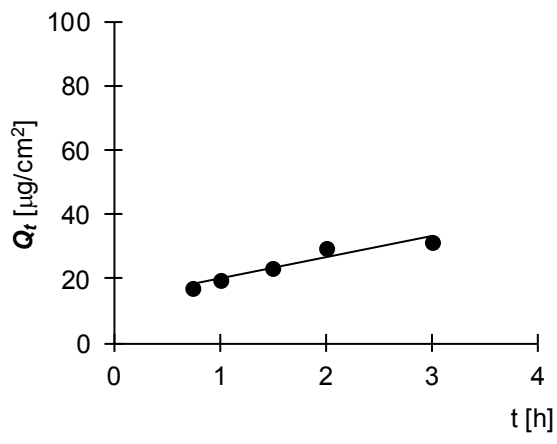
Měření: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	$Q_{t\ BSA}$
0.75	0.044	0.6	0.044	8.4	33.7
1	0.049	0.6	0.051	9.6	38.6
1.5	0.059	0.6	0.062	11.8	47.1
2	0.073	0.6	0.078	14.8	59.1
3	0.075	0.6	0.082	15.7	62.6
24	0.111	0.6	0.120	22.8	91.3

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.75	16.9	16.9
1	19.3	19.3
1.5	23.6	23.6
2	29.5	29.5
3	31.3	31.3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 6.7
Abs. člen	q = 13.1
Korelační koef.	r = 0.952



Protokol	3						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		$V_o = 19$
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		Membr.: SL N2LED
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		Donor: nano32H
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	CFP 6.8
$Q_t ALB$	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	Měření: FITC BSA

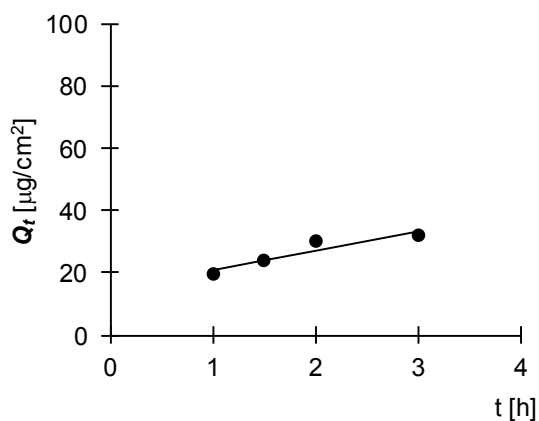
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	$Q_t BSA$
0,75	0,084	0,6	0,084	16,0	32,0
1	0,049	0,6	0,052	9,9	39,5
1,5	0,059	0,6	0,063	12,0	48,1
2	0,073	0,6	0,079	15,0	60,0
3	0,075	0,6	0,084	15,9	63,6
24	0,111	0,6	0,121	23,1	92,3

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	19,8	21,1
1,5	24,0	24,1
2	30,0	27,2
3	31,8	33,2

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 6,0$
Abs. člen	$q = 15,1$
Korelační koef.	$r = 0,932$



Protokol	4						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	
Q_t_{ALB}	[μ g] ve $V_o/1cm^2$	albumin celkem	

$V_o = 19$

Membr.: SL N2LED

Donor: nano32H
CFP 6.8

Měření: FITC BSA

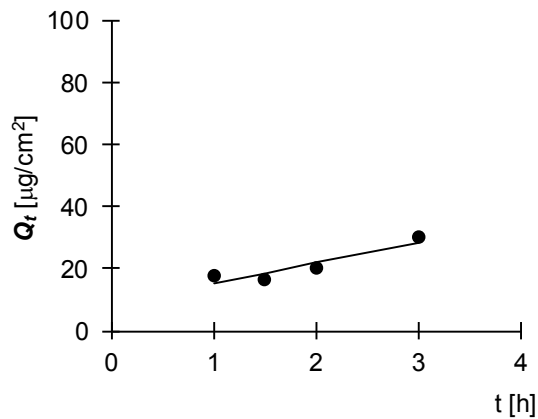
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t_{BSA}
0,75	0,049	0,6	0,049	9,3	37,3
1	0,045	0,6	0,047	8,8	35,4
1,5	0,040	0,6	0,043	8,1	32,4
2	0,050	0,6	0,054	10,2	41,0
3	0,073	0,6	0,078	14,9	59,7
24	0,118	0,6	0,126	24,0	95,8

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	17,7	15,2
1,5	16,2	18,6
2	20,5	21,9
3	29,8	28,5

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 6,7$
Abs. člen	$q = 8,6$
Korelační koef.	$r = 0,930$



Protokol	5						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	
Q_t_{ALB}	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	

$V_o = 16,8$

Membr.: SL N2LED

Donor: nano16H

CFP 6.8

Měření: FITC BSA

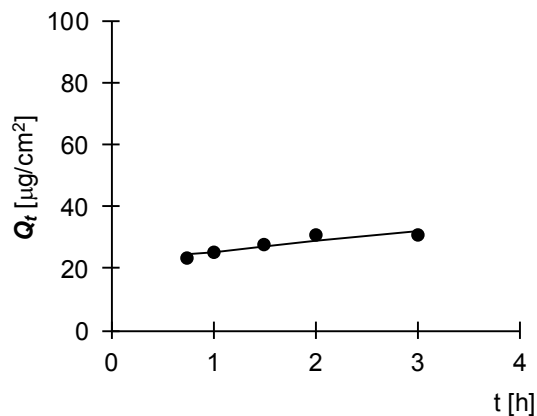
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t_{BSA}
0,75	0,070	0,6	0,070	11,7	47,0
1	0,072	0,6	0,074	12,5	50,1
1,5	0,077	0,6	0,082	13,7	55,0
2	0,084	0,6	0,092	15,5	61,8
3	0,082	0,6	0,092	15,5	62,0
24	0,135	0,6	0,148	24,9	99,7
7					
8					
9					

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,75	23,5	24,4
1	25,0	25,3
1,5	27,5	27,1
2	30,9	28,8
3	31,0	32,3

Parametry regrese

Počet bodů $n = 5$
 Flux $J = 3,5$
 Abs. člen $q = 21,8$
 Korelační koef. $r = 0,919$



Protokol	6						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	
Q_t ALB	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	

$V_o = 19$

Membr.: SL N2LED

Donor: nano16H

CFP 6.8

Měření: FITC BSA

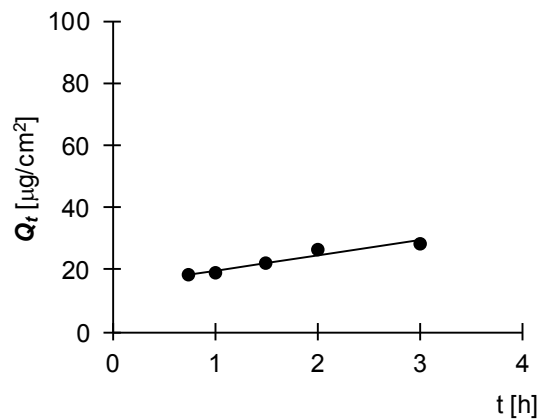
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t BSA
0,75	0,048	0,6	0,048	9,0	36,2
1	0,048	0,6	0,050	9,4	37,7
1,5	0,055	0,6	0,058	11,0	44,2
2	0,065	0,6	0,070	13,2	53,0
3	0,068	0,6	0,075	14,2	56,9
24	0,155	0,6	0,163	31,1	124,2

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,75	18,1	18,3
1	18,9	19,6
1,5	22,1	22,1
2	26,5	24,5
3	28,4	29,5

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 4,9$
Abs. člen	$q = 14,6$
Korelační koef.	$r = 0,967$



Protokol	7						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		$V_o = 16,8$
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		Membr.: SL N2LED
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		Donor: nano16H
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	CFP 6.8
$Q_{f\ ALB}$	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	Měření: FITC BSA

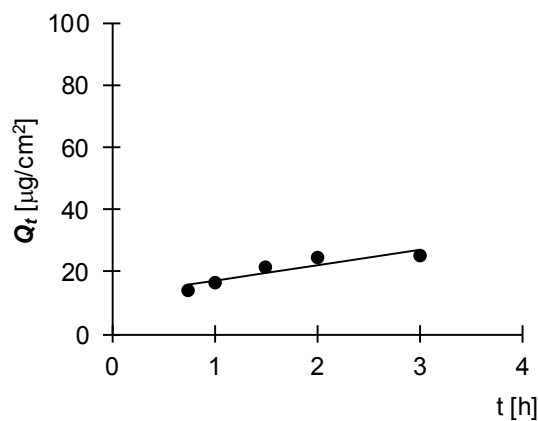
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	$Q_{f\ BSA}$
0,75	0,042	0,6	0,042	7,1	28,4
1	0,047	0,6	0,048	8,1	32,4
1,5	0,060	0,6	0,063	10,6	42,4
2	0,068	0,6	0,073	12,3	49,3
3	0,067	0,6	0,075	12,6	50,4
24	0,126	0,6	0,136	22,9	91,5

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,75	14,2	15,7
1	16,2	17,0
1,5	21,2	19,5
2	24,6	22,1
3	25,2	27,1

Parametry regrese

Počet bodů	n = 5
Flux	J = 5,1
Abs. člen	q = 12,0
Korelační koef.	r = 0,915



Protokol	8						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		$V_o = 18$
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		Membr.: SL N2LED
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		Donor: nano16H
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-BSA	CFP 6.8
$Q_t ALB$	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	albumin celkem	Měření: FITC BSA

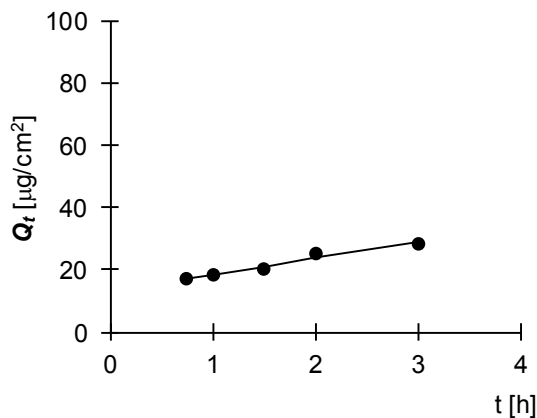
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	$Q_t BSA$
0,75	0,048	0,6	0,048	8,6	34,5
1	0,049	0,6	0,051	9,2	36,6
1,5	0,052	0,6	0,055	10,0	39,9
2	0,064	0,6	0,069	12,4	49,8
3	0,072	0,6	0,079	14,2	57,0
24	0,113	0,6	0,123	22,1	88,2

Interval regrese Q_t FITC BSA

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,75	17,2	17,1
1	18,3	18,4
1,5	19,9	21,0
2	24,9	23,6
3	28,5	28,8

Parametry regrese

Počet bodů	n = 5
Flux	J = 5,2
Abs. člen	q = 13,1
Korelační koef.	r = 0,984



Protokol	9						
-----------------	----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-ALB	
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	ALB	

$V_o = 18$

Kůže: SL N2LED

Donor: nano32H

6,8/slina

Měření: FITC ALB

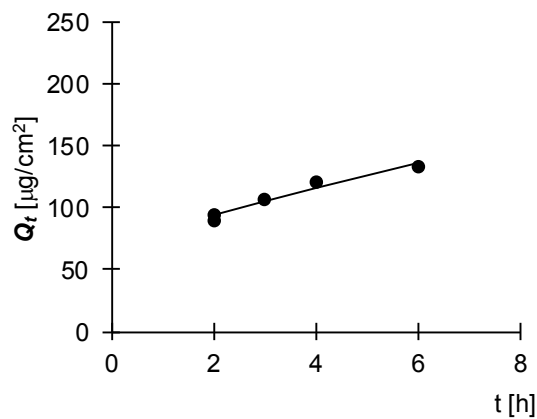
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,75	0,434	0,6	0,434	78,1	156,2
1	0,572	0,6	0,587	105,6	211,3
2	0,467	0,6	0,500	90,0	180,0
2	0,477	0,6	0,526	94,6	189,3
3	0,527	0,6	0,592	106,5	213,0
4	0,590	0,6	0,672	121,0	242,0
6	0,650	1,6	0,738	132,8	265,6
7	1,016	2,6	1,142	205,6	411,2
8	1,134	3,6	1,391	250,4	500,9

Interval regrese FITC ALB

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
2	90,0	94,4
2	94,6	94,4
3	106,5	104,8
4	121,0	115,2
6	132,8	136,1

Parametry regrese

Počet bodů n = 5
 Flux J = 10,4
 Abs. člen q = 73,5
 Korelační koef. r = 0,974



Protokol	10						
-----------------	-----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-ALB	
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	ALB	

$V_o = 18,8$

Kůže: SL N2LED

Donor: nano32H
6,8/slina

Měření: FITC ALB

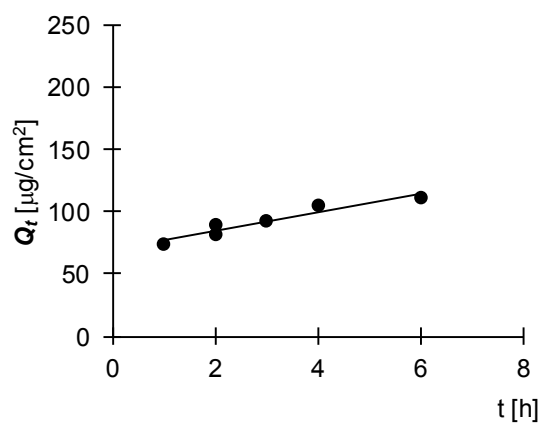
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,75	0,377	0,6	0,377	70,9	141,8
1	0,380	0,6	0,392	73,7	147,5
2	0,409	0,6	0,433	81,5	162,9
2	0,434	0,6	0,471	88,5	177,1
3	0,442	0,6	0,493	92,6	185,2
4	0,491	0,6	0,556	104,5	209,0
6	0,508	1,6	0,589	110,7	221,5
7	0,560	2,6	0,684	128,5	257,1
8	0,770	3,6	0,971	182,6	365,1

Interval regrese

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	73,7	73,7
2	81,5	81,5
2	88,5	88,5
3	92,6	92,6
4	104,5	104,5
6	110,7	110,7

Parametry regrese

Počet bodů	n = 6
Flux	J = 7,5
Abs. člen	q = 69,6
Korelační koef.	r = 0,960



Protokol	11						
-----------------	-----------	--	--	--	--	--	--

V_o	[ml]		
t	[h]		
C_{nk}	[mg/100ml]		
ΔV_{dop}	[ml]		
C_k	[mg/100ml]		
Q_t	[μ g] ve V_o	FITC-ALB	
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$	ALB	

$V_o = 17,6$

Kůže: SL N2LED

Donor: nano32H

6,8/slina

Měření: FITC ALB

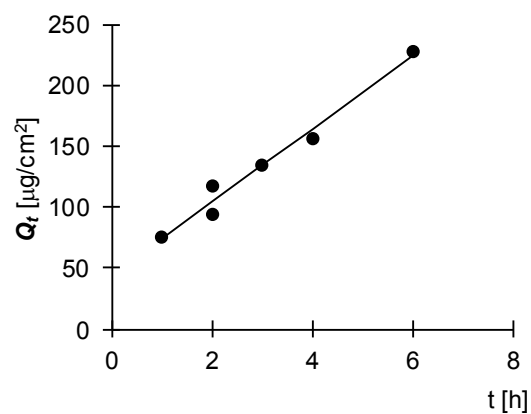
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,75	0,438	0,6	0,438	77,2	154,3
1	0,417	0,6	0,432	76,0	152,1
2	0,500	0,6	0,530	93,2	186,4
2	0,621	0,6	0,667	117,4	234,7
3	0,695	0,6	0,762	134,2	268,3
4	0,796	0,6	0,887	156,1	312,2
6	1,178	1,6	1,296	228,1	456,1
7	1,232	2,6	1,458	256,5	513,1
8	0,779	3,6	1,186	208,7	417,5

Interval regrese

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	76,0	74,5
2	93,2	104,3
2	117,4	104,3
3	134,2	134,2
4	156,1	164,0
6	228,1	223,7

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 29,9$
Abs. člen	$q = 44,6$
Korelační koef.	$r = 0,987$



Protokol 12

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 20$

Kůže: SL N2LED

Donor: R-EQ
CFP6,8/slina

Měření: FITC BSA

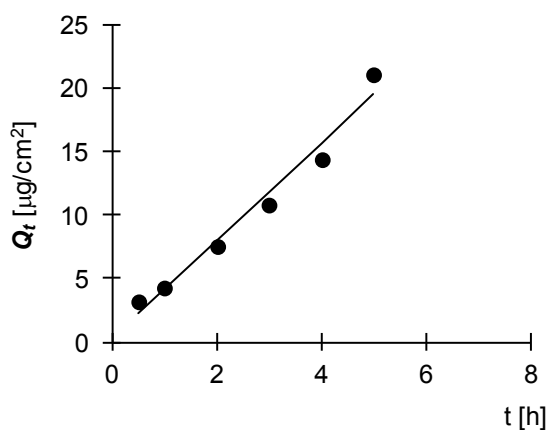
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.5	0.016	0.6	0.016	3.1	3.1
1	0.021	0.6	0.021	4.2	4.2
2	0.037	0.6	0.038	7.6	7.6
3	0.052	0.6	0.054	10.8	10.8
4	0.068	0.6	0.072	14.3	14.3
5	0.100	0.6	0.105	21.1	21.1

Interval regrese

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0.5	3.1	2.2
1	4.2	4.1
2	7.6	7.9
3	10.8	11.8
4	14.3	15.6
5	21.1	19.4

Parametry regrese

Počet bodů	n = 6
Flux	J = 3.8
Abs. člen	q = 0.3
Korelační koef.	r = 0.986



Protokol 13

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 20$

Kůže: SL N2LED

Donor: R-EQ
CFP6,8/slina

Měření: FITC BSA

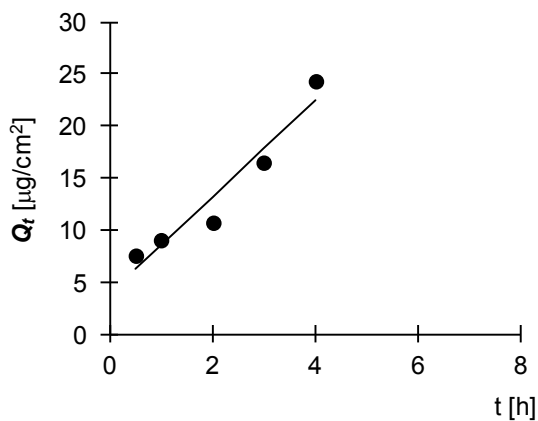
t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.5	0.038	0.6	0.038	7.5	7.5
1	0.044	0.6	0.045	9.1	9.1
2	0.051	0.6	0.054	10.7	10.7
3	0.078	0.6	0.082	16.4	16.4
4	0.115	0.6	0.121	24.3	24.3
5	1.591	0.6	1.601	320.2	320.2

Interval regrese

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.5	7.5	6.2
1	9.1	8.5
2	10.7	13.1
3	16.4	17.8
4	24.3	22.4

Parametry regrese

Počet bodů	n = 5
Flux	J = 4.6
Abs. člen	q = 3.9
Korelační koef.	r = 0.965



6. VÝSLEDKY A DISKUSE

Prvním experimentálním úkolem byla příprava vrstvených nanovláknenných nosičů pro permeační pokusy. Nanovláknenná membrána byla nejen dostatečně mechanicky pevná, ale i flexibilní, nedrobila se, vysekávání terčíkovitých nosičů nečinilo potíže. Navažování vzorků 16-vrstevných i 32-vrstevných nosičů probíhalo rovněž bez problémů, nebyly patrné známky vlivu atmosférické vlhkosti, slepování nebo měknutí terčíků.

Smáčení mnohovrstevného nanomembránového nosiče v podobě terčíku s obsahem 30 procent směsi BSA a FITC-BSA (1:1) probíhalo rychle velmi rychle. Následné rozpouštění nosiče probíhalo viditelně a značně rychle od okamžiku zakápnutí terčíku citran-fosforečnanovým pufrům pH 6,8 (CFP 6,8) v donorovém prostoru permeační komůrky. Podobně se terčíky chovaly také při zakápnutí směsí CFP 6,8 se slinou (1:1). Uvolněný FITC-BSA se prozrazoval žlutě fosforeskujícím zbarvením.

Analytická procedura stanovení FITC-BSA nebyla součástí zadání této práce.

Lze pouze konstatovat, že se na pracovišti podařilo (viz bod 4.9) adaptovat HPLC analytickou metodiku tak, že umožňovala stanovení příslušného proteinu při parametrech metodiky (především citlivost, mez detekce) požadovaných pro pilotní permeační studii.

Pro permeace dokumentované v **Protokolech 1 až 8** byla konkrétně použita kalibrační rovnice: $A = 4,3753 c + 0,6709$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,987$ (při $n = 10$).

Pro dílčí permeace zaznamenané v **Protokolech 9 až 13** byla použita jiná kalibrační rovnice: $A = 5,762 c + 0,4787$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,982$ (při $n = 8$).

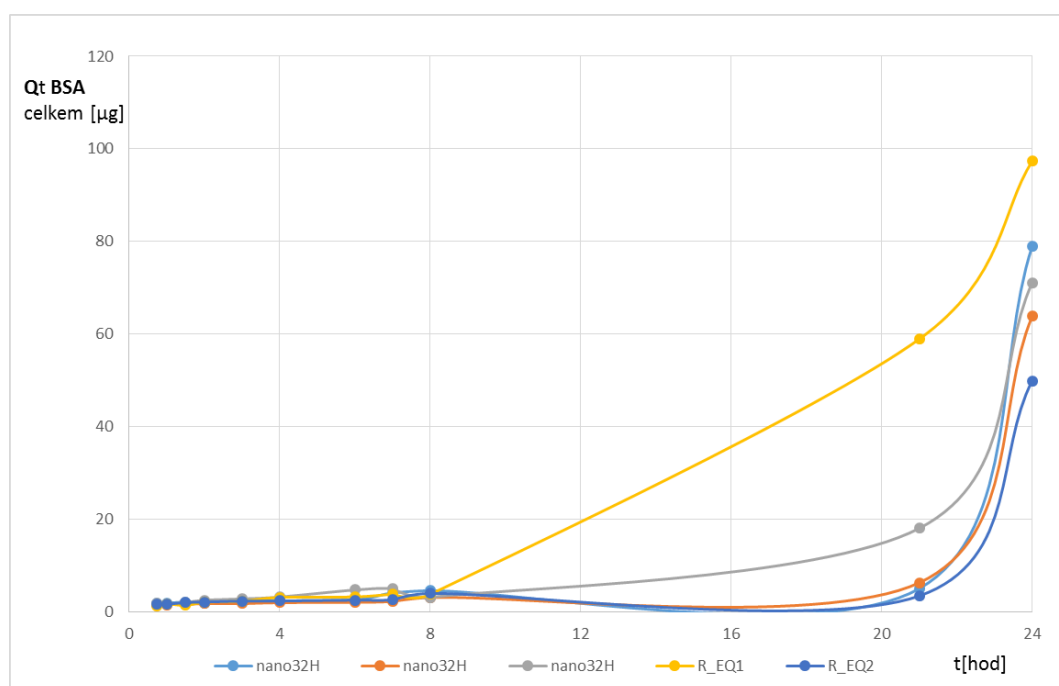
Při následujícím posuzování získaných permeačních dat se vycházelo z předpokladu, že se z nosiče rozpouštějí obě formy albuminu, tedy FITC-BSA i nezačtený BSA společně. Předpokladem rovněž bylo, že budou-li procházet sublingvální membránou, budou rovněž procházet společně.

Vzhledem k tomu, že v akceptorovém kompartmentu, tudíž v prostoru pod sublingvální membránou, byly ve všech odběrových časech naměřeny hodnoty fluorescence ve vlnových délkách odpovídajících excitační a emisní charakteristice FITC-BSA, byly tyto hodnoty považovány za průkaz permeace FITC a tím současně i nezačtené formy BSA. Tento nález může být považován za hlavní výsledek in vitro experimentu, neboť ani HPMC a PVA,

jako polymerní látky, které se také z nanovláknenného nosiče rozpustily a v roztocích vytvářejí síťovité trojrozměrné struktury, sledovaný protein nezachytily. Alespoň nikoli v té míře, že by permeaci albuminu znemožňovaly.

Typické časové průběhy průniku BSA-FITC v méně početné skupině vzorků, se třemi nanovláknennými donorovými terčíky a dvěma roztokovými donorovými vzorky, jsou znázorněny graficky na **Obr. 6.1**. Je zřejmé, že množství Q_t FICT-BSA bylo měřitelné od prvního do posledního časového intervalu a zpočátku vcelku pravidelně, pomalu stoupalo. Nicméně v časovém úseku po cca 6. až 8. hodině nastával neobvykle velký nárůst hodnot. Přestože makroskopicky nebyly v jednotlivých permeačních buňkách v jejich donorové i akceptorové části patrné žádné změny ani po 24 hodinách, lze předpokládat, že se výše popsaným způsobem projeví změny v integritě dotýčných sublingválních membrán.

Obr. 6.1 Časové profily průniku značeného albuminu (FICT-BSA) v druhém permeačním pokusu



Proto byl brány pro lineární regresi příslušných výpočtu hodnot J fluxů FICT-BSA [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] brány v úvahu pouze úseky kratší, pokud možno jednotně, nejdéle mezi 1. až 6. hodinou permeačního pokusu. Tento přístup je detailněji pro všechny jednotlivé případy vyznačen v dílčích permeačních protokolech části **5. Dokumentace**.

V **tabulkách 6.1 a 6.2** jsou shrnuty hodnoty fluxů J fluorescenčně značeného albuminu (FICT-BSA) v jednotkách, ve kterých je obvyklé udávat obdobné charakteristiky

nízkomolekulárních látek, tedy [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$], které informují o hmotnostním množství permeantu prošlého 1 cm^2 sublingvální membrány za jednu hodinu. Toto vyjádření je názorné pro praktické použití, proto není dále přepočítáváno na jiné možné varianty.

Tabulka 6.1: Permeace FICT-BSA z nosičů terčků po zvlhčení CFP 6,8

Flux $J_{\text{FICT-BSA}}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
HPMC nano 32	HPMC nano 16
7,5	3,5
6,7	4,9
6,0	5,1
6,7	5,2
Průměr $J = 6,7$	Průměr $J = 4,0$
<i>SD = 0,5</i>	<i>SD = 1,1</i>

Tabulka 6.2: Permeace FICT-BSA z nosičů po zakápnutí směsí CFP6,8 slina (1: 1)

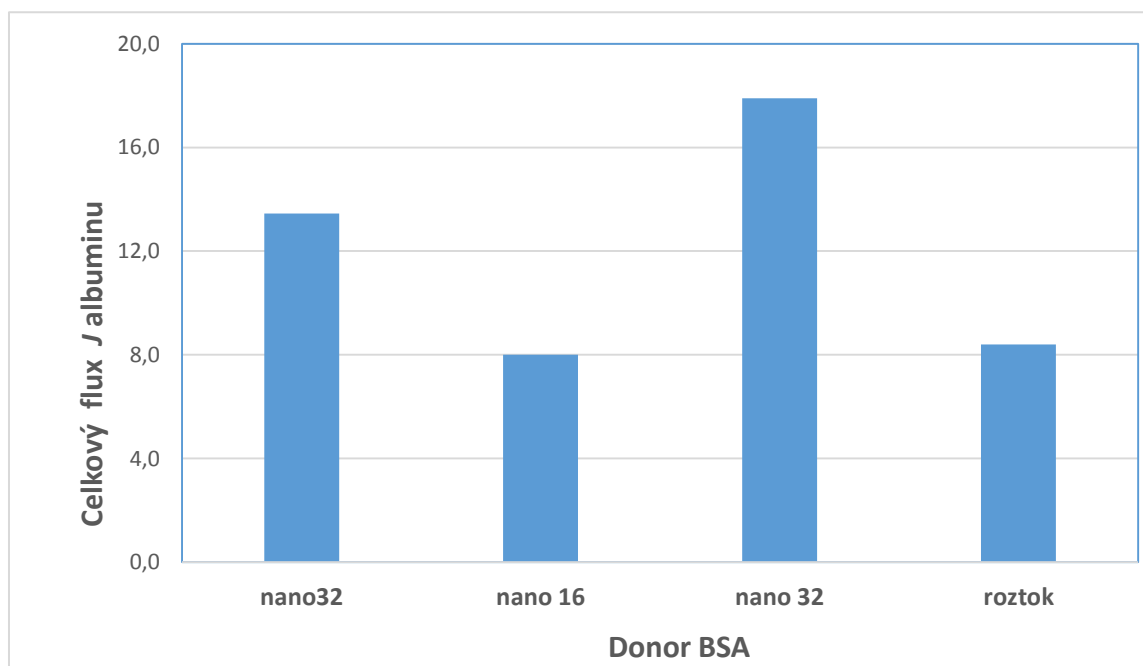
Flux $J_{\text{FICT-BSA}}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
nanovákenná membrána nano 32H	Ekvivalentní roztok R-EQ
10,4	3,8
7,5	4,6
Průměr $J = 8,9$	Průměr $J = 4,2$

V komentáři k oběma tabulkám je nutné říci, že přímé srovnání hodnot získaných nejprve s použitím CFP 6,8 (**Tab. 6.1**) a poté se směsí CFP 6.8 se slinou (1:1) (**Tab. 6.2**) není dost dobře možné, protože obě sestavy hodnot byly získány na sublingválních membránách z jiného jedince (donoru) a pravděpodobně také jiným pracovníkem, což musíme brát jako možné zdroje variability.

Skutečnost, že se podařilo získat více konečných hodnot fluxů pro první zmíněnou sadu hodnot, také poněkud komplikuje formulaci závěrů. Zejména je zřejmé, že v případech, ve kterých byla jako kapalina použita k rozpouštění pevných donorových materiálů směs CFP 6,8 se slinou je k dispozici jen málo hodnot příslušných fluxů, ať se jedná o donorové vzorky v podobě nanovlákněných membrán s obsahem 30 % celkového BSA nebo o směs lyofilizovaných prášků BSA a FITC-BSA, ze kterých po zakápnutí *in situ* vznikl roztok označovaný jako R-EQ. V **tabulce 6.2** byl výpočet navíc zjednodušen vypuštěním jedné odlehle hodnoty (přeskrtnuto a v závorce), takže ze dvou hodnot fluxů byl nakonec vyčíslen pouze aritmetický průměr.

Přesto byl pro souhrnnou prezentaci naměřených základních údajů z permeačních pokusů sestaven jeden graf (**Obr. 6.2**), v němž jsou vyneseny průměrné hodnoty celkově hypoteticky permeovaného albuminu.

Obr. 6.2 Souhrnné porovnání průměrných fluxů J [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] celkově permeovaného albuminu (bez chybových úseček)



Vzhledem k malému počtu dat nejsou u průměrných hodnot fluxů albuminu vyneseny úseky vymezující SEM. Tyto hodnoty, v případech, kdy to bylo možné, jsou však pro orientaci uvedeny v **tabulce 6.1**.

S potřebnou opatrností při celkovém hodnocení získaných permeačních dat lze za hlavní

výsledek experimentu považovat potvrzení sublingválního transmukosálního průniku albuminu. Je známa skutečnost, že albumin jako protein nevykazuje v oblastech pH 4,3 až 10,5 žádné konformační změny a chová se jako mírně hydratovaná sférická částice. Zbývá potvrdit, že průnik albuminu není po rozpuštění z testované nanovlákněné membrány omezován ani přítomností kompletní sliny na absorpční straně membrány.

7. ZÁVĚRY

Hlavní výhody systémového sublingválního podání léčiv lze spojovat s bohatou krevní zásobou velmi malou tloušťkou dané biologické membrány neobsahující buňky zrohovatělého slizničního epitelu. Teoretická část práce dílčím způsobem reaguje na dosud málo pojednanou problematiku sublingvální aplikační cesty a její souvislosti s vlivem mukosálních povlaků.

V in vitro pokusech zahrnujících i využití slin jako média zprostředkujícího kontakt léčiv s epitelu sublingvální sliznice prasete domácího, byl hodnocen průnik fluorescenčně značeného hovězího sérového albuminu (BSA).

Aplikace BSA v podobě 32vrstevných a 16vrstevných nanovláknenných nosičů s obsahem 30 procent hmotnostních BSA jako modelového permeantu a srovnání s jeho permeací z koncentračně ekvivalentního roztoku lyofilizovaného BSA přineslo tato zjištění:

1. FITC-BSA sublingvální membránou pronikal na úrovni fluxů J cca 10 až 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$
2. Nebyla zaznamenána snížená permeace FITC-BSA z donorového prostředí s obsahem slin

8. Použité zkratky a symboly

HPMC	hydroxypromelosa
PVA	polyvinylalkohol
PEO	polyethylenoxid
nano32H	nanovlákný terčík 32vrstvý s HPMC
nano16H	nanovlákný terčík 16vrstvý s HPMC
BSA	hovězí sérový albumin
FITC-BSA	fluorescenčně značený hovězí albumin
CFP, (CFP 6.8)	citrát-fosforečnanový pufr, (CFP pH 6,8)
FP	fosforečnanový pufr
HEPES	hepes pufr pH 7,4
A	plocha pod křivkou
c	koncentrace v mg/100 ml
J, J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	flux permeantu, průměrný flux permeantu
SEM	směrodatná odchylka průměru
r	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
n	počet měřených bodů
t [hod]	čas
SL N2LED	sublingvální membrána zmražená kapalným dusíkem a uchovávaná v lednici při -18°C až -20
C_{nk} [mg /100 ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_k [mg /100 ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého sublingvální membránou
Q_t [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	množství permeantu prošlého přes 1 cm^2 membrány
V_o [ml]	celkové množství akceptorové fáze
ΔV_{dop} [ml]	množství doplňované akceptorové fáze

9. LITERATURA

- ¹ E.L. McConnell, H.M. Fadda, A.W. Basit, Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery, *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 213–226.
- ² E.L. McConnell, F. Lui, A.W. Basit, Colonic treatment and targets: issues and opportunities, *J. Drug Target.* 17 (2009) 335–363.
- ³ C.R. Behl, H.K. Pimplaskar, A.P. Sileno, J. de Meireles, V.D. Romeo, Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 (1998) 89–116.
- ⁴ M.I. Ugwoke, N. Verbeke, R. Kinget, The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 3–22.
- ⁵ A.H. Shojaei, Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1 (1998) 15–30.
- ⁶ Vanessa Hearndena' b' , et al; New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease *Advanced Drug Delivery Reviews; Volume 64, Issue 1, January 2012, Pages 16–28; 2012*
- ⁷ <http://vos.palestra.cz/skripta/anatomie/10a3a1.htm>
- ⁸ Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57: 1556–1568.
- ⁹ W.R. Galey, H.K. Lonsdale, S. Nacht, The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water, *J. Invest. Dermatol.* 67 (1976) 713–717.
- ¹⁰ H.E. Bodde, M.E. De Vries, H.E. Junginger, Mucoadhesive polymers for the buccal delivery of peptides, structure–adhesiveness relationships, *J. Control. Release* 13 (1990) 225–231
- ¹¹ M.J. Rathbone, J. Hadgraft, Absorption of drugs from the human oral cavity, *Int. J. Pharm.* 74 (1991) 9–24.
- ¹² M.E. de Vries, H.E. Bodde, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Developments in buccal drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8 (1991) 271–303.
- ¹³ R.B. Gandhi, J.R. Robinson, Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 (1994) 43–74.

-
- ¹⁴ C.A. Squier, B.K. Hall, The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier, *J. Invest. Dermatol.* 84 (1985) 176–179.
- ¹⁵ A.H. Shojaei, Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1 (1998) 15–30.
- ¹⁶ M. Shimono, F. Clementi, Intercellular junctions of oral epithelium. I. Studies with freeze-fracture and tracing methods of normal rat keratinized oral epithelium, *J. Ultrastruct. Res.* 56 (1976) 121–136.
- ¹⁷ Ganem-Quintanar, F. Falson-Rieg, P. Buri, Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44 (1997) 107–120.
- ¹⁸ Harris, D. and Robinson, J.R., Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, *J. Pharm. Sci.*, 81:1-10, 1992.
- ¹⁹ Wertz, P.W. and Squier, C.A., Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.*, 8:237-269, 1991.
- ²⁰ Squier, C.A., Cox, P., and Wertz, P.W., Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa, *The J. Invest. Dermat.*, 96:123-126, 1991.
- ²¹ Squier, C.A. and Wertz, P.W. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery, in eds. M.J. Rathbone, *Oral Mucosal Drug Delivery*, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 1-26, 1996.
- ²² U. Kulkarni, R. Mahalingam, S.I. Pather, X. Li, B. Jasti, Porcine buccal mucosa as an in vitro model: relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 471–483.
- ²³ A.H. Shojaei, Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1 (1998) 15–30.
- ²⁴ Edgar WM. Saliva and dental health. *Br Dent J* 1990;169: 96–8.
- ²⁵ Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85:162–9.
- ²⁶ Silvers AR, Som PM. Salivary glands. *Radiol Clin North Am* 1998;36:941.

-
- ²⁷ L. Kalantzi, K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, J.B. Dressman, C. Reppas, Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies, *Pharm. Res.* 23 (2006) 165–176.
- ²⁸ Veerman ECI, Valentijn-Benz M, Van Nieuw Amerongen A. Viscosity of human salivary mucins: effect of pH and ionic strength and role of sialic acid. *J Biol Buccale* 1989;17:297–306.
- ²⁹ Huang C-M. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004;49:951–62.
- ³⁰ Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Prolong WF, et al. Human gingival crevicular fluid contains mrp8 (s100a8) and mrp 14 (s100a9), two calcium-binding proteins of the s100 family. *J Dent Res* 2000;79:740–7.
- ³¹ Macarthur DJ, Jacques NA. Proteome analysis of oral pathogens. *J Dent Res* 2003;82:870–6.
- ³² Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquidchromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res* 2006;5:1469–78.
- ³³ Christensen CM, Navazesh M. Anticipatory salivary flow to the sight of different foods. *Appetite* 1984;5:307.
- ³⁴ Lee VM, Linden RW. An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. *Exp Physiol* 1992;77:221.
- ³⁵ Gusman H, Leone C, Helmerhorst EJ, Nunn M, Flora B, Troxler RF, et al. Human salivary gland-specific daily variations in histatin concentrations determined by a novel quantitation technique. *Arch Oral Biol* 2004;49:11.
- ³⁶ Veerman ECI, Van den Keijbus PAM, Vissink A, Van Nieuw Amerongen A. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Euro J Oral Sci* 1996;104:346–52.
- ³⁷ Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002;29:189–94.
- ³⁸ Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972;220:529–45.
- ³⁹ Ferguson DB, Botchway CA. A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Arch Oral Biol* 1980;25:559–68.
- ⁴⁰ Castagnola M, Cabras T, Denotti G, Fadda MB, Gambarini G, Lupi A, et al. Circadian rhythms of histatin 1, histatin 3, histatin 5, statherin and uric acid in whole human saliva secretion. *Biol Rhythm Res* 2002;33:213–22.

-
- ⁴¹ Ferguson DB, Fort A, Elliott AL, Potts AJ. Circadian rhythms in human parotid saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* 1973;18:1155–73.
- ⁴² Shannon IL, Suddick RP, Dowd Jr FJ. Saliva: composition and secretion. *Monogr Oral Sci* 1974;2:1.
- ⁴³ Mandel ID. Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res* 1974;53:246–66.
- ⁴⁴ Schwartz WH. The rheology of saliva. *J Dent Res* 1987;66: 660–4.
- ⁴⁵ Veerman ECI, Valentijn-Benz M, Van Nieuw Amerongen A. Viscosity of human salivary mucins: effect of pH and ionic strength and role of sialic acid. *J Biol Buccale* 1989;17:297–306.
- ⁴⁶ Glantz PO. Interfacial phenomena in the oral cavity. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 1997;123–124:657–70.
- ⁴⁷ Glantz POJ, Friberg SE, Wirth SM, Baier RE. Thin-section transmission electron microscopy of human saliva. *Acta Odontol Scand* 1989;47:111–6.
- ⁴⁸ Rykke M, Smistad G, Rølla G, Karlsen J. Micelle-like structures in human saliva. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1995;4:33–44.
- ⁴⁹ Rykke M, Young A, Rølla G, Devold T, Smistad G. Transmission electron microscopy of human saliva. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1997;9:257–67.
- ⁵⁰ Raynal BDE, Hardingham TE, Thornton DJ, Sheehan JK. Concentrated solutions of salivary MUC5B mucin do not replicate the gel-forming properties of saliva. *Biochem J* 2002;362:289–96.
- ⁵¹ Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27:57–92.
- ⁵² Bolscher JGM, Veerman E, Van Nieuw Amerongen A, Tulp A, Verwoerd D. Distinct populations of high-M(r) mucins secreted by different human salivary glands discriminated by density-gradient electrophoresis. *Biochem J* 1995;309: 801–6.
- ⁵³ Wickstrom C, Christersson C, Davies JR, Carlstedt I. Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase. *Biochem J* 2000;351:421–8.
- ⁵⁴ Waigh TA, Papagiannopoulos A, Voice A, Bansil R, Unwin AP, Dewhurst CD, et al. Entanglement coupling in porcine stomach mucin. *Langmuir* 2002;18:7188–95.
- ⁵⁵ McCullagh CM, Soby LM, Jamieson AM, Blackwell J. Viscoelastic behavior of fractionated ovine submaxillary mucins. *Biopolymers* 1992;32:1665–74.

-
- ⁵⁶ Bromberg L, Barr D. Self-association of mucin. *Biomacromolecules* 2000;1:325–34.
- ⁵⁷ Raynal BDE, Hardingham TE, Sheehan JK, Thornton DJ. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible crosslinks in salivary mucus. *J Biol Chem* 2003;278:28703–10.
- ⁵⁸ Bromberg L, Barr D. Self-association of mucin. *Biomacromolecules* 2000;1:325–34.
- ⁵⁹ Nordbo H, Darwish S, Bhatnagar RS. Salivary viscosity and lubrication: influence of pH and calcium. *Scand J Dent Res* 1984;92:306–14.
- ⁶⁰ Biesbrock AR, Reddy MS, Levine MJ. Interaction of salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect Immun* 1991;59:3492–7.
- ⁶¹ Antimicrobial function of human saliva—how important is it for oral health? Tenovuo J., *Acta odontol Scand.* 56(5), 250-256
- ⁶² Cheaib Z1, Lussi A., Role of amylase, mucin, IgA and albumin on salivary protein buffering capacity: a pilot study. *J Biol Sci.* 2013 38 (2): 259-65.
- ⁶³ Loomis RE, Prakobphol A, Levine MJ, Jones PC. Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular–sublingual saliva. *Arch Biochem Biophys* 1987;258:452–64.
- ⁶⁴ Iontcheva I, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. Molecular mapping of statherin- and histatin-binding domains in human salivary mucin MG1 (MUC5B) by the yeast two-hybrid system. *J Dent Res* 2000;79:732–9.
- ⁶⁵ Peppas NA, Sahlin JJ. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials* 1996;17:1553-61
- ⁶⁶ Kharenko EA, Larionova NI, Demina NB. Mucoadhesive drug delivery systems (review). *Pharm Chem J* 2009;43:21-9
- ⁶⁷ Castellanos MR, Zia H, Rhodes CT. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 1993;19:143-94
- ⁶⁸ Ponchel G, Irache JM. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;34:191-219
- ⁶⁹ Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1666-91
- ⁷⁰ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1595-639
- ⁷¹ Waite JH: Marine adhesive proteins: natural composite thermosets. *Int. J. Biol. Macromol.* (1990) 12(2):139-144.

-
- ⁷² Doundoulakis JH: Surface analysis of titanium after sterilization: role in implant tissue interface and bioadhesion. *J. Prosthet. Dent.* (1987) 58(4):471-478
- ⁷³ Baier RE, Meyer AE: Future directions in surface preparation of dental implants. *J. Dent. Educ.* (1988) 52(12):788-791.
- ⁷⁴ Smart JD, Kellaway IW, Worthington HE: An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* (1984) 36(5):295-299
- ⁷⁵ Dittgen M, Oestereich S, Eckhardt D: Einfluss der Bioadhasivitat von Schleimen auf die Elimination von Naphazolinhydrochlorid vom Auge des Hausschweines. *Pharmazie* (1991) 46(10):716-718
- ⁷⁶ Gonda I, Gipps E: Model of disposition of drugs administered into the human nasal cavity. *Pharm. Res.* (1990) 7(1):69-75
- ⁷⁷ Geraghty PB, Attwood D, Collett JH, Sharma H, Dandiker Y: An investigation of the parameters influencing the bioadhesive properties of Myverol 18-99/water gels. *Biomaterials* (1997) 18(1):63-67
- ⁷⁸ Ch'ng HS, Park H, Kelly P, Robinson JR: Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.* (1985) 74(4):399-405.
- ⁷⁹ Longer MA, Ch'ng HS, Robinson JR: Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery III: oral delivery of chlorothiazide using a bioadhesive polymer. *J. Pharm. Sci.* (1985) 74(4):406-411.
- ⁸⁰ Lehr CM: Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1994) 11(2-3):119-160.
- ⁸¹ Lehr CM, Bouwstra JA, Kok W et al.: Effects of the mucoadhesive polymer polycarbophil on the intestinal absorption of a peptide drug in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* (1992) 44(5):402-407.
- ⁸² Wearly LL: Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1991) 8(4):331-394.
- ⁸³ E.L. McConnell, F. Lui, A.W. Basit, Colonic treatment and targets: issues and opportunities, *J. Drug Target.* 17 (2009) 335–363
- ⁸⁴ Vanessa Hearndena' et al; New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease *Adv. Drug Delivery Rev.*; 64 2012, s. 16–28

-
- ⁸⁵ <http://vos.palestra.cz/skripta/anatomie/10a3a1.htm>
- ⁸⁶ J. Gajdziok, D. Vetchy', Mucoadhesive polymers in medical forms, *Chem. Listy* 106 (2012) 632–638.
- ⁸⁷ W.R. Galey, H.K. Lonsdale, S. Nacht, The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water, *J. Invest. Dermatol.* 67 (1976) 713–717.
- ⁸⁸ H.E. Bodde, M.E. De Vries, H.E. Junginger, Mucoadhesive polymers for the buccal delivery of peptides, structure–adhesiveness relationships, *J. Control. Release* 13 (1990) 225–231
- ⁸⁹ H.E. Bodde, M.E. De Vries, H.E. Junginger, Mucoadhesive polymers for the buccal delivery of peptides, structure–adhesiveness relationships, *J. Control. Release* 13 (1990) 225–231
- ⁹⁰ www.midatechpharma.com/therapeutic-areas/endocrinology (dostupné 22.4.2016)
- ⁹¹ www.generex.com/UserFiles/File/Oral-LynFactSheet.pdf (dostupné 22.4.2016)
- ⁹² M.J. Rathbone, J. Hadgraft, Absorption of drugs from the human oral cavity, *Int. J. Pharm.* 74 (1991) 9–24.
- ⁹³ M.E. de Vries, H.E. Bodde, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Developments in buccal drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 8 (1991) 271–303.
- ⁹⁴ R.B. Gandhi, J.R. Robinson, Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13 (1994) 43–74
- ⁹⁵ C.A. Squier, B.K. Hall, The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier, *J. Invest. Dermatol.* 84 (1985) 176–179.
- ⁹⁶ A.H. Shojaei, Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1 (1998) 15–30.
- 96 Ganem-Quintanar, F. Falson-Rieg, P. Buri, Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44 (1997) 107–120.
- 98 Wertz, P.W. and Squier, C.A., Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.*, 8:237-269, 1991.
- ⁹⁷ Ganem-Quintanar, A., Falson-Rieg, F., Buri, P.: Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44 (1997), 107–120
- ⁹⁸ Harris, D. and Robinson, J.R., Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, *J. Pharm. Sci.*, 81:1-10, 1992.

⁹⁹ Wertz, P.W. and Squier, C.A., Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.*, 8:237-269, 1991.

¹⁰⁰ Squier, C.A., Cox, P., and Wertz, P.W., Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa, *J. Invest. Dermatol.*, 96:123-126, 1991.

¹⁰¹ www.enco.co.il/protocol (Dostupné 24.4.2016)

¹⁰² *Pharmaceutical Handbook*. 19th Ed. , Wade A. (ed). The Pharmaceutical Press, London. 1980. s. 240