

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
katedra farmaceutické technologie
studijní program: farmacie



**Sublingvální průnik kyseliny listové jako modelového
antimetabolitu**

**Sublingual permeation of folic acid as a model
antimetabolite**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Lucie Teofilová

Školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, květen 2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškeré informační zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v textu řádně vyznačeny.

Děkuji doc. RNDr. Pavlu Doležalovi za odborné vedení, cenné rady a veškerou pomoc při experimentech, následném zpracování dat i vypracování diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Pavlu Berkovi a Mgr. Moridu Mahmoudi Majdovi za pomoc poskytovanou během měření.

OBSAH

1	Úvod	3
2	Cíl práce	4
3	Teoretická část	5
3.1	Sublingvální podání léčiv	5
3.2	Nádorová onemocnění	6
3.2.1	Mechanismus vzniku nádoru	7
3.2.2	Aktuálně o nádorových onemocněních v České republice	8
3.3	Terapie nádorových onemocnění	9
3.3.1	Chemoterapie	12
3.4	Antimetabolity	14
3.4.1	Methotrexát	14
3.5	Kyselina listová	21
4	Experimentální část	26
4.1	Suroviny a materiál	26
4.2	Přístroje	27
5	Dokumentace	34
6	Výsledky a diskuse	<u>9190</u>
7	Závěry	99
8	Abstrakt	101
9	Abstract	102
10	Použité zkratky a symboly	103
11	Literatura	104

1 ÚVOD

Diplomová práce se zaměřuje na stanovení průniku kyseliny listové přes sublingvální membránu s využitím kofeinu jako markeru permeační integrity membrány.

Základní poznatky o sublingvální aplikaci byly popsány už v minulosti. Vzhledem k novým možnostem současné farmaceutické technologie nastalo období k novému uplatnění dalších typů aplikačních soustav a zkoušení nových metod podání léčiv.

Sublingvální aplikace se dnes ukazuje jako jedna z alternativních cest pro podání některých důležitých léčiv. Předkládaná práce přináší řadu prvotních dat, která budou součástí podkladů pro další výzkum v sublingválních aplikačních soustav na katedře farmaceutické technologie.

2 CÍL PRÁCE

2.1 V teoretické části bylo úkolem podat stručný přehled informací zaměřený na nádorová onemocnění a v kontextu s volbou kyseliny listové jako modelového permeantu popsat možnosti terapeutického využití relevantního antimetabolitu, konkrétně methotrexátu.

2.2 V experimentální části získat a vyhodnotit nové původní údaje o sublingválním průniku kyseliny listové.

K tomu využít:

- a) kofeinu jako vhodného markeru intergity membrány
- b) nativní membránu
- c) konzervovanou a zmraženou membránu
- d) trypsinizovanou membránu

Jako vehikula kyseliny listové vyzkoušet:

- a) 4 jednoduchá kapalná vehikula různé polarity
 - a 2 komplikovanější tekuté disperzní soustavy
- b) polyuretanovou membránu ve funkci modulátoru permeace

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Sublingvální podání léčiv

Jedním z mnoha důvodů pro výzkum sublingválního podání léčiv je snaha vyhnout se jaternímu first-pass efektu, který provází perorální podání. V praxi by sublingvální aplikace mohla přinést možnost snížení dávky podaného léčiva. Další výhodou může být snadná aplikace a tudíž i dobrá compliance. Sliznice jazyka je velmi tenká a bohatě prokrvená, léčivo se dostává přímo do krevního řečiště za velmi krátkou dobu. Doba k dosažení požadované terapeutické odpovědi však závisí na dávce a typu podaného léčiva.¹ V případě sublingválního podání obecně platí, že lépe se absorbují lipofilní léčiva. Nespornou výhodou je i snadné a rychlé přerušování podávání léčiva a tudíž i snížené riziko předávkování. Parenterální aplikace pak bývá náročná, často bolestivá a ve většině případů musí být prováděna kvalifikovaným zdravotnickým personálem.

Zdaleka ne všechna léčiva mohou být použita sublingválně, obtíže mohou nastat se složením léčivého přípravku, chutí, rozpustností a také omezená variabilita dávkování. Jako lékové formy se používají malé, rychle-rozpustné tablety, spreje, pastilky nebo tekuté suspenze.¹

Sublingvální léčiva se aplikují za různým účelem. Nejběžnější sublingvální léčivý přípravek je tableta s nitrátem glycerolu. Rychle relaxuje cévy a tím snižuje zátěž srdce a zmírňuje bolesti při anginy pectoris. Další sublingvální přípravky slouží k úlevě při bolestivých stavech, například u migrenózních bolestí, používají se ke kontrole krevního tlaku a také k léčbě duševní demence (například ergoloid mesylates).²

V poslední době začala řada farmaceutických společností vyrábět steroidy ve formě sublingválních tablet a to díky rozšířenému užívání steroidů v léčbě AIDS či při terapii u starších mužů trpících snížením sexuálního apetitu. V těchto případech poskytuje sublingvální tableta dostatečně silnou dávku

léčivé látky.. Pro kulturistu o hmotnosti 120 kg by zřejmě nebylo přijatelné, pokud by měl užívat najednou 20 či 30 tablet, které se rozpouští pod jazykem. Vzhledem k současným omezením a nařízením, která se týkají perorálních a injekčně aplikovaných steroidů by se populárnější formou aplikace mohly stát právě sublingvální tablety.. A vzhledem k tomu, že se stále více také používají při léčbě AIDS, musí zákonitě vzrůst i jejich produkce, což samozřejmě znamená lepší dostupnost.³

Dvě rozsáhlé nezávislé randomizované kontrolované studie hodnotící tablety s obsahem travního alergenu potvrdily účinnost sublingvální imunoterapie u dospělých osob trpících sezónní alergickou rhinokonjunktivitidou. Její účinky závisely jak na dávce alergenu, tak na době podání. Tablety dobře snášeli pacienti s monosenzitizací, s polysenzitizací i s astmatem na vrcholu sezóny (pacienti s celoročním astmatem byli ze studie vyloučeni), přičemž u všech byla léčba uvedenými tabletami stejně účinná. Lokální nežádoucí účinky se vyskytovaly často, ovšem většinou spontánně ustupovaly a nebyly příliš obtěžující. Nebyly zaznamenány žádné závažné nežádoucí účinky související s léčbou. Míra vlivu léčby byla podobná jako ve srovnatelné studii zaměřené na subkutánní imunoterapii s využitím vakcíny. Studie, v níž byl v podmínkách primární péče hodnocen přínos sublingválního podávání kapek dětem trpících polinózou, přinesla negativní výsledky, které ovšem nelze zobecňovat. Její postavení mezi jinými léčebnými postupy bude upřesněno dosud probíhajícími studiemi u dětí a na základě posouzení dlouhodobých účinků u dospělých pacientů.⁴

3.2 Nádorová onemocnění^{5,6}

Pojem nádorové onemocnění označuje různorodou skupinu chorob, které se navzájem velmi liší. Společným rysem je to, že některá populace buněk se vymkne kontrole a začne relativně autonomně růst. Tento růst může být naprosto neškodný (např. bradavice), ale také může v poměrně krátké době

postiženého zahubit (např. některé nádory krve). Obvykle se považuje za projev zhoubnosti (malignity) to, že nádor roste infiltrativně do okolí a je schopen se rozsévat se po těle a zakládat vzdálená ložiska, tzv. metastázy. Výjimku z tohoto pravidla představují maligní nádory mozku, které zakládají metastázy jen vzácně.

Nádor může vzniknout v jakékoliv tkáni, ale nejčastěji vzniká v těch tkáních, kde se nejvíce množí buňky a tam, kde jsou buňky stimulovány hormony. Nejčastějšími postiženými orgány u žen jsou prsa a děložní hrdlo. U mužů pak plíce, druhým nejčastějším nádorem je karcinom tlustého střeva a konečníku, dále prostaty, žaludku, leukémie, atd.

Nádorové onemocnění je u dospělých ve vyspělých zemích na druhém místě mezi příčinami úmrtí, za nemocemi srdce a cév. Vyskytuje se převážně ve vyšším věku, obvykle je způsobena kombinací vlivů prostředí a životního stylu. Vliv dědičnosti není tak výrazný. Některými nádory mohou trpět i mladí lidé, včetně dětí, pro něž jsou některé nádory typické. V dětském věku převažují nádory podmíněné vrozenou poruchou některého z opravných mechanismů DNA.

3.2.1 Mechanismus vzniku nádoru

Základem deregulace buněčné proliferace vedoucí k nekontrolovanému množení buněk je mutace DNA. Mutaci mohou způsobit různé faktory:⁶

- Biologické: např. viry, helminti.
- Chemické: působení mutagenů a karcinogenů (průmyslové zplodiny, azobarviva, arsen, azbest, kouření, alkohol, konzervace, nevhodná příprava potravin, nevhodná strava, chemizace zemědělství, léky).⁷
- Fyzikální: záření o vysoké energii, zejména ionizující (UV, rentgenové záření, gama záření, částice z jaderného rozpadu, atd.).

- Hormonální: dlouhotrvající hormonální stimulace některých tkání může způsobit jejich přeměnu v nádor.

Na vzniku nádoru se podílí také dědičnost.

Obvykle se rozlišují tři skupiny zasažených genů:

- Aktivace protoonkogenů na nádorové onkogeny.
- Inaktivace nádorových supresorových genů (antionkogenů).
- Mutace v genech zodpovědných za opravu DNA.

Aby se nádorová buňka stala buňkou vysoce maligní, schopnou tvořit sekundární nádory – metastázy, musí získat další vlastnosti, opět v důsledku dalších mutací více genů. Tento proces je mnohostupňový a může trvat delší čas.⁸

3.2.2 Aktuálně o nádorových onemocněních v České republice^{9,10}

S prodlužující se délkou lidského života narůstá i pravděpodobnost, že naše tělo postihne zhoubný nádor. Zjednodušeně řečeno je to tím, že více lidí se nádoru "dožije". S rostoucími počty pacientů poroste zátěž českých nemocnic a samozřejmě také náklady na léčbu.

- Každoročně onemocní v České republice rakovinou přes 66 000 lidí.
- Každý rok zemře v České republice na rakovinu přes 29 000 lidí.
- Česká republika dlouhodobě obsazuje 1. místo v Evropě v četnosti výskytu rakoviny tlustého střeva.
- Nejčastějším zhoubným onemocněním u mužů je karcinom plic. V roce 2003 onemocnělo 4 600 mužů.
- Nejčastějším zhoubným onemocněním u žen je karcinom prsu. V roce 2003 nově onemocnělo přes 6 000 žen.⁹

Pozitivní zprávou pro pacienty je, že výsledky péče měřené přežitím pacientů se za uplynulých 15 let významně zlepšily. Má-li tento pozitivní vývoj pokračovat, je třeba především dbát na prevenci nádorových onemocnění. Zde se mohou uplatnit i občané sami. Včasnému záchytu nejčastějších onemocnění výrazně napomůže pravidelný screening dostupný v ČR pro nádory prsu, tlustého střeva a konečníku a hrdla děložního.¹⁰

Onkologický výzkum směřuje k tomu, aby se nádorové onemocnění stalo opakovaně léčitelným a aby se tak zařadilo k chorobám, které se sice nedají vyléčit, ale dají se opakovaně léčit, tak jako např. hypertenze.⁸

(Při psaní tohoto textu byly použity údaje ze statistiky ÚZIS, softwaru SVOD, tisku a především s laskavým svolením autorů byly převzaty pasáže z brožurky ABC pacientů s onkologickým onemocněním autorů MUDr. Jiří Bartoš a kolektiv)⁹

3.3 Terapie nádorových onemocnění⁶

V terapii nádorů se obvykle rozlišují tzv. léčebné záměry, které jsou určeny jednak typem a pokročilostí nádoru a jednak celkovým stavem nemocného:

- Kurativní záměr: cílem léčby je nemocného vyléčit. Jako kritérium úspěšnosti terapie je pokládáno přežití bez návratu choroby po určitou dobu. U většiny nádorů je to 5 let, u některých pomalu rostoucích nádorů je to 10 let.
- Paliativní záměr: cílem léčby je nemocného zbavit projevů onemocnění a zastavit nebo zpomalit růst nádoru. Takový nemocný může žít kvalitním životem i mnoho let nebo dokonce desetiletí.
- Symptomatický záměr: nemocný je v takovém stavu, že není naděje ani na vyléčení ani na zastavení postupu onemocnění. Základem lékařské péče je snaha o udržení kvality života. Především je tišena případná bolest a jsou řešeny komplikace růstu nádoru.

Chirurgická terapie: tedy odstranění nádoru, byla po dlouhou dobu jedinou metodou léčby. I dnes platí, že největší naději na vyléčení má pacient s nádorem, který lze odoperovat. Kromě toho jsou chirurgické postupy využívány při řešení komplikací již neřešitelného nádoru.

Chemoterapie: je léčba vysokými dávkami cytostatik, tj. látek toxických pro buňky. Předpokladem je, že nádorové buňky jsou citlivější na toxické poškození než buňky zdravé. Skutečně některé nádory lze vyléčit jen použitím chemoterapie, jiné však na chemoterapii prakticky nereagují.

Radioterapie: je léčba ionizujícím zářením. Energie záření se předává do nádoru a nádor je tím poškozován. Opět se předpokládá, že nádorové buňky jsou citlivější k poškození. Kromě toho lze záření aplikovat více či méně cíleně. Jako zdroje záření se používají nejčastěji radionuklidy, vzácněji též lineární urychlovače.

Imunoterapie je metoda využívající poznatku, že tělo může alespoň někdy reagovat proti nádoru prostřednictvím vlastního imunitního systému.

Hormonální terapie: některé nádory, zejména nádory prsu, mohou být ve svém růstu nebo dokonce přežití závislé na přítomnosti určitých hormonů. Podání látek působících proti těmto hormonům nebo zabránění tvorbě těchto hormonů tak mnohdy dojde k zástavě růstu nádoru a někdy i k jeho zmenšování.

Biologická terapie: na růstu nádoru se podílí více faktorů. Kromě růstu samotných nádorových buněk je důležité i např. vrůstání cév do nádoru. Ovlivnění procesů regulovaných tzv. lokálními hormony je podstatou biologické terapie. V praxi se používají dva přístupy. Buď se podá látka, která zasahuje uvnitř buněk do signalizačních drah, nebo se podá látka blokující určitý receptor na povrchu buňky (obvykle protilátka).

Podpůrná terapie: kromě řešení vlastního nádorového onemocnění hraje důležitou roli v onkologii i péče o komplikace nemoci a o psychiku pacienta.

Podpůrná péče zahrnuje zejména: terapii bolesti, péči o výživu, psychoterapii a sociální terapii.

Alternativní medicína: vzhledem k časté špatné prognóze onkologických onemocnění se pacienti někdy obracejí k alternativní medicíně. Některé postupy nemocným neublíží, naopak mohou působit jako psychoterapeutická podpora (např. akupunktura nebo aromaterapie), jindy však může dojít k ohrožení pacienta buď přímo (různé drastické diety bez racionálního podkladu, odmítání onkologické terapie) nebo nepřímo (bylinné preparáty s nepředvídatelnými interakcemi s cytostatiky).

Homeopatie: kapitolou samou pro sebe je použití homeopatie, především pro její masovou rozšířenost. Lze najít velké množství odborně se tvářících článků prokazujících prospěšnost homeopatie jako doplňku ke standardní onkologické léčbě, nicméně v databázi PubMed lze nalézt (duben 2008) jen takové články, které buď jen popisují použití homeopatie, nebo konstatují, že přínos homeopatie je jen psychoterapeutický. Někteří homeopati prezentují úspěšné kazuistiky, což je ovšem podle pravidel EBM jako důkaz téměř bezcenná informace.

Ačkoliv dnes již dovedeme některá nádorová onemocnění vyléčit, nelze v širším měřítku považovat výsledky léčby za zcela uspokojivé. Je to způsobeno především povahou nádorového onemocnění. Jeho rozmanité formy jsou dány nejen předpokládané rozdílnými etiologickými faktory, ale i značně různorodou patogenezí. Je tedy logické, že léčba tohoto typu onemocnění bude obtížná, tím spíše, že bez znalosti etiologie nemůže v současné době existovat léčba kauzální. Ve většině případů nestačí k úspěšnému léčení nebo vyléčení pouze jediná z uvedených metod. Větší naději na úspěch má zpravidla komplexní přístup vyjádřený jejich vzájemnou kombinací, neboť tyto základní metody protinádorové léčby se vhodně doplňují.¹¹

3.3.1 Chemoterapie

Chemoterapie znamená podávání léčiv, které jsou produkty chemické syntézy. Chemoterapeutika se tedy používají jak k léčbě onkologických, tak k léčbě jiných (bakteriálních, plísňových, virových a parazitárních) onemocnění. V onkologii se pod pojmem chemoterapie rozumí podávání léčiv s cytotoxickým účinkem. Společnou vlastností je tedy ničení živých buněk, ať již jsou původu syntetického, či jde o deriváty látek získaných z rostlin či z plísní.

Cílem cytostatické léčby je omezení nádorového růstu, jinými slovy omezení buněčné proliferace (bujení) nádoru. Buněčné dělení představuje soubor metabolických pochodů buňky, které jsou předpokladem pro rozdělení buňky mateřské na dvě buňky dceřiné. Uskutečňuje se v tzv. buněčných cyklech. Buňka v dlouhodobě utlumené fázi G_1 se nazývá buňka klidová (fáze G_0) a taková buňka není zpravidla citlivá k účinku cytostatik. Cytotoxický účinek závisí na chemické povaze cytostatika a tedy způsobu, kterým poškozují buňky, liší se ve své schopnosti průniku do některých tkání a stejně tak jsou mezi nimi i podstatné rozdíly, co se týče jejich nežádoucích účinků.^{11,12}

Cytostatika působí několika mechanismy:

- Porucha syntézy nukleových kyselin inhibicí různých klíčových enzymů metabolismu.
- Přímé poškození struktury již hotových nukleových kyselin.
- Alterace tzv. mikrotubulárního proteinu, jež má za následek abnormální průběh mitózy a její blokádu v metafázi.
- Porucha syntézy proteinů (na ni je cytotoxický účinek vázán méně často).

Cytostatika však nejsou schopna v organismu rozpoznat zdravé buňky od nádorových, ve své podstatě ničí všechny živé buňky v těle, což poukazuje na jejich četné nežádoucí účinky, které se nejčastěji projevují:

- Zažívací obtíže : nauzea, zvracení, stomatitida, potíže při polykání, zácpa, průjem.
- Poruchy krvetvorby: leukopenie, erythrocytopenie, trombocytopenie.
- Jiné obtíže: vypadávání vlasů, problémy v plicích, v močovém ústrojí, v kloubech a svalech.

Dalším závažným problémem může být rezistence na cytostatickou léčbu. Rozlišujeme primární rezistenci, tj. nedostatečnou odpověď na první terapeutickou léčbu, a sekundární rezistenci, získanou předchozí léčbou. Ta se může projevit relapsy, persistujícím maligním onemocněním a vyžaduje změnu léčebné strategie. Mechanismus vzniku rezistence je zvýšení koncentrace enzymů, které degradují cytostatika. Závažná je také mnohočetná rezistence - MDR (multidrug resistance). V tomto případě dochází k urychlení odchodu cytostatika z buňky. Příčinou je přítomnost MDR – genu, který je zodpovědný za tvorbu P-glykoproteidu, který se hromadí v membráně buňky a je zodpovědný za projev této formy rezistence.^{8,13}

Je velmi důležité, zvolit správné dávkování. Poddávkování může snížit efektivitu léčby. Naopak předávkování může způsobit toxicitu. Pacient dostává různé typy cytostatik v přesně časovaném schématu, tzv. cyklu léčby. Série cyklů potom tvoří léčebný plán neboli protokol jedinečný pro každý typ nádorového onemocnění. Interval mezi cykly léčby je většinou 3 týdny . V této době se musí zdravé buňky organismu zregenerovat z poškození cytostatiky tak, aby organismus jako celek byl schopen pokračovat v chemoterapii. Pokud by ale interval mezi cykly byl příliš dlouhý, mohlo by dojít i k regeneraci buněk nádorových. Proto se vždy snažíme předepsaný interval mezi cykly či dávkami cytostatik maximálně dodržet.⁸

Většina cytostatik jsou léky určené k nitrožilnímu podání formou krátké či výjimečně delší, až 24 hodinové, infuze. Minimum cytostatik je podáváno ve formě tablet.

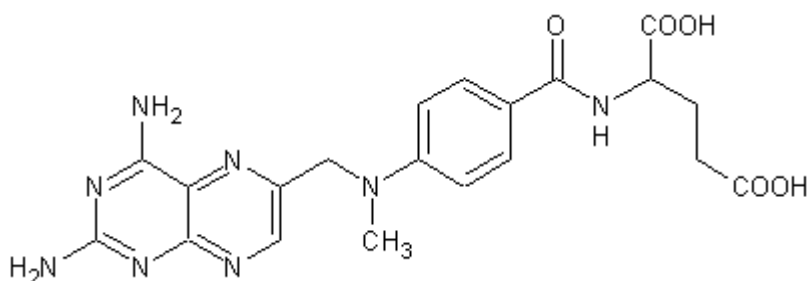
3.4 Antimetabolity

Patří do podskupiny chemoterapeutik, jejichž struktura je blízká přírodním metabolitům, které inhibují v buňkách biosyntézu nukleových kyselin (DNA i RNA). Rozdíl zpravidla spočívá v zavedení nové funkční skupiny nebo v náhradě stávající funkční skupiny jinou, případně v obnově základního skeletu. Tyto látky se zapojují do buněčných metabolických procesů, které vedou k poruše buněčných funkcí a to především u nádorových buněk, jejichž metabolismus bývá zvýšen, někdy i částečně pozměněn. Antimetabolity mohou buď blokovat dílčí reakce intermediálního metabolismu nebo jsou samy metabolicky pozměněny a v této formě pak inkorporovány do nukleové kyseliny. Vestavění „falešného“ metabolitu vede k syntéze nefunkční nukleové kyseliny. Zároveň mohou poškozovat i buňky zdravé, což má za následek jejich orgánovou toxicitu.

Ve vztahu k fyziologickým metabolitům lze antimetabolity rozdělit na:

- Analoga kyseliny listové (methotrexát, raltitrexed).
- Analoga purinových bází (merkaptopurin, thioguanin, kladribin, fludarabin).
- Analoga pyrimidinových bází (fluorouracil, tegafur, cytarabin, gemcitabin, kapecitabin, hydroxymočovina).

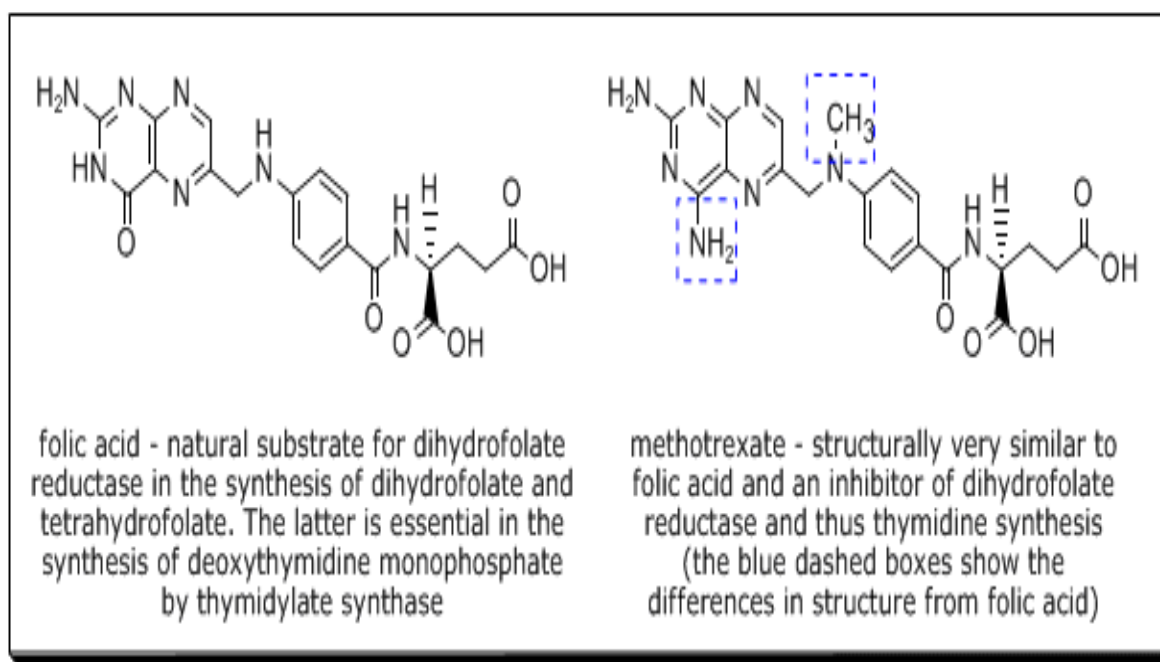
3.4.1 Methotrexát



Obr. 3.2.1.1 Chemická struktura methotrexátu¹⁴

Methotrexát (MTX) patří do skupiny cytostatik s antimetabolickým účinkem. MTX je tedy analog kyseliny listové, antifolát. Struktura kyseliny listové je značně specifická a prakticky každá její obměna vede k antagonistickým látkám, které se označují jako antifolika. Tyto mohou působit různým mechanismem: inhibicí folátových koenzymů, inhibicí reakcí katalyzovaných folátovými koenzymy nebo kompeticí s foláty o průnik do buňky.

MTX se od kyseliny listové liší náhradou hydroxylové skupiny v poloze 4 pteridinového jádra aminoskupinou a náhradou vodíku na N₍₁₀₎ methylovou skupinou.¹⁵

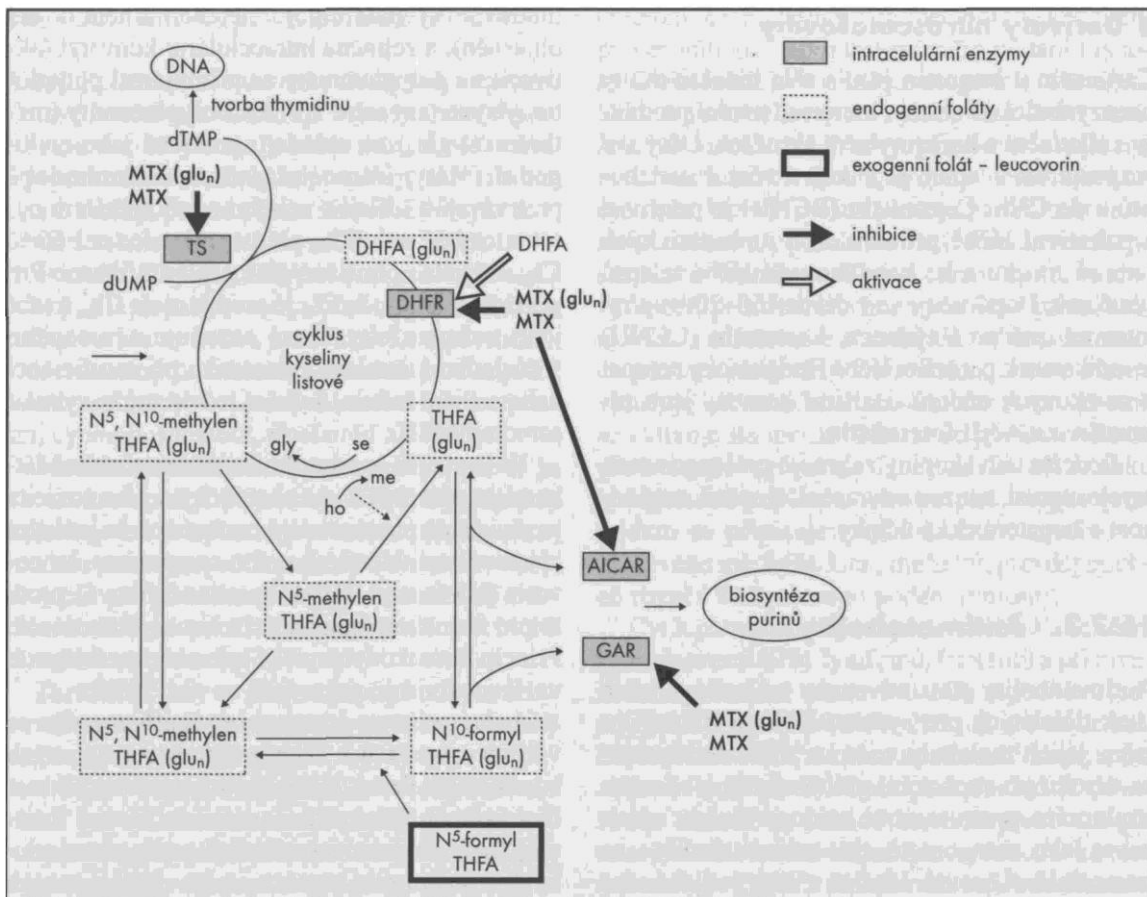


Obr. 3.2.1.2 Rozdíly v chemické struktuře methotrexátu a kyseliny listové¹⁶

Mechanismus účinku:

Mechanismus působení methotrexátu spočívá v konkurenční inhibici dihydrofolátreduktasy (DHFR), tj. enzymu důležitého pro redukci kyseliny dihydrolistové (DHFA) na tetrahydrolistovou (THFA). Navíc blokuje i další enzym nutný pro tvorbu DNA - thymidylátsyntetasu (TS), katalyzující tvorbu thymidinu. Vlastní blokáda DHFR se projeví v okamžiku, kdy se spotřebují

zásoby endogenních tetrahydrofolátů, a to zástavou tvorby DNA (následně i RNA). Dochází k buněčné smrti. Blokáda DHFR je za určitých podmínek reverzibilní, je možné ji zrušit podáním leukovorinu. Podstatou vlivu leukovorinu je jeho výše zmíněná konverze na endogenní foláty. Po podání leukovorinu se zvyšuje hladina extra a intracelulárních folátů, a tím i jejich schopnost antagonizovat inhibici enzymu thymidylátsyntetasy způsobenou methotrexátem. Výsledkem jsou narůstající nitrobuňkové koncentrace DHFA, vlastního kompetitoru s methotrexátem o vazebné místo na DHFR. Při dostatečně vysoké intracelulární koncentraci DHFA dochází k vytěsnění methotrexátu z vazby na enzym DHFR a k plnému obnovení funkce cyklu kyseliny listové.^{15,17}



Obr. 3.2.1.3 Mechanismus působení methotrexátu¹³

MTX proniká do buňky aktivním transportním mechanismem, jehož poruchou u nádorových buněk vzniká rezistence k MTX. Tu lze překonat nadměrným zvýšením dávky, jež by měla letální účinek na normálně proliferující buňky. Následné podání leukovorimu v opakovaných dávkách může účinek MTX v normálních buňkách zrušit, kdežto do nádorových buněk při porušeném transportním mechanismu leukovorin nepronikne. Na tom je založen princip podávání vysokých (gramových) dávek MTX.¹⁸

MTX může být v různých indikacích podáván jak perorálně, tak parenterálně (intramuskulárně, subkutánně, intravenózně, intraperitoneálně).²⁰ Pro nedostatečnou propustnost hematoencefalické bariéry se v indikovaných případech podává intratekálně. Plazmatická (celková) clearance (Cl_{tot}) MTX obsahuje složku metabolickou (Cl_{met}) a renální (Cl_{ren}). Cl_{met} znamená biotransformaci mateřské látky na 7-hydroxymethotrexát (význam tohoto metabolitu není dosud objasněn), zejména intracelulární konverzi (aktivaci) na polyglutamáty za přítomnosti polyglutamylsyntetasy. Polyglutamáty (methotrexát-glu_n) se ukládají, podobně jako endogenní foláty, intracelulárně, kde dlouhodobě přetrvávají a sdílejí s volným MTX cytotoxický účinek. Cl_{ren} představuje více než 60 % Cl_{tot} a děje se převážně glomerulární filtrací.¹⁵

Perorální podání:

Po perorálním podání se MTX téměř kompletně vstřebá, byly však zjištěny velké rozdíly v biologické dostupnosti v rozmezí 28 až 94 % v porovnání s intravenózně podanou látkou, což může mít za následek snížení účinnosti.¹⁷ MTX dosahuje maximální hladiny v séru během 1 až 3 hodin. Asi polovina absorbovaného množství se reverzibilně váže na bílkoviny séra a rychlým přechodem do tělesných tekutin a difúzí do buněk. Během 6 hodin se vyloučí 50 % podaného množství. Léčivo se vylučuje ledvinami (glomerulární filtrací a tubulární exkrecí), malá část se vylučuje játry (asi 6 %). Během 24 hodin po podání se vyloučí asi 50 až 80 % látky. Opakované denní

dávky stabilizují hladinu léčiva v séru a zároveň způsobují jeho kumulaci, zejména v játrech a ledvinách.¹⁸

Parenterální podávání:

Po parenterálním podání je MTX zpravidla úplně absorbován. Po intramuskulární injekci je maximální koncentrace v krvi dosaženo po 30 až 60 minutách. Po intravenózním podání je počáteční distribuční objem přibližně 0,18 l/kg (18 % tělesné hmotnosti) a v ustáleném stavu přibližně 0,4 až 0,8 l/kg (40 až 80 % tělesné hmotnosti). MTX pomalu proniká do tělních kompartmentů, jako je např. pleurální výpotek a ascites, kde byl po 6 hodinách zjištěn ustálený stav v porovnání s plazmatickou koncentrací. MTX soupeří s redukovanými foláty o nosiče v buněčném aktivním membránovém transportu. Při sérové koncentraci vyšší než 100 μM se stává nejdůležitější cestou k dosažení účinné intracelulární koncentrace MTX pasivní difúze. V séru je přibližně 50 % MTX vázáno na proteiny. MTX neprochází hematoencefalickou bariérou. V mozkomíšním moku lze dosáhnout vysokých koncentrací po intratekálním podání. Eliminace se děje především renální exkrecí a závisí na dávce. Po intravenózním podání se 44 až 100 % podané dávky vyloučí nezměněno do moči (glomerulární filtrací a tubulární exkrecí) do 24 hodin. Méně než 10 % podané dávky se vyloučí žlučí.^{15,18}

Dávkování a indikace:

Podání nízkých dávek (low - dose MTX, < 30 mg perorálně nebo subkutánně): farmakoterapie nezhoubných onemocnění (těžká forma psoriázy, revmatoidní polyartritida nebo Crohnova choroba).¹⁵

Podání střední (0,5 až 1 g/m^2) a zejména vysoké intravenózní dávky MTX podaného v infuzích (high - dose MTX, > 1 až 33 g/m^2): invazivní léčba ne Hodgkinského lymfomu a osteosarkomu. Předpokládá se, že vzestup extracelulární koncentrace MTX vlivem vysoké dávky navodí podmínky pro distribuci MTX do buňky cestou pasivní difúze, která je řízena koncentračním spádem. Tím nahradí aktivní saturabilní transport původně

určený pro THFA, kterým je MTX transportován intracelulárně při nízkých extracelulárních koncentracích. O aktivním saturabilním transportu rozhoduje buňka.¹⁵

Toxicita:

Výskyt a intenzita nežádoucích účinků MTX závisí především na dávce, délce užívání a celkovém stavu pacienta. Obecně se vyskytuje nevolnost a zvracení, průjmy, gastrointestinální krvácení a ulcerace, únava, horečky a snížená odolnost vůči infekcím. Dále se mohou vyskytovat fotosenzitivita, vyrážky na kůži, akné, depigmentace kůže a vypadávání vlasů. MTX může vyvolat poruchy krevního obrazu, hypoplazii kostní dřeně s leukopenií a trombocytopenií se zvýšením krvácivosti. Poškození ledvin může vzniknout v důsledku vysrážení metabolitu MTX v ledvinových kanálcích při kyselé reakci moče. Proto se doporučuje adekvátní hydratace a alkalizace moči. Hepatotoxicita přípravku může vést až k atrofii jaterní tkáně, nekróze, cirhóze, cystitidě, hyperurikémii, oligospermii, menstruačním poruchám, neplodnosti. Mohou se vyskytovat dýchací potíže, obstrukční choroba plicní. Účinky na CNS se mohou projevit bolestmi hlavy, poruchou vidění, afázií, parézou nebo křečemi, zvláště u nemocných po předchozím ozáření hlavy a páteře.¹⁵

Studie s MTX:

1. Studie byla založena na zkoumání účinku golimumabu (GLM, nová humánní monoklonální protilátka působící proti TNF- α) v kombinaci s MTX a MTX v kombinaci s placebem, v léčbě revmatoidní artritidy. Studie prokázala, že kombinace GLM s MTX dosáhla příznivější odpovědi na léčbu v porovnání s pacienty ve skupině MTX a placebo. Tudíž GLM v kombinaci s MTX u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou účinně snižuje projevy a příznaky revmatoidní artritidy.¹⁹

2. Randomizovaná studie zkoumala účinek MTX a leflunomidu v léčbě revmatoidní artritidy. Výsledky studie ukázaly, že významnější vliv má

leflunomid než MTX na parametry juxtaartikulární osteoporózy, protože docházelo k nižšímu zužování kloubních štěrbin po leflunomidu než po MTX.²⁰

3. Studie se zabývala analýzou exprese p53-signálních genů u maligních blastů po působení methotrexátu. MTX se používá u pacientů v léčbě akutní leukémie. Výsledky studie ukázaly, že vlastní odpověď leukocytů na čtyřdávkovou terapii MTX není objasněna. MTX navozuje u maligních blastů změny v expresi řady p53-signálních genů. Změní míru variability v transkripční aktivitě, jak při porovnávání expresních profilů v rámci jednotlivých typů leukémie, tak i u pacientů se stejnou diagnózou. Přesto se podařilo nalézt několik kandidátních genů, které by mohly hrát významnou úlohu při objasnění mechanismu buněčné odpovědi na působení cytostatika.²¹

4. Studie srovnávala perorální versus parenterální podávání MTX a subkutánní versus intramuskulární podávání MTX. Výsledky studie ukázaly, že parenterální způsob podání ve srovnání s perorálním nabízí rychlejší nástup účinku při vyšší biologické dostupnosti, nižším výskytu nežádoucích účinků na GIT a možnosti podávání nižších dávek MTX podle individuální potřeby.

Při subkutánním podávání MTX přistupuje ještě výhoda autoaplikace injekcí samotným pacientem a nižší bolestivost aplikace, což je spojeno se zvýšením kvality života pacienta. Současně přináší úsporu času nemocnému i zdravotnickému personálu a umožňuje pokračovat v této terapii i tam, kde jsou zapotřebí vyšší dávky MTX nebo kde je nedostupnost pracoviště k podání přípravku i. m.¹⁷

Registrované regulované léčivé přípravky v distribuci:

METHOTREXATE-TEVA 10 MG - POR TBL NOB 100X10 MG

METHOTREXAT "EBEWE" - INF CNC SOL

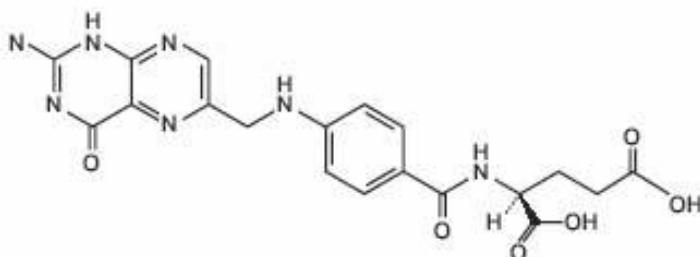
METHOTREXAT LACHEMA - INJ SOL

METHOTREXATE-TEVA - INJ SOL

METOJECT - ROZTOK NA INJEKCE, PŘEDPLNĚNÁ INJEKČNÍ STRÍKAČKA - INJ SOL (INJ a INF jsou k dispozici v různých koncentracích)

Předností MTX je, že je vhodným lékem do kombinaci, ať již s jinými chemickými chorobu modifikujícími léčivy nebo s biologickými léky. MTX má také příznivý poměr účinku a rizika.¹⁷

3.5 Kyselina listová



Obr. 3.5.1 Chemická struktura kyseliny listové²²

Kyselina N-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridylmethyl)-p-aminobenzoylglutamová

Objev tohoto vitamínu skupiny B spadá do 40. let minulého století, kdy byla prokázána identita faktoru nezbytného pro růst mikroorganismu *Lactobacillus casei* s kyselinou listovou, která byla v krystalické formě izolována v roce 1941 z listů špenátu. Její chemická struktura byla určena v roce 1944. Dobrymi zdroji kyseliny listové jsou především zelené části rostlin (hl. listová zelenina), játra, syrovátka. Kyselina listová je termolabilní, ve vodě rozpustná, je rozkládána světlem, podléhá oxidaci. Před oxidací ve vodním prostředí ji chrání vitamin C.

Molekula se skládá z pteridinového kruhu a kyseliny paraaminobenzoové, na jejíž karboxylovou skupinu je navázána molekula kyseliny glutamové. Pod názvem foláty se zahrnuje skupina dalších látek odvozených od kyseliny listové. V přírodě se vyskytují její deriváty, které mají ve své molekule navázáno až 6 zbytků kyseliny glutamové. Tyto deriváty vykazují nižší biologickou účinnost než kyselina listová.

Kyselina listová je v organismu nezbytná pro tvorbu koenzymů, pro syntézu purinů a pyrimidinů, pro erythropoézu a regeneraci methioninu.

Dále ovlivňuje syntézu histidinu, cholinu a serinu. Hlavním místem biologického působení jsou játra a hematopoetická tkáň. V mnoha biologických reakcích foláty fungují jako donory jednouhlíkatých skupin (formyl, methyl, hydroxymethyl). Kyselina listová je rovněž nezbytná pro konverzi homocysteinu na methionin.²³

Deficit a nadbytek:

Deficit kyseliny listové vede k hyperhomocysteinemii, což je rizikový faktor pro aterosklerózu a tedy i kardiovaskulární onemocnění. Deficit folátů může také přispívat k aberantní syntéze DNA a tedy i ke karcinogenezi snížením dostupnosti methioninu a interferencí s normální methylací DNA.

Nedostatek kyseliny listové může způsobovat útlum krve tvorby (anémii, leukopenii, trombocytopenii), dále únavu, snížení chuti k jídlu, nevolnost, průjem a vypadávání vlasů. Může způsobit i vředy v dutině ústní, bolesti jazyka či zpomalení růstu kojenců a dětí. Při nedostatku kyseliny listové těsně po oplodnění vajíčka dochází se zvýšenou pravděpodobností k rozštěpu neurální trubice. Celková zásoba folátů v organismu je limitována poločasem obratu, tj. asi 100 dní. Symptomy megaloblastické anémie se mohou manifestovat za 4 až 5 měsíců nedostatku kyseliny listové.^{23,24,25}

Vyšší příjem folátů je spojován s redukcí rizika rakoviny plic a tlustého střeva, zvláště u mírných alkoholiků.

Dávkování:

Doporučená denní dávka folátů je 25 až 35 µg dle věku pro kojence, 50 až 100 µg dle věku pro děti, 200 µg pro muže, 180 µg pro ženy. Zvýšený příjem je doporučen u těhotných žen a to 400 µg a u kojících žen ve výši 280 µg. Alkoholici, kuřáci, hemodialyzovaní pacienti, pacienti s poruchou GIT, pacienti dlouhodobě užívající kontraceptiva, cytostatika, steroidy, barbituráty, by měli také užívat zvýšené dávky.^{23,26}

Toxicita:

Toxicita kyseliny listové je relativně nízká. Supplementace ve vysokých dávkách (nad 5 mg/den) může maskovat příznaky nedostatku vitamínu B₁₂. Dále se může vyskytnout alergická reakce, dýchací obtíže, nauzea.²³

Perorální podání a metabolismus:¹⁸

Perorální podání je individuální v závislosti na indikaci. Perorálně podaná kyselina listová nekoriguje deficit folátů vyvolaných inhibitory dihydrofolátreduktázy, např. methotrexátem, zde je indikován leukovorin. Kyselina listová se dobře vstřebává v proximální části duodena. Kumuluje a metabolizuje se v játrech, hlavní účinný metabolit je 5-methyltetrahydrofolát, který se rozsáhle váže na plazmatické bílkoviny. Kyselina listová a její metabolity se distribuují do všech tkání, rovněž se aktivně koncentrují v cerebrospinalním moku. Foláty procházejí enterohepatálním oběhem a vylučují se močí. Denně se vyloučí v množství asi 4 až 5 µg. Procházejí placentární bariérou a vylučují se do mateřského mléka. Kyselina listová je dialyzovatelná. U jaterních chorob ztrácejí nemocní více než 0,1 mg kyseliny listové denně.

Parenterální podávání a metabolismus:¹⁸

Léčivý přípravek **Vorina**: sodná sůl kyseliny 5-formyltetrahydrofolové. Užívá se jako detoxikační činidlo pro antineoplastickou léčbu, čili ke zmenšení toxicity folátových antagonistů. Dále slouží jako zdroj koenzymové formy kyseliny folové. Často se používá k biologické modulaci účinku 5-fluoruracilu (5-FU), aby se posílila jeho cytostatická aktivita. Dále k prevenci a léčbě nedostatku folátů a k léčbě megaloblastické anemie způsobené nedostatkem folátů.

V methotrexátové terapii závisí dávkování Voriny na dávkování a metodě podávání MTX ve středních nebo vysokých dávkách. Této metodě se říká „foliante rescue“.

Léčivý přípravek **Leucovorin**: kalcii folinas

Používá se jako antidotum antifolátů (především methotrexátu), antianemikum, modulátor účinku 5-fluorouracilu.

Existuje mnoho schémat dávkování, která se liší podle druhu léčeného onemocnění a podle dávek MTX. Léčivo se podává s určitým zpožděním po aplikaci MTX, které však nesmí být příliš velké (4 až 8 hodin).

Studie s kyselinou listovou:

1. Cílem studie bylo zhodnotit relativní účinnost sublingválně versus perorálně podaného komplexu vitaminů B pro snížení hladiny sérového homocysteinu (tHcy). Každý komplex vitaminů B se skládal z 1000 µg vitaminu B₁₂ (jako metylkobalamin), 400 µg kyseliny listové a 5 mg vitaminu B₆. Statisticky významné snížení hodnot tHcy bylo pozorováno u obou skupin po ukončení 6-ti týdenní kúry. Výsledky: V séru nebyl statisticky významný rozdíl tHcy mezi sublingvální a perorální skupinou. Tudíž není žádný rozdíl v účinnosti mezi oběma formami podání.²⁷

2. Randomizovaná studie zkoumala, zda kombinace kyseliny listové s vitamínem B₁₂ a B₆ snižuje ohrožení kardiovaskulárními onemocněními u žen s touto diagnózou i bez ní. Studie probíhala 7,3 let u 5 442 žen a ukázala, že tato kombinovaná pilulka nesnížila riziko kardiovaskulárních příhod a to navzdory významnému snížení koncentrace homocysteinu.²⁸

3. Cílem randomizované studie byla analýza vztahů mezi farmakokinetikou a nežádoucími účinky MTX v iniciální fázi systémové léčby středně těžké a těžké psoriázy. Metody: Souhrnná analýza těch prospektivních otevřených randomizovaných studií zahrnula 63 nemocných s psoriázou. Koncentrace MTX v plazmě byly stanoveny HPLC a farmakokinetické parametry byly vypočteny nekompartmentovými postupy v programu Kinetica. Stav postižení kůže byl hodnocen pomocí PASI skóre (Psoriasis area and Severity index). Výsledky: Terapeutický účinek se rozvíjel postupně během 120 dní a byl nejmenší po týdenní dávce 7,5 mg jednorázově a největší po týdenní dávce 15 mg podané rozděleně do 3 dávek po 12 hodinách.

Farmakokinetika MTX byla lineární v dávkovém rozmezí 2,5 mg až 15 mg. Dále bylo zjištěno, že farmakologická suplementace kyselinou listovou (20 mg/týden) v iniciální fázi léčby středně těžké a těžké psoriázy methotrexátem (15 mg/týden p.o.) se terapeutický účinek zlepšil.²⁹

Registrované regulované a neregulované léčivé přípravky v distribuci:

LEUCOVORIN CA LACHEMA - INJ PLV SOL

LEUCOVORIN-TEVA - INJ SOL

VORINA - INJ SOL

ACIDUM FOLICUM LÉČIVA - POR TBL OBD 30X10 MG

Aktuální neregulované přípravky v distribuci:

KYSELINA LISTOVÁ tbl.

KYSELINA LISTOVÁ AKTIV cps.

KYSELINA LISTOVÁ FORTE tbl.

KYSELINA LISTOVÁ PLUS tbl.

KYSELINA LISTOVÁ SUPER tbl.

A další polykompozitní přípravky obsahující kyselinu listovou.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

azid sodný p.a.	Fluka, Buchs
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ČL 2002	Kulich, Hradec Králové
dimetikon kopolyol	Goldschmidt, Německo
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ČL 2002	Kulich, Hradec Králové
chlorid sodný	Lachema, Brno
isopropyl-myristát minimum 90%	Sigma-Aldrich, Praha
kofein ČL 2005	Kulich, Hradec Králové
kyselina listová	Sigma-Aldrich, Praha
methanol pro HPLC	Allied Signal, Seelze
diazolidinylmočovina 95%	Sigma-Aldrich, Praha
polyuretan (donorová membrána)	Elmarco, Liberec
propylenglykol ČL 2002	č. š. ECB 120502
propylglycerol-oleát	Goldschmidt, Německo
trypsin 1:250 z pankreatu prasete	Sigma-Aldrich chemie, Německo
voda čištěná	UK FAF, Hradec Králové
voda pro HPLC	UK FAF, Hradec Králové

Uvedené látky komerčně dostupné odpovídaly jakostním deklaracím podle norem výrobců, resp. dodavatelů.

4.2 Přístroje

Mraznička M 595/6015	Calex, Zlaté Moravce
Lednička Ardo	Ardo, Itálie
Analytické váhy VČ 02C.02.00.0D18	Sartorius, Gottingen
Digitální pH-metr GRYF 209S	Elektronické přístroje, Havl. Brod
Elektronická míchačka VČ 1000208	Variomag Labortechnik, Mnichov
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha
Ulترatermostat Haake L VČ 630414004	Haake, Berlín
Ultrazvuková lázeň VČ 300259	Tesla, Vráble
HPLC sestava HP 1200 Series	Agilent Technologies, USA

Analytický set pro HPLC Agilent Technologies, 1200 Series se skládal z izokratické pumpy, degaseru, autosampleru, termostatu a UV/VIS detektoru.
Software: ChemStation

4.3. Biologický materiál

K pokusům byly použity vzorky jazyka čerstvě poražených prasnic. Detaily metody jsou součástí příslušných SOP laboratoře.

1) Příprava netrypsinizované membrány: Prasečí jazyk byl omyt vlažnou vodou a následně z něj byla sejmuta sublingvální membrána. Ta byla poté konzervována, osušena, vložena do polyetylenových sáčků, zataveny a uchovány v mrazničce při -20 °C až do doby jejich použití.

2) Příprava trypsinizované membrány: Trypsin ve vodném roztoku byl vytemperován na 37°C v bakteriologickém termostatu BT 100. Po určitém časovém intervalu (18 až 36 hodin) byla membrána vyjmuta a následně trypsin důkladně promyt vodou.

4.4. Příprava konzervačního roztoku

Roztok byl použit pro konzervaci netrypsinizované membrány.

Složení:

chlorid sodný	90,0 g
čištěná voda	9910,0 g
azid sodný	0,2 g

Po navážení chloridu sodného a azidu sodného byly látky rozpuštěny v příslušném objemu čištěné vody.

4.5 Příprava fosfátového pufru

Pufr pH 7,4 byl použit jako akceptorový roztok pro kofein a kyselinu listovou (v1. měření bez diazolidinylmočoviny, v 2. měření s diazolidinylmočovinou jako antimikrobní látkou). Dále slouží pro přípravu impregnačního vehikula.

Složení:

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	2,1 g
hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	19,1 g
chlorid sodný	4,4 g
azid sodný	0,2 g
diazolidinylmočovina 95%	0,5 g

Postup:

Dihydrogenfosforečnan sodný se rozpustil v 500 ml čištěné vody. Hydrogenfosforečnan sodný se rozpustil v 400 ml čištěné vody. Poté se azid sodný nechal rozpustit v roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného. Z hydrogenfosforečnanového roztoku se odňalo 200 ml a ty se přidaly

4.7 Příprava kofeinových standardů HPLC

Pro permeaci byl použit kofein v podobě suspenze nebo roztoku.

Použité koncentrace standardů pro kalibraci :

10 mg/100ml, 5 mg/100ml, 1 mg/100ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/100ml.

Navážka kofeinu:

$m_{\text{cof}} = 0,01004 \text{ g}$

Postup:

Kofein byl po navážení kvantitativně vpraven do 100 ml odměrné baňky a rozpuštěn ve 100 ml tris-puftru. Ostatní standardy byly připraveny postupným ředěním základního roztoku.

Příprava tromethamolového puftru:

Puftr pH 7,4 byl použit pro přípravu standardů a jako akceptorový roztok pro kofein.

Složení:

tromethamol	24 g
azid sodný	0,02 g
voda pro HPLC	1000 ml
kyselina chlorovodíková	na pH 7,1

Postup:

Pevné podíly byly naváženy a rozpuštěny v 1000 ml ultračisté vody, pH roztoku bylo upraveno na 7,1 pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové, za použití digitálního pH-metru.

4.8. Příprava impregnačních vehikul

1 g FA.....100 ml vehikula

X g FA.....2 ml vehikula

X= 0,02 g = 20 mg FA 1%

0,02 g FA smísíme s 1,98 g vehikula.

4.8.1. 1. měření

1) FA s FP 7,4:

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g fosfátového pufru.

2) FA s FP 7,4 / PG:

FP 7,4 / PG v poměru 2:3 (40 ml:60 ml)

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g fosfátového pufru s propylenglykolem.

3) FA s IPM:

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g isopropyl-myristátu.

4) FA s EM1:

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g emulze 1.

5) FA s EM2:

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g emulze 2.

4.8.2. 2. měření

1) FA s IPM:

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g isopropyl-myristátu.

2) FA s FP 7,4 / PG:

FP 7,4 / PG v poměru 2:3 (40 ml:60 ml)

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g fosfátového pufru s propylenglykolem.

3) FA s propylglykol.

Impregnační vehikulum obsahuje 0,02 g FA a 1,98 g propylglycerol-oleátu.

4.9 Provedení permeačních pokusů

Každý vzorek jazyka (trypsinizovaný i netrypsinizovaný) byl umístěn mezi dvě destičky z umělé hmoty s kruhovým výřezem o ploše 2 cm² (permeační plocha tudíž činila 2 cm²). Trypsinizovaný vzorek se ale nejprve

musel umístit na filtrační papír ve tvaru kruhu a poté až byl vložen mezi dvě destičky. Zabránilo se tím propadnutí tenké trypsinizované membrány přes kruhový otvor destičky. Na stranu jazyka obsahujícího sublingvální membránu byl nanesen roztok nebo suspenze kofeinu, v odpoledních hodinách impregnační vehikulum s kyselinou listovou v množství 0,2 mg a následně překryto krycím sklíčkem. Tato sestava byla umístěna mezi donorovou a akceptorovou část permeační buňky.

Ve 2. měření jsme u některých vzorků použili polyuretanovou membránu, na ni jsme nanесли impregnační vehikulum s kyselinou listovou v množství 0,2 mg a nechali několik hodin impregnovat. Takto naimpregnovaná donorová membrána se položila na sublingvální trypsinizovanou či netrypsinizovanou membránu a následně překryla krycím sklíčkem. Tato sestava byla umístěna mezi donorovou a akceptorovou část permeační buňky.

Akceptorová část buňky byla naplněna roztokem fosfátového pufru s azidem sodným pH 7,4 (s antimikrobní přísadou nebo bez ní). Použitý objem akceptorového roztoku činil 20 ml na každou celu. Zbytkové objemy byly vpraveny do kalibrovaných zkumavek a odečteny s přesností na 0,1 ml. Z těchto údajů byl vypočítán přesný objem akceptorové fáze v každé permeační cele.

Takto byly buňky vloženy do temperované vodní lázně (37°C) a během celého pokusu promíchávány magnetickým míchadlem. Teplota ve vodní lázni byla kontrolována pomocí automatického teploměru.

V určených časových intervalech se odebralo z akceptorové fáze 0,6 ml vzorku a podrobilo HPLC stanovení.

Prvotní zpracování chromatografických záznamů a export dat realizoval Mgr. Pavel Berka.

4.10 Výsledky měření

Všechny potřebné údaje z permeačních pokusů jsou zaneseny v protokolech a prezentovány v části **5 Dokumentace**.

Výsledky permeačních pokusů vyjádřené formou fluxu **J** kofeinu a kyseliny listové jsou dále shrnuty v **tabulkách 6.1 až 6.9**.

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
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Subling. netrypsin.

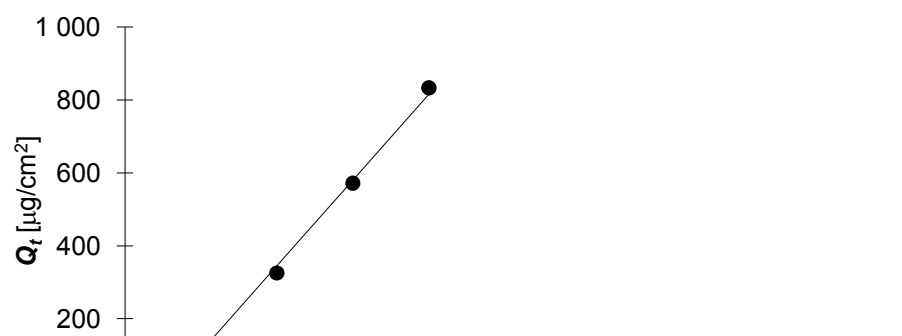
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,230	0,6	0,230	43,5	21,8
1	0,969	0,6	0,977	184,6	92,3
2	3,412	0,6	3,443	650,7	325,4
3	5,940	0,6	6,049	1 143,3	571,7
4	8,628	0,6	8,820	1 667,0	833,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	21,8	-7,5
1	92,3	110,1
2	325,4	345,4
3	571,7	580,7
4	833,5	815,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 235,2773
Abs. člen	q = -125,168
Korelační koef.	r = 0,997841





34

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
Q_f	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19$

Subling. netrypsin.

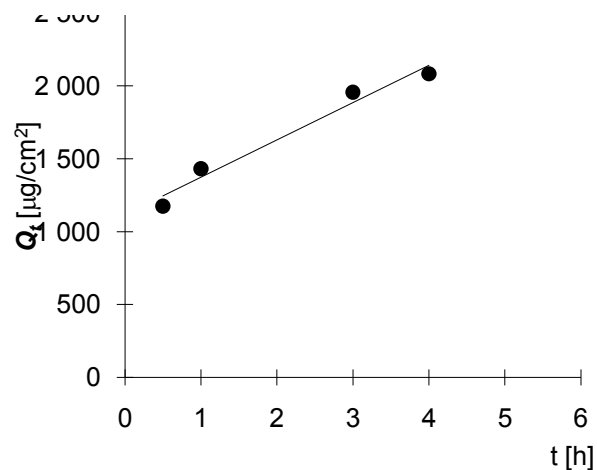
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
0,5	12,370	0,6	12,370	2 350,4	1 175,2
1	14,681	0,6	15,072	2 863,7	1 431,9
2	18,305	0,6	18,781	3 568,3	1 784,2
3	19,993	0,6	20,587	3 911,4	1 955,7
4	21,270	0,6	21,920	4 164,8	2 082,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,5	1175,2	1175,2
1	1431,9	1431,9
3	1955,7	1955,7
4	2082,4	2082,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 255,9039
Abs. člen	q = 1117,493
Korelační koef.	r = 0,984717



35

Protokol 3

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

$V_o = 19,1$

Subling. netrypsin.

Donor: FP 7,4

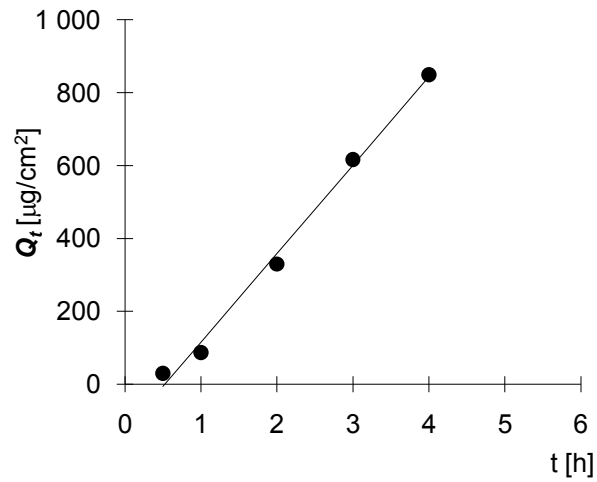
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,314	0,6	0,314	60,0	30,0
1	0,901	0,6	0,911	174,1	87,0
2	3,423	0,6	3,452	659,3	329,7
3	6,349	0,6	6,458	1 233,4	616,7
4	8,688	0,6	8,891	1 698,1	849,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	30,0	-6,1
1	87,0	115,3
2	329,7	358,2
3	616,7	601,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 242,88
Abs. člen	q = -127,556
Korelační koef.	r = 0,996721

4	849,1	844,0



36

Protokol 4

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 19,1

Subling. netrypsin.

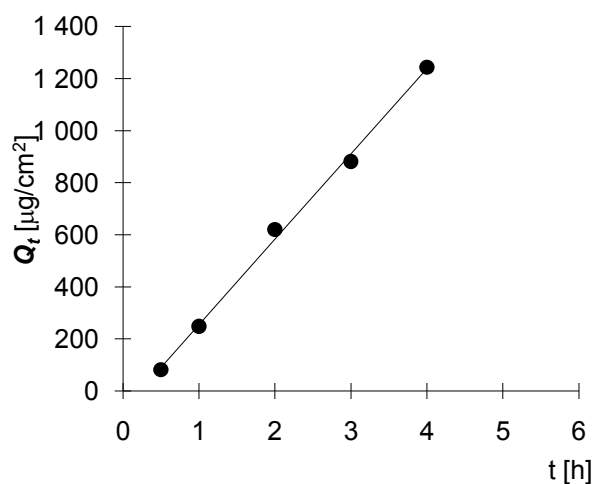
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
0,5	0,857	0,6	0,857	163,7	81,8
1	2,578	0,6	2,604	497,5	248,7
2	6,413	0,6	6,495	1 240,6	620,3
3	9,026	0,6	9,230	1 763,0	881,5
4	12,733	0,6	13,023	2 487,4	1 243,7

t	Qt (exp)	Qt (teor)
0,5	81,8	90,4
1	248,7	254,4
2	620,3	582,4
3	881,5	910,4
4	1243,7	1238,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 328,0242
Abs. člen	q = -73,6441
Korelační koef.	r = 0,998641



37

Protokol 5

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

$V_o = 18,1$

Subling. netrypsin.

Donor: FP 7,4

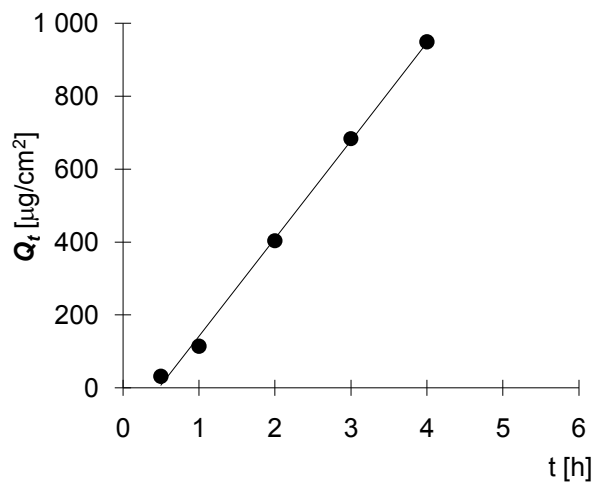
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,351	0,6	0,351	63,5	31,8

1	1,249	0,6	1,261	228,2	114,1
2	4,416	0,6	4,458	806,9	403,5
3	7,405	0,6	7,552	1 367,0	683,5
4	10,240	0,6	10,491	1 898,8	949,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,5	31,8	6,7
1	114,1	141,0
2	403,5	409,6
3	683,5	678,2
4	949,4	946,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 268,5774
Abs. člen	q = -127,569
Korelační koef.	r = 0,998797



38

Protokol 6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]

$V_o = 16,7$

Subling. netrypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μg] ve V_o
Q_t	[μg] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

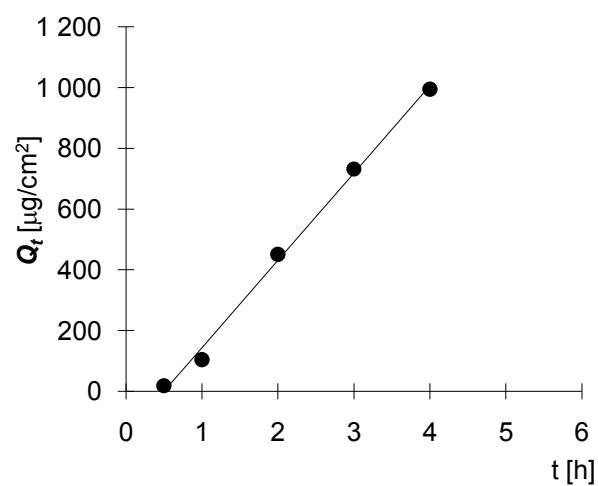
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,222	0,6	0,222	37,1	18,5
1	1,241	0,6	1,249	208,6	104,3
2	5,357	0,6	5,402	902,1	451,0
3	8,569	0,6	8,763	1 463,4	731,7
4	11,599	0,6	11,914	1 989,6	994,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	18,5	-0,2
1	104,3	143,6
2	451,0	431,3
3	731,7	719,0
4	994,8	1006,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 287,6981
Abs. člen	q = -144,088
Korelační koef.	r = 0,998099



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,3$

Subling. trypsin.

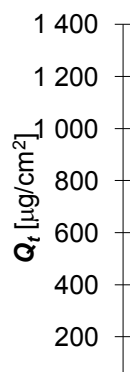
Donor: FP 7,4

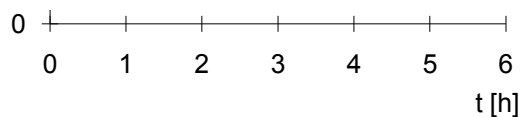
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	1,834	0,6	1,834	353,9	177,0
1	2,240	0,6	2,297	443,4	221,7
2	6,813	0,6	6,884	1 328,7	664,3
3	10,244	0,6	10,458	2 018,4	1 009,2
4	11,758	0,6	12,083	2 332,0	1 166,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	177,0	153,9
1	221,7	308,2
2	664,3	616,8
3	1009,2	925,3
4	1166,0	1233,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 308,5657
Abs. člen	q = -0,34945
Korelační koef.	r = 0,986251





40

Protokol 8

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Subling. trypsin.

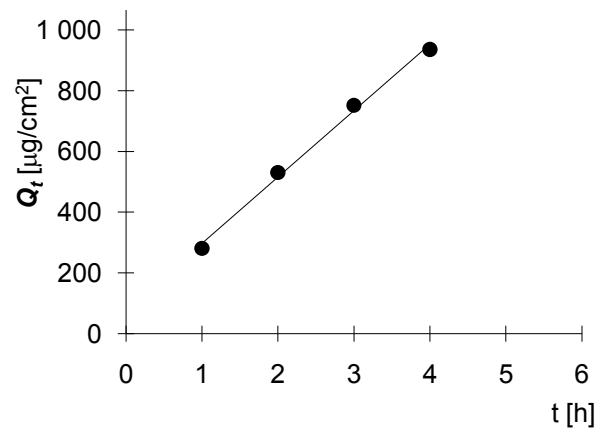
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,850	0,6	0,850	160,7	80,4
1	2,945	0,6	2,972	561,7	280,8
2	5,522	0,6	5,616	1 061,5	530,7
3	7,778	0,6	7,956	1 503,7	751,8
4	9,653	0,6	9,905	1 872,1	936,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	280,8	296,9
2	530,7	515,5
3	751,8	734,2
4	936,0	952,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 218,6693
Abs. člen	q = 78,18326
Korelační koef.	r = 0,997743



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,8$

Subling. trypsin.

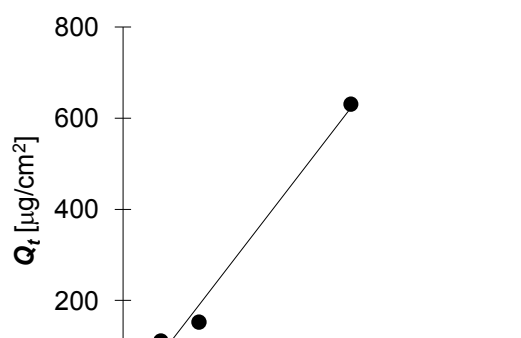
Donor: FP 7,4

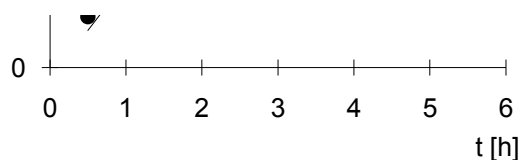
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	1,253	0,6	1,253	223,0	111,5
1	1,671	0,6	1,713	304,9	152,5
2	2,184	0,6	2,242	399,0	199,5
3	7,012	0,6	7,087	1 261,5	630,8
4	11,529	0,6	11,768	2 094,6	1 047,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	111,5	81,5
1	152,5	189,9
3	630,8	623,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 216,6994
Abs. člen	q = -26,81
Korelační koef.	r = 0,992915





42

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
Q_f	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,1$

Subling. trypsin.

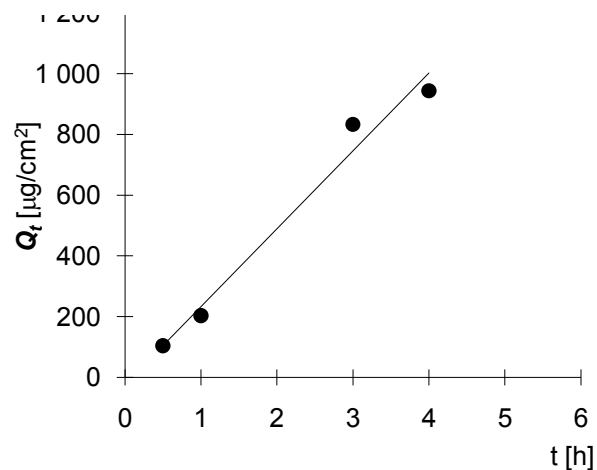
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
0,5	1,223	0,6	1,223	209,2	104,6
1	2,334	0,6	2,376	406,4	203,2
2	6,657	0,6	6,740	1 152,5	576,3
3	9,506	0,6	9,742	1 665,9	833,0
4	10,695	0,6	11,037	1 887,3	943,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,5	104,6	104,6
1	203,2	203,2
3	833,0	833,0
4	943,7	943,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 256,4511
Abs. člen	q = -23,8517
Korelační koef.	r = 0,989118



43

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
Q_f	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 20$

Subling. trypsin.

Donor: FP 7,4

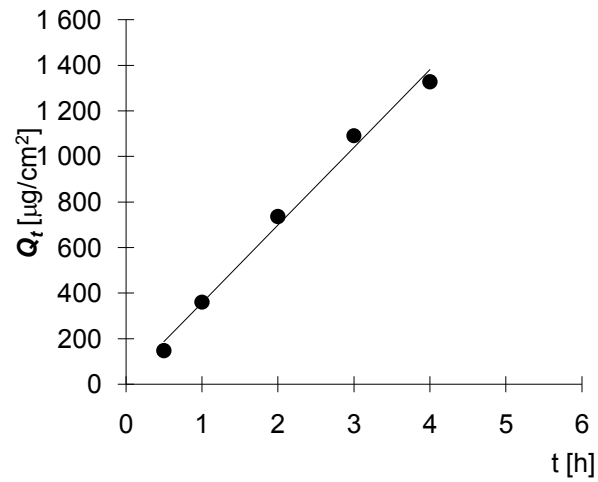
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
0,5	1,473	0,6	1,473	294,7	147,3
1	3,558	0,6	3,603	720,5	360,3
2	7,256	0,6	7,364	1 472,9	736,4
3	10,691	0,6	10,911	2 182,3	1 091,1
4	12,951	0,6	13,278	2 655,6	1 327,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,5	147,3	186,4
1	360,3	357,1
2	736,4	698,5
3	1091,1	1039,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 341,3641
Abs. člen	q = 15,7313
Korelační koef.	r = 0,995601

4	1327,8	1381,2



44

Protokol 12

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 19

Subling. trypsin.

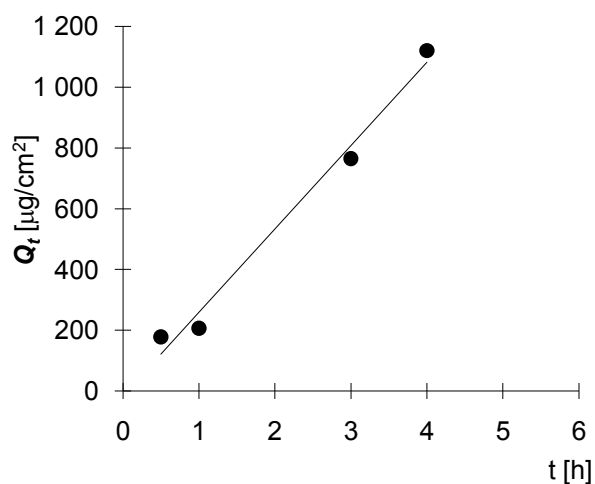
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
0,5	1,878	0,6	1,878	356,8	178,4
1	2,118	0,6	2,177	413,6	206,8
2	2,860	0,6	2,929	556,5	278,3
3	7,959	0,6	8,051	1 529,7	764,9
4	11,543	0,6	11,798	2 241,5	1 120,8

t	Qt (exp)	Qt (teor)
0,5	178,4	121,5
1	206,8	258,8
3	764,9	808,0
4	1120,8	1082,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 274,5838
Abs. člen	q = -15,7815
Korelační koef.	r = 0,992585



45

Protokol 13

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

$V_o = 19$

Subling. trypsin.

Donor: FP 7,4

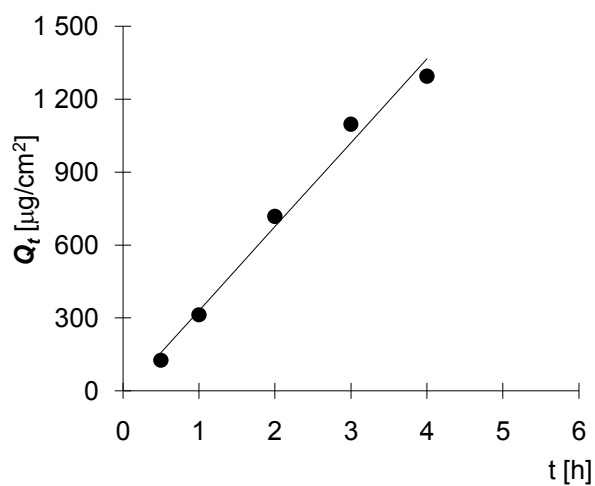
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	1,325	0,6	1,325	251,8	125,9

1	3,251	0,6	3,292	625,5	312,8
2	7,448	0,6	7,552	1 435,0	717,5
3	11,308	0,6	11,546	2 193,8	1 096,9
4	13,269	0,6	13,633	2 590,4	1 295,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,5	125,9	157,3
1	312,8	329,9
2	717,5	675,1
3	1096,9	1020,3
4	1295,2	1365,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 345,2178
Abs. člen	q = -15,3132
Korelační koef.	r = 0,99297



46

Protokol 14

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]

$V_o = 15,8$

Subling. trypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

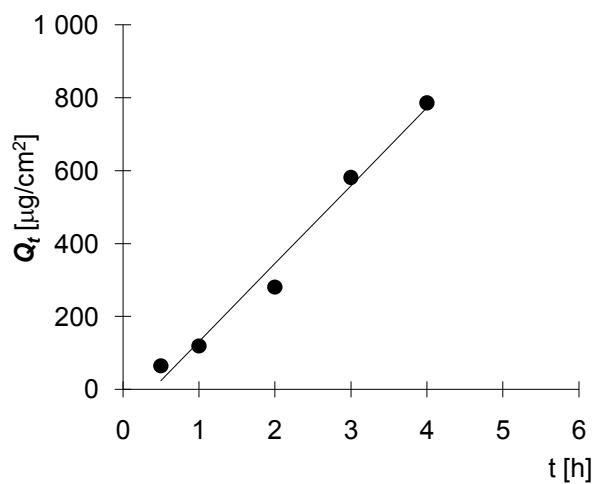
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	0,817	0,6	0,817	129,2	64,6
1	1,474	0,6	1,505	237,8	118,9
2	3,494	0,6	3,551	561,0	280,5
3	7,220	0,6	7,355	1 162,1	581,1
4	9,672	0,6	9,952	1 572,4	786,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	64,6	23,9
1	118,9	130,9
2	280,5	344,9
3	581,1	558,8
4	786,2	772,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 213,9637
Abs. člen	q = -83,0746
Korelační koef.	r = 0,99131



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 $V_o / 1cm^2$

Vo = 19

Subling. trypsin.

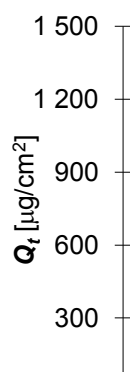
Donor: FP 7,4

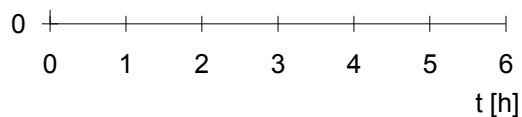
Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	1,809	0,6	1,809	343,8	171,9
1	3,018	0,6	3,075	584,3	292,1
2	5,920	0,6	6,017	1 143,3	571,7
3	9,338	0,6	9,528	1 810,3	905,1
4	11,395	0,6	11,696	2 222,2	1 111,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	171,9	167,0
1	292,1	305,6
2	571,7	582,7
3	905,1	859,8
4	1111,1	1136,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 277,0883
Abs. člen	q = 28,49608
Korelační koef.	r = 0,997587





Protokol 16

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Subling. trypsin.

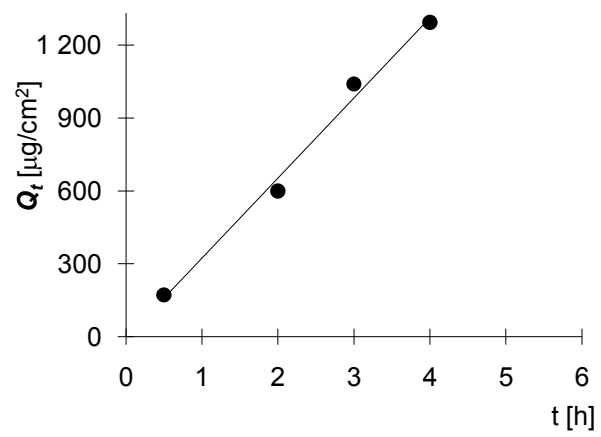
Donor: FP 7,4

Měření: Kofein

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,5	1,821	0,6	1,821	344,2	172,1
1		0,6	0,058	10,9	5,5
2	6,340	0,6	6,342	1 198,6	599,3
3	10,804	0,6	11,006	2 080,0	1 040,0
4	13,342	0,6	13,692	2 587,7	1 293,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,5	172,1	158,0
2	599,3	652,7
3	1040,0	982,4
4	1293,9	1312,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 329,7428$
Abs. člen	$q = -6,82311$
Korelační koef.	$r = 0,995424$



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Subling. netrypsin.

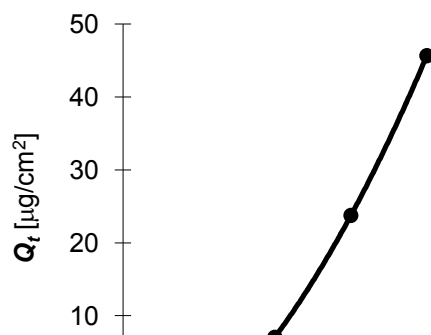
Donor: FP 7,4

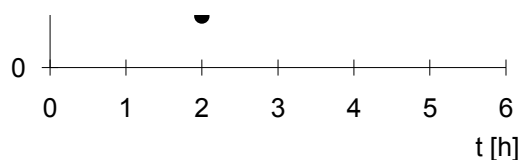
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1		0,6			
2	0,077	0,6	0,077	14,1	7,1
3	0,256	0,6	0,258	47,5	23,7
4	0,488	0,6	0,496	91,3	45,7
20	4,952	0,6	4,968	914,2	457,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	7,1	6,2
3	23,7	25,5
4	45,7	44,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 19,30416
Abs. člen	q = -32,4246
Korelační koef.	r = 0,996959





50

Protokol 18

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

$V_o = 19$

Subling. netrypsin.

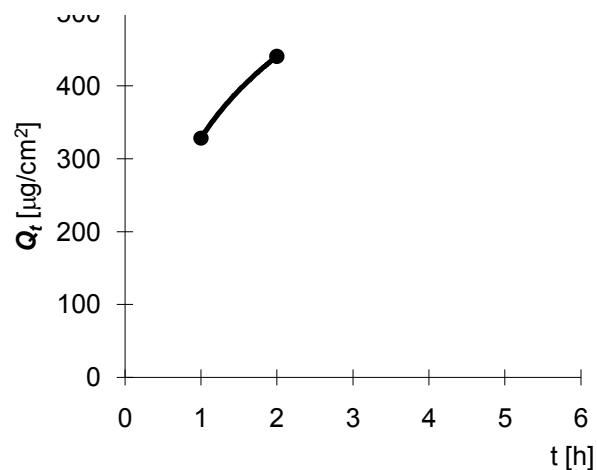
Donor: FP 7,4 / PPG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
1	3,455	0,6	3,455	656,5	328,2
2	4,525	0,6	4,634	880,5	440,3
3	4,675	0,6	4,821	916,0	458,0
4	4,779	0,6	4,931	936,9	468,4
20	7,541	0,6	7,697	1 462,4	731,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	328,2	328,2
2	440,3	440,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 2
Flux	J = 112,0246
Abs. člen	q = 216,2033
Korelační koef.	r = 1



51

Protokol 19

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

$V_o = 18,6$

Subling. netrypsin.

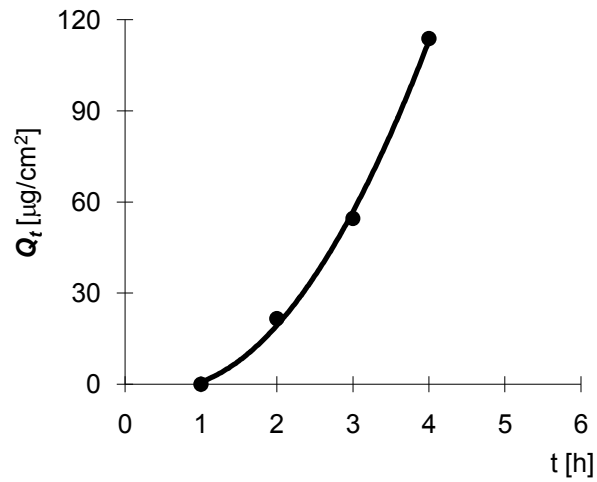
Donor: IPM

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
1		0,6			
2	0,232	0,6	0,232	43,2	21,6
3	0,579	0,6	0,587	109,1	54,6
4	1,205	0,6	1,224	227,6	113,8
20	7,026	0,6	7,065	1 314,1	657,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1		-8,7
2	21,6	28,8
3	54,6	66,2
4	113,8	103,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 37,43663
Abs. člen	q = -46,1071
Korelační koef.	r = 0,974916



52

Protokol 20

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,2

Subling. netrypsin.

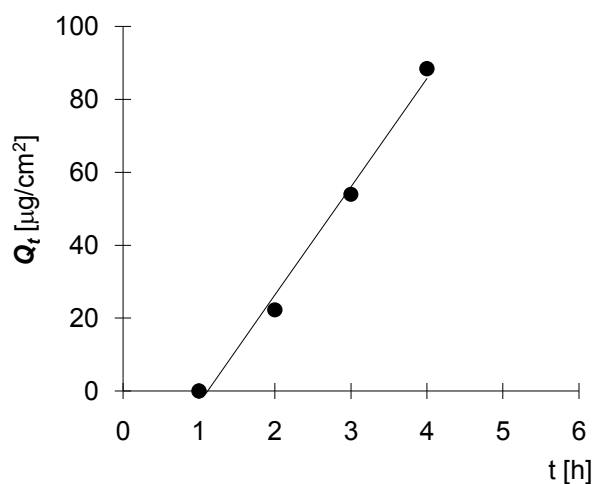
Donor: IPM

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
1		0,6			
2	0,245	0,6	0,245	44,5	22,3
3	0,585	0,6	0,593	108,0	54,0
4	0,952	0,6	0,971	176,8	88,4
20	6,961	0,6	6,993	1 272,8	636,4

t	Qt (exp)	Qt (teor)
1		-3,4
2	22,3	26,3
3	54,0	56,0
4	88,4	85,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 29,69044
Abs. člen	q = -33,0657
Korelační koef.	r = 0,995583



53

Protokol 21

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

$V_o = 18,2$

Subling. netrypsin.

Donor: EM 1

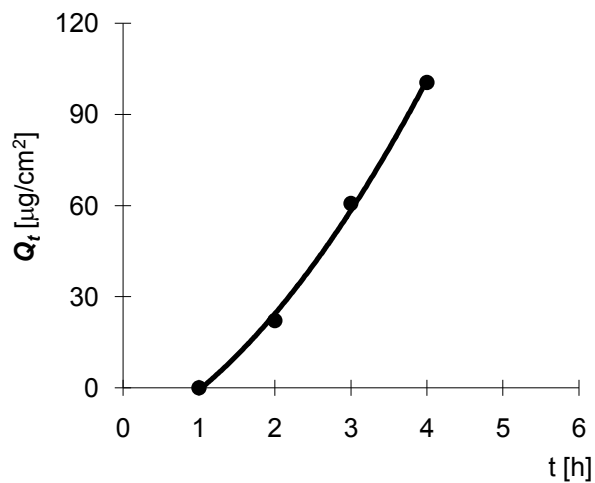
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1		0,6			

2	0,243	0,6	0,243	44,2	22,1
3	0,659	0,6	0,667	121,3	60,7
4	1,082	0,6	1,104	201,0	100,5
20	3,989	0,6	4,025	732,6	366,3

t	Qt (exp)	Qt (teor)
1		-5,2
2	22,1	28,8
3	60,7	62,8
4	100,5	96,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 34,00288
Abs. člen	q = -39,1866
Korelační koef.	r = 0,992319



54

Protokol 22

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]

Vo = 16,4

Subling. netrypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

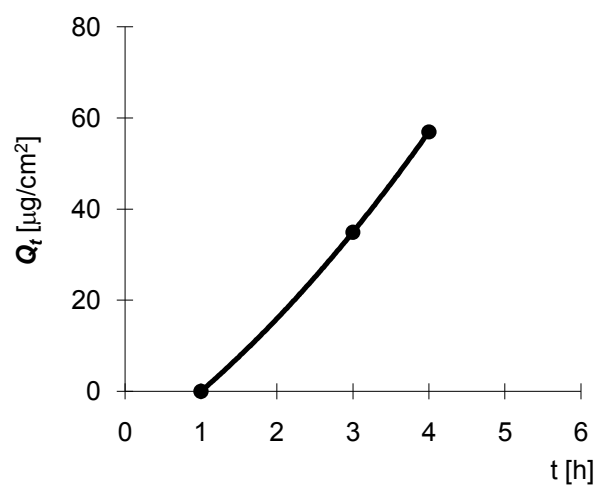
Donor: EM 2

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1		0,6			
2		0,6			
3	0,426	0,6	0,426	69,9	34,9
4	0,679	0,6	0,694	113,9	56,9
20	2,467	0,6	2,493	408,8	204,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1		-0,7
3	34,9	36,9
4	56,9	55,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 18,76565
Abs. člen	q = -19,4169
Korelační koef.	r = 0,998198



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 $V_o / 1cm^2$

Vo = 19

Subling. trypsin.

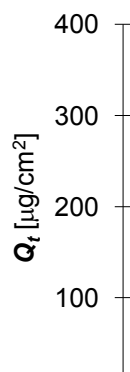
Donor: FP 7,4

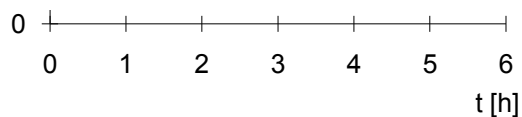
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,735	0,6	0,735	139,7	69,8
2		0,6	0,023	4,4	2,2
3	2,381	0,6	2,382	452,5	226,3
4	3,026	0,6	3,102	589,3	294,6
20	7,384	0,6	7,482	1 421,6	710,8
		0,6	0,236	44,9	22,4
		0,6	0,007	1,4	0,7
		0,6	0,000	0,0	0,0
			0,000	0,0	0,0

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	69,8	71,2
3	226,3	222,0
4	294,6	297,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 75,40625
Abs. člen	q = -4,17639
Korelační koef.	r = 0,999481





56

Protokol 24

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Subling. trypsin.

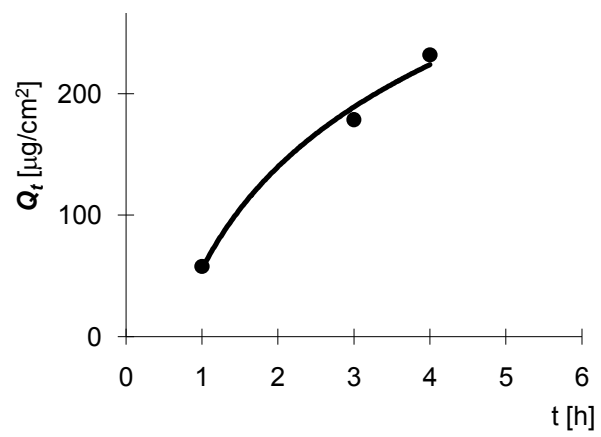
Donor: FP 7,4

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,622	0,6	0,622	115,6	57,8
2		0,6	0,020	3,7	1,9
3	1,921	0,6	1,922	357,4	178,7
4	2,433	0,6	2,495	464,0	232,0
20	6,292	0,6	6,372	1 185,3	592,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	57,8	58,8
3	178,7	175,6
4	232,0	234,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 58,40576
Abs. člen	q = 0,41751
Korelační koef.	r = 0,999541



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Subling. trypsin.

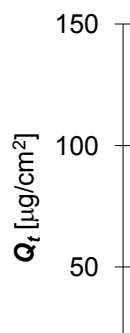
Donor: FP 7,4 / PPG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,251	0,6	0,251	44,1	22,1
2	0,633	0,6	0,642	113,0	56,5
3	0,991	0,6	1,013	178,3	89,2
4	1,287	0,6	1,321	232,5	116,3
20	4,678	0,6	4,723	831,3	415,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	56,5	57,4
3	89,2	87,3
4	116,3	117,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 29,89062
Abs. člen	q = -2,36795
Korelační koef.	r = 0,99856





58

Protokol 26

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

$V_o = 16,8$

Subling. trypsin.

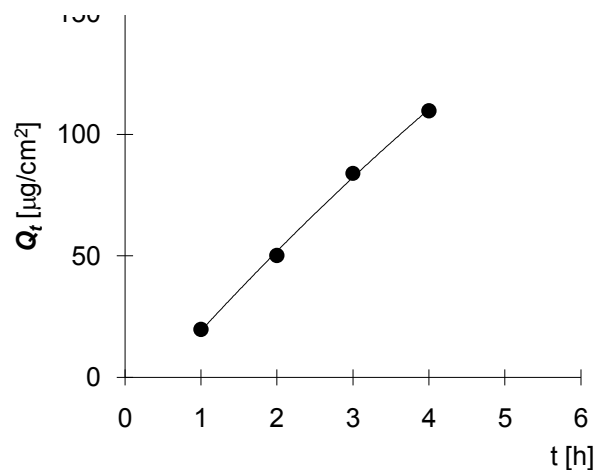
Donor: FP 7,4 / PPG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
1	0,235	0,6	0,235	39,5	19,7
2	0,589	0,6	0,598	100,4	50,2
3	0,978	0,6	1,000	168,0	84,0
4	1,271	0,6	1,306	219,5	109,7
20	5,593	0,6	5,639	947,4	473,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	19,7	19,7
2	50,2	50,2
3	84,0	84,0
4	109,7	109,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 30,37575
Abs. člen	q = -10,0211
Korelační koef.	r = 0,998709



59

Protokol 27

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

$V_o = 18,4$

Subling. trypsin.

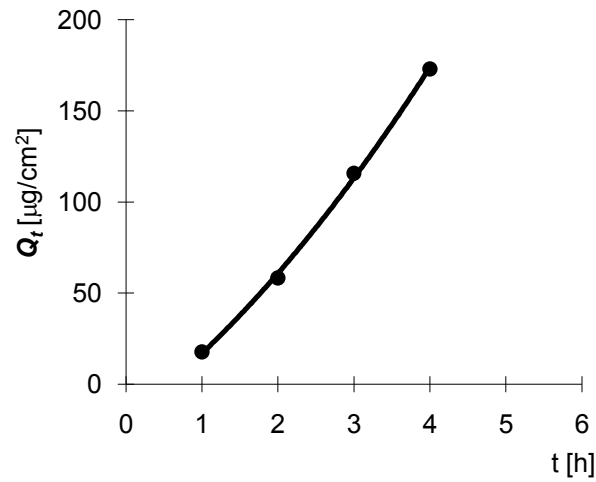
Donor: IPM

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,193	0,6	0,193	35,5	17,8
2	0,627	0,6	0,633	116,5	58,3
3	1,237	0,6	1,258	231,4	115,7
4	1,839	0,6	1,880	346,0	173,0
20	8,260	0,6	8,321	1 531,1	765,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	17,8	12,7
2	58,3	65,0
3	115,7	117,3
4	173,0	169,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 52,31
Abs. člen	q = -39,5881
Korelační koef.	r = 0,996905



60

Protokol 28

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,6

Subling. trypsin.

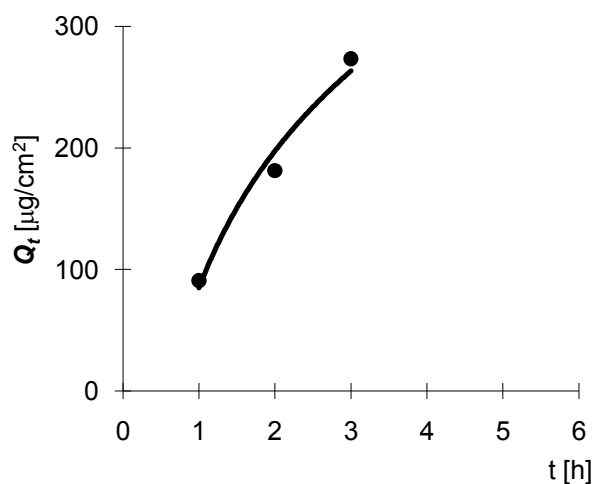
Donor: IPM

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
1	0,976	0,6	0,976	181,6	90,8
2	1,919	0,6	1,950	362,8	181,4
3	2,878	0,6	2,941	547,0	273,5
4	4,095	0,6	4,190	779,3	389,6
20	5,919	0,6	6,054	1 126,1	563,0

t	Qt (exp)	Qt (teor)
1	90,8	90,6
2	181,4	181,9
3	273,5	273,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 91,33676
Abs. člen	q = -0,7746
Korelační koef.	r = 0,999989



61

Protokol 29

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

$V_o = 18,4$

Subling. trypsin.

Donor: EM 1

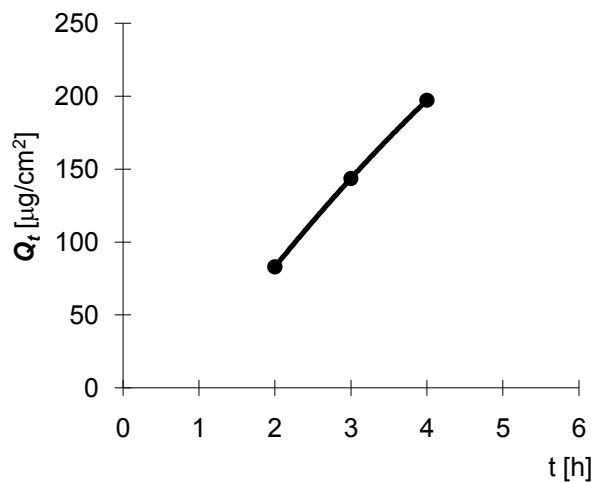
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,312	0,6	0,312	57,4	28,7

2	0,892	0,6	0,902	166,0	83,0
3	1,532	0,6	1,561	287,3	143,6
4	2,093	0,6	2,144	394,5	197,2
20	7,323	0,6	7,393	1 360,3	680,1

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	83,0	84,2
3	143,6	141,3
4	197,2	198,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 57,12689
Abs. člen	q = -30,089
Korelační koef.	r = 0,99937



62

Protokol 30

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]

Vo = 17,8

Subling. trypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

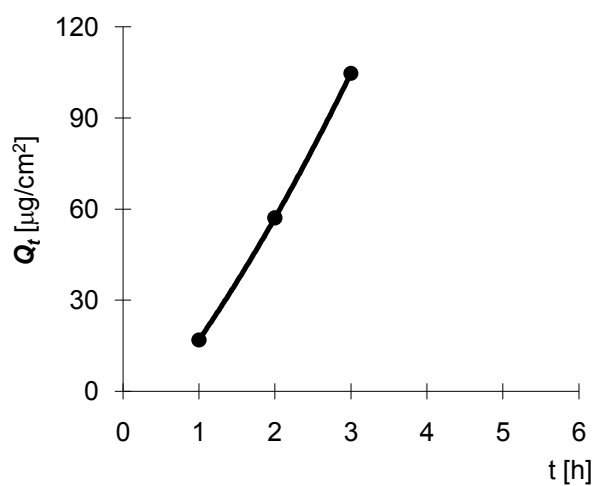
Donor: EM 1

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,190	0,6	0,190	33,9	16,9
2	0,635	0,6	0,641	114,2	57,1
3	1,155	0,6	1,176	209,4	104,7
4	1,576	0,6	1,616	287,6	143,8
20	5,969	0,6	6,023	1 072,1	536,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	16,9	15,7
2	57,1	59,6
3	104,7	103,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 43,88138
Abs. člen	q = -28,1905
Korelační koef.	r = 0,998795



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,8$

Subling. trypsin.

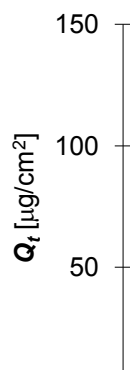
Donor: EM 2

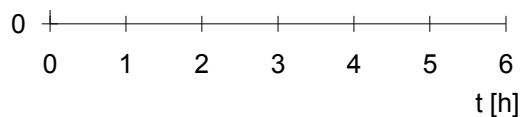
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,103	0,6	0,103	19,3	9,6
2	0,514	0,6	0,518	97,3	48,6
3	0,975	0,6	0,992	186,4	93,2
4	1,328	0,6	1,360	255,6	127,8
20	3,113	0,6	3,156	593,3	296,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	48,6	50,3
3	93,2	89,9
4	127,8	129,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 39,57664
Abs. člen	q = -28,8437
Korelační koef.	r = 0,997366





64

Protokol 32

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Subling. trypsin.

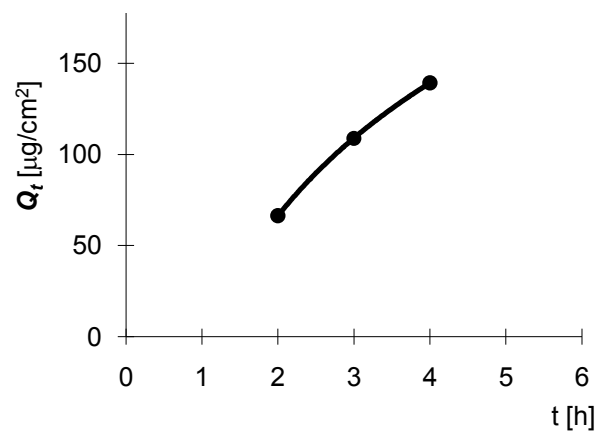
Donor: EM 2

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,255	0,6	0,255	46,9	23,4
2	0,713	0,6	0,721	132,7	66,3
3	1,159	0,6	1,182	217,6	108,8
4	1,476	0,6	1,514	278,6	139,3
20	2,615	0,6	2,664	490,3	245,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	66,3	68,3
3	108,8	104,8
4	139,3	141,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 36,48346
Abs. člen	q = -4,63711
Korelační koef.	r = 0,995577



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18$

Subling. trypsin.

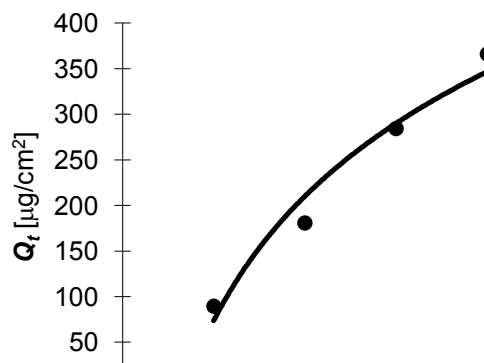
Donor: IPM

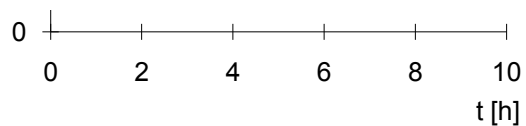
Měření: Fol.acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,995	0,6	0,995	179,1	89,5
4	1,974	0,6	2,007	361,2	180,6
6	3,091	0,6	3,157	568,3	284,2
8	3,963	0,6	4,068	732,2	366,1
19,5	5,416	0,6	5,552	999,3	499,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	89,5	90,1
4	180,6	183,4
6	284,2	276,8
8	366,1	370,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 46,66631
Abs. člen	q = -3,21981
Korelační koef.	r = 0,999096





66

Protokol 34

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

$V_o = 18,8$

Subling. trypsin.

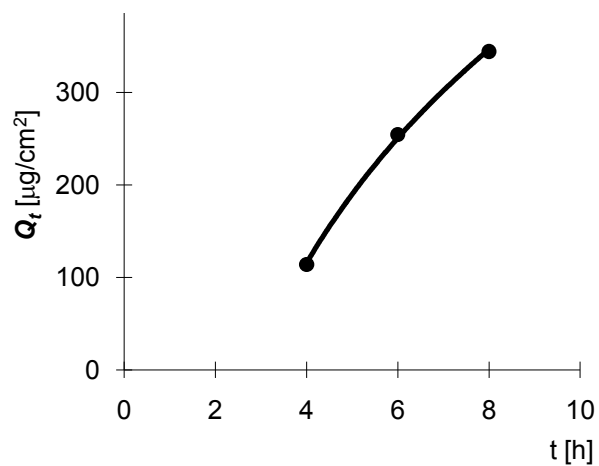
Donor: IPM

Měření: Fol.acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
2	0,603	0,6	0,603	113,4	56,7
4	1,192	0,6	1,212	227,8	113,9
6	2,667	0,6	2,706	508,7	254,4
8	3,575	0,6	3,662	688,4	344,2
19,5	4,802	0,6	4,919	924,8	462,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	113,9	113,9
6	254,4	254,4
8	344,2	344,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 57,57591
Abs. člen	q = -107,974
Korelační koef.	r = 0,992025



67

Protokol 35

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

$V_o = 18,6$

Subling. trypsin.

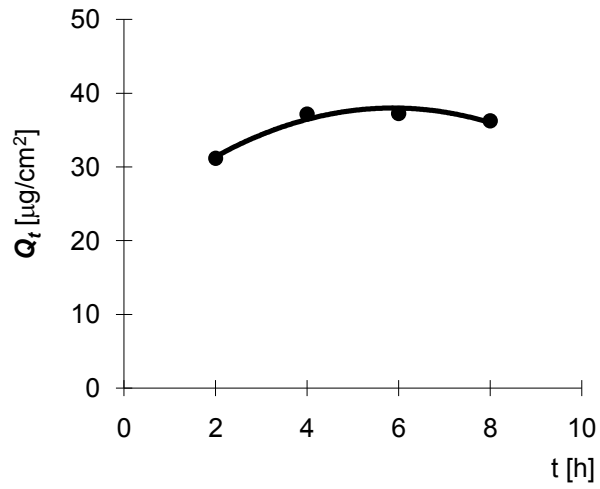
Polyur. IPM

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,335	0,6	0,335	62,3	31,2
4	0,389	0,6	0,400	74,4	37,2
6	0,388	0,6	0,401	74,5	37,3
8	0,377	0,6	0,390	72,5	36,2
19,5	1,105	0,6	1,118	207,9	104,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	31,2	33,2
4	37,2	34,7
6	37,3	36,2
8	36,2	37,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,766948
Abs. člen	q = 31,62836
Korelační koef.	r = 0,682329



68

Protokol 36

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 19,7

Subling. trypsin.

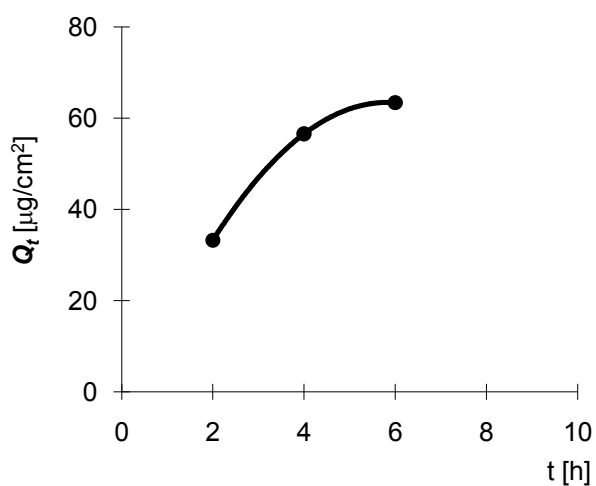
Polyur. IPM

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,337	0,6	0,337	66,5	33,2
4	0,564	0,6	0,574	113,1	56,6
6	0,626	0,6	0,644	126,8	63,4
8	0,616	0,6	0,636	125,3	62,6
19,5	1,727	0,6	1,747	344,1	172,1

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	33,2	36,0
4	56,6	51,1
6	63,4	66,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 7,546625
Abs. člen	q = 20,87921
Korelační koef.	r = 0,953872



69

Protokol 37

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,6

Subling. trypsin.

Polyur. IPM

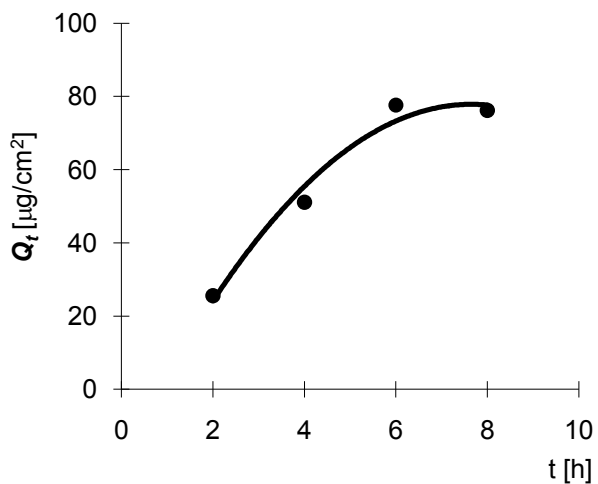
Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,275	0,6	0,275	51,2	25,6

4	0,541	0,6	0,549	102,2	51,1
6	0,817	0,6	0,835	155,3	77,6
8	0,792	0,6	0,819	152,4	76,2
19,5	1,598	0,6	1,624	302,1	151,1

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	25,6	30,9
4	51,1	48,7
6	77,6	66,5
8	76,2	84,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 8,915247
Abs. člen	q = 13,05306
Korelační koef.	r = 0,936289



70

Protokol 38

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]

Vo = 18,6

Subling. trypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

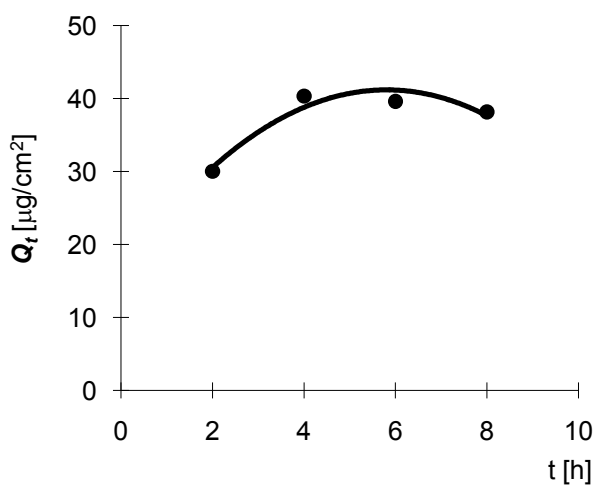
Polyur. IPM

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,323	0,6	0,323	60,1	30,0
4	0,423	0,6	0,434	80,7	40,3
6	0,412	0,6	0,426	79,2	39,6
8	0,397	0,6	0,410	76,3	38,2
19,5	0,855	0,6	0,868	161,4	80,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	30,0	33,5
4	40,3	35,9
6	39,6	38,2
8	38,2	40,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1,182543
Abs. člen	q = 31,12393
Korelační koef.	r = 0,641807



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,2$

Subling. netrypsin.

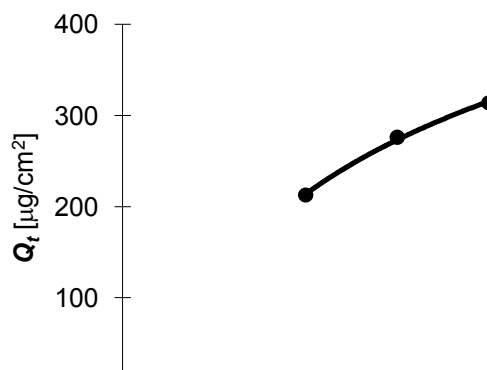
Donor: IPM

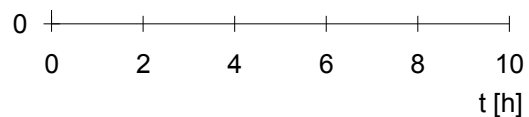
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,951	0,6	0,951	173,0	86,5
4	2,305	0,6	2,337	425,3	212,7
6	2,956	0,6	3,033	551,9	276,0
8	3,349	0,6	3,449	627,8	313,9
19,5	4,195	0,6	4,309	784,3	392,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	212,7	216,9
6	276,0	267,5
8	313,9	318,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 25,30907
Abs. člen	q = 115,6504
Korelační koef.	r = 0,989663





72

Protokol 40

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,3$

Subling. netrypsin.

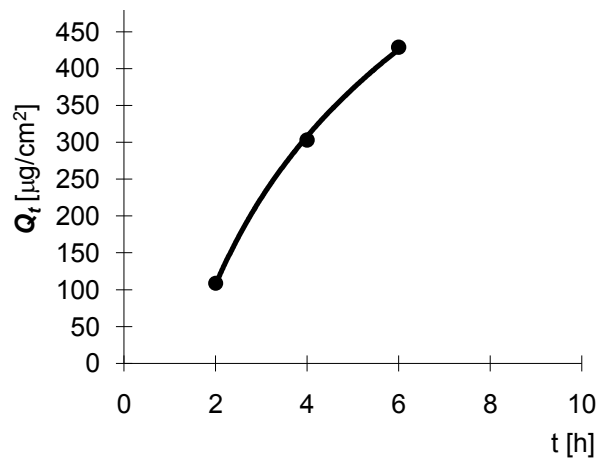
Donor: IPM

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	1,189	0,6	1,189	217,6	108,8
4	3,274	0,6	3,313	606,3	303,2
6	4,580	0,6	4,688	858,0	429,0
8	4,716	0,6	4,870	891,2	445,6
19,5	5,351	0,6	5,511	1 008,5	504,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	108,8	120,2
4	303,2	280,3
6	429,0	440,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 80,0473
Abs. člen	q = -39,8639
Korelační koef.	r = 0,992448



73

Protokol 41

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,2

Subling. netrypsin.

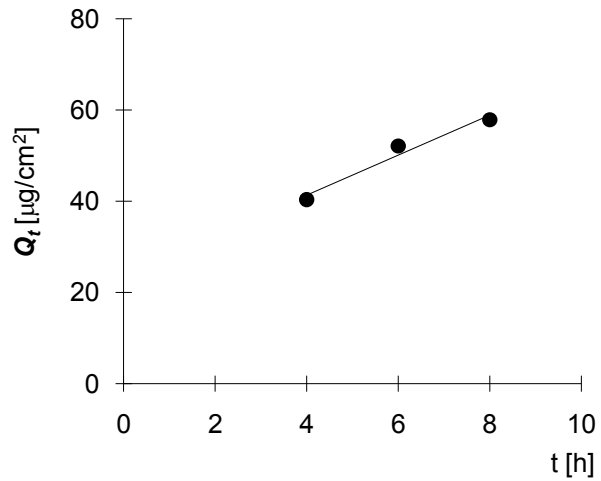
Polyur. IPM

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,148	0,6	0,148	27,0	13,5
4	0,439	0,6	0,443	80,7	40,4
6	0,558	0,6	0,573	104,2	52,1
8	0,617	0,6	0,636	115,7	57,9
19,5	1,249	0,6	1,270	231,2	115,6

t	Qt (exp)	Qt (teor)
4	40,4	41,4
6	52,1	50,1
8	57,9	58,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 4,379681
Abs. člen	q = 23,83238
Korelační koef.	r = 0,980971



74

Protokol 42

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _f	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,4

Subling. netrypsin.

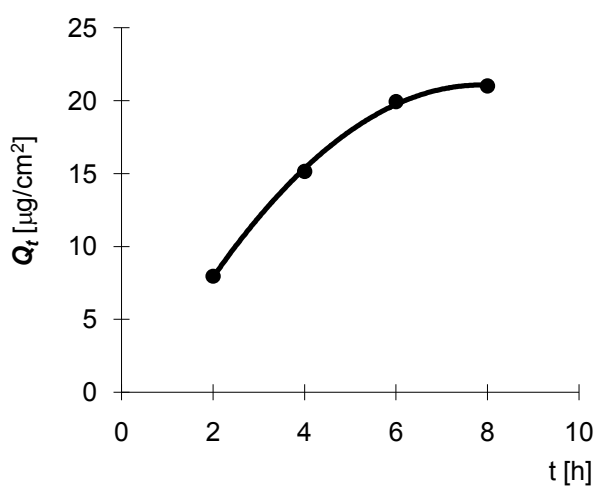
Polyur. IPM

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _f
2	0,087	0,6	0,087	15,9	8,0
4	0,162	0,6	0,165	30,3	15,2
6	0,211	0,6	0,217	39,9	19,9
8	0,221	0,6	0,228	42,0	21,0
19,5	0,967	0,6	0,975	179,3	89,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
2	8,0	9,4
4	15,2	13,8
6	19,9	18,2
8	21,0	22,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 2,19535
Abs. člen	q = 5,035253
Korelační koef.	r = 0,95426



75

Protokol 43

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

$V_o = 18,4$

Subling. netrypsin.

Polyur. IPM

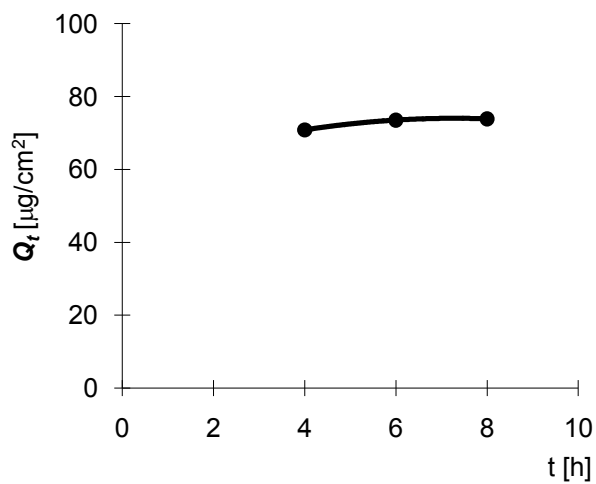
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
2	0,502	0,6	0,502	92,3	46,2
4	0,754	0,6	0,770	141,7	70,8

6	0,774	0,6	0,799	147,1	73,5
8	0,777	0,6	0,803	147,7	73,9
19,5	2,130	0,6	2,156	396,8	198,4

t	Qt (exp)	Qt (teor)
4	70,8	71,2
6	73,5	72,7
8	73,9	74,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 0,75784
Abs. člen	q = 68,19486
Korelační koef.	r = 0,912245



76

Protokol 44

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]

$V_o = 16,3$

Subling. netrypsin.

Polyur. IPM

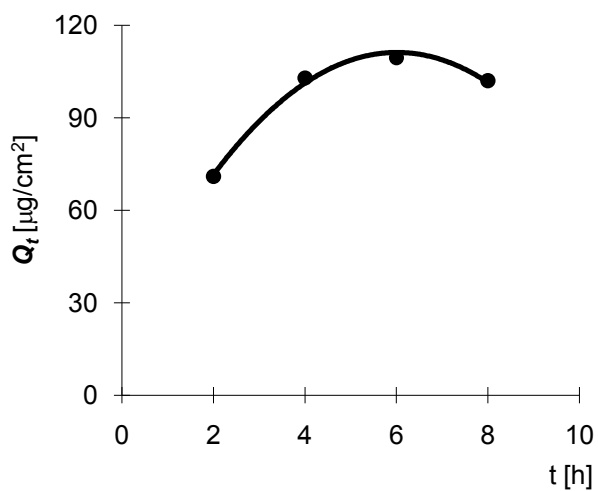
Q_t	[μg]	ve V_o
Q_t	[μg]	ve $V_o / 1\text{cm}^2$

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,871	0,6	0,871	141,9	71,0
4	1,231	0,6	1,263	205,8	102,9
6	1,297	0,6	1,343	219,0	109,5
8	1,202	0,6	1,252	204,0	102,0
19,5	1,765	0,6	1,811	295,1	147,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
2	71,0	81,4
4	102,9	91,4
6	109,5	101,3
8	102,0	111,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 4,984194
Abs. člen	q = 71,42063
Korelační koef.	r = 0,746483



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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,8$

Subling. netrypsin.

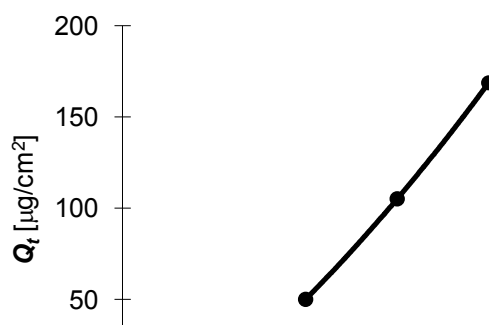
Donor: FP 7,4+PG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,093	0,6	0,093	15,6	7,8
4	0,592	0,6	0,596	100,1	50,0
6	1,230	0,6	1,251	210,2	105,1
8	1,964	0,6	2,009	337,5	168,7
19,5	6,345	0,6	6,417	1 078,0	539,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	50,0	48,6
6	105,1	108,0
8	168,7	167,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 29,67471
Abs. člen	q = -70,0858
Korelační koef.	r = 0,999135





78

Protokol 46

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

$V_o = 19,2$

Subling. netrypsin.

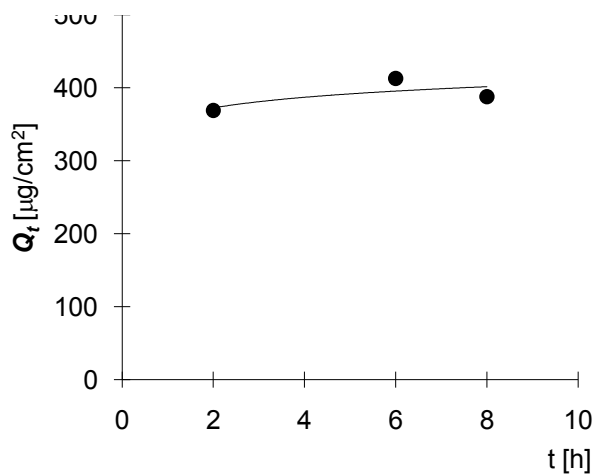
Donor: FP 7,4+PG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
2	3,842	0,6	3,842	737,6	368,8
4	4,538	0,6	4,658	894,3	447,1
6	4,155	0,6	4,301	825,7	412,9
8	3,905	0,6	4,039	775,5	387,7
19,5	4,108	0,6	4,234	813,0	406,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	368,8	368,8
6	412,9	412,9
8	387,7	387,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 4,277794
Abs. člen	q = 366,9811
Korelační koef.	r = 0,59144



79

Protokol 47

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _f	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,4

Subling. netrypsin.

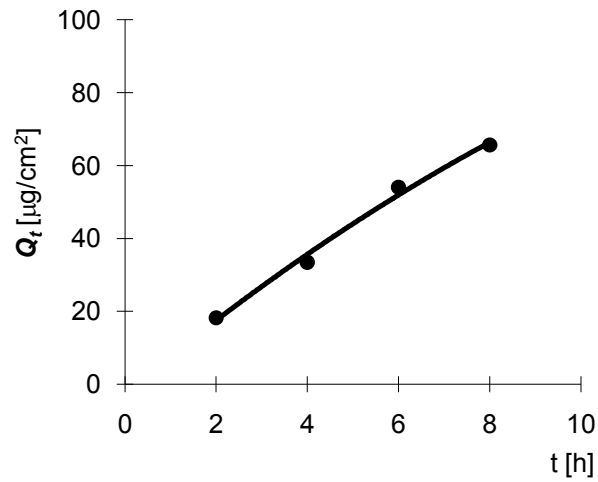
Polyur. FP 7,4+PG

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _f
2	0,198	0,6	0,198	36,5	18,2
4	0,358	0,6	0,364	67,0	33,5
6	0,576	0,6	0,588	108,1	54,1
8	0,694	0,6	0,714	131,3	65,6
19,5	1,973	0,6	1,996	367,2	183,6
		0,6	0,065	12,0	6,0
		0,6	0,002	0,4	0,2
		0,6	0,000	0,0	0,0
			0,000	0,0	0,0

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	18,2	18,4
4	33,5	34,7
6	54,1	51,0
8	65,6	67,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 8,140307
Abs. člen	q = 2,157857
Korelační koef.	r = 0,994901



80

Protokol 48

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,6

Subling. netrypsin.

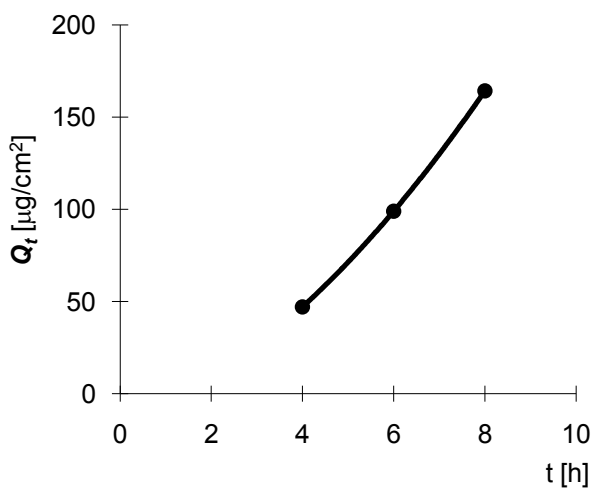
Polyur. FP 7,4+PG

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,143	0,6	0,143	26,6	13,3
4	0,501	0,6	0,506	94,1	47,1
6	1,048	0,6	1,064	198,0	99,0
8	1,732	0,6	1,766	328,6	164,3
19,5	3,637	0,6	3,694	687,1	343,6
		0,6	0,119	22,2	11,1
		0,6	0,004	0,7	0,4
		0,6	0,000	0,0	0,0
			0,000	0,0	0,0

t	Qt (exp)	Qt (teor)
4	47,1	44,8
6	99,0	103,4
8	164,3	162,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 29,30456
Abs. člen	q = -72,3895
Korelační koef.	r = 0,997839



81

Protokol 49

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

$V_o = 18,8$

Subling. netrypsin.

Polyur. FP 7,4+PG

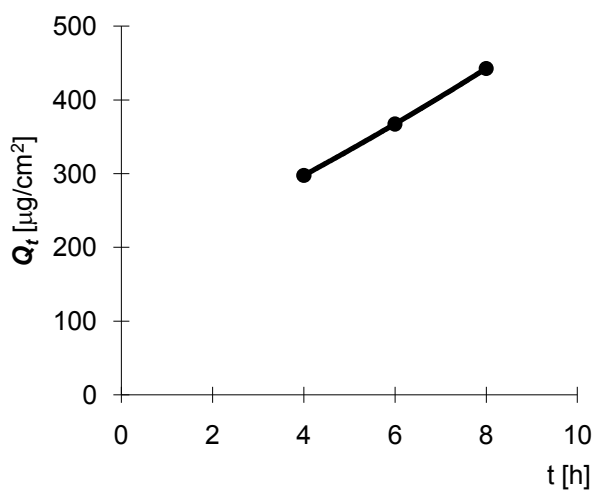
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	1,939	0,6	1,939	364,4	182,2

4	3,104	0,6	3,166	595,2	297,6
6	3,808	0,6	3,909	734,9	367,4
8	4,584	0,6	4,709	885,3	442,6
19,5	7,559	0,6	7,709	1 449,3	724,6

t	Qt (exp)	Qt (teor)
4	297,6	296,7
6	367,4	369,2
8	442,6	441,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 36,2607
Abs. člen	q = 151,6699
Korelační koef.	r = 0,999773



82

Protokol 50

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]

Vo = 16,6

Subling. netrypsin.

C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_f	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

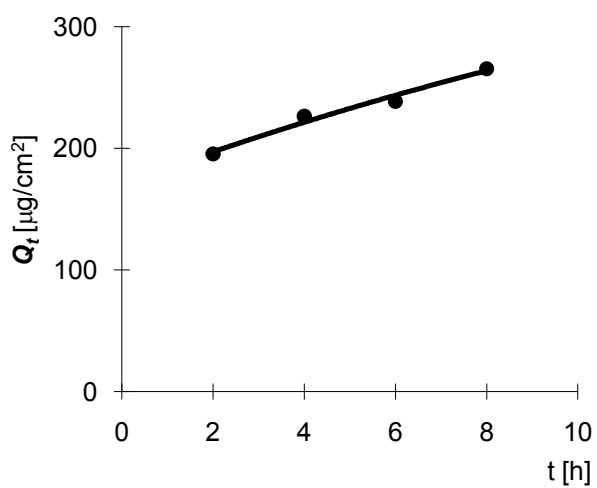
Polyur. FP 7,4+PG

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_f
2	2,355	0,6	2,355	390,9	195,5
4	2,643	0,6	2,728	452,8	226,4
6	2,777	0,6	2,875	477,3	238,6
8	3,095	0,6	3,198	530,9	265,5
19,5	5,475	0,6	5,591	928,1	464,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	195,5	198,2
4	226,4	220,4
6	238,6	242,6
8	265,5	264,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 11,11116
Abs. člen	q = 175,9442
Korelační koef.	r = 0,988089



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 $V_o / 1cm^2$

Vo = 17

Subling. netrypsin.

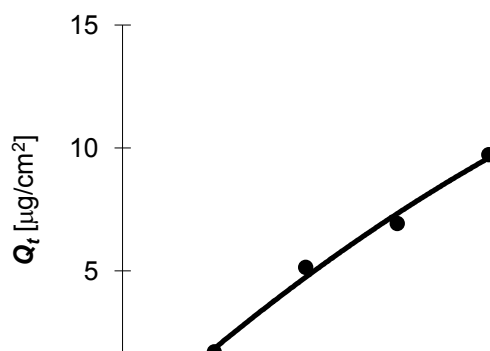
Donor: Propylgl-ol.

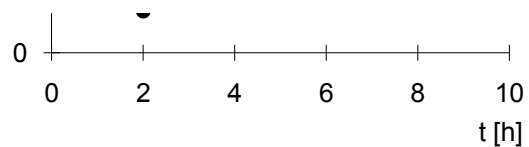
Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,020	0,6	0,020	3,4	1,7
4	0,060	0,6	0,060	10,3	5,1
6	0,079	0,6	0,082	13,9	6,9
8	0,112	0,6	0,114	19,5	9,7
19,5	0,920	0,6	0,924	157,0	78,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	1,7	2,0
4	5,1	4,6
6	6,9	7,2
8	9,7	9,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1,29381
Abs. člen	q = -0,59199
Korelační koef.	r = 0,993272





84

Protokol 52

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 $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,2$

Subling. netrypsin.

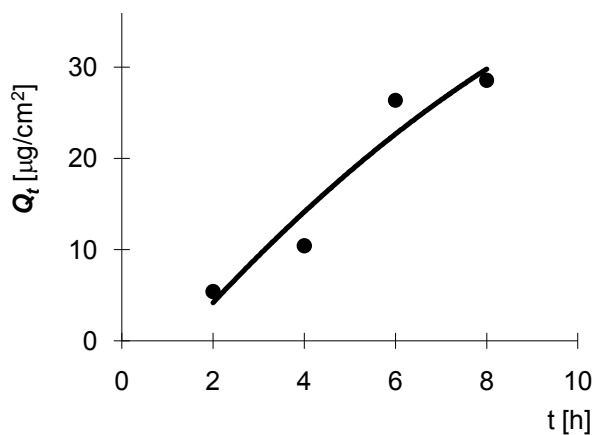
Donor: Propylgl-ol.

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,063	0,6	0,063	10,8	5,4
4	0,119	0,6	0,121	20,8	10,4
6	0,302	0,6	0,307	52,7	26,4
8	0,321	0,6	0,332	57,1	28,6
19,5	1,639	0,6	1,651	284,0	142,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
2	5,4	4,9
4	10,4	13,4
6	26,4	22,0
8	28,6	30,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 4,271479
Abs. člen	q = -3,66809
Korelační koef.	r = 0,958255



85

Protokol 53

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 16,8

Subling. netrypsin.

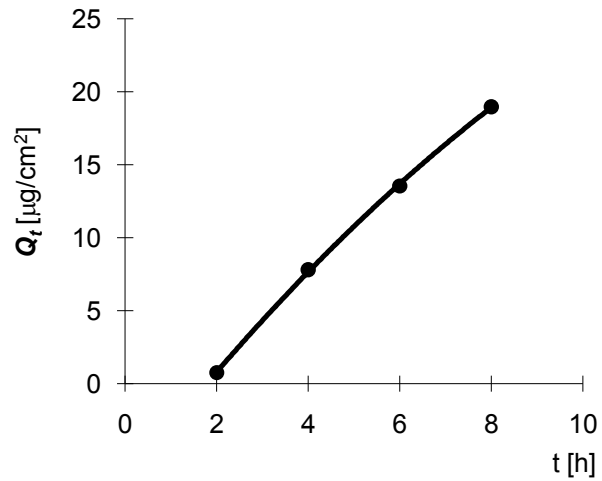
Polyur. Propylgl-ol.

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,009	0,6	0,009	1,5	0,8
4	0,093	0,6	0,093	15,6	7,8
6	0,158	0,6	0,161	27,1	13,5
8	0,220	0,6	0,226	37,9	19,0
19,5	1,356	0,6	1,364	229,1	114,5

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	0,8	1,2
4	7,8	7,2
6	13,5	13,3
8	19,0	19,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 3,020441
Abs. člen	q = -4,83384
Korelační koef.	r = 0,998056



86

Protokol 54

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _t	[µg] ve V _o / 1cm ²

Vo = 18,4

Subling. netrypsin.

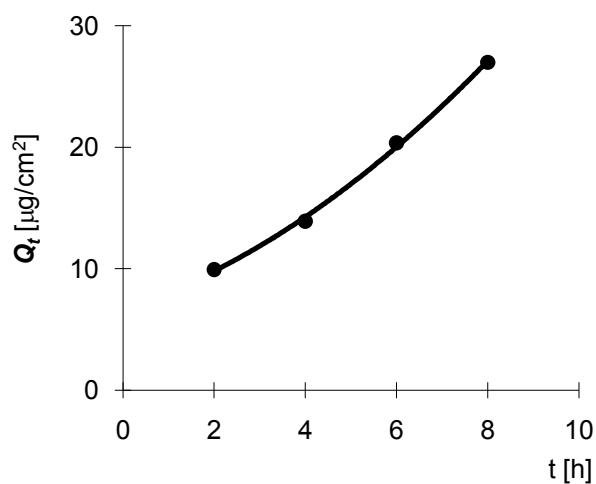
Polyur. Propylgl-ol.

Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _t
2	0,108	0,6	0,108	19,9	9,9
4	0,148	0,6	0,151	27,8	13,9
6	0,216	0,6	0,221	40,7	20,4
8	0,286	0,6	0,293	54,0	27,0
19,5	0,893	0,6	0,902	166,0	83,0

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	9,9	9,2
4	13,9	14,9
6	20,4	20,7
8	27,0	26,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 2,880832
Abs. člen	q = 3,394993
Korelační koef.	r = 0,994054



87

Protokol 55

V _o	[ml]
t	[h]
C _{nk}	[mg/100ml]
ΔV _{dop}	[ml]
C _k	[mg/100ml]
Q _t	[µg] ve V _o
Q _f	[µg] ve V _o / 1cm ²

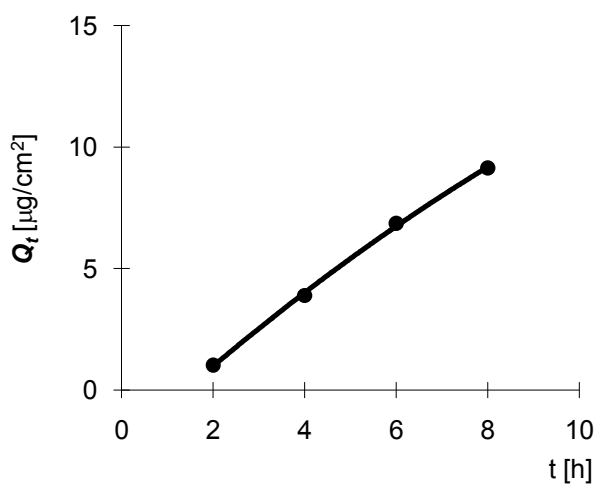
Vo = 18,2
Subling. netrypsin.
Polyur. Propylgl-ol.
Měření: Fol. acid

t	C _{nk}	ΔV _{dop}	C _k	Q _t	Q _f
2	0,011	0,6	0,011	2,1	1,0
4	0,042	0,6	0,043	7,8	3,9

6	0,074	0,6	0,075	13,7	6,9
8	0,098	0,6	0,100	18,3	9,1
19,5	1,252	0,6	1,255	228,5	114,2

t	Qt (exp)	Qt (teor)
2	1,0	1,1
4	3,9	3,9
6	6,9	6,6
8	9,1	9,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1,36562
Abs. člen	q = -1,59787
Korelační koef.	r = 0,99843



88

Protokol 56

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]

$V_o = 18,2$

Subling. netrypsin.

Polyur. Propylgl-ol.

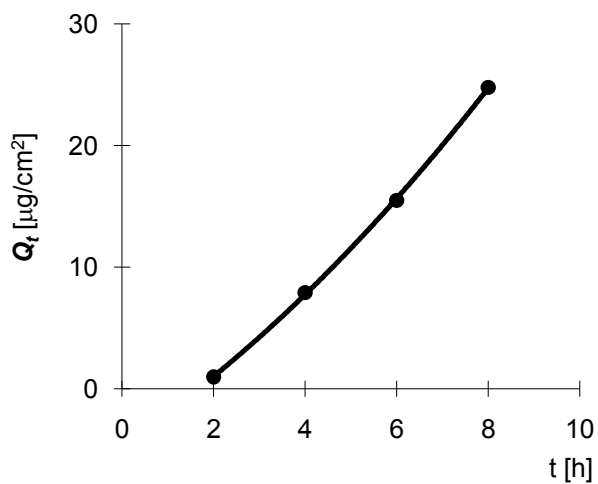
Q_t	[μg]	ve V_o
Q_t	[μg]	ve $V_o / 1\text{cm}^2$

Měření: Fol. acid

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
2	0,011	0,6	0,011	1,9	1,0
4	0,087	0,6	0,087	15,8	7,9
6	0,167	0,6	0,170	31,0	15,5
8	0,267	0,6	0,272	49,6	24,8
19,5	1,505	0,6	1,514	275,5	137,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
2	1,0	0,4
4	7,9	8,3
6	15,5	16,2
8	24,8	24,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 3,951789
Abs. člen	q = -7,47305
Korelační koef.	r = 0,99771



6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Permeace sublingválních membrán byly provedeny podle standardních postupů Katedry Farmaceutické technologie UK FAF Hradec Králové.

Ze získaných údajů závislosti koncentrace kofeinu a kyseliny listové v akceptorové fázi na čase byly sestaveny průběhy permeace ze zkoumaných vzorků (viz protokoly v části **5 Dokumentace**). Taková zobrazení umožnila odečty přímkových částí časové závislosti permeovaného množství kofeinu a kyseliny listové a výpočet směrnice této části průběhu permeace. Současně byl vždy vyčíslen flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] kofeinu a kyseliny listové jako základní výstupní parametr permeačních pokusů.

V následujících tabulkách jsou uvedeny fluxy kofeinu a kyseliny listové seřazeny podle typu membrány (trypsinizované či netrypsinizované), dále podle vehikul a donorové membrány. V tabulkách jsou dále uvedeny průměrné hodnoty fluxů (tučně) a směrodatná odchylka jednotlivých fluxů kofeinu a kyseliny listové (kurzívou).

Tab. 6.1 Výsledky permeace kyseliny listové trypsinizovanou a netrypsinizovanou membránou z IPM bez polyuretanové membrány

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
TR	NTR
52.3	37.4
91.3	29.7
46.7	25.3
57.6	80.0
62.0	43.1
<i>17.4</i>	<i>21.8</i>

Pokud srovnáme parametry permeace kyseliny listové z IPM bez polyuretanové donorové membrány, zjistíme, že se výsledky u trypsinizované i netrypsinizované sublingvální membrány významně neliší. Hodnoty fluxů zjevně nejsou statisticky odlišné.

Tab. 6.2 Výsledky permeace kofeinu trypsinizovanou a netrypsinizovanou membránou z FP 7,4

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
TR	NTR
308.6	235.3
218.7	255.9
216.7	242.9
256.5	328.0
341.4	268.6
274.6	287.7
345.2	-
214.0	-
277.1	-
329.7	-
278.2	269.7
49.0	31.1

Z uvedených hodnot fluxů kofeinu vyplývá, že kofein, jakožto velmi hydrofilní látka, permeuje jak přes trypsinizovanou, tak netrypsinizovanou membránu prakticky shodně, bez větších rozdílů fluxů.

Tab. 6.3 Výsledky permeace kyseliny listové trypsinizovanou a netrypsinizovanou membránou z IPM s polyuretanovou membránou

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$]	
TR	NTR
0.8	4.4
7.5	2.2
8.9	0.8
1.2	5.0
4.6	3.1
3.7	1.7

Jak lze z hodnot fluxů vyčíst, i v tomto případě se permeace kyseliny listové z IPM u trypsinizované a netrypsinizované membrány neliší.

Když srovnáme hodnoty fluxů kyseliny listové z IPM s polyuretanovou membránou a bez ní, zjistíme, že kyselina listová proniká mnohem lépe ze vzorků bez polyuretanové membrány.

Tab 6.4 Výsledky permeace kyseliny listové z disperzí EM1 a EM2 netrypsinizovanou membránou

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$]	
EM1	EM2
34.0	18.8
34.0	18.8
0.0	0.0

Pokus byl proveden pouze s dvěma buňkami, jedna byla s donorovou soustavou EM1 a druhá s disperzí EM2, v obou případech s netrypsinizovanou membránou. Velký rozdíl v hodnotě fluxů je sice patrný a ukazuje na to, že by kyselina listová mohla z hydrofilní EM1 pronikat rychleji, je to však výsledek jen orientační, vlastně první.

Tab 6.5 Výsledky permeace kyseliny listové z EM1 a EM2 trypsinizovanou membránou

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
EM1	EM2
57.1	39.6
43.9	36.5
50.5	38.0
6.6	1.5

Pokud srovnáme průměrné hodnoty fluxů kyseliny listové u trypsinizované membrány, zjistíme, že větší koncentrace v akceptorové fázi opět byla naměřena u donorových vzorků EM1. V tomto případě závěr musí být opět chápán jen jako orientační.

Při celkovém srovnání průniku kyseliny listové jsme zjistili, že kyselina listová vždy prostupuje lépe z EM1, ať se jedná o trypsinizovanou nebo netrypsinizovanou membránu.

Tab 6.6 Výsledky permeace kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z propylglycerol-oleátu s polyuretanovou membránou a bez membrány

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$]	
Polyuretan. Memb.	Žádná memb.
3.0	1.3
2.9	4.3
1.4	-
4.0	-
2.8	2.8
0.9	1.5

Z průměrné hodnoty fluxů lze v tomto případě vyčíst, že kyselina listová z propylglycerol-oleátu proniká prakticky stejně, ať je inkorporována do polyuretanové membrány nebo nikoli.

Tab 6.7 Výsledky permeace kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z FP 7,4 / PG s polyuretanovou membránou nebo bez membrány

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$]	
Polyuretan. Memb.	žádná memb.
8.1	112.0
29.3	29.7
36.3	4.3
11.1	-
21.2	70.8
11.9	41.2

Při použití FP 7,4 / PG jako vehikula, kyselina listová permeuje mnohem rychleji netrypsinizovanou membránou bez použití polyuretanové membrány. Hodnotu 4,3 není do průměru zahrnuta, neboť permeační křivka nevyšla správně.

Tab 6.8 Výsledky permeace kyseliny listové trypsinizovanou membránou z FP 7,4 / PG bez polyuretanové membrány

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]
Žádná memb.
29.9
30.4
30.1
0.2

Pokud srovnáme permeaci kyseliny listové z P 7,4 / PG přes trypsinizovanou a netrypsinizovanou membránu, tak lze s jistou určitostí říci, že kyselina listová z FP 7,4 / PG proniká nejlépe skrz netrypsinizovanou membránu bez polyuretanové membrány.

Tento zjištění je odlišné od všech ostatních výsledků, neboť tam kyselina listová permeovala vždy lépe přes trypsinizovanou membránu. Nevíme tedy, zda můžeme tento výsledek považovat za relevantní.

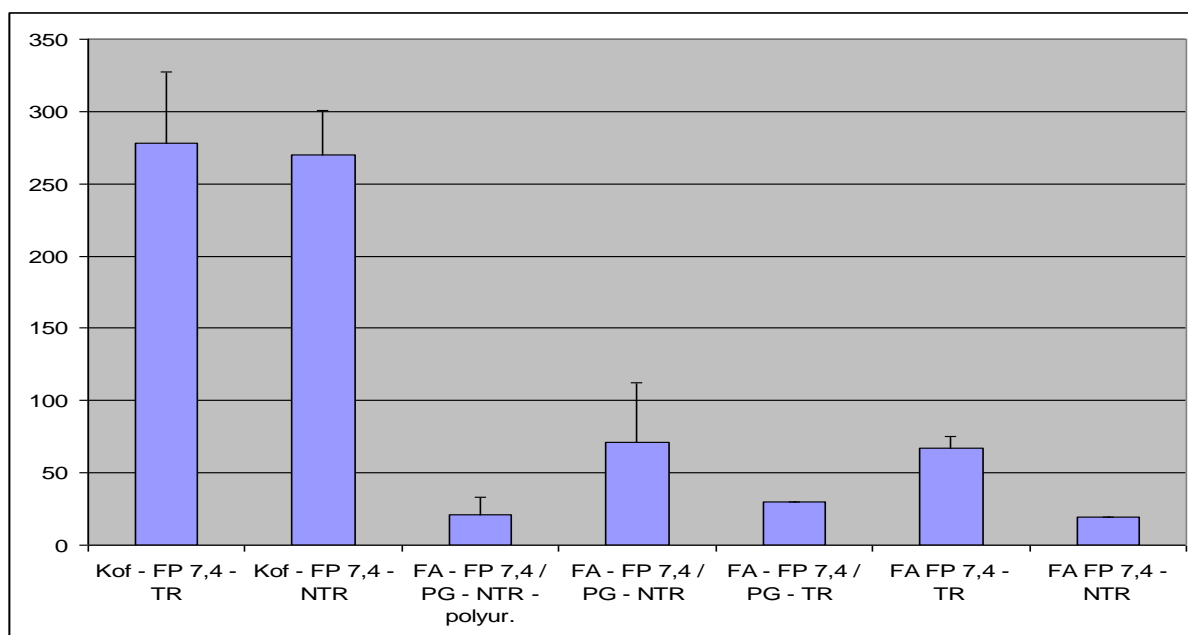
Tab 6.9 Výsledky permeace kyseliny listové trypsinizovanou a netrypsinizovanou membránou z FP 7,4

Flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
TR	NTR
75.4	19.3
58.4	-
66.9	19.3
8.5	0.0

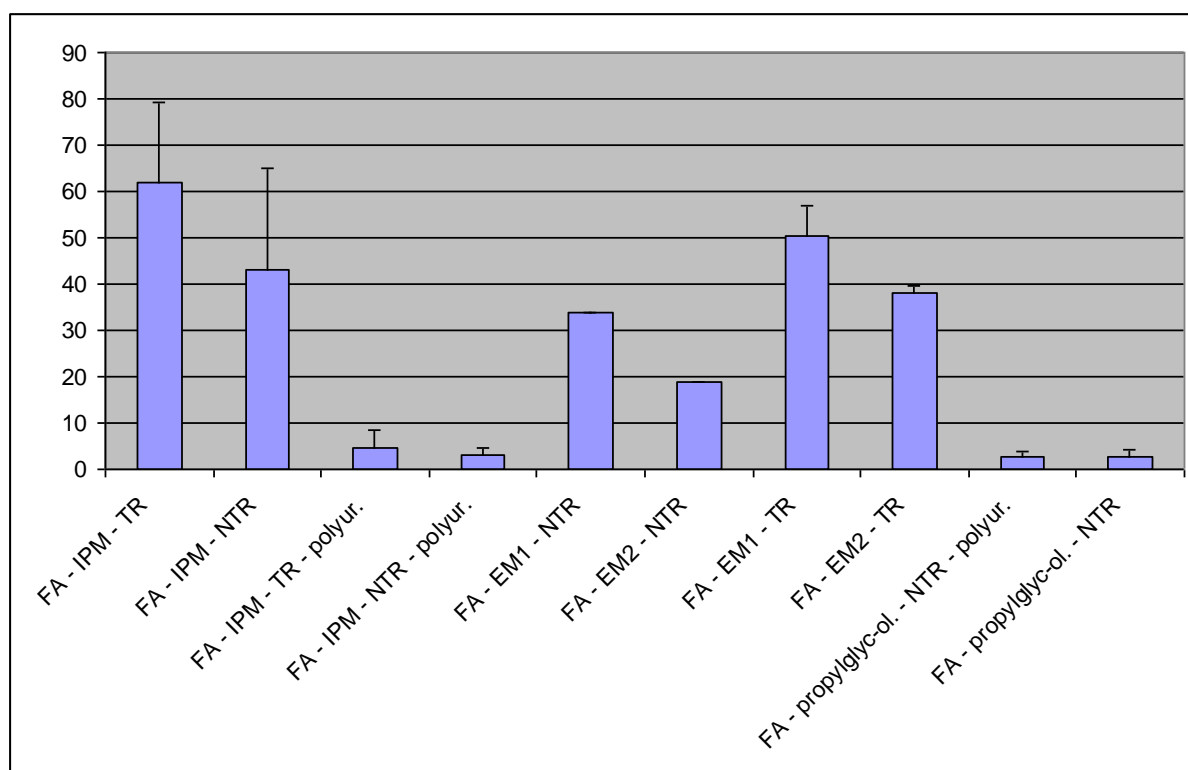
Při srovnání průměrných hodnot fluxů, je zřejmé, že kyselina listová z FP 7,4 lépe permeuje do akceptorové fáze přes netrypsinizovanou membránu.

Následující grafy souhrnně srovnávají průměrné hodnoty fluxů kofeinu jako markeru integrity membrány a kyseliny listové permeující z různých vehikul.

Graf 6.1 Průměrné hodnoty fluxů kofeinu a kyseliny listové z FP 7,4 a FP 7,4 / PG



Graf 6.2 Průměrné hodnoty fluxů kyseliny listové z IPM, EM1, EM2 a propylglycerol-oleátu



Dále hodnotí, zda látky pronikají lépe skrz trypsinizovanou, či netrypsinizovanou membránu a zda dojde k rychlejšímu průniku do akceptorové fáze při použití polyuretanové membrány, či nikoli.

Kofein jako marker integrity membrány nevykazuje významné rozdíly ať už pronikal skrz trypsinizovanou či netrypsinizovanou membránu.

Z použitých vehikul FP 7,4 a FP 7,4 / PG pronikala kyselina listová i kofein velmi podobně a velmi slibně.

Průměrné hodnoty fluxů těchto hydrofilních vehikul a EM1 jsou v tomto případě porovnatelné s hodnotami fluxů IPM jako hydrofobního vehikula, při níž kyselina listová permeovala přes trypsinizovanou membránu.

Ať už se jednalo o trypsinizovanou, či netrypsinizovanou membránu, naměřená hodnota fluxů kyseliny listové z propylglycerol-oleátu byla velmi nízká. Toto vehikulum se neosvědčilo.

S opatrností můžeme podotknout, že kyselina listová permeuje lépe do akceptorové fáze bez použití polyuretanové membrány.

Trypsinizace dále urychlila nárůst fluxů u obou látek.

ZÁVĚRY

Pro kofein jako permeační marker a kyselinu listovou jako modelové léčivo v permeačních pokusech s využitím sublingválních membrán byly získány tyto výsledky:

1. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové trypsinizovanou membránou z IPM bez polyuretanové membrány byla $J = 62,0 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 17,4$.
2. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z IPM bez polyuretanové membrány činila $J = 43,1 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 21,8$.
3. Závěrečná průměrná hodnota fluxu kofeinu sublingvální trypsinizovanou membránou z FP 7,4 byla $J = 278,2 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 49,0$.
4. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z FP 7,4 byla $J = 269,7 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 31,1$.
5. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové trypsinizovanou membránou z IPM s polyuretanovou membránou byla $J = 4,6 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 3,7$.
6. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z IPM s polyuretanovou membránou byla $J = 3,1 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 1,7$.
7. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové z disperze EM1 netrypsinizovanou membránou činila $J = 34,0 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 0,0$.
8. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové z disperze EM2 netrypsinizovanou membránou činila $J = 18,8 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 0,0$.
9. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové z disperze EM1 trypsinizovanou membránou činila $J = 50,5 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 6,6$.
10. Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové z disperze EM2 trypsinizovanou membránou byla $J = 38,0 \text{ } [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 1,5$.

- 11.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z propylenglycerol-oleátu s polyuretanovou membránou byla $J= 2,8$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 0,9$.
- 12.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z propylenglycerol-oleátu bez polyuretanové membrány činila $J= 2,8$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 1,5$.
- 13.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z FP 7,4 / PG s polyuretanovou membránou činila $J= 21,2$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 11,9$.
- 14.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z FP 7,4 / PG bez polyuretanové membrány byla $J= 70,8$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 41,2$.
- 15.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové trypsinizovanou membránou z FP 7,4 / PG bez polyuretanové membrány byla $J= 30,1$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 0,2$.
- 16.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové trypsinizovanou membránou z FP 7,4 byla $J= 66,9$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 8,5$.
- 17.** Průměrná hodnota fluxu kyseliny listové netrypsinizovanou membránou z FP 7,4 byla $J= 19,3$ $[\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 0,0$.

7 ABSTRAKT

Diplomová práce v teoretické části podává stručné informace o sublingvální aplikaci léčiv a zevrubný přehled informací o nádorových onemocněních a aktuálním výskytu nádorových onemocněních v České republice.

Druhý úsek teoretické části se zaměřuje na možnosti chemoterapie, hlavně na léčbu antimetabolity. Methotrexátu jako analogu kyseliny listové je věnována další kapitola. Kyselina listová také slouží jako modelový permeant v navazující pokusné části práce.

Experiment je zaměřen na permeaci kofeinu ve funkci markeru integrity membrány a kyseliny listové za využití sublingvální membrány prasečího jazyka. Kyselina listová byla aplikována v 6 různých vehikulech, případně za použití donorové membrány. Získány byly nové původní výsledky v podobě hodnot fluxů.

Za stěžejní výsledek lze považovat průkaz toho, že průměrné hodnoty fluxů kofeinu přes trypsinizovanou a nativní membránu se neliší.

Naopak, kyselina listová snáze proniká přes trypsinizovanou sublingvální membránu více než přes membránu nativní. Důležité je také potvrzení předpokladu, že kyselina listová permeuje ve většině měření více z hydrofilních vehikul. Například z fosforečnanového pufru pH 7,4 byla průměrná hodnota fluxu $J = 66,9 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 8,5$ a disperze EM1 s hodnotou $J = 50,5 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 6,6$. Vysoká permeace byla naměřena také z IPM jako vehikula hydrofobního $J = 62,0 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 17,4$.

8 ABSTRACT

Diploma thesis in the first section brings information about sublingual administration of drugs and a comprehensive overview of tumors including the actual incidence of malignant diseases in the Czech Republic.

The second section of the theoretical part focuses on the possibility of chemotherapy and mainly on treatment with antimetabolites. Specifically with methotrexate, a folic acid analogue, to which is dedicated next section. Folic acid is also used as a model permeant in the following experimental part of the work.

The experiment is focused on the permeation of caffeine in the function of membrane integrity marker and folic acid through sublingual membranes of pig tongue. Folic acid was dispersed in 6 different vehicles and also with the use of a donor membrane. New original results were obtained, namely values of fluxes.

Average values of caffeine fluxes through trypsinized and native membrane do not differ. It can be considered as the main result obtained.

Conversely, folic acid penetrates easily through trypsinized sublingual membrane than through the native membrane. Important as well is confirmation of the assumption, that folic acid permeates in most measurements from more hydrophilic vehicles, namely for example phosphate buffer pH 7.4 had the average flux value $J = 66.9 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 8.5$ EM1 and dispersion value $J = 50.5 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 6.6$. High permeation was measured using IPM hydrophobic vehicle $J = 62.0 [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}] \pm 17.4$.

9 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

FA = Folic acid	kyselina listová
FP 7,4	fosfátový pufr s azidem sodným
PG	propylenglykol
IPM	isopropyl-myristát
EM1	emulze 1
EM2	emulze 2
Propylgl.-ol.	Propylglycerol-oleát
MTX	methotrexát
GIT	gastrointestinální trakt
$J [\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}]$	flux permeantu
$C_{nk} [\text{mg}/100 \text{ ml}]$	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
$t [\text{hod}]$	čas
$Q_t [\mu\text{g}]$	množství permeantu prošlého sublingvální membránou
$Q_t [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$	množství permeantu prošlého přes 2 cm^2 sublingvální membrány
S_d	směrodatná odchylka
r	korelační koeficient
n	počet naměřených bodů
$V_o [\text{ml}]$	celkové množství akceptorové faze
$\Delta V_{\text{dop}} [\text{ml}]$	množství doplňované akceptorové fáze

10 LITERATURA

- ¹ Mary Elizabeth Martelli, "[Sublingual and buccal medication administration](http://findarticles.com/p/articles/mi_gGENH/is_20050229/ai_2699003760/)". Encyclopedia of Nursing and Allied Health. FindArticles.com, 17.11.2009, http://findarticles.com/p/articles/mi_gGENH/is_20050229/ai_2699003760/
- ² Mary Elizabeth Martelli, The Gale Group Inc., Gale, Detroit, 2002, [Gale Encyclopedia of Nursing and Allied Health](#)
- ³ Alternativní metody aplikace steroidů, 28.07.2009, <http://www.fit-centrum.cz/odborne-clanky/3081-alternativni-metody-aplikace-steroidu.html>
- ⁴ Stephen R. Durham, Sublinguální imunoterapie – co jsme se dozvěděli z „velkých studií“, Curr Opin Allergy Clin Immunol/CS 2009; 6, MeDitorial, ISSN 1803-6597. Poslední aktualizace: 16.9.2009, <http://www.prolekare.cz/coaci-clanek?id=3188&search=sublingual>
- ⁵ Martin Vokurka, Jan Hugo, Velký lékařský slovník. 6. vydání, Maxdorf, Praha, 2006, s. 781 – 782, ISBN: 80-7345-105-0
- ⁶ Petr Klener: Klinická onkologie. Galén/Karolinum, Praha 2002, Petruželka L., Konopásek B.: Klinická onkologie, Karolinum, Praha 2003, Poslední aktualizace: 2.11.2009, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina>
- ⁷ Zdeněk Dienstbier, Kdy je rakovina léčitelná?, 1. vydání, 2003, Grada Publishing a. s. , U Průhonu, Praha 7, s. 11 – 14, ISBN 80-7169-303-0
- ⁸ Juraj Kaušitz, Čestmír Altaner, Onkológia, 1. vydání, VEDA, Bratislava 2003, s. 3, ISBN 80-224-0711-9
- ⁹ Co musíte vědět o onkologických onemocněních, http://www.linkos.cz/pacienti/co_vedet.php, (Při psaní tohoto textu byly použity údaje ze statistiky ÚZIS, softwaru SVOD, tisku a především s laskavým svolením autorů byly převzaty pasáže z brožurky ABC pacientů s onkologickým onemocněním autorů MUDr. Jiří Bartoš a kolektiv), 13.11.2009

¹⁰ Aktuálně. Kvalita onkologické péče a její vývoj, Praha, 22.9.2009, www.linkos.cz

¹¹ Pavel Klemer, Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky, Vesmír, č. 73, 205, 1994/4, obor: Nemoci člověka, ISSN 1214-4029, 17.11.2009, <http://www.vesmir.cz/clanek/uspesnost-lecby-nadorovych-onemocneni-cytostatiky>

¹² Účel chemoterapie, Principy onkologické léčby, FN Brno, 15.12. 2009, <http://www.detskaonkologie.cz/pages/chemoterapie.html>

¹³ Daagmaar Lincová, Hassan Farghali, Základní a aplikovaná farmakologie, Chemoterapie nádorových onemocnění, 2. doplněné a přepracované vydání, Galén, Praha 5, 2007, s. 541 – 552, ISBN 978-80-7262-373-0

¹⁴ <http://www.chemicalregister.com/upload/cr/59-05-2.png>, 26.5.2010

¹⁵ Jiří Hartl, Farmaceutická chemie IV, Chemoterapeutika nádorového bujení, 1. vydání, vydala Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 1, 2006, s.136 - 139, ISBN 80-246-1169-4

¹⁶ <http://thekanjifoundrypress.com/sketch%20files/m%20GIF/methotrexate%20and%20Ofolic%20acid.gif>, 27.5.2010

¹⁷ Radka Svobodová, Současné postavení injekčního methotrexátu v terapii revmatických chorob, Farmakoterapie 2 (6), 2006. s. 671- 674, ISSN: 1801-1209

¹⁸ AISLP, SPC

¹⁹ Jiří Venkovský, Golimumab u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou a nedostatečnou odpovědí na léčbu methotrexátem, Farmakoterapie 4 (6), 2008, s. 631-632, ISSN: 1801-1209

²⁰ Karel Pavelka, Komentář ke studii účinnost léčby leflunomidem a methotrexátem u pacientů s revmatoidní artritidou, Farmakoterapie .4 (6), 2008, s. 599, ISSN: 1801-1209

²¹ Eva Nichalová, Jaroslav Štěřba, Analýza exprese p53-signálních genů u maligních blastů po působení methotrexátu, Chemické listy 100 (5), 2006, s. 396, ISSN: 0009-2770

²²<file:///G:/DIPLOMCAA/teorie/folic%20acid/FA%20a%20ultrayvuk.osel.cz.htm>,

26.5.2010

²³ Kyselina listová, poslední aktualizace 27.3. 2007,

https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_22033.html

²⁴ Tomáš Arndt, Kyselina listová, poslední aktualizace 29.9. 2008,

<http://www.celostnimediceina.cz/kyselina-listova.htm>

²⁵ Štěpán Svačina, Kyselina listová, Klinická dietologie, celkem, s. 38, Grada Publishing a.s., 2008, ISBN: 8024722569

²⁶ Kyselina listová, poslední aktualizace 27.12. 2009,

http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_listov%C3%A1

²⁷ Y. Yazaki, G. Chow, M. Mattie, A single-center, double-blinded, randomized controlled study to evaluate the relative efficacy of sublingual and oral vitamin B-complex administration in reducing total serum homocysteine levels, J Altern Complement Med. 2006 Nov;12(9):881-5,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109579?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=2

²⁸ M. Albert Christiane, R. Nancy Cook, J. Michael Gaziano, Ivana Suchanová, Účinek kyseliny listové a vitamínů B na ohrožení kardiovaskulárními příhodami a celkovou úmrtnost u žen s vysokým ohrožením kardiovaskulárními onemocněními, JAMA, Roč. 16, č. 5 (2008), s. 254, ISSN: 1210-4132

²⁹ Jaroslav Chládek, Nové postupy sledování a prevence nežádoucích účinků farmakoterapie psoriázy methotrexátem: Farmakokinetika methotrexátu a vlivy genového polymorfizmu enzymu methylenetetrahydrofolátreduktáza, suplementace foláty ve stravě a podávání kyseliny listové, Praha, IGA MZ ČR, 49, (2)2007, s. 11, ISSN: 1211-4285