

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Studium vlivu terminálního rozvětvení u akceleračních transdermálních
permeací ze skupiny karbamátů a alkoholů**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Kateřina Vávrová, PhD.

Hradec Králové 2005

Mgr. Lucie Šámalová

Mgr. Lucie Šámalová

Děkuji PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za odborné vedení při vypracování diplomové práce, pomoc při psaní její teoretické části a získávání a zpracování experimentálních výsledků. Dále děkuji Ing. Lud'ku Stauberovi za grafickou úpravu textu.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	4
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
2.1. Transdermální podání léčiva	5
2.2. Výhody transdermálního podání	5
2.3. Nevýhody transdermálního podání.....	6
2.4. Charakteristika ideálního permeantu	6
2.5. Definice permeačních parametrů.....	6
2.6. Matematické vyjádření permeačního procesu	7
2.7. Struktura epidermis	7
2.8. Stratum corneum jako kožní bariéra.....	9
2.8.1. Složení mezibuněčných lipidů SC.....	9
2.8.2. Proces tvorby SC	10
2.8.3. Fázové chování bariérových struktur	12
2.8.4. Energetické zdroje pro procesy formující bariéru	13
2.9. Permeační cesty léčiv kůží	13
2.10. Faktory ovlivňující permeaci.....	13
2.10.1. Supersaturace vehikula	14
2.10.2. Zvýšení rozpustnosti permeantu.....	14
2.10.3. Zvýšení difúzního koeficientu permeantu	15
2.10.4. Charakteristika ideálního permeačního akcelarantu.....	16
2.11. Vliv struktury hydrofobního řetězce akcelarantu na jeho aktivitu	16
2.11.1. Délka hydrofobního řetězce	16
2.11.2. Geometrická izomerie v řetězci	18
2.11.3. Poloha dvojně vazby v řetězci	18
2.11.4. Počet dvojných vazeb v řetězci	18
2.11.5. Rozvětvenost řetězce	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1. Použité suroviny	21
3.2. Použité přístroje a pomůcky	22

3.3.	Permeační pokusy	23
3.3.1.	Příprava kůže	23
3.3.2.	Příprava donorových vzorků.....	23
3.3.3.	Akceptorová fáze	23
3.3.4.	Uspořádání permeačních experimentů	24
3.4.	HPLC stanovení theofylinu	25
3.4.1.	Analytická metodika	25
3.4.2.	Mobilní fáze.....	25
3.4.3.	Příprava standardů	25
3.4.4.	Parametry kalibrační křivky	26
3.5.	Stanovení vlivu akcelarantu na rozpustnost theofylinu v donorovém vzorku.....	26
3.6.	Způsob hodnocení.....	26
4.	VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE.....	28
5.	ZÁVĚR	33
6.	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	34
7.	LITERATURA	35

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Předmětem farmaceutického výzkumu a následně průmyslu je mimo jiné poslední dobou využitelnost kůže pro transdermální podání léčiv.¹ Přidá-li se k léčivé látce vhodný transdermální akcelerant, oslabí se tak bariérové vlastnosti kůže, za které je především zodpovědné epidermální stratum corneum (dále jen SC). Tento postup představuje vítanou alternativu lékové aplikace v medicínské praxi.

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat rešerši na téma vznik, struktura a chování kožní bariéry, možnosti ovlivnění transdermálního podání léčiva pomocí permeačních akcelerantů a především zpracovat dostupná data o vlivu struktury hydrofobního řetězce akcelerantu na jeho účinek.

Cílem experimentální části práce bylo studium vlivu terminálního rozvětvení u akcelerantů transdermální permeace. K hodnocení byla vybrána série rozvětvených karbamátů a rozvětvených alkoholů, jejich potenciálních metabolitů, s různou délkou hydrofobního řetězce; pro srovnání byla otestována také série analogických nerozvětvených karbamátů a dodekanol jako zástupce alkoholů s lineárním řetězcem. Kromě přímého porovnání aktivity rozvětvených a nerozvětvených akcelerantů jsme zamýšleli zjistit, zda má rozvětvení vliv na optimální délku hydrofobního řetězce akcelerantu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Transdermální podání léčiva

SC, nejzevnější kožní vrstva, aktivně čelí průniku exogenních látek do organismu a umožňuje odpařování adekvátního množství vody pro zachování homeostázy v těle.² Jedním z důkazů bariérové vlastnosti SC je například 1000násobný vzrůst koncentrace malých nenabitých ve vodě rozpustných molekul v cévním řečišti po odstranění SC.³ (Kvantitativní limity prostupu léčivých látek bariérou neplynou ovšem jen z mechanické odolnosti SC, ale v menší míře i z přítomnosti degradačních enzymů v kůži.⁴)

Napomoci prostupu léčiva bariérou dokáže již zmíněný transdermální akcelerant. Princip urychlení je různorodý v závislosti na chemické struktuře akcelerantu.

2.2. Výhody transdermálního podání

- * aplikace léčivé látky je snadná
- * eliminuje se negativní působení léčiv dráždivých sliznici gastrointestinálního traktu
- * je vyloučen zásah degradačních trávicích enzymů, působení acidity žaludeční šťávy a sorpce léčivé látky na složky potravy
- * biologická dostupnost léčiva je zvýšena, protože se neuplatňuje jaterní first-pass effect
- * compliance pacienta pozitivně ovlivňuje snížená frekvence dávkování – obvyklý je až týdenní interval výměny náplasti
- * provedené monitorování lékové hladiny nasvědčuje poměrně stabilní systémové koncentraci léčiva v porovnání s perorálním podáním, transdermální lékové formy jsou tedy vhodné při podávání léčiv s nízkým terapeutickým indexem prakticky bez rizika pod- a předávkování a projevů nežádoucích účinků
- * permeaci léčiva lze okamžitě přerušit pouhým odstraněním náplasti
- * působení léčiv s krátkým biologickým poločasem je prolongovatelné⁵

2.3. Nevýhody transdermálního podání

Počet léčiv s žádanými vlastnostmi (viz níže) pro průnik kůže je malý. Jejich denní dávka představuje nejvýše desítky miligramů léčivé látky vzhledem k neakceptovatelnosti větších rozměrů transdermální náplasti. Dalšími problémy při aplikaci je možnost lokální nebo systémové alergizace léčivem nebo jinými složkami lékové formy, změna hydratace pokožky a případné množení patogenů v místě kontaktu lékové formy s pokožkou.³

2.4. Charakteristika ideálního permeantu

Ideální permeant by měl mít

- * nízkou molekulovou hmotnost s horním limitem 600D, kdy má látka vysoký difúzní koeficient (**D**)
- * takový poměr rozpustnosti v oleji a ve vodě, aby membránový koncentrační gradient – předpoklad difúze léčiva kůže – byl vysoký, ideální jsou nasycené až přesycené roztoky, v nichž má permeant tendenci přestupovat do lipofilního prostředí, které mu nabízí rozpustnost srovnatelnou s vehikulem, příliš vysoký rozdělovací koeficient (**K**) ovšem vede k zadržování léčiva ve svrchních vrstvách kůže
- * nízkou teplotu tání předurčující vysokou rozpustnost ve vehikulu i lipofilním prostředí epidermis

Tyto vlastnosti mají klinicky využívané takzvané transdermální terapeutické systémy čítající kolem deseti látek (nebo směsí látek): skopolamin, nitroglycerin, klonidin, estradiol (v kombinaci s norethisteronem nebo levonorgestrem), testosteron, fentanyl, nikotin a v nejbližší době lidokain.³

2.5. Definice permeačních parametrů

Flux (tok) **J** [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$] je množství permeujícího léčiva, které pronikne jednotkovou plochou kůže za časovou jednotku.

Kumulativní množství léčiva proniknuvšího jednotkovou plochou za určitou dobu – nejčastěji za 24 hodin – se označuje jako Q_{24} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$].

Akcelerační poměr **AP** vypovídá o efektivitě použitého akceleraantu. Vyjadřuje se jako podíl **J**, Q_{24} či množství léčiva přítomného v kůži za použití akceleraantu a týchž veličin, jejichž hodnoty nejsou ovlivněny působením akceleraantu.⁶ V této práci je AP vyjadřován jako poměr fluxu léčiva v přítomnosti akceleraantu a fluxu léčiva bez přítomnosti akceleraantu.

2.6. Matematické vyjádření permeačního procesu

Dle Fickova zákona je **J** přímo úměrný **D**, rozpustnosti v membráně ($c_{s,m}$) a koncentraci ve vehikulu (c_v). Naopak klesá s rostoucí šířkou SC (**L**) a rozpustností léčiva ve vehikulu ($c_{s,v}$).

$$J = \frac{D \times c_{s,m}}{L} \times \frac{c_v}{c_{s,v}}$$

Zvýšení hodnot **D**, $c_{s,m}$ a poměru $c_v/c_{s,v}$ (tedy difúzivity a solubility léčiva a dále pak nasycenosti vehikula léčivem) níže uvedenými mechanismy zvyšuje flux bariérou.⁶

2.7. Struktura epidermis

Součástí kůže je epidermis – vnější nevaskularizovaná epiteliální kožní vrstva – a dermis – vrstva kůže bohatě prokrvená, inervovaná, obsahující potní a mazové žlázy a vlasové či chlupové folikuly.

Samotná epidermis (průměrné šířky 100 až 150 μm) je složena ze čtyř vrstev buněk v různých stádiích diferenceiace jak morfologické, tak funkční. Buňky vzniklé v proliferujícím *stratum basale* migrují k povrchu kůže a vytváří v ní vrstvy zvané *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum*,² v němž se proměňují z metabolicky aktivních dělicích se keratinocytů (reprezentují 95 % celkového obsahu epidermis) ve funkčně mrtvé, zploštělé buněčné útvary se sníženým obsahem vody zvané korneocyty. Pro vodu neprostupné proteiny uvnitř těchto buněk, multilamelární lipidová matrix je

obklopující a desmosomy spojující buňky navzájem přispívají k udržení bariérové funkce kůže.

Dále se v epidermis vyskytují melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky (mechanoreceptory).⁴

Stratum basale

Stratum basale je vrstva množících se kmenových buněk připojených k bazální membráně pomocí hemidesmosomů. Většinu jejich cytoplasmatického prostoru vyplňuje jádro, dalšími buněčnými organelami jsou zejména mitochondrie a keratinová vlákna (konkrétně druhy označované jako K5 a K14), která se napojují na hemidesmosomy.

Stratum spinosum

Buňky této vrstvy mají díky velkému počtu desmosomů, vzájemně je spojujících, trnitý vzhled.¹ (Desmosomy jsou přítomné v této a všech následujících epidermálních vrstvách). Pro cytoplasmu buněk jsou charakteristické organely zvané lamelární tělíska (též Odlandova tělíska nebo keratinosomy). Tyto buněčné membránové organely oválného tvaru s průměrem 200 až 500 nm obsahují množství lipidových lamel, popsatelných jako zploštělé váčky, a v malé míře též lipidovou matrix amorfního charakteru. Byly nalezeny v keratinizujících epitelech všech dosud zkoumaných druhů savců.⁷ Co se týče množství keratinových filament, zvyšuje se především obsah keratinu 1 a 10.¹

Stratum granulosum

V keratohyalinových granulech typických pro tuto vrstvu se nachází množství profillaggrinu, lolikrinu a keratinů 1 a 10, jež nabývá na objemu v souvislosti s přibližujícím se SC. Buněčná diferenciace má za následek zvýšenou lipogenezi – stále početnější lamelární tělíska dosahují až 20 % obsahu cytoplasmy. V terminální fázi svého vývoje jsou granulocyty připraveny k extruzi lipidového materiálu a enzymaticky řízenému zesílení keratinu, tedy procesům nepostradatelným při tvorbě ochranné bariéry SC.¹

Stratum corneum

Stratum corneum tvoří korneocyty (keratinocyty v konečné fázi svého vývoje) obklopené lipidovými lamelami. V lidské kůži se počet buněčných vrstev SC pohybuje od

18 do 21. Jednotlivé korneocyty mají 20 až 40 μm v průměru (zatímco rozměry buněk na bazální membráně jsou 6 až 8 mikrometrů). Korneocyty se mohou lišit svým tvarem a stupněm hydratace (10 – 30 % vody) v závislosti na místě na těle, z kterého SC pochází, nebo na jejich lokaci v samotném SC.¹

2.8. Stratum corneum jako kožní bariéra

2.8.1. Složení mezibuněčných lipidů SC

Mezibuněčné lipidy SC jsou tvořeny z 10 – 15 % nerozvětvenými nasycenými **mastnými kyselinami** s nejčastějším počtem uhlíků pohybujícím se mezi 22 až 24.

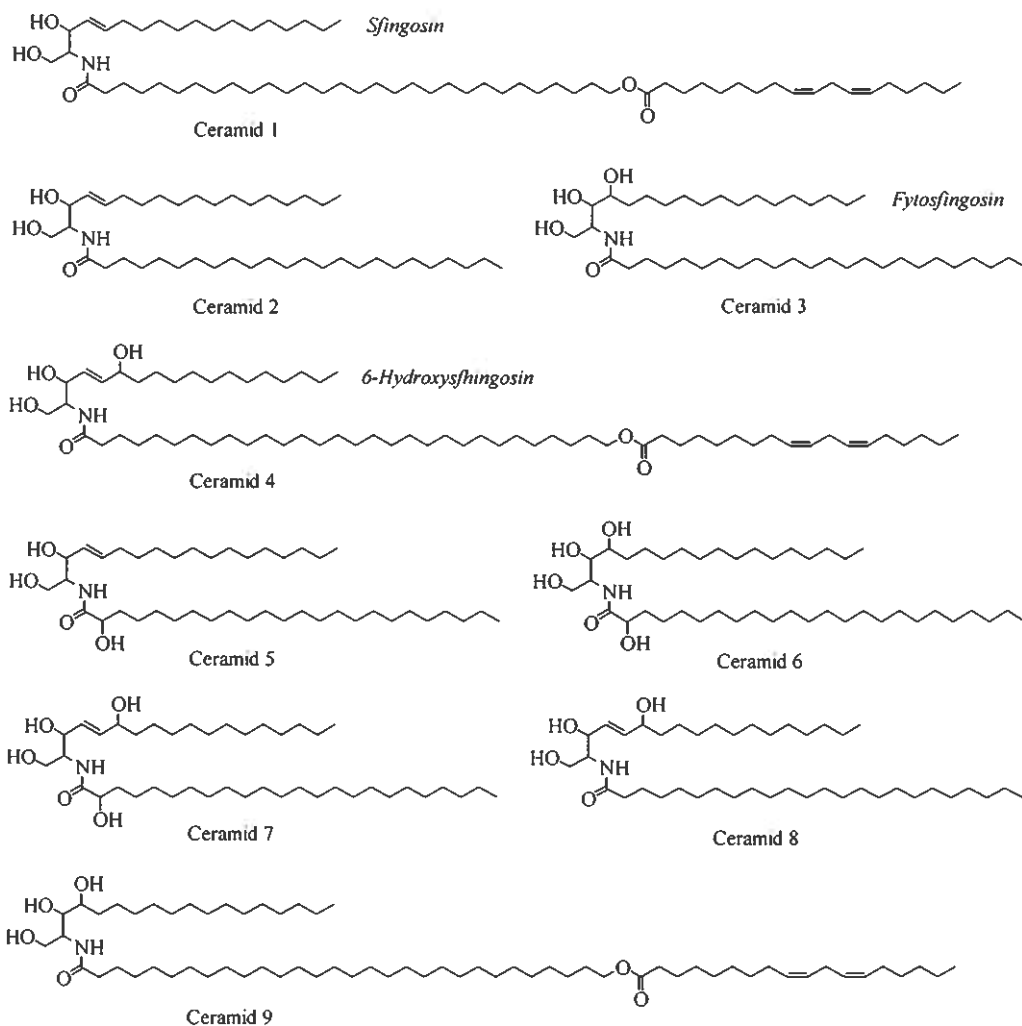
Cholesterol představuje 25 % lipidové masy.

Cholesterolsulfát zaujímá asi 5 % z tohoto celku.

Estery cholesterolu (s nenasycenými mastnými kyselinami, například kyselinou olejovou) jsou přítomny ve velmi malém množství a nejsou obsaženy v lipidové dvojvrstvě charakteristické pro bariérovou strukturu.⁸

Nejhojnějšími a funkčně nevýznamnějšími lipidy bariéry jsou **ceramidy**. Tyto amidické deriváty sfingosinu, fytosfingosinu nebo 6-hydroxysfinganinu, dále dělitelné na základě strukturálních odlišností do devíti skupin (obr. 1), představují 50 % lipidového obsahu SC.

Představitelé jednotlivých skupin ceramidů se liší bazickou částí molekuly a dále amidicky vázanou mastnou kyselinou, případně α - nebo ω -hydroxykyselinou, jejichž počet uhlíků je průměrně 24, případně 30 u ω -hydroxykyselin. V lidském SC mají jedinečnou strukturu ceramid 1, 4 a 9, na jejichž ω -hydroxykyseliny se estericky váže linoleát.⁹



Obrázek 1. Struktury ceramidů

Tyto molekuly svým specifickým uspořádáním dávají vzniknout struktuře přirovnatelné ke „zdi“, v níž keratinem vyplněné korneocyty představují „cihly“ a lipidy v mezibuněčných prostorech je jako „malta“ zpevňují.¹⁰

2.8.2. Proces tvorby SC

Intercelární proměna

Lipidový materiál, který má za úkol „stmelovat“ jednotlivé korneocyty, pochází z lamelárních tělísek, která se poprvé objevují již ve stratum spinosum (viz výše). Jednou ze

známek dokončené buněčné diferenciaci během migrace do SC je extruze lipidového obsahu do mezibuněčného prostoru. Děje se tak na rozhraní stratum granulosum a stratum corneum procesem exocytózy. Lamelární tělíčka disponují řadou hydrolytických enzymů, které jsou během extruze zodpovědné za následující chemické změny ve strukturách lipidů. Současně se lipidy přeskupují do lamel paralelně orientovaných k buněčnému povrchu tak, aby jejich bariérové vlastnosti byly optimální.

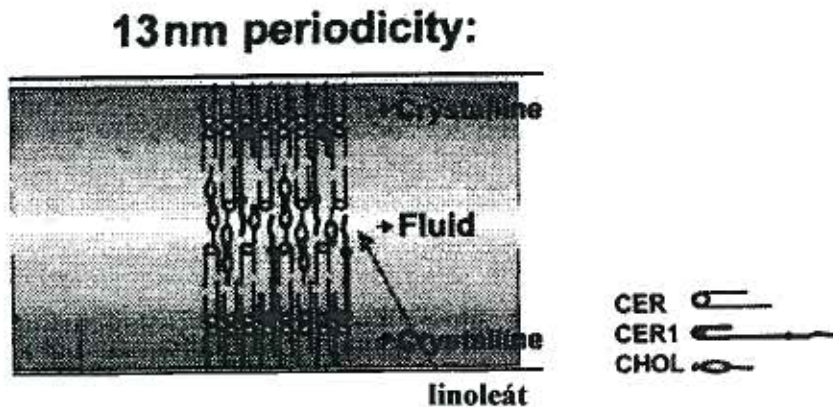
Endogenní akceleranty permeace, které by mohly ohrozit odolnost bariéry – nenasycené mastné kyseliny vznikající degradací fosfolipidů – jsou odštěpeny a navázány na cholesterol.^{9, 10}

Intracelulární proměna

V keratinocytech obsažená keratinová vlákna a keratohyalinová granula nabývají na objemu a buňky se stávají úměrně tomuto jevu zploštělými. V keratohyalinových granulech vyskytující se profillagrin je enzymaticky upraven na kratší fillagrin, který iniciuje agregaci keratinových vláken do svazků, které vyplní veškerý prostor buňky. Mezitím buněčné orgány zanikají a bílkovinný materiál je přemístěn na vnitřní povrch cytoplazmatické membrány. Tato silná proteinová vrstva je dále zpevněna příčně tvořenými disulfidickými vazbami a isopeptidickými spoji kyselého glutamátu a bazického lysinu. Hydrolyzou glukosylceramidů při jejich extruzi z Odlandových tělísek vznikají odštěpením glukózy vlastní ceramidy. Linoleát ceramidu 1, případně 4 a 9, hrající významnou roli v udržení celistvosti bariéry, je v průběhu obnovování stavebních kamenů bariéry z části ceramidů odštěpen a přesunut na buněčný povrch, odkud může být přemístěn jako důležitý prekursor prostaglandinů do živé epidermis. ω -hydroxyceramidy (produkty štěpení acylglukosylceramidů) se esterovou vazbou přes ω -hydroxyl připojují k vnějšímu povrchu buněčné membrány. Buněčná membrána se tedy prostřednictvím kovalentně vázaných ceramidů přetváří v kompaktní vodonepropustnou lipidickou obálku korneocyту, a společně s lipofilní nepolární matrix mezibuněčných prostor tak klade odpor difúzi většiny exogenních látek a stejně tak zamezuje úniku látek, zvláště vody, z organismu.¹¹

2.8.3. Fázové chování bariérových struktur

Lipidové lamely tvoří 20 % objemu SC. Ceramidy kovalentně vázané na povrch korneocyty slouží jako templáty pro uspořádání lipidových vrstev. Soudržnost ceramidů je dána především vodíkovými vazbami mezi polárními hlavami těchto molekul. Metodou širokouhelné rentgenové difrakce bylo zjištěno, že oblasti krystalicky uskupených lipidů se střídají s fázemi povahy gelu v pravidelném sledu.¹ Elektronověmikroskopickou analýzou pomocí fixace preparátu oxidem rutheničelým byly pozorovány 13nanometrové opakující se jednotky sestávající ze světlých proužků ve sledu široký – úzký – široký. V širokých 6nanometrových pásech na koncích mezibuněčného prostoru se nacházejí lipidy vázané na buněčný povrch, lipidy jsou ve fázi krystalické a zodpovídají pravděpodobně za bariérové vlastnosti kůže. Úzké 3nanometrové pruhy sestávají z cholesterolu a jeho derivátů a dále sem zasahují linoleátové řetězce ceramidu 1 (4,9), takzvané molekulové zipy.^{4, 8} Tyto úzké pruhy pravděpodobně zodpovídají za elasticitu kůže. Tento model bariérové struktury lze graficky znázornit (viz obr. 2).⁹



Obrázek 2. Zobrazení bariérové struktury prasečího SC: CER – ceramidy, CER 1 – ceramid 1, CHOL – cholesterol

2.8.4. Energetické zdroje pro procesy formující bariéru

Hlavním zdrojem energie pro ještě zcela funkční keratinocyty je glukóza jakožto jeden z produktů štěpení acylglukosylceramidů. Ta vstupuje do aerobní glykolýzy a následně vzniklý acetylkoenzym A poskytuje 38 molekul ATP v Krebsově cyklu. Diferencující se keratinocyty ztrácejí své organely včetně mitochondrií, a proto se následný energetický metabolismus ubírá anaerobní cestou přeměny pyruvátu na laktát. Ač je tento způsob získu energie méně výhodný (přeměnou jedné molekuly glukózy se tvoří pouze 2 molekuly ATP), je jediný možný, protože neprokrvená epidermis není zásobována kyslíkem. Kyselý laktát snižuje hodnotu pH SC, tento pokles zaručuje dostatečnou aktivitu kyselých hydroláz účastnících se „zrání“ bariéry. Nižší hodnota pH též přispívá k vyšší mikrobiální odolnosti pokožky.⁸

2.9. Permeační cesty léčiv kůží

Procesy absorpce a difúze látek pokožkou nejsou podmíněny přísunem energie. Existují dva možné způsoby průniku látek – transepidermální pasivní difúze a penetrace jakýmsi „zkratkami“ tvořenými vlasovými folikuly, mazovými a potními žlázami. Druhá varianta má zanedbatelný význam – adnexy představují totiž jen 0,1 % celkového kožního povrchu. Ovšem látky s vysokou molekulovou hmotností pravděpodobně upřednostňují tento způsob „dopravy“.⁴ Transepidermální permeační cestou je míněna difúze molekul mezi korneocyty lipidovou matrix (cesta interceluární) a dále difúze molekul prostupujících korneocyty a mezibuněčnými prostory (cesta intraceluární). Léčivé látky nejrůznější polarity každopádně vstoupí do mezibuněčného prostoru. Od tohoto faktu se odvíjí snaha vyvinout akcelerant, který by interagoval s lipidovou složkou kožní bariéry.⁶

2.10. Faktory ovlivňující permeaci

Vliv okolního prostředí se též odráží v míře percutánní permeace látek. S růstem teploty a vlhkosti klimatu permeační parametry stoupají.

Přítomnost aktivačních a detoxikačních enzymů (oxidáz, reduktáz, esteráz, proteáz a konjugačních enzymů) předurčuje biologickou dostupnost léčiva pronikajícího kůží. (Metabolická aktivita cytochromu P-450 v kůži představuje nezanedbatelných 27 % aktivity tohoto enzymu v játrech.)

Okluze udržuje pokožku optimálně hydratovanou pro snadný prostup léčivé látky, dále zabraňuje vypařování těkavých permeantů, a napomáhá tak vytvoření jejich dostatečného koncentračního gradientu ve svrchní kožní vrstvě nutného pro realizaci difúze.

Stupeň saturace vehikula léčivem (ale i akcelerantem) lze optimalizovat zvýšením koncentrace léčiva nebo snížením rozpustnosti léčiva ve vehikulu (koncentrace léčiva není absolutním předpokladem úspěchu permeace). Obě alternativy zaručují zvýšení termodynamické aktivity léčivé látky v rozpouštědle umožňující permeační proces.

Difúzní koeficient permeantu a dále jeho rozpustnost v kůži hrají významnou roli v rychlosti permeace. Jsou ovlivnitelné přidáním akcelerantu do přípravku.⁶

2.10.1. Supersaturace vehikula

Supersaturace, tedy nasycení až přesycení vehikula léčivem, se v klinické praxi realizuje odnětím vody přípravku kůží, odpařením těkavých složek přípravku během aplikace anebo tvorbou kosolventního systému bezprostředně před aplikací. Supersaturace vehikula akcelerantem se provádí za následujícím účelem: zvýšené množství akcelerantu zajišťuje vyšší permeační flux látky kůží. Koncentraci akcelerantu v roztoku je ale nutno limitovat v závislosti na možném výskytu nežádoucích iritací kůže.

Supersaturované soustavy mají tu nevýhodu, že jejich nízká termodynamická stabilita s rizikem krystalizace permeantu vylučuje dlouhodobé uchovávání i po přidání určitých stabilizujících polymerů do systému.⁶

2.10.2. Zvýšení rozpustnosti permeantu

Zvýšit rozpustnost permeantu v kůži lze například pomocí propylenglykolu, transkutolu (monoethyletheru diethylenglykolu), ethanolu nebo N-methylpyrrolidonu.^{4,6}

2.10.3. Zvýšení difúzního koeficientu permeantu

Interakce akceleraantu s lipidy SC

Interakce akceleraantu s hydrofobními řetězci lipidů

Zvýšení difúzního koeficientu permeantu interagujícího s lipidovými řetězci SC též napomáhá urychlení jeho prostupu do systému – molekula akceleraantu se svým dlouhým hydrofobním řetězcem včlení mezi řetězce lamelárních lipidů (konkrétně ceramidů) a naruší jejich uspořádání. Následný vzrůst fluidity lamelární matrix zvyšuje difuzivitu prostupujícího léčiva. Takové ovlivnění lamelárního uspořádání bylo popsáno u Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-on) nebo terpenů.

V případě nenasycených mastných kyselin vede včlenění například kyseliny olejové mezi ceramidové řetězce až k fázové separaci lipidů, tímto způsobem se významně usnadňuje tok molekul permeantu.^{4,6}

Tento mechanismus účinku se dá předpokládat také u látek studovaných v této práci.

Interakce akceleraantu s polární hlavou lipidů SC

Působením akceleraantu v oblasti polární hlavy prostřednictvím vodíkových a iontových vazeb dochází ke změně hydratačních obalů lipidů. Takovou schopnost modifikace struktury SC umožňující vyšší prostup léčivé látky mají malé molekuly (voda, ethanol, dimethylsulfoxid).^{4,6}

Interakce akceleraantu s proteiny SC

Změny v konformaci keratinu způsobují například dimethylsulfoxid, propylenglykol a ethanol. Takto pozměněné proteiny představují již méně efektivní bariéru při prostupu exogenních molekul. Dithiothreitol – látka schopná redukce disulfidických vazeb – též pozměňuje konformaci proteinových molekul. Zvýšení permeability ovšem není tak markantní jako v případě působení akceleraantů na lipidovou matrix. Tento akceleraant neovlivňuje totiž lipidové uspořádání ve SC, které má pro bariérové vlastnosti epidermis zásadní význam.^{4,6}

2.10.4. Charakteristika ideálního permeačního akceleraantu

- * permeační akceleraant by měl být farmakologicky neaktivní
- * neměl by být dráždivý, alergizující a toxický
- * nástup jeho účinku by měl být rychlý a doba působení dostatečně dlouhá a předvídatelná
- * při jeho průchodu SC dochází k určitému porušení této kožní vrstvy, oslabení bariérové funkce SC by mělo být ovšem reverzibilní, nemělo by docházet k úniku endogenních látek kůží
- * měl by být fyzikálně i chemicky kompatibilní se všemi složkami přípravku
- * je-li kapalný, měl by být dobrým rozpouštědlem pro permeované léčivo
- * měl by být kosmeticky přijatelný, tedy bez barvy a zápachu
- * neměl by být příliš drahý⁶

2.11. Vliv struktury hydrofobního řetězce akceleraantu na jeho aktivitu

Nejúčinnější a zároveň nejméně toxické akceleraanty jsou obecně popsateľné jako amfifilní molekuly tvořené polární částí a hydrofobním řetězcem.^{12, 13, 14, 15} Tato kapitola popisuje, jaký vliv má struktura hydrofobního řetězce akceleraantu na urychlení permeace léčiv.¹⁶ Text je rozčleněn na kapitoly podle vlastností řetězce:

- * délka
- * *cis/trans* izomerie
- * poloha dvojně vazby
- * počet dvojných vazeb
- * rozvětvenost

2.11.1. Délka hydrofobního řetězce

V permeační studii Aungsta se spolupracovníky byl urychlován prostup naloxonu lidskou kůží. Jako permeační akceleraanty sloužily nasycené mastné kyseliny se 7 – 18uhlíkatým řetězcem. Aktivita akceleraantu stoupala s rostoucím počtem uhlíků až do

počtu 12, pak klesala. Nejúčinnějšími akceleranty se ukázaly být kyseliny s počtem uhlíků 9 – 12.¹⁷

V Ogisově práci byla testována řada nasycených mastných kyselin o různé délce řetězce na urychlení permeace propranololu králičí kůží. Nejvyšší akcelerační aktivitu vykázaly kyselina dodekanová a tetradekanová.¹⁸

Kanikkannan se spolupracovníky provedli experiment se skupinou nasycených mastných kyselin s 9 – 14uhlíkatým řetězcem. Při permeaci melatoninu krysí kůží se ukázaly být nejlepšími akceleranty tyto kyseliny v následujícím pořadí: nonanová < dekanová < undekanová.¹⁶

Vliv délky řetězce nasycených mastných kyselin s 6 – 12 uhlíky na rychlost prostupu kyseliny *p*-aminobenzoové byl sledován na lidské kůži. AP vykázal parabolickou závislost na počtu uhlíků v řetězci a nejvyšších hodnot dosáhl u kyseliny dodekanové a tridekanové.¹⁹

Aungst se spolupracovníky studovali akcelerační vlastnosti nasycených 8 – 18uhlíkatých mastných alkoholů. Při prostupu naloxonu, indomethacinu a levonorgestrelu lidskou kůží bylo prokázáno, že závislost účinku na délce řetězce je parabolická a nejúčinnějšími akceleranty jsou alkoholy s 10 a 12 uhlíky.¹⁷

Podobné výsledky přinesla další studie, v níž byl permeován tegafur oholenou myší kůží. Jako akceleranty byly použity nasycené mastné alkoholy ve vehikulu etanol:voda (6:4). AP jednotlivých akceleračních o různých počtu uhlíků stoupaly v následujícím pořadí: 18 C < 16 C < 14 C < 8 C < 9 C < 10 C < 12 C.²⁰

Ze Sloanova experimentu při prostupu theofylinu oholenou myší kůží vyplynulo, že u alkoholů se stoupajícím počtu uhlíků od 5 do 9 též stoupá jejich akcelerační aktivita. Akcelerační účinek 11- a víceuhlíkatých alkoholů byl ovšem ve srovnání s výše uvedenými akceleranty opět nižší.²¹

Z uvedených údajů je patrné, že optimální počet uhlíků řetězce molekuly akceleračního je 10 – 12.

2.11.2. Geometrická izomerie v řetězci

Morimoto se spolupracovníky srovnávali akcelerační potenciál *cis* a *trans* izomerů kyseliny oktadec-9-enové při permeaci indomethacinu krysí kůží. Účinnějším akcelerantem byl *cis* izomer, tedy kyselina olejová, než její *trans* forma (kyselina elaidová).²²

2.11.3. Poloha dvojně vazby v řetězci

V práci směřované k objasnění vlivu polohy dvojně vazby byl hodnocen akcelerační účinek *cis*-oktadecenových kyselin s dvojnou vazbou na 6., 9., 11. nebo 13. uhlíku. Tyto akceleranty urychlovaly permeaci kyseliny *p*-aminobenzoové lidským SC. Statisticky významný rozdíl v účinku jednotlivých izomerů nebyl pozorován.¹⁹

K stejnému závěru dospěli Morimoto s kolegy, když využili při permeaci indomethacinu krysí kůží akceleračních schopností kyseliny *cis*-oktadec-9-enové, *cis*-oktadec-11-enové a *cis*-oktadec-6-enové.²²

2.11.4. Počet dvojných vazeb v řetězci

Aungst a kolektiv srovnávali akcelerační aktivitu 18uhlíkatých mastných kyselin o různém počtu dvojných vazeb při permeaci naloxonu lidskou kůží. Z výsledků pokusu vyplynulo, že nejúčinnější je kyselina s dvěma, méně účinná s jednou a nejméně účinná s třemi dvojnými vazbami.¹⁷

Další studie hodnotila rychlost permeace melatoninu oholenou krysí kůží. Jako permeační akcelerant byly přidány kyselina olejová, linolová nebo linolenová (tedy kyselina oktadec-9-enová, oktadeca-9,11-dienová nebo oktadeca-9,11,13-trienová). Byl pozorován mírný nárůst akceleračního účinku jednotlivých látek s rostoucím počtem dvojných vazeb v molekule, ovšem rozdíl v účinnosti kyseliny linolové a linolenové nebyl statisticky významný.²³

Tanojo se spolupracovníky využili akceleračních schopností kyseliny olejové, linolové, linolenové a arachidonové pro prostup kyseliny *p*-aminobenzoové lidským SC.

Nejnižší hodnotu AP z uvedených vykazala opět kyselina s jednou dvojnou vazbou, ovšem výrazný rozdíl v akcelerační aktivitě těchto kyselin nebyl pozorován.¹⁹

Carelli se spolupracovníky hodnotili akcelerační vlastnosti kyseliny linolové a olejové při prostupu alprazolamu oholenou myší kůží. Dospěli k závěru, že účinnějším akcelerantem je první z uvedených kyselin.²⁴

Naopak v Morimotově experimentu nebyl flux theofylinu ovlivněn různým počtem dvojných vazeb v molekulách jednotlivých kyselin.²²

Přestože výše popsané výsledky nejsou zcela jednoznačné, ve většině studií účinek stoupá se zavedením druhé dvojně vazby do molekuly a přítomnost dalších dvojných vazeb již účinek nezvyšuje.

2.11.5. Rozvětvenost řetězce

V experimentu určeném k objasnění vlivu rozvětvenosti akcelerační na jeho aktivitu srovnávali Aungst se spolupracovníky účinek mastných kyselin rozvětvených na 2. uhlíku řetězce a nerozvětvených mastných kyselin. Permeace naloxonu probíhala na lidské kůži. Nerozvětvené i rozvětvené 9 – 12uhlíkaté kyseliny byly podobně účinnými akceleranty.²⁵

V další práci s podobnou tematikou byla srovnávána akcelerační aktivita rozvětvených a lineárních 6 – 9uhlíkatých alkoholů a byl učiněn závěr, že akcelerační schopnosti rozvětvených alkoholů jsou nižší než schopnosti lineárních alkoholů. Akcelerační schopnosti dále klesaly s přibližováním hydroxylové skupiny ke středu molekuly.²⁶

Při testování akcelerační aktivity rozvětvených a nerozvětvených esterů kyseliny 6-aminohexanové na lidské kůži Hrabálek se spolupracovníky zjistili, že rozvětvení řetězce na uhlíku sousedícím s kyslíkem esterové skupiny výrazně snižuje aktivitu. Podobně jako v předchozí práci účinek klesal s větším rozvětvením alkylu. Výrazně nižší účinek způsobila také cyklizace řetězce.¹²

Z uvedených dat vyplývá, že rozvětvené analogy ve srovnání s lineárními jsou méně účinnými akceleranty, ovšem ideálně dlouhý řetězec čítá jak u rozvětvených, tak lineárních analogů 10 – 12 uhlíků.¹²

Závislostí aktivity akceleraantu na rozvětvenosti a délce jeho uhlíkatého řetězce se zabývá také tato rigorózní práce.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

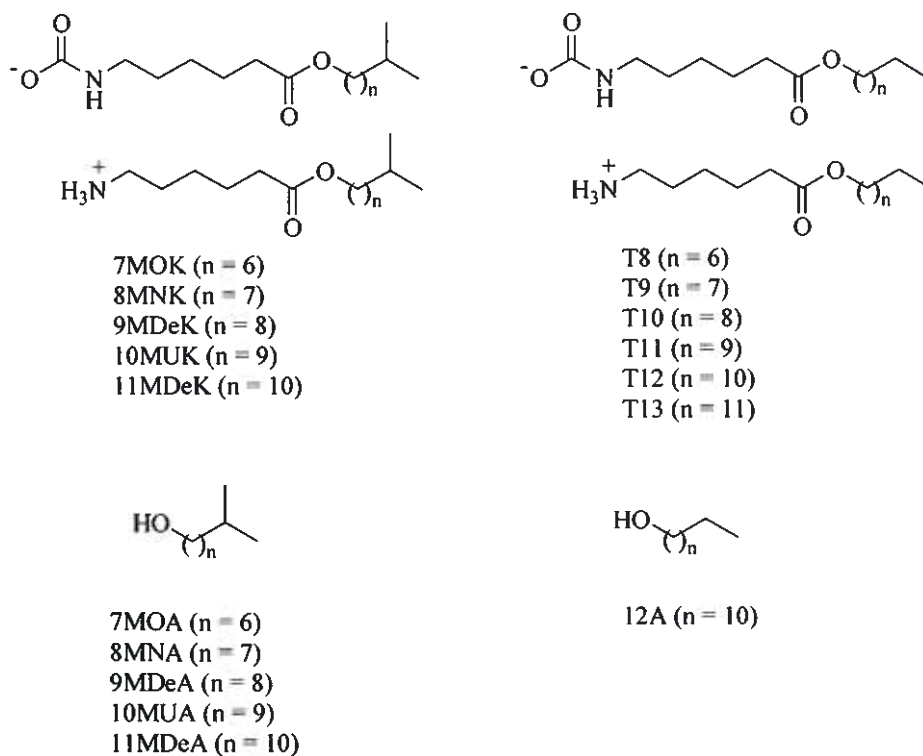
3.1. Použité suroviny

Azid sodý p.a.	(Flucha, Buchs)
Dihydrofosforečnan sodný dihydrát, ČL 97	(Lachema, Brno)
Hydrogenfosforečnan sodný bezvodý, ČL 97	(Penta Praha)
Chlorid sodný p.a.	(Lachema, Brno)
Methanol pro HPLC	(AlliedSignal, Seelze)
Theofylin, ČL 97	(Lachema, Brno)
Voda pro HPLC	(FaF UK, Hradec Králové)

Uvedené komerčně dostupné substance měly deklarovanou jakost dle daných norem výrobců či dodavatelů.

Testované látky:

Předmětem testování bylo 17 látek, syntetizovaných na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové, jejichž struktury a kódy jsou uvedeny na obrázku 3.



Obrázek 3. Struktury testovaných akceleraantů a jejich zkratky – rozvětvené karbamáty, nerozvětvené karbamáty, rozvětvené alkoholy a dodekanol.

3.2. Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy	(Sartorius, Göttingen)
Biologický termostat BT 120	(Laboratorní přístroje, Praha)
Digitální pH-metr GRYF 209S	(Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod)
Elektronická míchačka	(Cole Parmer)
Lednice ARDO	(ARDO, Itálie)
Liberační zařízení JPP 01	(FaF UK, Hradec Králové)
Magnetická míchačka MM 2A	(Laboratorní přístroje, Praha)
Mraznička M 595/6015	(Calex, Zlaté Moravce)
Ulترatermostat U2 ^o	(VEB MLW Prüfgeräte-Werk, Medingen)
Ultrazvuková lázeň	(Tesla, Vráble)

UV/VIS detektor LCD 2083	(Ecom, Praha)
Analytický software CSW 1.7. 2K	(Ecom, Praha)
Vysokotlaké čerpadlo LCP 4100	(Ecom, Praha)

3.3. Permeační pokusy

3.3.1. Příprava kůže

K permeačnímu testování byla použita prasečí kůže (Skaličan a.s., Česká Skalice). Kůže byla pomocí skalpelu stažena z dorzální strany ucha, poté oholena a na 5 minut ponořena do konzervačního 0,05% roztoku azidu sodného. Osušená kůže byla zatavena do polyethylenových sáčků, evakuována a skladována při teplotě – 18 °C.

3.3.2. Příprava donorových vzorků

100 mg theofylinu a 20 mg příslušného akcelarantu bylo dispergováno ve 2 ml rozpouštědla (propylenglykol:voda v poměru 6:4). Homogenizace probíhala po dobu 5 minut na magnetické míchačce při teplotě 50 °C. Poté byly vzorky uloženy na dobu 48 hodin do termostatu udržujícím teplotu 37 °C.

Příprava standardu

200 mg theofylinu bylo dispergováno ve 4 ml výše uvedeného rozpouštědla. Následný postup přípravy vzorku se shoduje s postupem přípravy donorových vzorků.

3.3.3. Akceptorová fáze

Jako akceptorová fáze byl použit fosfátový pufr pH 7,4 pro své vlastnosti zaručující vysokou rozpustnost permeantu ve fázi, minimální riziko inkompatibilit se stanovovanou látkou, šetrnost k biologickému materiálu a rozlišitelnost retenčního času permeantu a komponent fáze při analytickém hodnocení.

Fosforečnanový pufr pH 7,4

2,1 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v 500 ml vody pro HPLC. 19,1 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného bylo rozpuštěno v 400 ml vody pro HPLC. Roztok hydrogenfosforečnanu byl přidáván k roztoku dihydrogenfosforečnanu za stálého míchání na magnetické míchače. Konečné pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. Fáze byla izotonizována příslušným množstvím chloridu sodného tak, aby bylo docíleno koncentrace 4,4 g/l fáze. Konzervans azid sodný představoval 0,3 g substance/l fáze.

3.3.4. Uspořádání permeačních experimentů

K in vitro testování byly použity Franzovy difúzní cely – tyto permeační buňky se skládají z donorového a akceptorového kompartmentu oddělených vzorky kůže.⁶ Kůže byla fixována mezi dvě destičky z plexiskla, v nichž je vyříznut kruhový otvor o průměru 1 cm ohraničující permeační plochu membrány. Na místech styku ploch jednotlivých částí cely byl nanesen silikonový adhezivní film. Buňky naplněné přibližně 18 ml akceptorové fáze (přesný objem byl zjištěn před pokusem a zahrnut do výpočtu) byly umístěny do vodní lázně a jejich obsah po celou dobu odběru vzorků promícháván magnetickým míchadlem. Stálá teplota (32 °C) byla zajištěna termostátováním. Donorové vzorky byly v množství 200 µl nanесeny na povrch kůže a překryty krycím sklíčkem, aby se zabránilo odpařování média.

Z akceptorového kompartmentu byly ke stanovení koncentrace theofylinu odebírány vzorky v množství 0,6 ml v časových intervalech 19, 23, 27, 39, 41 a 43 hodin. Případný malý posun doby odběru byl při výpočtech vzat v úvahu. Úbytek tekutiny v buňce byl nahrazen akceptorovou fází o stejném objemu. Tento fakt byl zohledněn při korekci hodnot koncentrace permeantu ve vzorcích.

3.4. HPLC stanovení theofylinu

3.4.1. Analytická metodika

Pro určení množství theofylinu ve vzorcích byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Stacionární fázi představovala náplň LiChrospher 100 RP – 18 o velikosti částic 5 μm v koloně LiChroCART (Merck) o průměru 4 mm a délce 250 mm. Mobilní fáze (viz níže) protékala kolonou rychlostí 1,2 ml/min.

Detekce byla prováděna na UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 272 nm.

Na kolonu bylo nastříknuto vždy 20 μl vzorku. Retenční čas theofylinu se pohyboval kolem $3,3 \pm 0,1$ min.

K výpočtu plochy theofylinu pod píkem sloužil analytický software CSW 1.7.

Jako externí standard byl použit 0,01% roztok theofylinu ve fosfátovém pufru.

3.4.2. Mobilní fáze

Již v minulosti byla vypracována metodika pro stanovení theofylinu, která byla přejata pro účely této práce. Mobilní fázi tvořila směs methanolu pro HPLC a 0,1M roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného v poměru 4:6.

l l mobilní fáze obsahoval 7,20 g dihydrogenfosforečnanu sodného nebo 9,36 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného rozpuštěného v 600 ml vody pro HPLC. Tento roztok byl doplněn 400 ml methanolu pro HPLC. Následovala důkladná homogenizace a odplynění v ultrazvukové lázni.

3.4.3. Příprava standardů

Parametry kalibrační křivky byly stanoveny v rámci již vypracované metodiky: kalibrace byla uskutečněna pomocí standardních roztoků theofylinu ve fosfátovém pufru (svým složením odpovídajícím akceptorové fázi) o koncentracích 10, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,1 mg/100 ml. Jednotlivé roztoky byly získány ředěním roztoku o koncentraci

20 mg/100 ml. Roztok o koncentraci 1 mg/100 ml sloužil jako vnější standard během měření.

3.4.4. Parametry kalibrační křivky

Kalibrační roztoky byly třikrát nastříknuty na kolonu a odezva detektoru odečtena jako plocha pod píkem. Z těchto dat byla sestrojena kalibrační křivka, jejíž parametry byly stanoveny metodou lineární regrese.

Kalibrace: $y = 494,5x$ $r = 0,9972$

Hodnota x odpovídá nekorigované koncentraci permeantu v akceptorové fázi, hodnota y představuje plochu pod analyzovaným HPLC – píkem, r je korelační koeficient.

3.5. Stanovení vlivu akcelarantu na rozpustnost theofylinu v donorovém vzorku

Pro stanovení rozpustnosti theofylinu v donorovém vzorku, který byl předtím ponechán 2 dny v termostatu při 37 °C, byly jednotlivé vzorky 5 minut centrifugovány (3000 otáček/min), dále bylo odebráno 20 μ l supernatantu a 2500krát naředěno. Koncentrace theofylinu byla stanovena metodou HPLC.

3.6. Způsob hodnocení

Prvotní nekorigovaná koncentrace theofylinu c_{nk} (μ g/100ml) byla přepočtem, zohledňujícím odběr a doplňování tekutiny do vzorku a mírné odchylky objemu tekutiny v akceptorovém kompartmentu jednotlivých buněk, upravena na korigovanou koncentraci theofylinu c_{kor} (μ g/100ml). Byly tak získány údaje o skutečném množství theofylinu prošlém přes 1 cm^2 kožní membrány Q_t (μ g/ cm^2).

Z dalšího zpracování byla vyloučena data, z jejichž hodnot zanesených do grafu kumulativního množství theofylinu na čase vyplynulo, že při jejich zisku došlo k náhodné či systematické chybě (nestejnorodost permeační plochy membrány, chyby měření, atd.).

Oblast ustáleného toku permeantu byla využita pro výpočet příslušných hodnot směrnic k odpovídajících číselně hodnotám fluxů.

Pro stanovení lag-time u jednotlivých permeací byl prodloužen lineární úsek permeační křivky na osu x ($x = T$) a jako lag-time odečtena hodnota průsečíku osy x a směrnice dané permeace.

Ke statistickému hodnocení byly použity t-testy.

4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv rozvětvení na konci hydrofobního řetězce akceleraantu na jeho účinnost. Látky byly testovány na prasečí kůži plné tloušťky pomocí Franzovy difúzní cely a theofylinu jako modelového permeantu střední polariry. Testované vehikulum propylenglykol/voda bylo vybráno na základě předchozích pokusů, kde bylo zjištěno, že u amfifilních akceleraantů přítomnost propylenglykolu působí synergicky, patrně kvůli odlišnému mechanismu účinku (nepublikované výsledky).

Výsledky práce jsou shrnuty v tabulce 1, jednotlivé hodnoty fluxů pak v příloze 1. Z hodnot fluxů J , respektive akceleračních poměrů fluxů AP_J vyplývá, že všechny testované látky jsou poměrně účinnými akceleraanty. Nejvyšší akcelerační schopnosti byly pozorovány u série karbamátů s nerozvětvenými řetězci (T8 – T13). Tyto látky jsme vybrali jako pozitivní standardy pro zhodnocení vlivu rozvětvení na konci hydrofobního řetězce na akcelerační účinnost. Tyto karbamáty byly testovány již dříve,²⁷ ale za použití lidské kůže, proto bylo nutné je znovu otestovat za stejných podmínek. Akcelerační poměry této série potvrdily předchozí výsledky;¹⁶ závislost účinku na délce hydrofobního řetězce je parabolická s maximem u 10 uhlíků ($AP = 35,1$). S podobným výsledkem (10 – 12 uhlíků jako optimální délka řetězce) se můžeme setkat téměř u všech amfifilních akceleraantů. Teorií, které dávají tento fakt do souvislosti s mechanismem účinku na molekulární úrovni, je několik, žádná však dosud neposkytla uspokojivé vysvětlení.

Série karbamátů s rozvětvenými řetězci (7MOK – 11MDoK) je obecně méně účinná než jejich lineární analogy, rozdíl však není tak markantní jako v případě akceleraantů s rozvětvením řetězce v blízkosti polární hlavy či cyklem místo lineárního řetězce. Nižší účinek rozvětvených derivátů oproti lineárním by se dal vysvětlit horší schopností penetrace rozvětveného, tedy objemnějšího akceleraantu do lipidových lamel SC.

V této práci byla hodnocena také akcelerační aktivita série rozvětvených alkoholů (7MOA – 11MDoA), tedy potenciálních metabolitů testovaných karbamátů. Účinek těchto látek byl slabší než u karbamátů, rozdíl však nebyl statisticky významný.

Akcelerační poměry všech tří testovaných skupin akceleraantů v závislosti na délce jejich řetězce jsou uvedeny v grafu 1. Zde je jasně patrná parabolická závislost na délce řetězce. Dále je zřejmé, že ačkoliv rozvětvení snižuje účinek, nemění nijak optimální délku

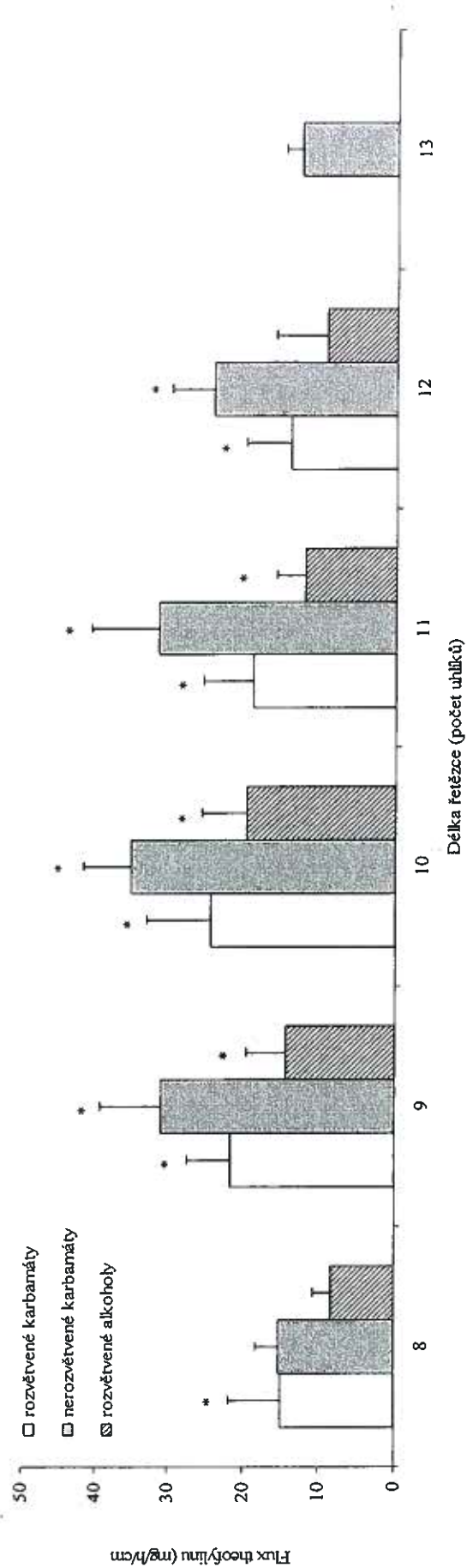
řetězce, která je 10 uhlíků u všech testovaných skupin. Zřejmě zůstává zachován mechanismus účinku těchto akceleračních látek, mění se jen jeho velikost.

Hodnoty lagT theofylinu byly poměrně vysoké, kolem 12 hodin u kontrolního vzorku bez akceleračního činidla, což se dá vysvětlit použitím kůže plné tloušťky. Tato hodnota však vykazuje značnou variabilitu a přidavek akceleračního činidla hodnotu již statisticky významně nemění, kromě dvou látek (viz tab. 1).

Kromě přímého účinku akceleračního činidla v SC mohou tyto látky ovlivňovat permeaci i nepřímo, ve vehikulu, proto jsme se pokusili zjistit, jestli přítomnost akceleračního činidla ovlivňuje rozpustnost theofylinu v donorovém vzorku. Rozpustnost byla stanovována ve stejných vzorcích, které byly použity k permeacím, a přibližně ve stejné době, kdy byly aplikovány na kůži. Toto měření bylo pouze orientační, k přesnějšímu zhodnocení vlivu akceleračního činidla bude potřeba dalších experimentů.

Akcelerant	n	C (mg/cm ³)	LagT (h)	J (mg/h/cm ²)	AP _J
Kontrola	23	22 ± 2	12.7 ± 6.1	0.97 ± 0.54	1
7MOK	7	27 ± 0	19.1 ± 2.7*	14.97 ± 6.80*	15.5
8MINK	8	25 ± 1	14.3 ± 2.7	21.65 ± 5.79*	22.4
9MdeK	6	27 ± 0	17.8 ± 5.1	24.21 ± 8.69*	25.1
10MUK	7	25 ± 1	16.6 ± 6.0	18.78 ± 6.56*	19.5
11MdoK	9	23 ± 2	15.3 ± 2.4	13.98 ± 5.63*	14.5
T8	2	35 ± 0	16.8 ± 1.9	15.19 ± 3.05	15.7
T9	3	25 ± 1	16.6 ± 1.2	30.89 ± 8.25*	32.0
T10	4	27 ± 1	15.1 ± 1.5	35.10 ± 6.50*	36.3
T11	4	27 ± 1	12.1 ± 2.1	31.29 ± 9.22*	32.4
T12	7	26 ± 1	13.7 ± 3.1	24.03 ± 5.49*	24.9
T13	2	27 ± 1	11.1 ± 3.2	12.6 ± 2.05	13.1
7MOA	3	21 ± 1	16.9 ± 5.3	8.36 ± 2.32	8.7
8MNA	4	19 ± 1	13.8 ± 2.6	14.41 ± 5.14*	14.9
9MdeA	4	17 ± 0	12.6 ± 4.1	19.56 ± 5.88*	20.3
10MUA	6	17 ± 2	12.4 ± 5.5	12.02 ± 3.68*	12.5
11MDoA	6	19 ± 0	17.7 ± 2.8*	9.21 ± 6.61	9.5
12A	4	21 ± 2	6.8 ± 2.3	16.05 ± 4.13*	16.6

Tabulka 1. Souhrnné výsledky permeačních pokusů: n – počet opakování; C – rozpustnost theofylinu v donorovém vzorku (n = 2); J – flux theofylinu; AP_J – akcelerační poměr fluxů; LagT – lag-time; * statisticky významně (p < 0.05) odlišný od kontroly



Graf 1. Srovnání fluxu theofylinu z prostředí propylenglykol/voda 6:4 v přítomnosti 1% disperzí testovaných akcelerantů podle délky jejich řetězce. * - statisticky významně ($p < 0.05$) odlišný od kontroly

kontrola	7MOK	8MNK	9MDeK	10MUJ	11MDoK	T8	T9	T10	T11	T12	T13	7MOA	8MNA	9MDeA	10MUA	11MDoA	12A
0,4	11,2	19,1	21,7	18,3	14,5	12,1	24,9	45,7	40,9	13,8	14,7	8,4	14,9	10,3	9,1	16,1	19,1
0,7	20,2	22,6	15,1	17,2	12,4	18,2	43,3	36,6	27,6	19,7	10,5	11,8	4,1	23,9	6,6	22,2	19,5
0,3	15,1	20,8	37,9	8,2	5,4		24,5	22,1	16,6	4,3		4,9	20,9	17,1	18,5	5,6	7,8
2,8	26,6	28,1	34,0	34,1	5,0			36,1	40,1	13,1			17,7	27,0	9,3	2,1	17,8
0,6	21,9	20,4	9,8	26,5	7,8					26,8					12,1	7,1	
1,0	4,1	37,4	26,8	8,7	21,2					29,7					16,6	2,2	
1,3	5,8	9,3		18,6	23,6					26,6							
1,6		15,5			20,8												
0,3					15,2												
0,8																	
2,1																	
1,4																	
2,0																	
1,1																	
0,2																	
0,4																	
0,3																	
0,9																	
0,9																	
1,6																	
0,8																	
0,5																	
0,3																	
0,97	14,97	21,65	24,21	18,78	13,98	15,19	30,89	35,10	31,29	24,03	12,60	8,36	14,41	19,56	12,02	9,21	16,05

Příloha 1. Jednotlivé hodnoty fluxů a jejich průměr (poslední řádek)

5. ZÁVĚR

1. Byla studována schopnost 19 látek (rozvětvené, nerozvětvené karbamáty, rozvětvené alkoholy a dodekanol) urychlovat permeaci theofylinu jako modelového léčiva přes kůži prasečího ucha in vitro.
2. Získané výsledky potvrdily parabolickou závislost mezi délkou hydrofobního řetězce a účinkem akcelerantu s maximem u 10 – 12uhlíkatých řetězců.
3. Terminální rozvětvení řetězce negativně ovlivnilo permeaci theofylinu, ne však do té míry jako rozvětvení v blízkosti polární hlavy akcelerantu.
4. Rozpustnost theofylinu v donorovém vzorku byla mírně zvýšena jak v přítomnosti rozvětvených, tak nerozvětvených karbamátů a naopak mírně snížena v přítomnosti alkoholů.

6. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

AP	akcelerační poměr
AP _j	akcelerační poměr fluxů
C	rozpustnost theofylinu
C _{kor}	korigovaná koncentrace permeantu
C _{nk}	nekorigovaná koncentrace permeantu
C _{s,m}	rozpustnost léčiva v membráně
C _{s,v}	rozpustnost léčiva ve vehikulu
C _v	koncentrace léčiva ve vehikulu
D	difúzní koeficient
J	flux permeantu
K	rozdělovací koeficient permeantu
k	směrnice přímky ustáleného průběhu permeace
L	délka difúzní dráhy v membráně
n	počet bodů regresní přímky
Q ₂₄	množství permeantu prošlého kožní membránou
Q _t	skutečné množství permeantu prošlého 1 cm ² kožní membrány
r	korelační koeficient regresní přímky
SD	směrodatná odchylka
T	čas
LagT	lag-time

7. LITERATURA

1. Menon GK. 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev* 54(1): S3-S17.
2. Morgani P, Ruocco E, Ronni W, Ruocco V. 2001. Percutaneous Absorption and Delivery Systems. *Clin Dermatol* 19:489-501.
3. Barry BW. 2001. Novel Mechanisms and devices to enable succesful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 14:101-114.
4. Suhonen TM, Bouwstra JA, Urti A. 1999. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation stratum corneum structural alterations. *J Control Release* 59:149-161.
5. El-Kattan A, Asbill CS, Haidar S. 2000. Transdermal testing: practical aspects and methods. *Pharm Sci Technol Today* 3(12):426-430.
6. Moser K, Kriwet, K Naik A, Kalia YN, Guy RH. 2001. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 52:103-112.
7. Wertz PW. 2000. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol* 208:7-11.
8. Wertz PW. 1996. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 8:283-294.
9. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. 2003. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* 42:1-36.
10. Kerscher M, Korting HC, Schäfer-Korting M. 1991. Skin ceramides: structure and function. *Eur J Dermatol* 1:39-43.
11. Wertz PW, Bergh B van den. 1998. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids* 91:85-96.
12. Hrabálek A, Vávrová K, Doležal P, Macháček M. 2005. Esters of 6-aminohexanoic acid as skin permeation enhancers: The effect of branching in the alkanol moiety. *J Pharm Sci* 94:1494-9.
13. Šámalová L 2003. Studium modulace a transdermální permeace syntetickými ceramidy na bázi serinu a glycinu. Diplomová práce.

14. Vávrová K, Hrabálek A, Doležal P, Holas T, Zbytovská J. 2003. L-Serine and Glycine Based Ceramide Analogues as Transdermal Permeation Enhancers; Polar Head Size and Hydrogen Bonding. *Bioorg Med Chem* 13(14):2351-2353.
15. Vávrová K, Hrabálek A, Doležal P, Šámalová L, Palát K, Zbytovská J, Holas T, Klimentová J. 2003. Synthetic ceramide analogues as skin permeation enhancers: structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* 11:5381-5390.
16. Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba SS, Singh M. 2000. Structure – activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr Med Chem* 7:593-608.
17. Aungst BJ, Rogers NJ, Shefter E. 1986. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. *Int J Pharm* 33(1-3):25-234.
18. Ogiso T, Shintani S. 1990. Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol. *J Pharm Sci* 79(12):1065-71.
19. Tanojo H, Bouwstra JA. 1997. In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm Res* 14(1):42-9.
20. Lee CK, Uchida T, Noguchi E, Kim NS, Goto S. 1993. Skin permeation enhancement of tegafur by ethanol/panasate 800 or ethanol/water binary vehicle and combined effect of fatty acids and fatty alcohols. *J Pharm Sci* 82(11):1155-9.
21. Sloan KB, Beall HD, Taylor HE, Getz JJ, Villaneuva R, Nipper R, Smith K. 1998. Transdermal delivery of theophylline from alcohol vehicles. *Int J Pharm* 171(2): 185-193.
22. Morimoto K, Tojima H, Haruto T, Suzuki M, Kakemi M. 1996. Enhancing effects of unsaturated fatty acids with various structures on the permeation of indomethacin through rat skin. *J Pharm Pharmacol* 48(11):1133-7.
23. Kandimalla K, Kanikkannan N, Andega S, Singh MJ. 1999. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal water loss in rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 51(7):783-90.
24. Carelli V, Di Colo G, Nannipieri E, Serafini MF. 1992. Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin. *Int J Pharm* 88:89-97.

25. Aungst BJ. 1989. Structure/effect studies of fatty acid isomers as skin penetration enhancers and skin irritants. *Pharm Res.* 6(3):244-7.
26. Chantasart D, Li, SK, He N, Warner KS, Prakongpan S, Higuchi WI. 2004. Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 93:762-779.
27. Hrabálek A, Doležal P, Farsa O, Krebs A, Kroutil A, Roman M, Šklubalová Z. 2001. US 6 187,938.