

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 11

Nanofibre membranes as drug carriers 11

Mgr. Martina Swierkosz

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

Hradec Králové, srpen 2016

PROHLÁŠENÍ

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

V Ostravě dne 21.8.2016

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za všechny čas, který mi věnoval při vypracování rigorózní práce, za jeho rady, ochotu a pomoc. Také děkuji Mgr. Pavlu Berkovi a Mgr. Petru Vrbatovi za získání dat z HPLC a pomoc poskytnutou během měření.

Poděkování patří také mé rodině za podporu v době psaní této práce.

Obsah

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ÚVOD	5
2. ZADÁNÍ PRÁCE.....	6
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1 Cesty léčiv biologickými membránami.....	8
3.1.1 Transcelulární transport.....	8
3.1.2 Paracelulární transport	9
3.2 Oromukozální bariéra	11
3.2.1 Reologické vlastnosti slin	12
3.2.2 Epitely dutiny ústní	13
3.3 Nanovláčenné membrány	14
3.4 Albumin	16
3.4.1 Funkce a využití albuminu.....	17
3.4.2 Medicínské využití albuminu	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
4.1 Použité látky.....	20
4.2 Přístroje.....	21
4.3 Pracovní postupy a metody	22

4.3.2 Příprava citrát-fosforečnanového pufru	22
4.3.3 Úprava donorových membrán s albuminem.....	23
4.3.4 Příprava permeačních komůrek	24
4.3.5 Permeace z membrán, HEPES pufr, citrát-fosfátový pufr	24
4.3.6 Permeace z membrán, HEPES pufr, lidské sliny	26
4.4 Chromatografické podmínky	26
4.5 Zpracování výsledků	26
5. DOKUMENTACE	28
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	38
7. ZÁVĚRY	43
8. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	44
9. LITERATURA.....	45

ABSTRAKT

Sublingvální a bukální aplikační cesty jsou pro některá léčiva variantou systémové aplikace. Po stručném souhrnu základních informací o cestách průniku léčiv do organismu podává teoretická část práce nástin problematiky oromukosální bariéry, zejména v souvislosti s možnými problémy souvisejícími s fyzikálními vlastnostmi slin a mukusu.

Úkolem experimentu bylo ověření liberace a následné permeace albuminu (BSA) sublingvální membránou *in vitro*. Jako biologická membrána byla použita podjazyková sliznice prasete domácího (*Sus scrofa*) uchovávaná při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Náplní *in vitro* pokusů bylo uvolňování a permeace 16-násobně a 32-násobně navrstveného nanomembránového nosiče s obsahem polyvinylalkoholu, polyethylenoxidu a 30 procent směsi (1:1) albuminu (BSA) a fluorescenčně značeného hovězího sérového albuminu (FITC-BSA). Kapalným prostředím pro uvolňování byl citrát-fosforečnanový pufr pH 6,8, resp. jeho směs s lidskou slinou (1 : 1), akceptorovým prostředím HEPES pufr pH 7,4.

Násobně vrstvené nanovlákněné membrány se smáčely bezprostředně po prvním kontaktu s malým množstvím pufru pH 6,8, resp. jím zředěnou slinou. Uvolněný FITC-BSA byl díky žlutému zbarvení pozorovatelný makroskopicky.

Sublingvální membrány zpracované rychlým zmrazením v kapalném dusíku se na základě permeačních výsledků v *in vitro* pokusu jeví jako spolehlivě neporušené po dobu nejméně 6 hodin permeačního pokusu.

BSA procházel sublingvální membránou za daných podmínek ze všech vrstvených nosičů i z ekvivalentně koncentrovaných roztoků. V přepočtu na celkový albumin to bylo na úrovni fluxů J o hodnotách 10 až $20\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$

Nebyla zaznamenána snížená permeace BSA z donorového prostředí citrát-fosforečnanového pufru pH 6,8 s obsahem slin (1:1).

ABSTRACT

Sublingual and buccal routes of represent alternative approaches of system drug administration. After a brief summary of essential information about the ways of drug penetration into the body the theoretical part of the work possess information on oromucosal barriers, particularly in relation to possible problems related to the physical properties of saliva and mucus.

The experiment was to verify the release and subsequent permeation albumin (BSA) through sublingual membrane in vitro was performed. Sublingual porcine (*Sus scrofa*, var. domestica) mucosa stored at - 20 ° C was used as biological membrane.

The content of the in vitro experiments was release and permeation using 16-fold and 32-fold layered nanomembrane carriers containing polyvinyl alcohol, polyethylene oxide and 30 percent of a mixture (1: 1) albumin BSA and fluorescently labelled bovine serum albumin (FITC-BSA). The liquid medium for the release was citrate-phosphate buffer pH 6.8, respectively its mixture with human saliva (1: 1) and the acceptor medium was HEPES buffer pH 7.4.

Multiple layered nanofibrous membrane was perfectly wetted immediately after the first contact with a small amount of buffer pH 6.8, resp., with saliva diluted by buffer. Release FICT-BSA was macroscopically observable due to yellow color arisen.

Sublingual membranes prepared by rapid freezing in liquid nitrogen, based on the permeation results of an in vitro experiment, seemed reliably intact for at least 6 hours permeation experiment.

BSA permeates through the sublingual membrane from all layered nanofiber bodies and solutions at total albumin level fluxes J about 10-20 micrograms/cm² .h⁻¹

No permeation reduction of BSA from the donor medium citrate-phosphate buffer pH 6.8 containing saliva (1: 1) was observed.

1. ÚVOD

Elektrostatické zvláknění je principiálně jednoduchým a široce využitelným procesem tvorby nanovláken z roztoku polymeru nebo polymerní taveniny působením silného elektrického pole. Velkou předností membrán tvořených nanovláknem je jejich vysoká porozita a vysoký poměr povrchové plochy k hmotnosti nanovláken. Medikovaná nanovlákná s obsahem řady dosud obtížně zpracovatelných léčiv jsou příslibem rozvoje nových typů lékových forem. Zejména obrovská plocha, kterou může být léčivo v nich obsažené vystaveno kontaktu s prostředím v místě aplikace, je jednou z výhod, pro kterou jsou v posledních letech nanovláknenné nosiče s obsahem léčiv v dané souvislosti intenzivně studovány. Předkládaná práce k nim patří a představuje další část spolupráce katedry farmaceutické technologie FaF UK s firmou Elmarco, s r.o. Liberec.

Předmětem experimentální části předkládané práce je úvodní hodnocení chování nanovláknenných membrán s obsahem albuminu za in vitro biomimetických podmínek se zaměřením na podchycení případného průniku této vysokomolekulární látky sublingvální membránou. Nanovláknenné membrány byly vyrobeny Ing. D. Stránskou metodou beztryskového zvláknění na výrobním zařízení NanoSpiderTM v laboratořích výše zmíněné firmy. Výsledky byly získány paralelně s prací Mgr. V. Houdkové (2016) po stránce metodické byly získány analogicky, po stránce obsahové ji rozšiřují a interpretačně doplňují.

2. ZADÁNÍ PRÁCE

1. **V teroretické části** podat stručný přehled způsobů průniku léčivých látek buňkami a oromukozální bariérou se zřetelem na vlastnosti součástí oromukozální kapaliny in vivo jako vehikula prvního kontaktu léčiva s biologickým prostředím při sublingválním podání.
2. **Realizovat in vitro permeační pokusy** s transmukozálním podáním albuminu jako modelové vysokomolekulární látky na podjazykovou membránu získanou z prasete domácího (*Sus scrofa v. domestica*) jako hlavní permeační bariérou.

Přitom se zaměřit na in vitro průnik fluorescenčně značeného hovězího sérového albuminu (FITC-BSA), resp. hovězího sérového albuminu (BSA) vpraveného elektrospinningem do vícenásobně vrstveného nanovláknenného polymerního nosiče s obsahem polyvinylalkoholu, polyethylenoxidu a celkem 30 % BSA. Orientačně také provést porovnání s průnikem FITC-BSA z roztoku ekvivalentního množství albuminu za stejných aplikačních podmínek.

Dílním úkolem je získat doplňující údaje o permeaci albuminu z prostředí obsahujícího lidskou slinu.

3. **Vyhodnocení experimentálních dat** z HPLC stanovení FITC-BSA ponechat pracovníkům s příslušnou speciální erudicí.

K následnému vyhodnocení vlastních permeačních dat přednostně využít postupů zavedených v laboratoři katedry, aby bylo možné pokus dobře reprodukovat a výsledky interpretovat i v relacích s jinými pracemi.

4. Zpracování kompletního prvopisu

Pro formulaci závěrů využít vlastních zkušeností z předchozí diplomové práce, případně konzultace s paralelně probíhající rigorózní prací Mgr. Veroniky Houdkové.

5. **Vypracování finální podoby práce a příprava prezentace pro obhajobu.**

3. TEORETICKÁ ČÁST

Myšlenka sublingválního podání léčiv byla pro farmakoterapii poprvé popsána koncem 19. století pro trinitrát glycerolu,¹ označovaný tehdy jako nitroglycerin. Exaktněji byla pro stejnou látku využita po roce 1950, ale větší výzkumné pozornosti se sublingvální terapii znovu dostává teprve v posledních asi 15 letech, a to především v podobě orodisperzních tablet, mukoadhezivních bukálních tablet, sublingválních tablet a sprejů.^{2,3}

Souběžně byl v posledních letech také zkoumán koncept mukoadhezivních přípravků směřujících na absorpční místa na površích sliznic v distálnějších partiích GIT, tedy v žaludku a navazujících součástí střeva. Do současné doby se zatím ukázalo, že tento přístup má stále poměrně daleko k dříve předpokládanému využití. Hlavní důvody spočívají v kontinuálním pohybu a neustálé obnově gelové vrstvy hlenu pokrývající povrchy sliznic.⁴ Výpočty a in vivo experimenty ukázaly, že doba obměny mucinu (hlenu, slizu) je značně rychlá, může být měřena v hodinách.

To vše zatím ukazuje, že perorální mukoadhezivní přípravky, oproti přípravkům s prodlouženým uvolňováním, mají jen malé nebo prakticky žádné výhody. Mukoadhezivní přípravek se totiž v prostředí GIT s lumenálním obsahem v zásadě chová jako normální tablety. In vivo experimenty ukázaly, že v rámci podmínek převládajících v GIT se dosud známé mukoadhezivní polymery nechovají z hlediska řízeného uvolňování optimálně.⁵ Přesto však jsou i poznatky z oblasti mukoadheze pro sublingvální podání léčiv dobře využitelné. A to je dnes považováno za podání použitelné také pro systémové podání výšemolekulárních léčiv.

V oblasti účinných látek typu proteinů a peptidů, které jsou v současnosti označovány několika různými názvy, například jako biologika (biologics), bioterapeutika nebo proteinová terapeutika, se v současnosti objevuje mnoho prací přinášejících nové poznatky o možnostech jejich podávání k diagnostickým i léčebným účelům. Mnohé z biologik jsou založeny na principu protilátek, které jsou zacíleny na specifické typy imunitních buněk, (plazmatické buňky a T-buňky), nebo na buněčné povrchové receptory podílející se na regulaci buněčného chování. Příkladem je epidermální růstový faktor (EGFR), který ovlivňuje růst některých nádorů hlavy a krku. Tyto látky mohou přinést převrat v léčbě mnoha systémových, ale také lokálních onemocnění, například v ústech. Stále však existují tradiční

problémy spojené s jejich podáváním. Protože biologika jsou rychle ničena v žaludku a ve střevě, musejí být podávány parenterálně, což omezuje spektrum možností, za kterých mohou být používány k léčbě. Proto nově vrostl zájem o transmukosální přípravky, kterými by biologika mohla být aplikována.

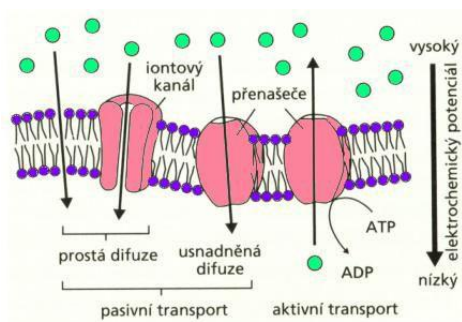
3.1 Cesty léčiv biologickými membránami

Na buněčné úrovni můžeme možnosti transportu léčiv rozdělit na dvě skupiny:⁶

3.1.1 Transcelulární transport

Je závislý na transmembránových mechanismech transportu, k nimž patří:

- **Prostá difuze** – pro látky rozpustné v lipidech (volně pronikají lipidovou dvojvrstvou), malé neutrální molekuly (O_2 , CO_2) a voda
- **Prostup iontovými kanály** – pro ionty a vodu (prostupují přes membránu póry, jejichž základem je vodou naplněný kanál v transportním proteinu, kterým malé molekuly difundují)
- **Primární aktivní transport** – probíhá proti elektrochemickému gradientu (nutný je přísun energie, např. Na^+ a K^+ pumpa)
- **Sekundární aktivní transport (spřažený transport)** – je sám o sobě pasivním transportem, ale je spřažen se systémem, při kterém je spotřebovávána energie. Existují dva typy tohoto transportu: symport – transport látek stejným směrem a antiport – transport látek opačným směrem.
- **Endocytóza, exocytóza** – pro transport látek pomocí transportních vezikul (je využíván řadou látek, např. cholesterolem, proteiny)



Obr. 3.1 Základní transportní mechanismy⁷

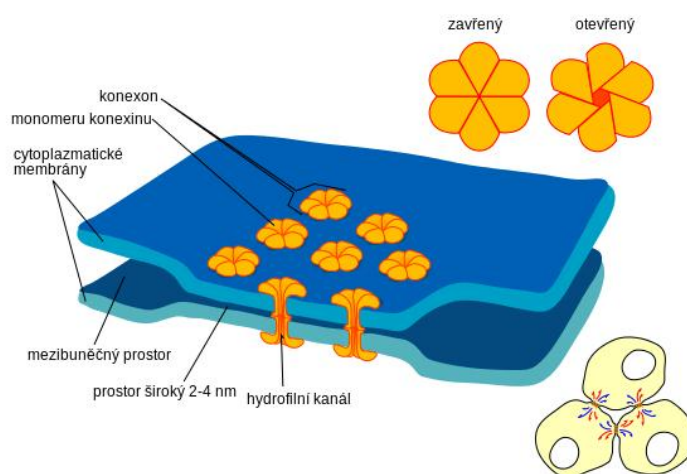
U transmukosální absorpce v oblasti dutiny ústní se transcelulární průnik léčiv běžně týká jen omezené skupiny lipofilních nízkomolekulárních látek (např. zmíněného trinitrátu glycerolu).

3.1.2 Paracelulární transport

Cesty paracelulárního transportu jsou charakterizovány i limitovány typem a funkčním stavem intracelulárních kontaktů (gap junctions a tight junctions). Podle počtu vrstev, šířky a symetrie intracelulárního prostoru dělíme tyto kontakty do tří kategorií: ^{8,9}

● **Zonula occludens = těsné spojení** – dochází zde k těsnému přiblížení zevních listů membrán. Podle počtu listů membrán dělíme toto spojení na: ⁶

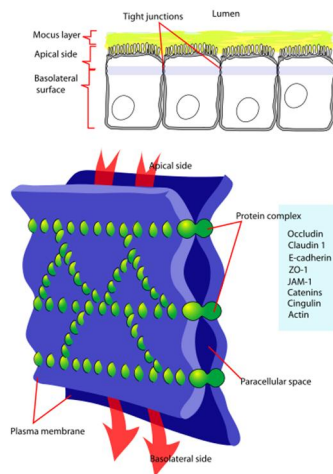
„**gap junctions**“ = **skulinové spojení**, kde zevní listy se přiblíží na vzdálenost 2 nm až 3 nm bez úplného uzavření štěrbin (zaujímá menší plochu). Tímto spojením je umožněn transport iontů a malých molekul mezi sousedními buňkami. ^{10,11}



Obr. 3.2 Základní transportní mechanismy: Gap Junctions ¹²

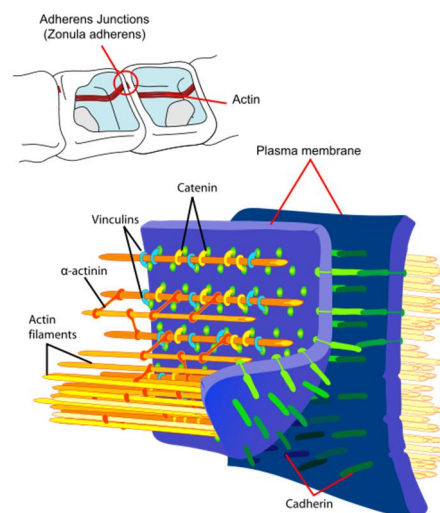
„**tight junctions**“ = **pravé těsné spojení**, kde dochází ke splynutí zevních listů membrán (obepíná celý obvod buňky). Toto spojení hraje klíčovou roli v ovlivnění permeability. Je tvořeno rodinou transmembránových proteinů a okcludinem, jehož role je stále ještě zkoumána. Tight junctions obsahují nejméně 40 různých proteinů. Klaudin a okcludin jsou transmembránové proteiny zodpovědné za intercelulární, mezibuněčnou adhezi, zatímco proteiny zonula occludens 1 a zonula occludens 2 (ZO-1, ZO-2) ^{13,14} a cingulin ¹⁵ řadíme mezi intracelulární proteiny, které vytvářejí síť mezi transmembránovými proteiny a aktinovým cytoskeletem. ^{16,17}

Jsou to proteiny lokalizované na periferní straně membrány a podílejí se na spojení okludin-aktin jako základu cytoskeletonu. Proteiny se tedy takto napojují z každé strany na jednu z membrán a tím většinou látek zamezí průniku mezi těmito membránami.^{6,7}



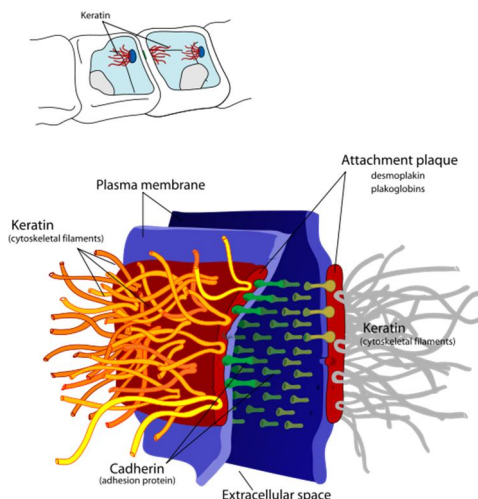
Obr. 3.3 Základní transportní mechanismy – Tight Junction¹⁸

- **Zonula adherens = zpevňující kontakt** – volné přiblížení obou membrán, objevující se v endoteliálních buňkách. Tento spoj je tvořen proteiny kadheriny. Pevnost tohoto spoje je dána provázáním adhezního spoje s buněčnou kostrou, cytoskeletem (z vnitřní strany se na tento spoj váží vlákna aktinu – mikrofilamenta). S tímto spojem je svázána další skupina proteinů regulující buněčnou adhezi (např. α -katenin, β katenin).¹⁹



Obr. 3.4 Transportní mechanismy – Zonula adherens¹⁹

- **Macula adherens = desmosom** - nejsložitější ze zmíněných kontaktů, který je tvořen diskoidním útvarem. Intercelulární prostor je široký 40 nm - 50 nm. Štěrbinu symetricky rozdělují materiály uložené mezi membránami. Uspořádaný systém cytoplazmatických filamentů je symetricky umístěn na cytoplazmatické straně buněk.²⁰



Obr. 3.5 Transportní mechanismy – desmozomy²¹

3.2 Oromukozální bariéra

V ústní dutině jsou aplikačně dostupné celkem čtyři poněkud rozdílné oblasti sliznice. Pro systémové podání léčiv je potenciálně použitelná oblast sliznice bukální a sublingvální. Zejména sublingvální sliznice je tenčí a více propustná než ostatní povrchy sliznice dutiny ústní. Zaujímá relativně dostatečnou plochu, není keratinizována a vyznačuje se vysokým průtokem krve. To vše při sublingválním podání teoreticky umožňuje rychlý nástup účinku léčiva v případech, kdy je to žádoucí. Sublingvální cesta se proto dosud používá především pro podání léčiv při léčbě akutních stavů. Předpokládá se, že většina léčiv, včetně případů biologik, proniká oromukozální membránou paracelulárně.

Nejen u perorálního podání do GIT, ale také u sublingvální aplikace je jedním z problémů to, že povrch sliznice v místě kontaktu s léčivem je neustále omýván slinami. U sublingválního podání sice není problémem peristaltika, ale kontakt účinné látky se sliznicí ovlivňují a ztěžují pohyby jazyka. Tento faktor se v praxi těžko koriguje. Ani složení slin není u daného jedince v průběhu dne konstantní. V každém případě ovšem je první překážkou průniku léčiva přes sliznici v ústech produkt mezibuněčných granulí, který je přítomen na nejsvrchnějších buňkách slizničního epitelu v podobě 200 mikrometrů silné vrstvy.^{22,23} Na

epitelech ústní dutiny jsou takto uloženy produkty označované souhrnně jako mukus, hlen. Ten se v podstatě sestává z proteinů a sacharidů, základních fyziologických iontů a vody. Udržuje hydratovaný stav povrchu ústní dutiny, poskytuje lubrikaci, koncentruje ochranné molekuly (např. imunoglobuliny) a snižuje uchycení mikroorganismů. Mucin obsahuje sulfhydrylové skupiny a ionizované skupiny kyseliny sialové, je záporně nabitý a je zodpovědný za mukoadhezi.²⁴

Vzhledem k tomu, že efektivitu sublingválního i bukalního podávání léčiv ovlivňují vlastnosti mukusu a slin, jsou k nim v následujících odstavcích uvedeny některé relevantní informace.

3.2.1 Reologické vlastnosti slin

K popisu tekutiny přítomné v ústní dutině se používají pojmy jako celá slina, kompletní slina, smíšená slina, komplexní slina, ústní tekutina nebo orální tekutina. Slina se skládá z 99,5 % vody, bílkovin (0,3%), anorganických látek a stopových látek (0,2%).^{25,26} Proteiny ve slinách (1mg až 2 mg/ml) jsou tvořeny převážně glykoproteiny, enzymy (např. α -amyláza), imunoglobuliny, a značně širokou paletou peptidů (cystatiny, statherin, histatiny a proteiny bohaté na prolin) s antimikrobiální aktivitou.^{27,28} Anorganický podíl slin obnáší elektrolyty obvyklé v tělních tekutinách (sodík, draslík, hořčíkový a vápenatý kation, chloridový, hydrogenuhličitanový a hydrogenfosforečnanový anion), ale v odlišných koncentracích.

Typ sekretu, který produkují slinné žlázy, souvisí s poměrem serózní mukózní složky žláзовých buněk. Serózní buňky, které se nacházejí v příušních, submandibulárních, palatálních (patrových) a lingválních žlázkách, vylučují vodnatou tekutinu téměř bez obsahu hlenu. Tato sekrece je silně závislá na aktivaci nějakým stimulem. Kromě toho slizniční buňky přítomné v submandibulárních, a hlavně sublingválních žlázkách produkují sliny velmi bohaté na viskózní mukus. Ten je vždy do jisté míry elastický a zabraňuje dehydrataci sliznic v ústech.²⁹

Kompletní slina může být reologicky klasifikována jako non-newtonovská tekutina. Viskozita slin totiž při zvýšeném mechanickém smykovém namáhání klesá.³⁰ Hlavním důvodem pro tixotropní charakter celé sliny jako mírně viskózního gelu je přítomnost velkých glykoproteinů, mucinů. Dřívější studie prokázaly, že viskozita slin, které neobsahují muciny s

vysokou molekulovou hmotností, je na smykovém napětí nezávislá a je jen o něco vyšší než samotné vody. Původ a typ mucinu tedy hrají důležitou roli, viskozita submandibulární a palatální sliny je ještě o něco nižší a méně tixotropní než slina sublingvální.³¹

Vysoká pružnost sublingválních slin a jejich vhodná přilnavost k ústní sliznici umožňují jejich retenci, submandibulární sliny zase více přispívají k lubrikaci při mluvení, tvorbě bolusu a k polykání.³²

Dalším parametrem ovlivňujícím reologické vlastnosti slin a mucinu je hodnota jejich pH. Viskozita slinných mucinů je největší při pH o hodnotách kolem 4,60, zatímco u žaludečního mucinu prasat je tomu při pH 2,95. Toto optimum mizí při významně zvýšené iontové síle prostředí. V některých případech mělo snížení pH za následek pokles viskozity celkové nestimulované sliny a jen malé zvýšení viskozity stimulované sliny. Tyto účinky pH obecně byly vysvětleny konformačními změnami proteinů.³³

Viskozita slin během skladování v průběhu několika hodin klesá. Bylo zjištěno, že při teplotě místnosti je viskozita stimulované sliny enzymaticky a viskozitně stabilní nejméně po dobu 30 minut. Je-li potřeba zabránit změnám viskozity slin, doporučuje se přidat inhibitory proteáz přímo po odběru slin.³⁴

Pro in vitro permeační pokusy je důležité, že se důrazně nedoporučuje používat muciny odvozené od jiných druhů. Zejména prasečí žaludeční hlen a hovězí podčelistní mucin nejsou jako model lidských slin vhodné.³⁵

3.2.2 Epitely dutiny ústní

V ústní dutině lze nalézt tři typy ústní sliznice, nekeratinizovaná bukalní a sublingvální a měkké patro (zaujmají asi 60 % plochy) s tenkou a pružnou lamina propria, keratinizovaná sliznice gingivální a tvrdé patro (asi 25 % plochy), které obsahuje neutrální lipidy, jako ceramidy a acyl ceramidy, pevně vázaná k periostu a specializovaná sliznice na zadní části hřbetu jazyka (asi 15 % plochy) s množstvím dobře vyvinutých papil, která je jak keratinizovaná tak bez keratinu.³⁶

Povaha epitelů dutiny ústní se tedy liší podle lokalizace, obecně se však všechny chovají jako bariéra lipofilního typu. Pro nízkomolekulární léčiva s určitým vyšším stupněm lipofility je přitom hlavní cestou průniku látek transcelulární prostup sliznicí bukalní a sublingvální.

Permeabilitu hydrofilních a ionizovatelných léčiv popisují vztahy rozdělování podle pH a teorie pasivní difúze.³⁷ Zvyšující se neionizovaný podíl u ionizovatelných látek by měl podporovat penetraci léčiva transcelulární cestou. Známý je příklad lidokainu jako slabé base s hodnotou pKa 7,9. Pokles pH zvyšuje iontovou frakci a jeho rozpustnost, ale snižuje propustnost přes ústní sliznici.³⁸

Peptidy jsou těmito sliznicemi vzhledem k jejich obvykle nízké lipofilitě transportovány paracelulárně, tedy intercelulárně, a to převážně pasivní difuzí vodními cestami.³⁹ Při paracelulárním transportu záleží na typu a funkčnosti přítomných intracelulárních spojů, tzv. tight junctions, (viz výše), a v neposlední řadě na fluiditě buněčné membrány, konformaci proteinů slizniční membrány a na vlastní struktuře aktivního peptidu. Předpokládá se, že bukalní a sublingvální sliznice jsou pro velké molekuly nepropustné, což se tedy týká i většiny peptidů. Přesto stále existuje značný zájem o vyhovující řešení, které by tuto bariéru překonalo a vedlo ke zvýšení permeability těchto slizničních membrán. Možnosti zlepšení ústní absorpce těchto látek spočívají v uplatnění enhancerů nebo inhibitorů enzymů, nebo v případě polypeptidů zvýšením jejich stability modifikací biokompatibilními funkčními skupinami, nebo použitím bioadhezivních aplikačních systémů.^{40,41,42}

V posledních letech tak byly v oblasti sublingválního podání proteinů zaznamenány určité úspěchy. Zajímavá je například informace od firmy Genex Biotechnology, která přišla s komerčně použitelným systémem směsných micel a enhancerů pro podání insulinu přes sliznici dutiny ústní.⁴³ Nedávno zavedené typy sublingválních a bukalních přípravků podává například přehled z roku 2011,⁴⁴ a některé novější.⁴⁵

Kromě toho se ovšem objevují také nové přípravky k lokálnímu podání biologických látek pro lokální léčbu onemocnění ústní sliznice, (ekzémy, mykózy, aftózní vředy). Nové mukoadhezivní gely a náplasti zlepšují lokalizaci působení léčiv přímo na postižených místech.

3.3 Nanovláknenné membrány

Elektrospinning je jednoduchý a univerzální proces, kterým se vyrábějí nanovláknna pomocí elektrostaticky vytaženého ultratenkého vlákna z roztoku polymeru, taveniny polymeru nebo z hybridních anorganicko-organických směsí.⁴⁶ Představují příslib pro rozvoj

nových systémů k aplikaci léčiv, což je dáno jejich vysokým specifickým povrchem, vysokou porozitou a schopností zapouzdřit vysoký podíl léčiva (drug loadings).^{47,48,49}

Vlastnosti polymerů, které podmiňují vysokou úroveň retence přípravku v dané aplikační lokalitě pokryté vrstvami mukusu, zahrnují hydrofilitu, záporný náboj a přítomnost funkčních skupin poskytujících vodíkové vazby. Kromě toho by povrchová energie polymeru měla být dostatečná k potřebnému "smáčení" tekutinou na slizničním povrchu. Polymer by měl rovněž mít dostatečnou flexibilitu, aby jeho řetězce mohly proniknout sítí mukusu, být biokompatibilní, netoxický a ekonomicky výhodný. Literatura dělí mukoadhezivní polymery na klasickou první a novější druhou generaci.

V první generaci jsou polymery rozděleny do tří hlavních skupin v závislosti na jejich povrchovém náboji. Zahrnují tak aniontové, kationtové a neiontové polymery.

Aniontové polymery jsou používány v rámci farmaceutických přípravků nejčastěji z důvodu jejich vysoké mukoadhezivity a nízké toxicity, resp. dráždivosti. Jsou charakterizovány přítomností karboxylových a síranových funkčních skupin, které při hodnotách pH nad pKa polymeru vedou k vytvoření čistě záporně nabitého povrchu. Mezi typické příklady patří deriváty kyseliny polyakrylové (PAA) a její slabě zesítěné deriváty a sodná sůl karboxymethylcelulózy (CMC-Na), které vzhledem k tvorbě silné vodíkové vazby s mukusem vykazují vynikající mukoadhezivní vlastnosti.⁵⁰

Mezi kationtovými polymerními systémy, je nejvíce zkoumán chitosan a jeho deriváty. Chitosan je kationtový polysacharid, vyrábí se deacetylací chitinu a je vedle celulózy nejrozšířenějším polysacharidem.⁵¹ Chitosan je populární vzhledem k jeho biologické kompatibilitě, biologické rozložitelnosti a příznivým toxikologickým vlastnostem.⁵²

Váže se iontovými interakcemi svých primárních aminoskupin a sialovou kyselinou a sulfonovou kyselinou na substrukury hlenu.⁵³

Cyklodextriny (CD) řadíme do skupiny cyklických oligopolymerů α -D-glukosy, mají řadu výhodných vlastností, jsou-li získávány biotechnologicky jsou označovány jako nativní, z nichž se dále připravují modifikované CD. CD komplexy jsou využívány i pro jejich stabilizační účinek, zlepšují stálost vodných roztoků chemicky labilních léčivých látek, biopolymerů, polypeptidů, bílkovinných frakcí.⁵⁴ Pro inkorporaci velkých molekul nejsou vhodné.

Použitím hydrofilních a hydrofobních polymerů můžeme vytvořit membránu s vlastnostmi, které by při použití jen jednoho typu polymeru (hydrofilního nebo hydrofobního) nebylo možné. Výběrem vhodných polymerních látek pro výrobu membrán lze ovlivnit uvolňování léčiva (např. prodloužení nebo zrychlení jeho uvolňování) a tím ovlivnit jeho terapeutický účinek léčiva, případně snížit nežádoucí vedlejší účinky.^{55,56}

K možným variantám patří také inkorporace cyklodextrinů (β -CD) do roztoku PVA a s tím spojená tvorba membrán s uvolňováním léčiva zrychleným z týdnů na minuty.

Tato vlastnost se využívá hlavně při léčbě akutních onemocnění, při kterých je potřeba okamžitý účinek léčiva (použití nitrátů u symptomatické léčby myokardiální ischemie s okamžitým ovlivněním anginózní bolesti).

Polyvinylalkohol (PVA) je biodegradabilní, hydrofilní polymer se specifickými vlastnostmi.^{57,58} Vzniká alkalickou hydrolýzou polyvinylacetátu neboli procesem zmýdelnění.^{59,60,61} Řadí se mezi hydrofilní termoplastické polymery,^{62,63,64} je netoxický, chemický odolný a biologicky rozložitelný. Díky těmto vlastnostem našly PVA membrány své uplatnění v biomedicíně.⁶⁵

Jeho vlastnosti závisí na stupni hydrolýzy polyvinylacetátu (částečná hydrolýza, úplná hydrolýza), na molekulové hmotnosti (20 000 – 400 000)⁶⁶ a na stupni krystalizace.⁶⁷

Směsi polymerů mohou ovšem také efektivně prodloužit uvolňování léčiva a snížit toxicitu plynoucí z jejich rychlého uvolnění. Této vlastnosti se využívá při léčbě chronických onemocnění, např. při profylaxi myokardiální ischemie při chronické stabilní angině pectoris.⁶⁸

3.4 Albumin

Lidský albumin tvoří podstatnou část krevních bílkovin (albuminy, globuliny, fibrinogen). Z 50% až 60 % představuje nejhojněji zastoupenou složku. Nevyskytuje se jen v krvi (42 %), ale i v dalších tělních tekutinách (tkáňový mok, mozkomíšní mok) a tkáních (svaly, podkoží).

Molekula albuminu (molekulová hmotnost 69 000) má tvar elipsy a je tvořena jedním polypeptidovým řetězcem o 585 aminokyselinách. Obsahuje 17 disulfidických můstků, které se pomocí proteáz štěpí a tvoří tři jednotky (α , β , γ). Tyto jednotky spolu vzájemně spolupracují a umožňují albuminu fungovat jako transportér látek (např. léčivé látky, mastné kyseliny) a zároveň pomáhají udržet stále vnitřní prostředí.

Syntéza plazmatických proteinů probíhá především v játrech. Za den vyprodukují asi 12 g albuminu, což představuje asi 50 % proteinů vylučovaných játry a čtvrtinu proteinů v játrech vytvořených. Při poruše syntézy albuminu může dojít k hypoalbuminemii (snížená koncentrace albuminu) nebo k hyperalbuminemii (zvýšená koncentrace albuminu).

Vazba malých molekul na plazmatické bílkoviny má ochrannou funkci, snižuje jejich osmotickou účinnost a chrání je před vylučováním ledvinami. Tato vazba je reverzibilní a umožňuje transport látek z místa resorpce, produkce nebo zásoby do cílových orgánů a tkání.⁶⁹

3.4.1 Funkce a využití albuminu⁷⁰

Udržování objemu plazmy

Stěna systémových kapilár je volně propustná pro vodu a nízkomolekulární látky, to znamená, že jejich koncentrace v plazmě i v intersticiální tekutině je stejná. Stejný je i osmotický tlak obou tekutin. V krevní plazmě se nachází více bílkovin, jejichž molekuly uplatňují na stěny kapilár osmotický (onkotický) tlak 25-30mm Hg. Tento tlak je vzhledem k nízké molární koncentraci plazmatických proteinů malý, ale má značný biologický význam – nasává vodu z intersticia do kapilár. Proti němu působí hydrostatický tlak v cévách. Tyto síly, působící proti sobě, jsou zodpovědné na udržení stálého objemu intravaskulární tekutiny.

Při nedostatečné syntéze plazmatických bílkovin se v důsledku nadměrného průniku vody do tkání objevují otoky.

Transportní funkce

Plazmatické bílkoviny mají velký povrch, který umožňuje vázat a transportovat velké množství důležitých látek:

Transport volných mastných kyselin

Albumin má pro volné mastné kyseliny několik vazebných míst s různou afinitou, pevnost vazby závisí na délce acylového řetězce mastné kyseliny.

Transport bilirubinu

Bilirubin je žlučové barvivo, které vzniká z hemoglobinu. Hemoglobin se skládá z hemu (nebílkovinná složka) a globinu (bílkovinná složka). Po rozpadu erytrocytu se hem mění na bilirubin (nekonjugovaný, volný). Samotný bilirubin je nerozpustný ve vodě. Po vazbě na albumin je transportován do jater, kde se naváže na cukernou složku a stane se dobře rozpustným (konjugovaný, vázaný bilirubin). Následně je vyloučen do žluči, do trávicí trubice, kde se vlivem dalších chemických reakcí mění na sterkobilin. Sterkobilin je vylučován stolicí (hnědé zbarvení). Část bilirubinu se ve střevě vrací zpět do krve (enterohepatická oběh) a je vylučován ledvinami, močí.⁷¹

Transport hormonů (hormony štítné žlázy – trijodthyronin, thyroxin; hormony steroidní povahy)

Transport léků a xenobiotik (antibiotika, sulfonamidy, aspirin, dikumarol...), transport mědi, vápníku, zinku, hořčíku

3.4.2 Medicínské využití albuminu⁷²

Hypovolemie (nedostatek krevní tekutiny – plazmy – v krevním oběhu)

Protože albumin působí onkotickým tlakem, dokáže při nedostatku krevní tekutiny „nasát“ tekutinu zpět z tkání do krevního oběhu. Léčbu hypovolemie albuminem volíme u pacientů s dostatečnou hydratací, u kterých z nějakého důvodu dochází ke ztrátě krevních tekutin z krevního oběhu do mezibuněčných prostor.

Hypoalbuminemie

Snížená koncentrace albuminu může mít různé příčiny. Patří mezi ně snížená syntéza albuminu v játrech (těžké poranění jater, podvýživa), extrémní nároky organismu na živiny a energii (těžká poranění, popáleniny) a patologický únik albuminu z organismu (onemocnění ledvin, těžká zánětlivá onemocnění).

Těžké popáleniny

Při popáleninách dochází k abnormální ztrátě bílkovin. Podávaný albumin může částečně tyto ztráty vyrovnat.

Syndrom dechové tísně u dospělých

Při nedostatku bílkovin se tekutina z krevní plazmy dostává do tkání, hromadí se v plicích a dochází k dechovým obtížím. V tomto případě může být nasazena léčba albuminem spolu s léky podporující močení (vyloučení přebytečné vody z organismu).

Nefróza

Při onemocnění ledvin může dojít k úniku albuminu močí. Doplněním albuminu se zmírňují otoky způsobené únikem tekutiny z krevního oběhu do tkání.

Operace kardiopulmonálního by-passu (mimotělní oběh používaný zejména při operacích srdce).⁷³ Doporučuje se podávat albumin pacientům před operací nebo v jejím průběhu.

Hemolytická nemoc novorozence

Při této poruše dochází k nadměrnému rozpadu erytrocytů a uvolňování bilirubinu. Podávání albuminu může zmírnit toxické účinky bilirubinu.

Dnes jsou v distribuci dostupné přípravky se dvěma koncentracemi albuminu (5%, 20%). Každá koncentrace má své specifické využití. Albumin je získáván z krve zdravých dárců, kteří prošli přísnou a pečlivou kontrolou.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité látky

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

Albumin hovězí, lyofilizovaný

(No. A 9647); BSA	Sigma-Aldrich, Praha
Dihydrogen fosforečnan sodný (ČL 2009)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1 ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, Praha
Hydroxid sodný (ČL 2009)	Penta, Praha
Chlorid sodný (ČL 2009)	Penta, Praha
Kyselina citrónová (ČL 2009)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Voda čištěná (ČL 2009)	FaF UK, Hradec Králové
Voda pro HPLC ultračistá	FaF UK, Hradec Králové

Testované nanovláknenné membrány byly získány od firmy Elmarco s.r.o., se sídlem v Liberci, k dispozici byly dány s následujícími údaji:

Podkladový substrát: PP spunbond modrý

Polymer: 11% PVA/PEO/Albumin 30%

2,3893g Albuminu na 50,0g roztoku (sušina 5,5g), 15,6 g/m²

Detailní kvantitativní složení nanovláknenných membrán je uloženo v podkladech u výrobce.

4.2 Přístroje

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

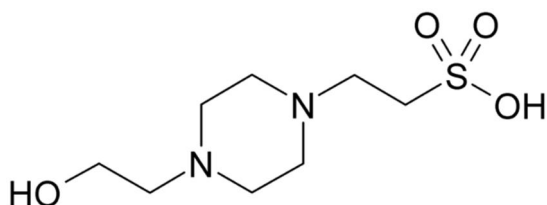
Sestava HPLC Agilent Technologies 1200

- Isokratické čerpadlo: Iso Pump G1310A
- UV/VIS detektor: VWD G1414B s proměnnou vlnovou délkou
- Kolony: Zorbax Eclipse plus C18, oktadecylsilanový sorbent, průměr 4,6 mm, délka 150 mm, zrnitost 5 mikrometrů
- Mobilní fáze: fosfátový pufr pH 2,5: acetonitril (55:45)
- Software: ChemStation 1.22

Další pomůcky: Standardní skleněné vialky o objemu 1,5 až 2,0 ml, vialky objemu 5 ml a 10 ml a další běžné laboratorní sklo, mikropipety, hliníková folie, permeační komůrky, výsečník.

4.3 Pracovní postupy a metody

4.3.1. Příprava HEPES pufru pH 7,4



Kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethansulfonová⁷⁴

HEPES pufr o pH 7,4, byl použit k simulaci prostředí extracelulární tekutiny

Složení:

Dihydrogenfosforečnan sodný R	0,21 g
HEPES volná kyselina	11,9 g
Roztok hydroxid sodného	20,0 ml
Chlorid sodný	16,4 g
Voda pro HPLC	ad 1000,0 ml

Postup:

V 500 ml vody pro HPLC se rozpustí 11,9 g HEPES. Ve 100 ml vody se rozpustí chlorid sodný a přidá se k roztoku HEPES. Pomocí dihydrogenfosforečnanu sodného a hydroxidu sodného se následně upraví bazicita roztoku na pH 7,4. Nakonec se přidá 400,0 ml vody, vznikne 1000 ml roztoku.

4.3.2 Příprava citrát-fosforečnanového pufru

Složení:

Dihydrogenfosforečnan sodný R	5,53 g
Kyselina citrónová	0,48 g
Voda čištěná	ad 100,0 ml

Postup:

V 50 ml vody se rozpustí 0,48 g kyseliny citronové. V 50 ml vody se rozpustí dihydrogenfosforečnan sodný a přidá se k roztoku kyseliny citronové. pH konečného roztoku je 6,8.

4.3.3 Úprava donorových membrán s albuminem

Membrány jsme nastříhaly na čtverečky velikosti 5 cm x 5cm (25 cm²).

Jednotlivé čtverečky jsme poskládaly na sebe do 32 vrstev a 16 vrstev bez použití pojiv a pomocí výsečnicku přizpůsobily otvoru v připravené komůrce. Vytvořené vrstevnaté struktury jsme poté zvážily na analytických vahách (čisté membrány bez obalových vrstev) a zaznamenaly jsme navážky.

Byly zaznamenány a současně kódovány tyto hodnoty navážek:

Membrány pro komůrku **HEPES pufr – CITRÁT-FOSFÁTOVÝ pufr**:

Polymer: 11% PVA/PEO/Albumin 30%; (1 díl BSA a 1 díl FITC_BSA)

Substrát: PP spunbond modrý

2,3893g Albuminu na 50,0g roztoku (sušina 5,5g), 15,6 g/m²

n1 (32 vrstev) = 0,031 g

n5 (16 vrstev) = 0,019 g

n2 (32 vrstev) = 0,034 g

n6 (16 vrstev) = 0,020 g

n3 (32vrstev) = 0,037 g

n7 (16 vrstev) = 0,018 g

n4 (32vrstev) = 0,031 g

n8 (16 vrstev) = 0,019 g

Membrány pro komůrku **HEPES pufr – SLINY : CITRÁT-FOSFÁTOVÝ pufr (1:1)**:

Polymer: 11% PVA/PEO/Albumin 30%; (1 díl BSA a 1 díl FTIR BSA)

Substrát: PP spunbond modrý

2,3893g Albuminu na 50,0g roztoku (sušina 5,5g), 15,6 g/m²

n1 (32 vrstev) = 0,038 g

n2 (32 vrstev) = 0,039 g

n3 (32 vrstev) = 0,036 g

2,2842g Albuminu na 50,0g roztoku (sušina 5,2g), 14,0 g/m²

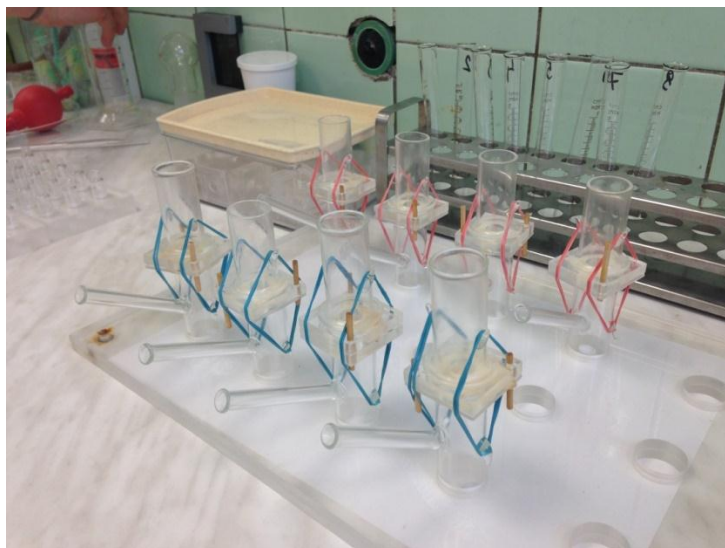
n1 (32 vrstev) = 0,039 g

n2 (32 vrstev) = 0,035 g

n3 (32 vrstev) = 0,036 g

4.3.4 Příprava permeačních komůrek

Permeační komůrka byla složena ze spodní části, která obsahovala 20,0 ml HEPES pufru pH 7,4, magnetického míchadla, dvou sklíček mezi nimiž byla natažena sublingvální membrána a kloboučku (viz **Obr. 4.1**). Ke spojení obou sklíček jsem použila silikon. Takto připravené komůrky jsem vložila do vodní lázně (viz **Obr. 4.2**) vytemperované na teplotu těla $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.



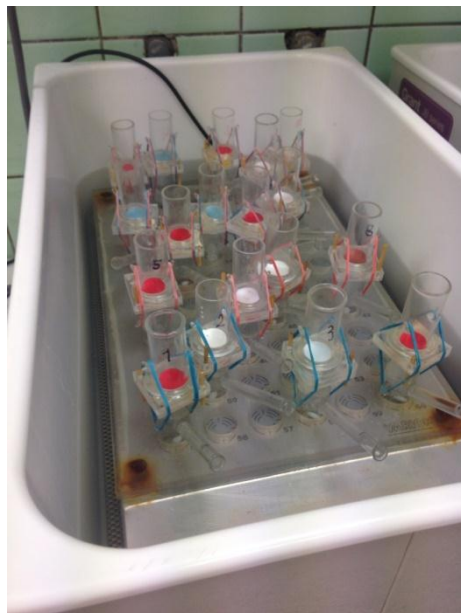
Obr. 4.1: Sestavená sada permeačních komůrek

Jako sublingvální membránu jsem použila preparát z jazyka prasete domácího s minimalizovaným množstvím svalové tkáně. Po rozmražení jsem podjazykovou membránu potřela malým množstvím HEPES pufru, aby došlo k jejich pomalému prohřátí a hydrataci. Membránu jsem mezi sklíčka vkládala svalovou stranou směrem dolů a následně jsem sklíčka zakolíčkovala.

4.3.5 Permeace z membrán, HEPES pufr, citrát-fosfátový pufr

Do permeační komůrky jsem doplnila cca 18 ml HEPES pufru 7,4 a na uchycenou sublingvální membránu jsem do otvoru mezi sklíčky v permeační komůrce nakápla 200 μl

citrát-fosfátového pufru, pinzetou jsem vložila terčíky nanovlákných membrán, doplnila 200 μ l citrát-fosfátovým pufrům pH 6,8, začala měřit čas, komůrku přikryla víčkem, a kompletní sestavu vložila zpět do temperované vodní lázně.



Obr. 4. 2 Uložení permeačních komůrek v termostatované lázni

Ve stanovených časových intervalech jsem odebírala 0,6 ml vzorku akceptorového média pomocí injekční stříkačky a přemísťovala je do vialek pro autosampler HPLC. Zároveň jsem do permeačních komůrek doplňovala HEPES pufr. Odběry probíhaly v předem stanovených časových intervalech (po 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 420, 480, 1260 a 1440 minutách).

Odebrané vzorky akceptorové fáze jsem zakryla alobalem (ochrana před světlem) a dávala do lednice, kde byly uchovávány před HPLC stanovením FITC-BSA.

Totéž jsem provedla se dvěma permeačními komůrkami, ve kterých byl místo donorových nanomembrán jako nosič vpraven pouze roztok s ekvivalentním množstvím albuminu (9 dílů BSA a 1 díl FITC-BSA).

4.3.6 Permeace z membrán, HEPES pufr, lidské sliny

Odebrané vzorky sliny jsem smíchala s citrát-fosfátovým pufrům v poměru 1:1 o pH 6,85 a použila k nakápnutí na terčičky nanovláken s 32 vrstvami umístěné v permeačních buňkách a provedla permeační experiment analogicky jako v předchozích případech.

4.4 Chromatografické podmínky

Nástřik vzorku byl na autoinjektoru chromatografické soustavy nastaven na 20 μ l, průtok mobilní fáze činil 0,8 ml/min, teplota kolony byla nastavena na 30°C, doba separace byla omezena na 7,5 min, vlnové délky fluorescenčního stanovení FICT činily $E_x = 495\text{nm}$, $E_m = 203\text{ nm}$.

Veškerá chromatografická měření prováděl Mgr. P. Berka na HPLC přístrojové sestavě Agilent T 1200.

4.5 Zpracování výsledků

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

Nejprve byly sestaveny časové průběhy koncentrace analytu v jednotlivých buňkách (permeačních průběhů) pro příslušné donorové vzorky nanovlákných membrán a roztoků s FICT-BSA. Jednalo se o závislosti emise permeovaného BSA-FITC v akceptorové fázi na čase. Tyto závislosti byly vyjádřeny graficky (viz **Obr.6.1**).

Na základě kalibrační rovnice byly tyto závislosti v připravených výpočetních šablonách převedeny na koncentrační údaje FICT-BSA a dále na celkově permeovaný BSA. V sestavených závislostech koncentračních, resp. množstvíných údajů na čase byla vyhledána přímková část průběhu permeace FITC-BSA a vypočtena směrnice tohoto úseku. Tímto postupem byly současně vyčísleny hodnoty fluxů J [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] FICT-BSA a dále také případně příslušné průměrné hodnoty J [$\mu\text{g} / \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$].

Vzhledem k tomu, že součástí zkoumaných nanovlákných membrán byla směs FICT-BSA a neznačeného BSA 1 : 1, byla v souhrnném grafu a konečném hodnocení

považována za hlavní parametr číselně dvojnásobná hodnota, tedy flux J celkového albuminu.

5. DOKUMENTACE

Protokol 1

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 17.8$

K 0e: SL N2LED

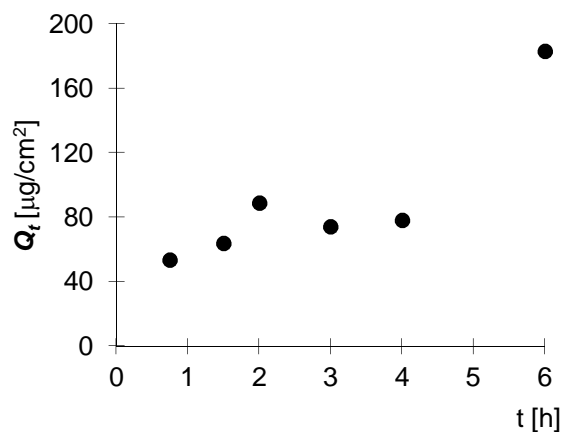
Donor: nano16

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.150	0.6	0.150	26.7	53.5
1.5	0.174	0.6	0.179	31.8	63.7
2	0.239	0.6	0.250	44.5	89.0
3	0.189	0.6	0.208	37.1	74.1
4	0.194	0.6	0.219	39.0	78.1
6	0.483	0.6	0.514	91.6	183.2
8	0.559	0.6	0.603	107.3	214.5
21	0.448	0.6	0.504	89.7	179.3
24	4.561	0.6	4.624	823.1	1 646.2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0.75	53.5	44.7
1.5	63.7	60.8
2	89.0	71.5
3	74.1	92.9
4	78.1	114.4
6	183.2	157.2

Parametry regrese	
Po et bod	n = 6
Flux BSA	J = 21.4
Korela ní koef.	r = 0.868



Protokol 2

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 18.2$

K 0e: SL N2LED

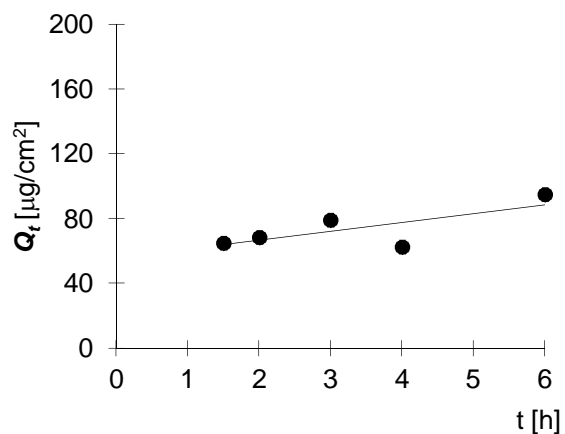
Donor: nano16

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.147	0.6	0.147	26.8	53.5
1.5	0.174	0.6	0.179	32.5	65.0
2	0.177	0.6	0.188	34.2	68.4
3	0.201	0.6	0.217	39.5	79.0
4	0.149	0.6	0.172	31.2	62.5
6	0.233	0.6	0.261	47.5	95.0
8	0.708	0.6	0.744	135.4	270.8
21	0.915	0.6	0.974	177.3	354.5
24	7.486	0.6	7.575	1 378.6	2 757.3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1.5	65.0	65.0
2	68.4	68.4
3	79.0	79.0
4	62.5	62.5
6	95.0	95.0

Parametry regrese	
Po et bod	$n = 5$
Flux	$J = 5.5$
Korela ní koef.	$r = 0.739$



Protokol 3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 18$

K 0e: SL N2LED

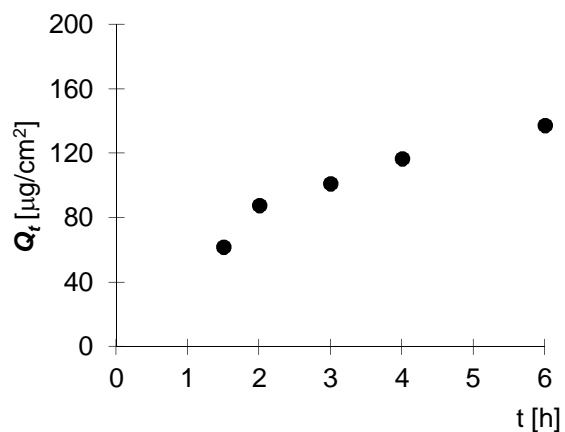
Donor: nano16

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.176	0.6	0.176	31.7	63.3
1.5	0.166	0.6	0.172	30.9	61.8
2	0.232	0.6	0.243	43.8	87.5
3	0.262	0.6	0.281	50.5	101.1
4	0.297	0.6	0.325	58.4	116.8
6	0.344	0.6	0.382	68.8	137.5
8	0.550	0.6	0.599	107.8	215.6
21	0.925	0.6	0.992	178.6	357.2
24	8.340	0.6	8.438	1 518.8	3 037.7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1.5	61.8	73.2
2	87.5	80.9
3	101.1	96.3
4	116.8	111.8
6	137.5	142.6

Parametry regrese	
Po et bod	$n = 5$
Flux BSA	$J = 15.4$
Korela ní koef.	$r = 0.962$



Protokol 4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 18.6$

K 0e: SL N2LED

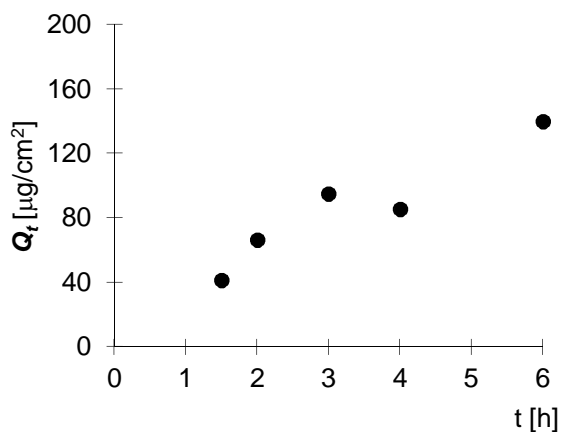
Donor: nano16

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.130	0.6	0.130	24.2	48.3
1.5	0.107	0.6	0.111	20.7	41.3
2	0.171	0.6	0.178	33.2	66.3
3	0.241	0.6	0.255	47.3	94.7
4	0.209	0.6	0.230	42.7	85.4
6	0.348	0.6	0.376	69.9	139.8
8	0.462	0.6	0.501	93.2	186.3
21	0.713	0.6	0.766	142.6	285.1
24	11.431	0.6	11.507	2 140.4	4 280.7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1.5	41.3	50.6
2	66.3	60.3
3	94.7	79.7
4	85.4	99.1
6	139.8	137.9

Parametry regrese	
Po et bod	n = 5
Flux BSA	J = 19.4
Korela ní koef.	r = 0.948



Protokol 5

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 17.6$

K 0e: SL N2LED

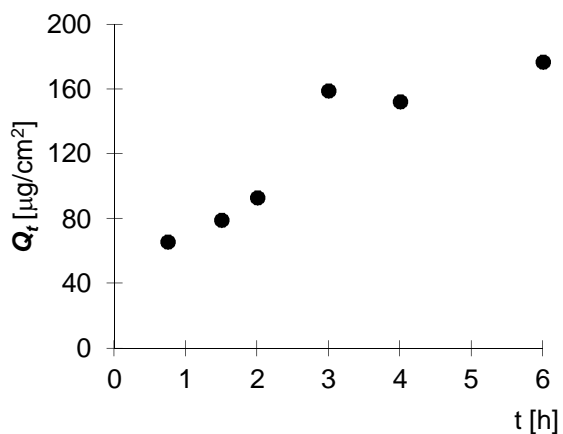
Donor: nano32

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.187	0.6	0.187	32.9	65.8
1.5	0.219	0.6	0.225	39.6	79.2
2	0.250	0.6	0.264	46.5	93.0
3	0.430	0.6	0.452	79.6	159.2
4	0.396	0.6	0.433	76.2	152.5
6	0.452	0.6	0.503	88.4	176.9
8	0.487	0.6	0.553	97.4	194.8
21	0.623	0.6	0.706	124.2	248.3
24	6.904	0.6	7.008	1 233.4	2 466.7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.75	65.8	72.8
1.5	79.2	89.9
2	93.0	101.2
3	159.2	124.0
4	152.5	146.7
6	176.9	192.1

Parametry regrese	
Po et bod	n = 6
Flux BSA	J = 22.7
Korela ní koef.	r = 0.919



Protokol 6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 19$

K o e: SL N2LED

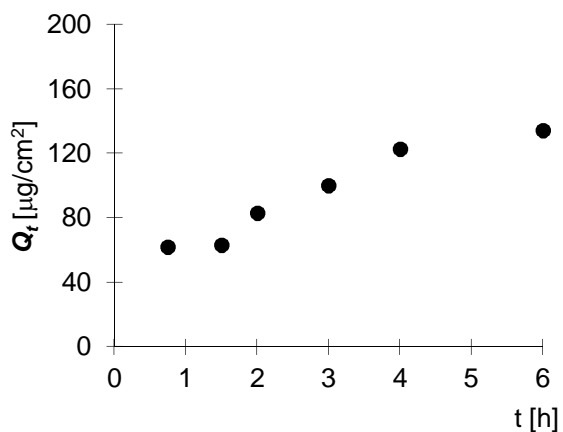
Donor: nano32

M e n í: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.163	0.6	0.163	31.0	62.0
1.5	0.161	0.6	0.166	31.6	63.1
2	0.208	0.6	0.218	41.5	83.0
3	0.247	0.6	0.263	50.1	100.1
4	0.299	0.6	0.323	61.4	122.8
6	0.319	0.6	0.353	67.1	134.1
8	0.549	0.6	0.593	112.6	225.2
21	0.931	0.6	0.992	188.5	377.0
24	4.647	0.6	4.738	900.3	1 800.5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.75	62.0	61.7
1.5	63.1	73.2
2	83.0	80.8
3	100.1	96.1
4	122.8	111.4
6	134.1	142.0

Parametry regrese	
Po et bod	n = 6
Flux BSA	J = 15.3
Korela ní koef.	r = 0.965



Protokol 7

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 18.6$

K 0e: SL N2LED

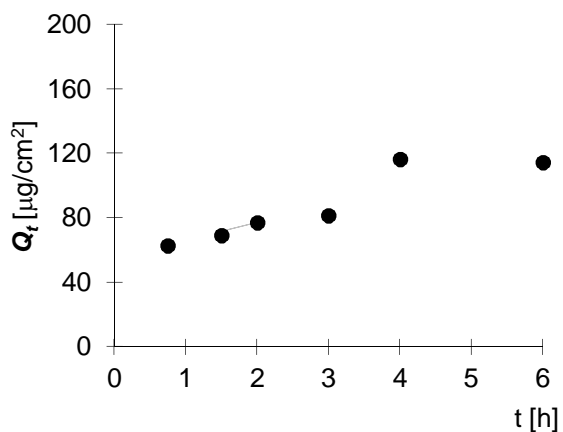
Donor: nano32

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.169	0.6	0.169	31.4	62.8
1.5	0.180	0.6	0.185	34.5	69.0
2	0.196	0.6	0.207	38.6	77.1
3	0.201	0.6	0.219	40.7	81.4
4	0.289	0.6	0.313	58.2	116.4
6	0.274	0.6	0.308	57.2	114.4
8	0.453	0.6	0.496	92.2	184.4
21	0.883	0.6	0.939	174.7	349.5
24	3.444	0.6	3.530	656.5	1 313.0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.75	62.8	63.2
1.5	69.0	71.5
2	77.1	77.1
3	81.4	88.2
4	116.4	99.4
6	114.4	121.7

Parametry regrese	
Po et bod	n = 6
Flux BSA	J = 11.1
Korela ní koef.	r = 0.922



Protokol 8

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 17.6$

K 0e: SL N2LED

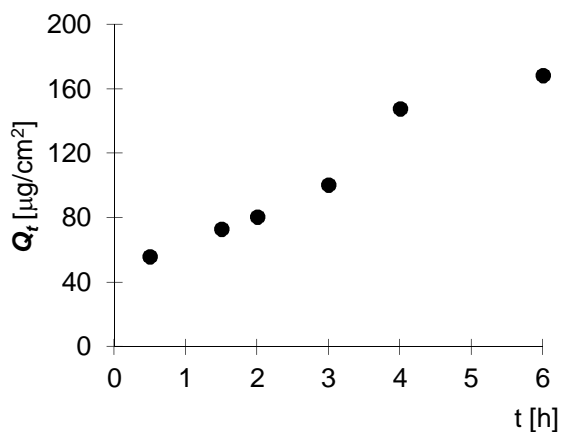
Donor: nano32

M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.5	0.159	0.6	0.159	27.9	55.8
1.5	0.202	0.6	0.208	36.6	73.2
2	0.217	0.6	0.229	40.3	80.6
3	0.265	0.6	0.285	50.1	100.3
4	0.391	0.6	0.420	73.9	147.9
6	0.436	0.6	0.479	84.2	168.4
8	0.475	0.6	0.532	93.6	187.2
21	0.831	0.6	0.904	159.1	318.2
24	5.842	0.6	5.943	1 046.0	2 092.1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0.5	55.8	52.7
1.5	73.2	74.9
2	80.6	85.9
3	100.3	108.0
4	147.9	130.2
6	168.4	174.4

Parametry regrese	
Po et bod	n = 6
Flux BSA	J = 22.1
Korela ní koef.	r = 0.977



Protokol 9

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 17.8$

K o e: SL N2LED

Donor: R-Eq
CFP6,8/slina

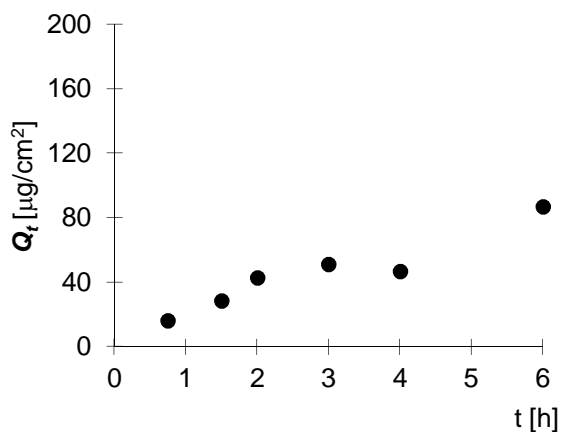
M e n í: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.091	0.6	0.091	16.1	16.1
1.5	0.158	0.6	0.161	28.7	28.7
2	0.232	0.6	0.240	42.7	42.7
3	0.270	0.6	0.287	51.0	51.0
4	0.236	0.6	0.262	46.6	46.6
6	0.456	0.6	0.489	87.0	87.0
8	0.459	0.6	0.504	89.8	89.8
21	0.767	0.6	0.823	146.5	146.5
24	3.760	0.6	3.833	682.4	682.4

Interval regrese

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0.75	16.1	19.7
1.5	28.7	28.8
2	42.7	34.8
3	51.0	46.9
4	46.6	58.9
6	87.0	83.0

Parametry regrese	
Po et bod	$n = 6$
Flux BSA	$J = 12.1$
Korela ní koef.	$r = 0.954$



Protokol 10

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] FICT-BSA ve V_o
Q_t	[μ g] BSA ve V_o

$V_o = 17.8$

K 0e: SL N2LED

Donor: R-Eq

CFP6,8/slina

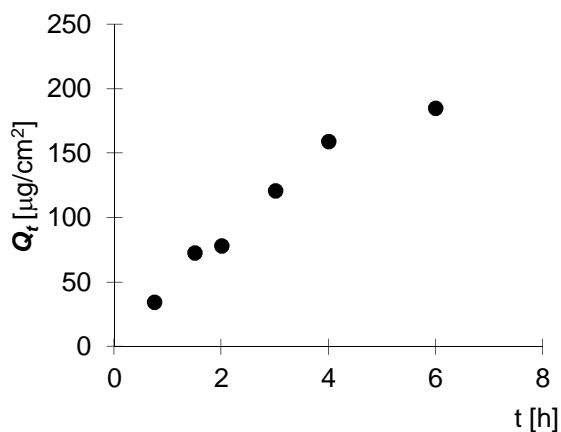
M ení: FITC BSA

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0.75	0.098	0.6	0.098	17.4	34.8
1.5	0.201	0.6	0.204	36.4	72.7
2	0.210	0.6	0.220	39.2	78.5
3	0.323	0.6	0.340	60.6	121.2
4	0.419	0.6	0.447	79.6	159.1
6	0.478	0.6	0.520	92.6	185.2
8	0.728	0.6	0.783	139.3	278.6
21	1.660	0.6	1.732	308.4	616.8
24	4.550	0.6	4.672	831.6	1 663.2

Interval regrese

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0.75	34.8	46.8
1.5	72.7	68.6
2	78.5	83.1
3	121.2	112.2
4	159.1	141.3
6	185.2	199.5

Parametry regrese	
Po et bod	$n = 6$
Flux BSA	$J = 29.1$
Korela ní koef.	$r = 0.975$



6. VÝSLEDKY A DISKUSE

Literatura uvádí, že orální mukóza je 4 až 4000 krát propustnější než kůže.⁷⁵ Permeabilita vody přes bukalní mukózu je vyšší asi 10krát, zatímco její průnik přes měkké patro přibližně 20 krát vyšší než přes kůži.^{76,77} Průnik výšemolekulárních látek, zejména proteinů, přes neporušenou kůži není považován za možný. Otázkou stále je, zda-li se nemožnost průniku látek typu proteinů týká také neporušené oromukozální membrány a také toho, do jaké míry v tomto může hrát roli oromukozální kapalina, resp. sliny.

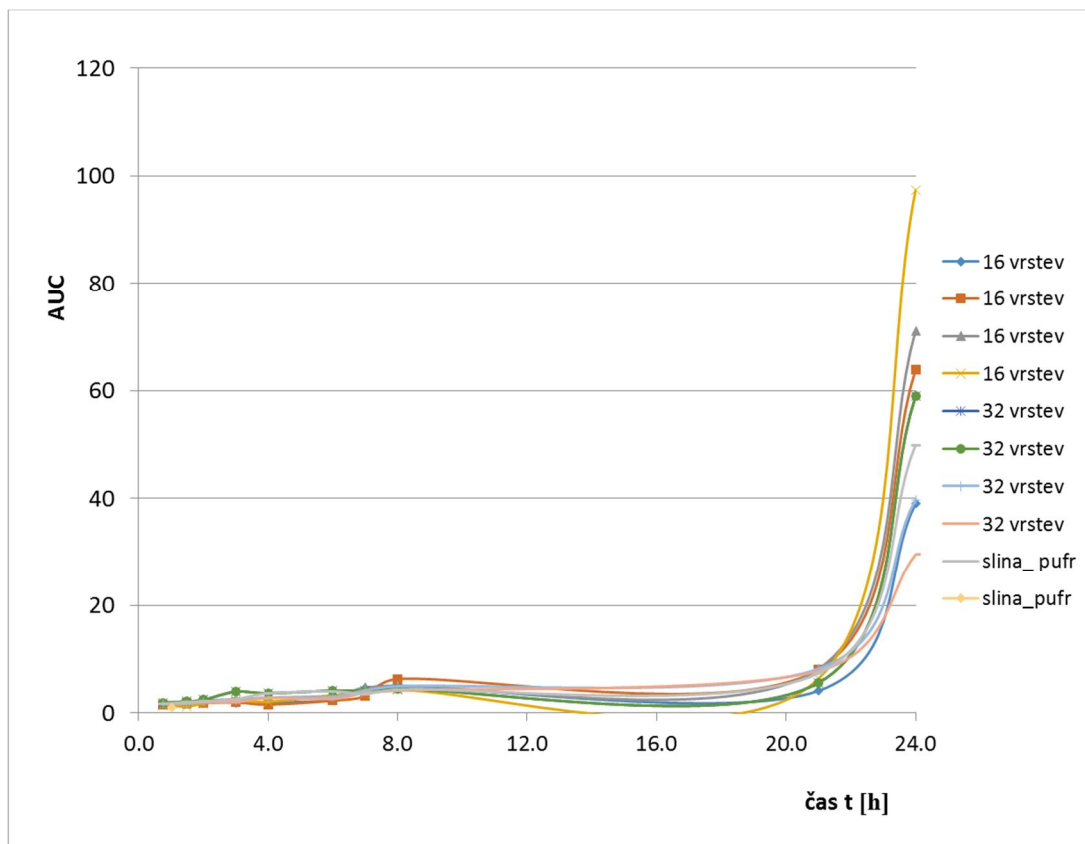
Mukoadhezivní hydrofilní soustavy představují slibnou variantu nosičů léčiv, které by mohly relativně permeabilní oromukozální bariéru využít pro podání léčivých látek, včetně některých výšemolekulárních. K takovým soustavám patří také nanovláknenné membrány zkoumané v experimentu této práce.

První poznatek spojený s prováděním in vitro permeačních pokusů vyšel z makroskopického pozorování interakce vícevrstevných nanovláknenných terčků s citrát-fosfátovým pufrům pH 6,8. Nastavení pH na tuto hodnotu bylo zvoleno proto, že odpovídá fyziologické aciditě slin. Bylo zřejmé, že se kruhové terčiky velmi dobře smáčejí nejen v samotném pufru, ale také v jeho směsi s čerstvou slinou (vlastní). Tento jev je důležitý zejména z hlediska dostatečně rychlého rozpuštění polymerů nanovláknenného nosiče a také rozpuštění BSA a FICT-BSA v ústní dutině. Rychlý počátek rozpouštění v řádu několika sekund byl díky přítomnosti FICT dobře pozorovatelný. Rozpouštění začalo probíhat prakticky okamžitě po kontaktu malého množství donorové kapaliny (tedy pufru nebo jeho směsi se slinou) a „suchého“ nanovláknenného terčiku. Žluté zbarvení v donorovém prostoru permeační buňky bylo ihned dobře patrné.

Permeace BSA byla sledována celkem po dobu 24 hodin s tím, že až po vyhodnocení výsledků HPLC stanovení BSA (resp. FICT-BSA) bude patrné, jaký celkový časový profil bude permeace mít a na jaké časové intervaly se bude možné v obdobných pokusech zaměřit. Pro všechny hodnocené vzorky jsou příslušné časové profily znázorněny graficky na souhrnném **Obr. 6.1.**

Z daných průběhů koncentrace FITC-BSA v akceptorové fázi permeačních komůrek bylo zřejmé, že se v případě všech donorových vzorků jednalo o časové závislosti velmi podobné. Nebylo z nich na první pohled patrné, jestli permeace BSA probíhala z terčků o 32

vrstvách, 16 vrstvách nebo z roztoků značeného albuminu (dva poslední vzorky, tedy č. 9 a č. 10, v **Protokolech kapitoly 5. Dokumentace**).



Obr. 6.1 Permeační profily FICT-BSA sublingvální membránou in vitro

Dále bylo důležité, že první odezvy na záření emitované vzorky s obsahem FICT-BSA byly detekovány již v prvních odběrech akceptorové fáze, kterou představoval HEPES pufr pH 7,4. Nastavení pH v akceptorové fázi bylo zvoleno tak, aby simulovalo prostředí extracelulární tekutiny, se kterou se případně může sledovaná látka po průniku sublingvální membránou setkat za situace in vivo.

Vzhledem k naměřeným hodnotám emitance bylo následně možné vhodně nastavit koncentrační sadu roztoků FICT-BSA pro sestavení kalibrační závislosti. Tato závislost byla pro podchycený interval relevantních koncentrací přímková s těmito parametry:

Rovnice kalibrační přímky:

$$C [\text{mg}/100 \text{ ml}] = \text{AUC} + 0,2568 / 8,4977 \quad (\text{rov. 1})$$

Koeficient determinace $R^2 = 0,9998$ ($n = 6$)

V dalším kroku byly všechny hodnoty AUC použitím uvedené kalibrační rovnice přepočteny až na údaje o permeovaných množstvích Q_t [μg] fluorescenčně značeného albuminu FICT-BSA a množstvích Q_t [μg] celkového BSA v jednotlivých časových intervalech. Jejich další zpracování, jak je ukázáno ve všech protokolech, bylo pro zjednodušení zaměřeno na prvních 6 hodin permeace. Důvodem tohoto omezení bylo také to, aby výsledky permeačního pokusu nebyly ovlivněny změnami v sublingválních membránách poruchou jejich integrity, na kterou zřejmě ukazovaly extrémní hodnoty permeovaných kvant FICT-BSA na **Obr. 6.1** po 24 hodinách.

Pracovní zobrazení v protokolech umožnila odečty přímkových částí časové závislosti permeovaného množství FITC-BSA, resp. BSA. Výpočtem směrnice této části průběhu permeace byl vždy vyčíslen flux J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] proniknuvšího BSA jako základní výstupní parametr z těchto in vitro pokusů.

V následujících tabulkách jsou shrnuty odhady hodnot fluxů J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] celkového BSA z vrstvených nanovlákných terčů (**tabulka 6.1**) a z roztoků s obsahem BSA a FICT (**tabulka 6.1**), které jsou v této rozměrové variantě fluxů vhodné pro prezentaci i pro praktické použití.

Možné závěry budou pouze opatrné, statisticky je není dost dobře možné doložit, ale pro představu a další orientaci v dalších experimentech mohou být cenné.

Tabulka 6.1: Permeace BSA z vrstvených nanovláknenných PVA/POE/BSA terčů

Flux BSA J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	
nano 16	nano 32
21,4	22,7
18,2	15,3
5,5	11,1
19,4	22,1
Pr m r $J = 14,1$	Pr m r $J = 17,8$
<i>SD = 5,5</i>	<i>SD = 4,3</i>

V každém případě je však podstatným zjištěním, že se albumin za daných podmínek z nanovláknenných nosičů uvolňoval a dále pronikal přes sublingvální membránu. První kvanta byla rezervou stanovitelná již po 40 minutách od počátku in vitro pokusu.

Vliv počtu vrstev nanovláknenného nosiče nebyl patrný, jak formálně lze z dat uvedených v tabulce 6.1 vyhodnotit i statisticky. Vzhledem k pilotnímu charakteru pokusu není tento pracovně jednoduchý úkon prezentován.

Podobným způsobem je orientačně v **tabulce 6.2** uveden výsledek, získaný za použití srovnávacího roztoku BSA-FICT BSA ve směsi sliny s pufrům. Citrát-fosforečnanový pufr o pH 6,8 byl použit ke zředění nativní lidské sliny (1:1) a tato směs sloužila jako simulace prostředí slin pro donorový roztok BSA s FICT BSA.

Tabulka 6.2: Permeace BSA z R-Eq roztoků v pufru 6,8 a slin (1:1)

Flux BSA J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]
12,4
29,1
Pr m r $J = 16,0$

Jakkoli jsou obě získané hodnoty fluxu značně rozdílné, i v tomto případě platí, že dosvědčují hlavně to, že albumin sublingvální membránou procházet může. Navíc se předběžně neprojevila měřitelná retardace permeace albuminu přítomností lidské sliny. Tento poznatek může být posílen nebo zpochybněn po srovnání s výsledky souběžně probíhající práce V. Houdkové, jak je zmíněno v úvodu.

7. ZÁVĚRY

1. Směs polyvinylalkoholu a polythylenoxidu s obsahem BSA zpracovaná procesem elektrospinningu do nanovláken má schopnost dobře se smáčet v hydrofilním prostředí citrat-fosfátového pufru pH 6,8 a uvolňovat protein prakticky okamžitě.
2. Nanovláknenné membrány daného složení lze jednoduchým postupem zpracovat do vícevrstevných útvarů, ze kterých za in vitro podmínek proniká BSA po rychlém rozpuštění přes sublingvální membránu na úrovni fluxů J cca 10 až 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$
3. Na srovnatelné úrovni fluxů prochází BSA sublingvální membránou také z roztoků s obsahem lidské sliny zředěné puftrem pH 6.8.

8. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

PVA	polyvinylalkohol
PEO	polyethylenoxid
nano32	nanovláknenný terčik 32vrstvý
nano16	nanovláknenný terčik 16vrstvý
BSA	hovězí sérový albumin
FITC-BSA	fluorescenčně značený hovězí albumin
CFP, (CFP 6.8)	citrát-fosforečnanový pufr, (CFP pH 6,8)
FP 8	fosforečnanový pufr
HEPES	hepes pufr pH 7,4
SL N2LED	sublingvální membrána zmražená kapalným dusíkem a uchovávaná v lednici při -18°C až -20
C_{nk} [mg /100 ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_k [mg /100 ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
Q_t [μg]	množství FICT-BSA prošlého sublingvální membránou
Q_t [μg]	celkové množství BSA prošlého sublingvální membránou
V_o [ml]	celkové množství akceptorové fáze
ΔV_{dop} [ml]	množství doplňované akceptorové fáze
AUC	plocha pod křivkou emitancí FICT
c	koncentrace v mg/100 ml
J, J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$]	flux BSA, průměrný flux BSA
SEM	směrodatná odchylka průměru
r	korelační koeficient
R^2	koeficient determinace
n	počet měřených bodů
t [hod]	čas

9. LITERATURA

¹ Parker, J. D.; Parker, J. O. Nitrate Therapy for Stable Angina Pectoris. *N.Engl. J. Med.* **1998**, 338, 520-531.

² *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2005**, 57, 1556– 1568.

³ Yanga Zhen; Sotthiviratb, S.; Wua, Y.; Lallooc, A.; Nissleya, B.; Mansera, K.; Lid., H. Application of in vitro transmucosal permeability, dose number, and maximum absorbable dose for biopharmaceutics assessment during early drug development for intraoral delivery. *Int. J. Pharmaceutics.* **2016**, 503, 78–89.

⁴ Lehr, C.M. Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1994**, 11(2-3), 119-160.

⁵ Lee, J.W.; Park, J.H.; Robinson, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89(7), 850-866.

⁶ Trojan, K. a kol. Lékařská fyziologie, 4th ed. Grada Publishing: Praha, **2003**, s. 29 – 32, 28-29.

⁷ <http://sszdra-karvina.cz/bunka/bi/04tra/trashr.htm>

⁸ Lum, H.; Malik, A.B. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am.J.Physiol.* **1994**, 267, L223-241.

⁹ Dejana, E.; Corada, M.; Lampugnani, M.G. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.*, **1995**, 910-918.

¹⁰ Noria, S.; Cowan, D.B.; Gotlieb, A.I.; Langille, B.L. Transient and Steady-State Effects of Shear Stress on Endothelial Cell Adherens Junctions. *Circ.Res.*, **1999**, 85, 504-514.

¹¹ Seebach, J.; Dieterich, P.; Luo, F.; Schillers, H.; Vestweber, D.; Oberleithner, H.; Galla, H.J.; Schnittler, H. Endothelial Barrier Function under Laminar Fluid Shear Stress. *J.Lab. Invest.*, **2000**, 80,1819-1831.

¹² http://cs.wikipedia.org/wiki/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_spoj#mediaviewer/Soubor:Gap_cell_junction-cs.svg

-
- ¹³ Stevenson, B.R.; Siliciano, J.D.; Mooseker, M.S.; Goodenough, D.A. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J.Cell.Biol.*, **1986**, 103, 755-766.
- ¹⁴ Gumbiner, B.; Lowenkopf, T.; Apatira, D. Identification of a 160 – kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, **1991**, 88, 3460-3464.
- ¹⁵ Citi, S.; Sabanay, H.; Jakes, R.; Geiger, B.; Kendrick-Jones, J. Cingulin: a new Peripheral Component of Tight Junctions. *Nature*, London, **1988**, 333, 272-276.
- ¹⁶ Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S.; Tsukita, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J.Cell. Biol.*, **1993**, 123, 1777-1788.
- ¹⁷ Gonzales-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P.; Jaramillo, B.E. Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2003**, 81(1),1-44.
- ¹⁸http://cs.wikipedia.org/wiki/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_spoj#mediaviewer/Soubor:Cellular_tight_junction-en.svg
- ¹⁹http://cs.wikipedia.org/wiki/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_spoj#mediaviewer/Soubor:Adherens_Junctions_structural_proteins.svg
- ²⁰ Trojan, K. a kol: Lékařská fyziologie, 4th ed. Grada Publishing: Praha, 2003, s.29
- ²¹http://cs.wikipedia.org/wiki/Desmozom#mediaviewer/Soubor:Desmosome_cell_junction_en.svg
- ²² Gandhi, R.B.; Robinson, J.R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery, *Adv.Drug Deliv. Rev.* . **1994**, 13, 43–74.
- ²³ Wertz, P.W.; Squier, C.A. Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* **1991**, 8, 237–269.
- ²⁴ Peppas, N.A.; Buri, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Control. Release.* **1985**, 2, 257–275.
- ²⁵ Zalewska, A.; Zwierz, K.; Zólkowski, K.; Gindzienski, A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Polonica.* **2000**,47,1067–79.

-
- ²⁶ Humphrey, S.P.; Williamson, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* **2001**,85,162–9.
- ²⁷ Van Nieuw Amerongen, A.; Bolscher, J.G.M.; Veerman, E.C.I. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* **2004**,38,247–53.
- ²⁸ De Smet, K.; Contreras, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, **2005**,27,1337.
- ²⁹ Mandel, I.D. A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med.* **1993**,4, 599-604.
- ³⁰ Schwartz, W.H. The rheology of saliva. *J Dent Re.*, **1987**,66,660–4.
- ³¹ Veerman, E.C.I.; Valentijn-Benz, M.; Van Nieuw Amerongen, A. Viscosity of human salivary mucins: effect of pH and ionic strength and role of sialic acid. *J Biol Buccale.* **1989**,17, 297–306.
- ³² Van der Reijden, W.A.; Veerman E.C.I.; van Nieuw Amerongen, A. Shear rate dependent viscoelastic behaviour of human glandular salivas. *Biorheology.* **1993**,30 ,141–52.
- ³³ Shibata, S.; Asakura, J.; Isemura, T.; Isemura, S.; Saitoh, E.; Sanada, K. Conformational study of the basic proline-rich polypeptides from human parotid saliva. *Int J Pept Protein Res.* **1984**, 23(2), 158-65.
- ³⁴ Rantonen, P.J.F.; Meurman, J.H. Viscosity of whole saliva. *Acta Odontol Scand.* **1998**, 56, 210–4.
- ³⁵ Mellema, J.; Holterman, H.J.; Waterman, H.A.; Blom, C.; Gravenmade, E.J. Rheological aspects of mucin-containing solutions and saliva substitutes. *Biorheology.* **1992**, 29, 231–49.
- ³⁶ Collins, L.M.C.; Dawes, C. The surface area of adult human mouth and thickness of salivary film covering the teeth and oral mucosa, *J. Dent. Res.* **1987**, 66, 1300–1302.
- ³⁷ Veuillez, F.; Kalia, Y.N.; Jacques, Y.; Deshusses, J.; Buri, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, 51 (2), 93–109.

-
- ³⁸ Okamoto, H.; Taguchi, H.; Iida, K.; Danjo, K. Development of polymer film dosage forms of lidocaine for buccal administration-I. Penetration rate and release rate. *J. Contr. Rel.* **2001**, 77 (3), 253–260.
- ³⁹ Shojaei, A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J.Pharm. Pharmaceut. Sci.* **1998**, 1, 15–30.
- ⁴⁰ Veuillez, F.; Kalia, Y.N.; Jacques, Y.; Deshusses, J.; Buri, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, 51, 93-109
- ⁴¹ Le Cluyse, E.L.; Sutton, S.C. In vitro models for selection of development candidates. Permeability studies to define mechanisms of absorption enhancement. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, 23, 163 – 183.
- ⁴² Patel, V.F.; Liu, F.; Brown, M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Release*, 153 , **2011**, 106–116.
- ⁴³ Generex Oral-lyn. [http:// www.generex.com/index.php/id/270](http://www.generex.com/index.php/id/270), dostupné 10.5.2016
- ⁴⁴ Sevda, S.; Rathbone, M. J.; Cansız, M.; Pather, I. Recent developments in buccal and sublingual delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, 9, 615-628.
- ⁴⁵ Chronakis, I.S. Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review. *J. Mater. Proces. Technol.* **2005**, 167, 283–293.
- ⁴⁶ Reneker, D.H.; Chun, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology.* **1996**, 7, 216–223.
- ⁴⁷ Verreck, G.; Chun, I.; Peeters, J.; Rosenblatt, J.; Brewster, M.E. Preparation and characterization of nanofibers containing amorphous drug dispersions generated by electrostatic spinning. *Pharm. Res.* **2003**, 20, 810–817.
- ⁴⁸ Verreck, G.; Chun, I.; Rosenblatt, J.; Peeters, J.; Van Dijck, A.; Mensch, J.; Noppe, M.; Brewster, M.E. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J. Control. Rel.* **2003**, 92, 349 – 360.
- ⁴⁹ Wei, A.; Wang, J.; Wang, X.; Wei, Q.; Ge, M.; Hou, D. Preparation and characterization of the electrospun nanofibers loaded with clarithromycin. *J. Appl Polym Sci.* **2010**, 118,

346–352.

⁵⁰ Fefelova, N.; Nurkeeva, Z.; Mun, G.; Khutoryanskiy, V. Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2- (methacryloyloxy) ethyl] trimethyl ammonium chloride, *Int. J. Pharm.* **2007**, 339, 25–32.

⁵¹ He, P.; Davis, S.; Illum, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.* **1998**, 166, 75–88.

⁵² Portero, A.; Teijeiro-Osorio, D.; Alonso, M.; Remuñán-López, C. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin, *Carbohydr. Polym.* **2007**, 68, 617–625.

⁵³ Rossi, S.; Ferrari, F.; Bonferoni, M.; Caramella, C. Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, 10, 251–257.

⁵⁴ Komárek, P.; Rabišková, M. et al. Technologie léků. 3.vyd. Galén: Praha, s.148–149, s.147, s.148.

⁵⁵ Maretschek, S.; Greiner, A.; Kissel, T. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *J.Control. Rel.*, **2008**, 127,180-187.

⁵⁶ Singh, S.; Webster, D.C.; Singh, J. Thermosensitive polymers: synthesis, characterization, and delivery of proteins. *Int.J.Pharm.* **2007**, 341,68-77.

⁵⁷ Kenawy, E.-R.; Abdel-Hay, F.I.; El-Newehy, M.H.; Wnek, G.E. Controlled release of ketoprofen from elektrospun poly(vinyl-alcohol), nanofibres, *Mater.Sci.Eng.* **2007**, 459, 390-396.

⁵⁸ Taepaiboon, P.; Rungsardthong, U.; Supaphol, P. Drug-loaded electrospun mats of poly (vinyl-alcohol) fibres and their release characteristic of four model drugs. *Nanotechnology*, **2006**, 17,2317-2329

⁵⁹ Razzak, M.T.; Darwis, D.; Zainuddin; Sukirno. Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiat. Phys. Chem.* **2001**, 62, 107–113.

⁶⁰ Zainuddin; Hill, D.J.; Le, T.T. An ESR study on -irradiated poly (vinyl alcohol). *Rad. Phys. Chem.* **2001**, 62,283–291.

-
- ⁶¹ Pal, K.; Banthia, A.K.; Majumdar, D.K. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *Am. Assoc. Pharm. Sci. PharmSciTech.* **2007**, *8*, E142–E146.
- ⁶² Qiu, K.; Netravali, A.N. A Composting Study of Membrane-Like Polyvinyl Alcohol Based Resins and Nanocomposites. *J. Polym. Environ.* **2013**, *21*, 658–674.
- ⁶³ Qiu, K.; Netravali, A.N. Fabrication and characterization of biodegradable composites based on microfibrillated cellulose and polyvinyl alcohol. *Compos. Sci. Technol.* **2012**, *72*, 1588–1594.
- ⁶⁴ Qiu, K.; Netravali, A.N. Halloysite nanotube reinforced biodegradable nanocomposites using noncrosslinked and malonic acid crosslinked polyvinyl alcohol. *Polym. Compos.* **2013**, *34*, 799–809.
- ⁶⁵ Yang, J.M.; Su, W.Y.; Leu, T.L.; Yang, M.C. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. *J. Membr. Sci.* **2004**, *236*, 39–51.
- ⁶⁶ Demerlis, C.C.; Schoneker, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 319–326.
- ⁶⁷ Maria, T.M.; Carvalho, R.A.; Sobral, P.J.; Habitantea, A.M.; Solorza-Ferriab, J. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. *J. Food Eng.* **2008**, *87*, 191–199.
- ⁶⁸ Siepmann, F.; Siepmann, J.; Walther, M.; MacRae, R.J.; Bodmeier, R. Polymer blends for controlled release coatings. *J. Controlled Release.* **2008**, *125*, 1-15.
- ⁶⁹ <http://cs.wikipedia.org/wiki/Albumin>
- ⁷⁰ Trojan, K. a kol: *Lékařská fyziologie*, 4th ed. Grada Publishing: Praha, **2003**, s. 115.
- ⁷¹ <http://cs.medixa.org/lecba/bilirubin>
- ⁷² http://www.baxter.cz/pro_verejnost/lecba_akutnich_stavu/lidsky_albumin/index.html
- ⁷³ <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/bypass-kardiopulmonalni-1>
- ⁷⁴ <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HEPES.png>

⁷⁵ Galey, W.R.; Lonsdale, H.K.; Nacht, S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water, *J. Invest. Dermatol.* **1976**, 67, 713–717.

⁷⁶ Lesch, C.A.; Squier, C.A.; Cruchley, A.; Williams, D.M.; Speight, P. The permeability of human oral mucosa and skin to water, *J. Dent. Res.* **1989**, 68, 1345–1349.

⁷⁷ Squier, C.A.; Hall, B.K. The permeability of the skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier. *J. Invest. Dermatol.* **1985**, 84, 176–179.