STUDIUM TOPICKÉHO PODÁNÍ CIDOFOVIRU IN VITRO

RIGORÓZNÍ PRÁCE

MARTINA SEDLÁČKOVÁ

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRALOVÉ

Univerzita Karlova

Katedra organické a bioorganické chemie

Školitel: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

V Třeboni, únor 2020

Martina Sedláčková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména své školitelce prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D., za pomoc a cenné rady, které mi během mého rigorózního studia poskytla.

Dále bych ráda poděkovala kolegyním Mgr. Lence Valáškové a Mgr. Monice Kopečné, Ph.D.

Za osobní podporu a zázemí děkuji svému manželovi a přátelům.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 1404213).

Martina Sedláčková
Studium topického podání cidofoviru in vitro
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Abstrakt

Cidofovir (CDV), antivirotikum ze skupiny acyklických nukleosidfosfonátů, je velmi účinnou látkou v léčbě různých infekcí virového původu. Nízké využití tohoto léčiva v topické terapii virových infekcí kůže je způsobeno jeho vysokou cenou. Tato práce se zabývá možnostmi zvýšení koncentrace a dostupnosti CDV v kůži, které by vedlo ke snížení nákladů na výrobu léčivých prostředků s tímto léčivem.

Cílem práce bylo studium vlivu koncentrace CDV aplikovaného na kůži na jeho množství v různých vrstvách kůže. Dále byl zkoumán vliv přidání akcelerantu transdermální permeace dodecylesteru kyseliny 6-dimethylaminohexanové na prostup CDV do kůže. Oba vlivy byly zkoumány *in vitro* pomocí modifikovaných Franzových difúzních cel jak na vzorcích lidské kůže zdravé, tak i modelově poškozené (metodou tape stripping).

Z námi zvolených kombinací výchozích vzorků 0,3%, 1% a 3% CDV s a bez použití akcelerantu dosahovalo nejvyšších koncentrací CDV v epidermis použití donorového vzorku 3% CDV v kombinaci s 1 % akcelerantu. Po použití tohoto vzorku byla koncentrace CDV v epidermis 1115 µg na gram, což je 1,45krát více než bez použití akcelerantu. Při použití kůže poškozené byla koncentrace CDV zvýšena na 2584 µg na gram epidermis, což je 1,55krát více, než bez použití akcelerantu.

Dostupnost CDV byla nejvyšší při použití jeho 0,3% roztoku s přídavkem 1% akcelerantu (6 % aplikovaného množství CDV bylo nalezeno v epidermis kůže zdravé a 14 % v epidermis kůže poškozené).

Akcelerant také zlepšoval prostup CDV i do hlubších vrstev kůže a snižoval jeho laterální difuzi mimo permeační plochu.

Pomocí permeačního akcelerantu lze zvýšit koncentraci CDV v epidermis, čehož by šlo s výhodou využít v lokální léčbě infekcí způsobených viry citlivými na toto léčivo.

Martina Sedláčková
In vitro study of topical use of cidofovir
Pharmaceutical faculty in Hradec Králové, Charles University

Abstract

Cidofovir (CDV), an antiviral drug belonging to the group of acyclic nucleoside phosphonates, is a highly potent drug used for treatment of various infections of viral origin. The low usage of CDV is caused by its price. This work deals with possibilities of increasing the concentration and availability of CDV r in the skin that could lead to lowering of the production costs of the preparations containing this substance.

The goal of this work was to study the concentration of CDV in different skin layers after its application on intact and tape striped human skin. The effect of permeation enhancer 6-(dimethylamino)hexanoic acid dodecyl ester was also investigated. Both attitudes were investigated *in vitro* using modified Franz diffusion cells.

Three different concentration of CDV (0.3%, 1% and 3%) were applied on the intact or tape-stripped skin with or without 1% enhancer. In intact skin, the combination of 3% CDV with 1% enhancer provided epidermal CDV concentration of 1115 µg/g, which is 1.45-times higher than without an enhancer. In tape-striped skin, the epidermal concentration of CDVincreased to 2584 µg/g which is 1.55- times higher than without enhancer.

The highest bioavailability was reached when the 0.3 % solution of CDV in combination with 1% enhancer was applied: almost 6 % in intact and 14 % in stripped skin.

Application of the enhancer also increased the permeation of CDV into deeper layers of skin and decreased the lateral drug diffusion.

Thanks to the permeation enhancer the epidermal concentration of CDV can be increased, which could be useful in local therapy of skin infections caused by viruses sensitive to the CDV.

OBSAH

1. Úvod a cíl práce 1
2. Teoretická část 2
2.1. Kůže a její stavba 2
2.1.1. Epidermis 3
2.1.2. Dermis 3
2.1.3. Hypodermis 3
2.2. Kožní bariéra 4
2.2.1. Bariérové lipidy 4
2. 3. Akceleranty transdermální permeace a penetrace 6
2.3.1. DDAK 7
2.4. acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) 7
2.4.1. Cidofovir 8
3. Experimentální část 10
3.1. Permeační pokusy 10
3.1.1. Kůže 10
3.1.2. Modifikované Franzovy difúzní cely 10
3.1.3. Donorové a akceptorové vzorky 11
3.1.4. Měření elektrické impedance 12
3.1.5. Postup permeačních pokusů 12
3.1.6. Stanovení množství léčiva ve vzorcích 13
4. Výsledky 14
4.1. Měření elektrické impedance 14
4.2 Rozpustnost CDV v roztoku 15
4.3. Permeační pokusy 16
4.3.1. Epidermis 16
4.3.2. Dermis 27
4.3.3. Zbytek kůže 33
5. Diskuze 36
6. Závěr 38
6. Použité zkratky 39
7. Literatura 40

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Acyklické nukleosidfosfonáty jsou významná antivirotika vyvinutá v laboratoři prof. Antonína Holého. Pro tuto práci byla vybrána jedna z těchto látek, cidofovir (CDV). CDV se uplatňuje v léčbě infekcí způsobených lidskými papillomaviry, herpesviry a poxviry, a to s velmi dobrými výsledky. Při topickém aplikaci, pokud není na kůži porušeno *stratum corneum*, nevykazuje CDV významnější systémovou absorpci, a tedy ani s ní spojené nežádoucí účinky. Limitací širšího rozšíření této látky je ovšem jeho cena.

Cílem této práce je studovat prostupnost CDV do lidské kůže *in vitro*, a to za použití různě koncentrovaných roztoků této látky (0,3%; 1% a 3% roztok). Podmínky těchto testů byly částečně převzaty podle práce Dr. Cundyho a jeho kolektivu, který zkoumal topickou aplikaci CDV králíkům a to v 1% gelu s přídavkem propylenglykolu. [1]

Dále je hodnocen vliv akcelerantu transdermální permeace DDAK (dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové) na prostup CDV kůží.

Oba typy vzorků byly aplikovány nejen na kůži zdravou, ale také na kůži poškozenou, s cílem co nejpřesnějšího napodobení reálné situace v praxi.

2. TEORETICKÁ ČÁST

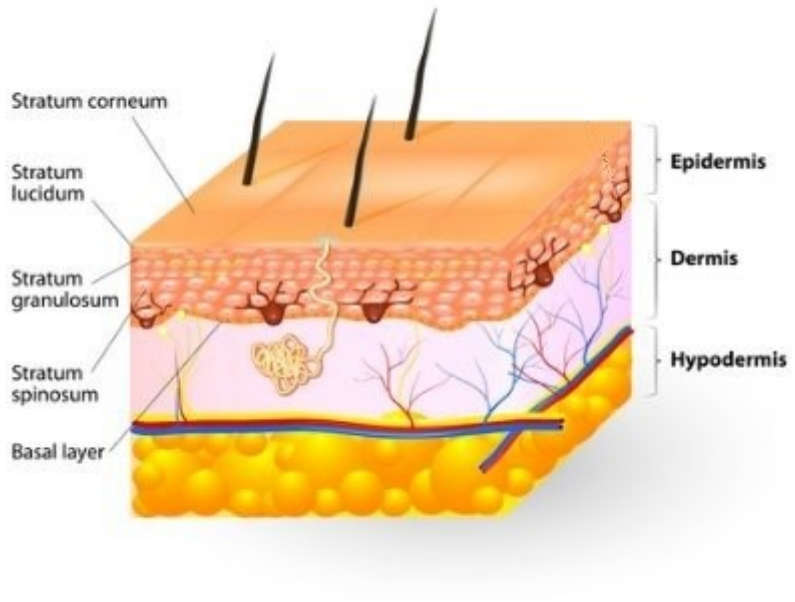
2.1. KŮŽE A JEJÍ STAVBA

Kůže je největším orgánem lidského těla a tvoří jeho zevní povrch. Díky její specifické stavbě je organismu umožněno pohybovat se na souši bez nadměrných ztrát vody z vnitřního prostředí, zároveň je i bariérou, která poskytuje ochranu proti vstupu cizorodých látek zvenčí. [2]

Kůže je účinnou ochranou vůči škodlivým chemickým, fyzikálním i mikrobiologickým vlivům. Díky možnosti regulace činnosti potních žláz, ovládání průtoku krve v cévách a nízké tepelné vodivosti je kůže také termoregulačním systémem ovládajícím tepelné ztráty do okolí. Kůže se dále účastní látkové výměny, je místem, kde je tvořen vitamín D a významným podílem se účastní funkcí imunitního systému. [3]

U dospělého jedince dosahuje kůže plochy až 2 m^2, tloušťky do 4 mm a hmotnosti přibližně 3 kg (v přítomnosti silného tukového polštáře až 20 kg). [3]

Kůže je složena z několika vrstev – epidermis (pokožky) a škáry (dermis) a hypodermis (podkoží).



Obr. 1. Vrstvy lidské kůže [4]

2.1.1. EPIDERMIS

Epidermis je povrchová vrstva tvořená vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který může být na povrchu zrohovatělý. Je rozdělena do pěti základních částí, z nichž nejspodnější je *stratum germinativum*, tzv. vrstva zárodečná, která je dále rozdělena na *stratum basale* a *stratum spinosum*. Ve *stratum basale* probíhá vznik a dělení nových buněk,ve *stratum spinosum* se tyto buňky dále vyvíjejí, rostou a oplošťují se. Směrem k povrchu se dále nachází *stratum granulosum.* V této vrstvě se v buňkách začínají tvořit granula s obsahem prekurzoru keratinu a buňky se dále diferencují, postupují směrem k povrchu, podléhají buněčné smrti a následně tvoří *stratum lucidum* (nápadné na dlani nebo chodidlech), které pak přechází přesnou hranicí ve *stratum corneum. Stratum corneum* je vrstva složená z 18-20 vrstev již plně zrohovatělých bezjaderných buněk, které byly vytvořeny ve *stratum basale*, dále se diferencovaly, ukládal se do nich keratin a migrovaly směrem k povrchu. Tento proces obnovy epidermis se nazývá keratinizace a trvá asi 30 dní. [5]

Buňky *stratum corneum* se nazývají korneocyty. Bezjaderné korneocyty jsou obklopeny lipidovou matrix, která je s pomocí mezibuněčných spojení zpevňuje v jednu kompaktní vrstvu, zásadně zodpovědnou za bariérovou funkci kůže. Deriváty epidermis jsou chlupy a kožní žlázy – mazové a potní. [3] [6]

2.1.2. DERMIS

Dermis je hlubší část kůže, tvořená zejména vazivem se zvlněnými kolagenními a elastickými vlákny. Je silná maximálně 2,5 mm a dělí se do dvou vrstev – *stratum papillare*, které obsahuje hustou síť vláken a velké množství vazivových buněk; a *stratum reticulare*, obsahující méně elastických a více kolagenních vláken, zodpovědné za tažnost kůže. V dermis se také nachází hladké svalstvo (např. vzpřimovače chlupů), je bohatě inervována a protkána sítí cév, jak krevních, tak lymfatických, nachází se zde cibulky vlasových folikulů, sekreční části kožních žláz a buňky imunitního systému. [2] [3]

Dermis je vazivem připoutána k podkožnímu vazivu, které dělí kůži od povrchových fascií a periostu. Mimo tyto spoje se nachází tukový polštář, jehož vývoj a rozložení na těle se významně liší u různých jedinců. [3]

2.1.3. HYPODERMIS

Hypodermis je tvořena především pojivovou tkání a podkožním tukem. Dále se zde nachází krevní a lymfatické cévy, které odsud pokračují do dermis, vlasové folikuly a nervy.

2.2. KOŽNÍ BARIÉRA

Tato bariéra se u živočichů vyvinula s přechodem na suchozemský život a funguje jako bariéra mechanická, tak i permeační, která chrání před ztrátou vody a průnikem alergenů, toxinů a podobně. Dále je bariérou tepelnou, ochrannou před ultrafialovým zářením a v neposlední řadě i bariérou mikrobiologickou, zprostředkovanou protektivní mikroflorou. [7]

Pro tuto práci, a transdermální aplikaci léčiv obecně, je zásadní bariéra permeační. Ze všech kožních struktur se na této bariéře největší částí podílí nejsvrchnější část kůže – *stratum corneum*. [8]

Základní stavební strukturou *stratum corneum* jsou již zmíněné korneocyty. Jsou to nerozpustné buňky vyplněné proteinem keratinem, vysoce odolné vůči působení různých chemikálií. Korneocyty jsou obklopené lipidovou matrix. Jejich tvar je uzpůsoben tak, aby do sebe jednotlivé buňky těsně zapadly a mezibuněčné prostory byly co nejmenší. Tento typ stavební struktury bývá označován jako struktura cihel a malty. [6] [9]

Korneocyty jsou většinou v 18-20 vrstvách, v závislosti na anatomické lokaci. Navzájem jsou spojeny korneodesmosomy, které jsou podle potřeby degradovány a tím je umožněno odstranění odumřelých korneocytů z kožního povchu. [9]

Lipidová matrix, která vyplňuje prostory mezi jednotlivými korneocyty, představuje asi 20 % objemu *stratum corneum*. Zatímco korneocyty jsou zodpovědné spíše za bariéru fyzikální, lipidová matrix tvoří bariéru permeační. Jedná se o velice komplexní směs ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin. Na rozhraní *stratum corneum* a *granulosum* se vyskytují probariérové lipidy, ty slouží jako prekurzory lipidů; a lipolytické a proteolytické enzymy, které jsou zodpovědné za přeměnu probariérových lipidů a degradaci desmosomů. Lipidová matrix tvoří také tzv. rezervoár stratum corneum, v němž se kumulují hydrofobní látky a jsou postupně uvolňovány do hlubších vrstev kůže (např. topické kortikosteroidy). [10] Někteří autoři předpokládají i existenci vodních pórů. [9] [11]

Stratum corneum je ze 75-80 % složeno z proteinů, 5-15 % jeho hmotnosti tvoří lipidy, zbytek zaujímá voda a dalšími organické sloučeniny. *Stratum corneum* není rigidní strukturou, ale naprosto unikátním systémem, který je vysoce organizovaný, velmi přizpůsobivý a schopný autopoiézy. [8] [11]

2.2.1. BARIÉROVÉ LIPIDY

Jsou lipidy přítomné v mezibuněčných prostorách *stratum corneum* vznikající z tzv. probariérových lipidů. Lipidy jsou uspořádány velice těsně do několikavrstevné vzájemně propojené lamelární struktury. Propustnost těchto lamel je významně nižší než propustnost fosfolipidových dvojvrstev. [6]

Lipidové lamely jsou tvořeny směsí lipidů, z nichž nejvíce jsou zastoupeny ceramidy (50 %), dále cholesterol (25 %) a volné mastné kyseliny (10 %). Molární poměr těchto tří složek je 1:1:1 a předpokládá se, že právě tento poměr je jedním z předpokladů bariérové funkce. Zbytek tvoří estery cholesterolu a cholesterol sulfát. [6] [11] [12]

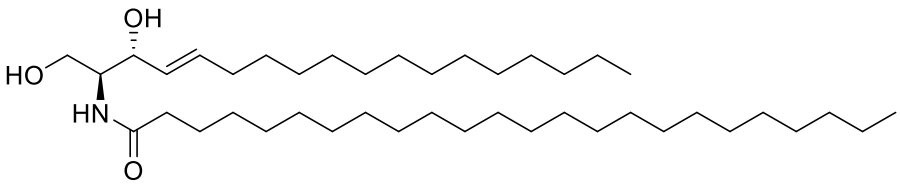
Syntéza bariérových lipidů probíhá na rozhraní se *stratum granulosum*, kdy jsou sekretována tzv. lamelární granula, obsahující probariérové lipidy (např. glykosylceramidy, cholesterol, glycerolfosfolipidy a sfingomyelin) a hydrolytické enzymy (proteázy, lipázy, kyselé fosfatázy a glykosidázy). Po vylití do mezibuněčného prostoru jsou probariérové lipidy zmíněnými enzymy následovně zpracovány na hydrofobnější produkty: Glykosylceramidy jsou extracelulárně zpracovány na ceramidy. Hydrolýzou sfingomyelinu vznikají ceramidy 2 a 5. A nakonec hydrolýzou fosfolipidů vznikají neesenciální volné mastné kyseliny. Dále je část cholesteryl sulfátu metabolizována na cholesterol. [13]

Za normálních podmínek je sekrece lamelárních granul pomalá, ale dostatečná pro integritu bariéry. Pokud dojde k porušení bariéry, odchází kalcium z vnější epidermis a obsah lamelárních granul je vypuštěn. Kalcium je tedy důležitým regulátorem sekrece. Lamelární granula také sekretují antimikrobní peptidy, jako např. lidský betadefensin. Antimikrobní bariéra je proto úzce spjata s permeační. Toto spojení vysvětluje například častou predispozici lidí s atopickou dermatitidou ke kolonizaci kůže bakterií Staphylococcus aureus. [11] [14]

2.2.1.1.CERAMIDY

Jedná se o hlavní polární lipidy ve *stratum corneum*. Mají různou délku a liší se stavbou polární části. Základem každého ceramidu je sfingoidní baze vázaná amidovou vazbou na mastnou kyselinu. Sfingoidní baze může být sfingosin, fytosfingosin, dihydrosfingosin anebo 6-hydroxysfingosin. Mastná kyselina může v poloze α nebo ω obsahovat hydroxyskupinu. Velký význam mají ceramidy s ω-hydroxymastnou kyselinou s délkou přibližně 30 uhlíků, které mají esterově navázanou kyselinu linolovou. Tyto ceramidy slouží jako molekulární spojky mezi jednotlivými lamelami, vyskytují se pouze v epidermis a jsou nezbytné pro bariérovou funkci kůže. [5]

Obecně lze říci, že hlavním úkolem ceramidů v kůži je zamezení nadměrné transepidermální ztráty vody z organismu snížením jejího prostupu přes kůži. Nedostatek ceramidů v kůži je sledován u mnoha kožních onemocnění (např. u pacientů s atopickým ekzémem byl zaznamenán nedostatek některých typů ceramidů). Dále je nedostatek ceramidů spojován s lupénkou, akné, suchou a stárnoucí kůží, a dokonce i psychickým stresem. Pro léčbu poškozené kožní bariéry je proto možné použít lokální přípravky s obsahem ceramidů. [5] [15] [14]



Obr. 2. Obecný vzorec ceramidu

2.2.1.2. Další bariérové lipidy

Dalšími lipidy, podílejícími se na tvorbě kožní bariéry jsou cholesterol a vyšší mastné kyseliny. Zastoupení cholesterolu v lipidové matrix je asi 25 % a je zásadní pro mísení různých druhů lipidů. Vyšší mastné kyseliny tvoří asi 10 % lipidové matrix, nejčastěji jsou nasycené, s řetězcem delším než 20 C. Kyselina linolová je jediná nenasycená kyselina vyskytující se ve *stratum corneum* a je nezbytná pro homeostázu bariéry. Pokles v koncentraci jakékoliv z těchto složek vede ke snížení integrity bariéry. [11]

2. 3. Akceleranty transdermální permeace a penetrace

Jedná se o látky navržené tak, aby byly schopné reverzibilně zvyšovat prostupnost kůže pro léčiva do hlubších vrstev kůže (penetrace) a také do oběhu (permeace), dále jen akceleranty. Ideální akcelerant by neměl dráždit kůži ani být toxický, jeho účinek by měl být reverzibilní a chemicky by měl být kompatibilní s léčivem. Neměl by mít vlastní biologickou aktivitu. Nástup jeho účinku by měl být rychlý, opakovatelný a léčivo by mělo prostupovat pouze jednosměrně. Také jeho výroba by neměla být příliš nákladná a složitá. Měl by být snadno odbouratelný.[6] [16]

Akceleranty jsou chemicky velmi nejednotnou skupinou a jejich mechanismus často ještě není zcela objasněn. Pravděpodobně jde o působení vedoucí k rozrušení organizace bariérových lipidů, zvýšení fluidity lipidové vrstvy, interakce s intracelulárními proteiny a zvýšení hydratace kůže, anebo o jejich kombinaci [16].

Mezi akceleranty patří například látky ze skupiny alkylsulfoxidů, terpenů, analogů močoviny i močovina samotná, deriváty hydroxykyselin, laktamy (Azon), alkoholy (koakcelerant propylenglykol) a látky novější s výrazně sníženou toxicitou, např. transkarbamy, DDAK a podobně. [16] [6].

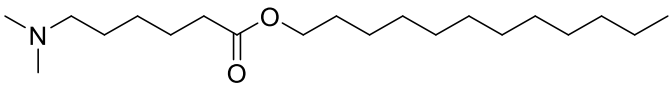
2.3.1. DDAK

DDAK je dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové. V této sloučenině spojuje pětiuhlíkatý řetězec enzymaticky labilní esterovou skupinu (pro přidání této skupiny byl vzorem Transkarbam 12) s polární hlavou 2-(dimethylamino)propanové kyseliny, která se osvědčila u akcelerantu DDAIP [17] [18].

Mechanismus účinku DDAK spočívá v inkorporaci do lipidů stratum corneum a narušení jejich organizace, vedoucí ke zvýšení propustnosti. Poté je labilní esterová vazba tohoto akcelerantu hydrolyzována esterázami přítomnými v epidermis na netoxické a nedráždivé produkty a bariéra kůže se znovu obnoví, což bylo potvrzeno měřením elektrické impedance[18] [19].

DDAK je možné použít s velkým množstvím látek, jeho účinnost byla potvrzena například u theofillinu, hydrokortizonu, indometacinu a u látek ze skupiny acyklických nukleosidfosfátů - adefovir a cPr-PMEDAP [18] [20] [21].

U tohoto akcelerantu byla *in vitro* potvrzena přijatelná toxicita vůči keratinocytům a fibroblastům. Podle dalších studií není DDAK toxický ani pro myši a potkany po orálním aplikaci. Optimální účinek vykazuje při pH 6 [18] [21] [19].



Obr. 3. Akcelerant DDAK, dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové

2.4. ACYKLICKÉ NUKLEOSIDFOSFONÁTY (ANP)

Acyklické nukleosidfosfonáty jsou látky vyvinuté významným českým vědcem, profesorem Antonínem Holým. Lze je považovat za analogy nukleotidů, které mají na ekvivalentu sacharidu etherově vázanou fosfomethylovou skupinu, což vede k větší stabilitě molekuly. Etherová vazba totiž není, na rozdíl od esterové, která v molekule nukleotidu váže fosfát, *in-vivo* hydrolyzována fosfatázami. Tyto látky fungují na principu antimetabolitu, jejich zařazení do vznikajícího řetězce nukleové kyseliny vede k zastavení replikace inhibicí DNA-polymerázy nebo reverzní transkriptázy. Z této skupiny jsou nejvýznamnějšími tenofovir, adefovir a CDV. Adefovir je derivátem adeninu a CDV cytosinu.

2.4.1. CIDOFOVIR

Jedná se o nukleosidový analog deoxycytidin monofosfátu se širokou antivirovou aktivitou. V literatuře se nejčastěji uvádí pod názvem HPMPC, celý chemický název ([S]-1-[3-hydroxy-2-fosfonylmethoxypropyl])cytosin anebo (S)-[2-(4-amino-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-1-yl)-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methylfosfonová kyselina. Toto účinné antivirotikum je obsaženo v komerčním přípravku Vistide®.

CDV je ve vodě rozpustná polární molekula s nízkou dostupností po perorálním aplikaci. Je nefrotoxický, tuto vlastnost však lze ovlivnit prehydratací a snížením tubulární sekrece pomocí probenecidu. Dále může být tato negativní vlastnost ovlivněna tvorbou cyklického fosfonátu cHPMPC. Ten je v cytoplazmě decyklizujícími fosfodiesterázami přeměněn na CDV a jelikož cHPMPC není substrátem transportérů proximálních tubulů, léčivo se v nich nehromadí. Dostupnost tohoto cyklického fosfonátu po orálním aplikaci lze zvýšit další tvorbou proléčiva, a to vytvořením soli s kyselinou salicylovou. [22] [23] [24] [25]

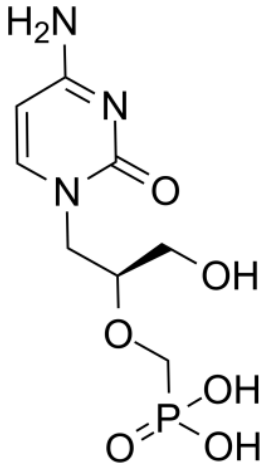
Esterifikace cHPMPc s lipidickými alkoxyalkanoly zvyšuje *in-vitro* aktivitu proti herpesvirům, poxvirům, zejména pak proti Variola viru [26].

Farmakokinetická data jsou k dispozici po aplikaci léčiva zvířatům a HIV-pozitivním jedincům. Farmakokinetika CDV je závislá na dávce, po systémovém aplikaci je 90 % léčiva eliminováno do 24 hodin. Pro lokální aplikaci u člověka zatím neexistují data, biodostupnost a metabolismus byly testovány pouze na králících. Po lokálním aplikaci na nepoškozenou kůži králíka dosahovala dostupnost CDV v kůži 0,2-2,1 %; po aplikaci na kůži poškozenou pak 41 %. Vehikulem pro tyto pokusy byl propylenglykol, který zvyšoval dostupnost CDV, proto byl jako vehikulum použit i v předkládané práci. [22] [1] [27] [28]

CDV je velmi účinným antivirotikem. Hlavní skupiny virů, na které působí, jsou lidské papillomaviry, herpes viry, poxviry a byla dokonce popsána jeho aktivita proti jednomu retroviru. Proti RNA virům CDV není aktivní. [25] [26] [29] [30]

Na rozdíl od starších antivirotik, acikloviru a gancikloviru, která jsou nukleosidovými analogy, obsahuje CDV fosfonátovou skupinu. Aktivace tohoto léčiva na trifosfát tím pádem není závislá na virových kinázách (zajišťujících první fosforylační krok), ale pouze na kinázách hostitelské buňky, které dokážou zajistit přeměnu CDV na di- a trifosfát. Díky tomu CDV funguje i u některých herpetických infekcí, kde aciklovir a ganklovir selžou. [29] [31] [32] [33].

Bylo prokázáno, že CDV a jeho metabolity mají dlouhý poločas a díky této vlastnosti je schopný chránit také ještě neinfikované buňky v okolí infekce. [29] [31]



Obr. 4. Cidofovir

2.4.1.1. POUŽITÍ CIDOFOVIRU

V současné době je CDV schválený pro intravenózní aplikaci v léčbě cytomegalovirové retinitidy u pacientů s AIDS, a to jak Evropskou lékovou agenturou (EMEA), tak i její americkou obdobou (FDA – Food Drug Administration). [26]

Účinek CDV byl prokázán u různých papillomavirových infekcí, jako jsou například respirační papillomatózy, genitální bradavice a bradavice obecně (HPV 16, HPV 33, HPV 66). Při použití u herpetických infekcí byl účinný u infekcí způsobených HSV 1 a HSV 2, Varicela Zoster viry, Cytomegaloviry, virem Epstein-Baarové a fungoval proti herpesviru spojenému s Kaposiho-sarkomem. Ze skupiny poxvirů byl efekt CDV zdokumentován u onemocnění molluscum contagiosum způsobujícím molusky a u opičích neštovic. Obecně je CDV užíván k léčbě těch infekcí, u kterých ostatní antivirotika selhávají a u imunokompromitovaných jedinců (většinou jde o další virová onemocnění HIV pozitivních). Zkoumána byla i jeho cytostatická aktivita. [26] [29] [33]

Nejčastěji je CDV podáván lokálně ve formě 0,3% a 1% krému nebo gelu a pokud je podán na kůži, kde není porušeno stratum corneum, nevykazuje významnější nežádoucí účinky. Většímu rozšíření CDV brání jeho cena, která se v současné době pohybuje okolo 100 USD za 50 mg látky. [33] [34]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

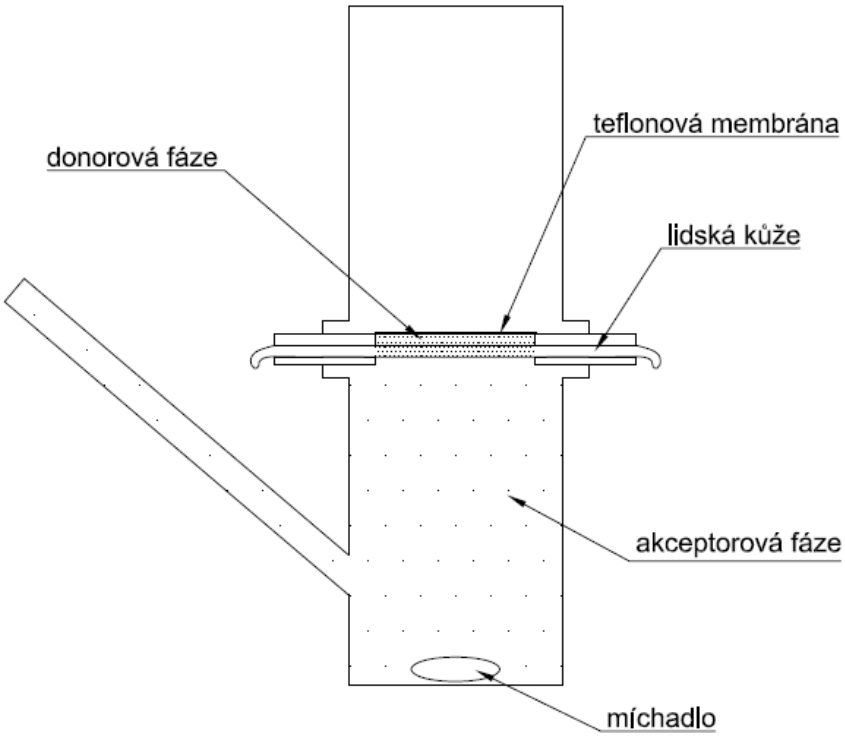
3.1. PERMEAČNÍ POKUSY

3.1.1. KŮŽE

Pro všechny provedené pokusy byla použita lidská kůže. Jednalo se o kůži pacientů bělošské rasy, kteří podstoupili plastickou operaci břicha. Tato práce byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (souhlas číslo 200609 S09P) a s kůží bylo nakládáno dle pravidel Helsinské deklarace [20]. Co nejdříve po odebrání vzorku byla kůže zbavena nadbytečné tukové tkáně a zamražena na -20 °C. Těsně před začátkem permeačních pokusů byla kůže rozmražena a hydratována v PBS pufru o PH 7,4 při laboratorní teplotě. Pokud se jednalo o kůži, která měla být použitá pro pokusy s kůží poškozenou, byl každý kus kůže 10x ostripován, tzn. na celý povrch byla nalepena lepicí páska, kůže byla zatěžkána závažím o váze 3 kg na dobu 10 vteřin a poté byla páska opatrně strhnuta. Celý proces byl desetkrát opakován. Následně byly vzorky kůže, jak zdravé, tak poškozené, rozřezány skalpelem na čtverečky o velikosti přibližně 2x2 cm. Takto připravené vzorky pak byly použity pro pokusy ve Franzových celách.

3.1.2. MODIFIKOVANÉ FRANZOVY DIFÚZNÍ CELY

Jedná se o skleněné nádoby o velikosti asi 10 cm složené ze dvou dílů. Horní část má široké hrdlo sloužící pro aplikaci donorového vzorku, pod ní je přiloženo plexisklo o síle asi 5 mm, které kryje svrchní stranu vzorku kůže. Plexisklo má uprostřed kruhový otvor o ploše 2 cm^2, vymezující permeační plochu, a právě na ni je nanášena donorová fáze. Donor byl po nanesení překryt nesmáčivou teflonovou membránou, zajišťující jeho rovnoměrné rozprostření po kůži. Kůže byla umístěna na dalším plexiskle, asi 2 mm silném a se stejným kruhovým výřezem. Ten umožňuje kontakt kůže s akceptorovou fází, fosfátovým pufrem (viz. níže). Franzova cela je schematicky znázorněna na obrázku 4.



Obr 4. Modifikovaná Franzova difuzní cela

3.1.3. DONOROVÉ A AKCEPTOROVÉ VZORKY

Donorové vzorky byly připraveny rozpuštěním či dispergací CDV v roztoku připraveném smísením propylenglykolu s vodou v poměru 6:4 (v/v) a to v takovém množství, aby donorová fáze obsahovala 0,3 %, 1 %, či 3 % CDV (dále jen CDV). Analogicky byla připravena další sada donorů, obsahující navíc 1 % akcelerantu DDAK. Připravené vzorky byly důkladně protřepány a 24 hodin temperovány na 32°C. CDV nebyl plně rozpuštěn v roztoku, jednalo se o suspenze. Po homogenizaci byl vzorek aplikován na kůži. Zbytek vzorku byl centrifugován při 10 000 otáčkách po dobu 10 min, a bylo stanoveno množství CDV v supernatantu (tedy jeho rozpustnost v donoru).

Akceptorovou fází byl isotonický fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4; který je vhodný pro HPLC analýzu a CDV je v něm dostatečně rozpustný. Pro přípravu pufru bylo naváženo 0,312 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; 2,865 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 8 g NaCl a 0,201 g KCl. Tato navážka byla rozpuštěna v 1000 ml vody pro HPLC a připravený pufr byl doplněn o 0,1 g gentamicinu zajišťujícíhu ochranu proti mikrobiální kontaminaci. Po rozpuštění všech složek bylo pH pufru upraveno přidáním koncentrovaného roztoku NaOH nebo H_3PO_4 na hodnotu 7,4.

3.1.4. Měření elektrické impedance

Impedance byla měřena pomocí LCR přístroje 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo) měřící rozpětí 20 Ω–10 MΩ, chyba v kΩ hodnotách <0,5 %). Pro toto měření byl do donorové části cely nanesen 1 ml pufru. Po 30min ustálení byla měřena impedance opatrným ponořením jedné elektrody do tohoto pufru a druhé do akceptorové části. Měření bylo u každé cely vždy provedeno dvakrát.

3.1.5. Postup permeačních pokusů

Nejprve byly sestaveny Franzovy cely a jejich akceptorová část naplněna pufrem až po okraj bočního raménka. Byla zkontrolována těsnost cel a po hodinové temperaci ve vodní lázni o teplotě 32°C za stálého míchání byla změřena impedance. Dále byly cely 24 hodin temperovány při stejné teplotě za intenzivního míchání. Za tuto dobu došlo k dostatečné hydrataci kůže. Po jejím uplynutí bylo na kůži naneseno 40 µl donorové fáze, která byla pro lepší rozprostření vzorku překryta nesmáčivou teflonovou membránou. Po ukončení 24hodinové pokusu byl odebrán vzorek akceptorové fáze, cely byly rozebrány, kůže pečlivě omyty pufrem a osušeny. V místě kontaktu s donorovým vzorkem byly kůže ještě navíc omyty ethanolem a destilovanou vodou, a z jejich středu byl mechanicky vyseknut kruhový výsek o ploše 2 cm^2, který odpovídá ploše, na kterou působil donorový vzorek. Výseky byly zabaleny do aluminiové folie a zahřáty na 80 °C po dobu dvou minut. Po tomto zahřátí bylo možné oddělit epidermis od zbytku kůže. Po jejím oddělení byla epidermis zvážena a umístěna do 1 ml extrakčního roztoku za účelem stanovení koncentrace léčiva v epidermis. Stejně tak byly zváženy i vzorky dermis a zbytky kůže. Vzorky dermis byly umístěny do 2 ml roztoku mobilní fáze a zbytky kůží po vyražení byly umístěny do 5 ml roztoku extrakčního roztoku. Jako extrakční roztok byla použita mobilní fáze pro HPLC o složení 25 % 50 mmol/l octanu amonného a 75 % acetonitrilu (ACN).

Všechny vzorky byly následně 24 hodin extrahovány při 32 °C, opět za intenzivního míchání. Po uplynutí této doby bylo temperování a míchání ukončeno a vzorky byly zfiltrovány přes vatu. V získaném filtrátu byla pomocí HPLC analýzy stanovena koncentrace CDV.

Ve třetím permeačním pokusu, kdy byly použity pouze kůže nepoškozené, byla permeační plocha kůží po ukončení pokusu nejdříve 10x ostripována a lepící páska s přilepenými svrchními vrstvami epidermis byla celá umístěna do 1 ml mobilní fáze. Tato metoda stripování slouží k postupnému odstranění vrstev *stratum corneum*. Po ostripování byla permeční plocha kůží obdobně jako ve výše zmíněném případě, vyseknuta, vystavena teplotě 80°C po dobu dvou minut, byla oddělena epidermis od dermis (pokud k oddělení epidermis nedošlo již při stripování), a se vzorky bylo dále nakládáno stejně jako u výše popsaných permeačních pokusů.

3.1.6. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ LÉČIVA VE VZORCÍCH

3.1.6.1. ANALYTICKÁ METODA

Pro stanovení množství CDV z permeačních pokusů byla použita metoda HPLC.

Mobilní fáze použitá jak pro extrakci CDV přítomného v kůži po permeačních pokusech, tak pro samotnou HPLC analýzu byla připravena z 25 % 50 mmol/l octanu amonného a 75 % ACN.

Pro měření byl použit HPLC přístroj Shimadzu Prominence (výrobce Shimadzu, Kyoto, Japonsko), který obsahuje vysokotlakou pumpu LC-20 AD, odplyňovač DGU-20A3, autosampler SIL-20 A HT, kolonový termostat CTO-20AC, diode array detektor SPD-M20A a komunikační modul CBM20-A. Data byla analyzována integračním softwarem LCsolutions verze 1.22.

Separace CDV byla dosažena na koloně SeQuant ™ ZIC®-HILIC o rozměrech 150-4,6 mm s 5µm velkými částicemi s porozitou 200 Å (Merck, Darmstadt, Německo) v HILIC módu při 30°C. Použita byla výše zmiňovaná mobilní fáze o průtoku 2 ml/min, nástřik vzorku byl 20 µl, detekce probíhala při vlnové délce 274 nm.

Pro kalibraci přístroje před zahájením analýzy byl použit roztok CDV v pufru o koncentraci 100 -0,01 µg/ml (12 kalibračních hladin)

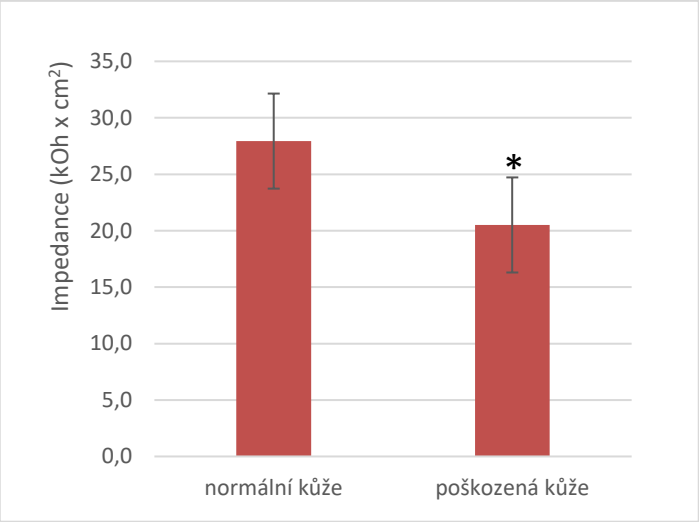
3.1.6.2. ANALÝZA DAT

Pomocí této metody bylo možné zjistit celkové množství CDV v jednotlivých vrstvách kůže a díky známým hmotnostem kožních vrstev bylo možné vypočíst i koncentraci CDV v různých hloubkách kůže. Všechna předkládaná data jsou prezentována jako průměr z naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou. K vyhodnocení statistické významnosti rozdílu hodnot ve vzorcích s akcelerantem DDAK a bez něj byl použit Studentův t-test.

4. VÝSLEDKY

4.1. MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ IMPEDANCE

Jako měřítko bariérové funkce zdravé kůže a také ukazatel míry poškození kůže po provedení metody *tape stripping* byla použita elektrická impedance. Průměr hodnot elektrické impedance pro kůži zdravou a poškozenou je uveden v grafu 1.

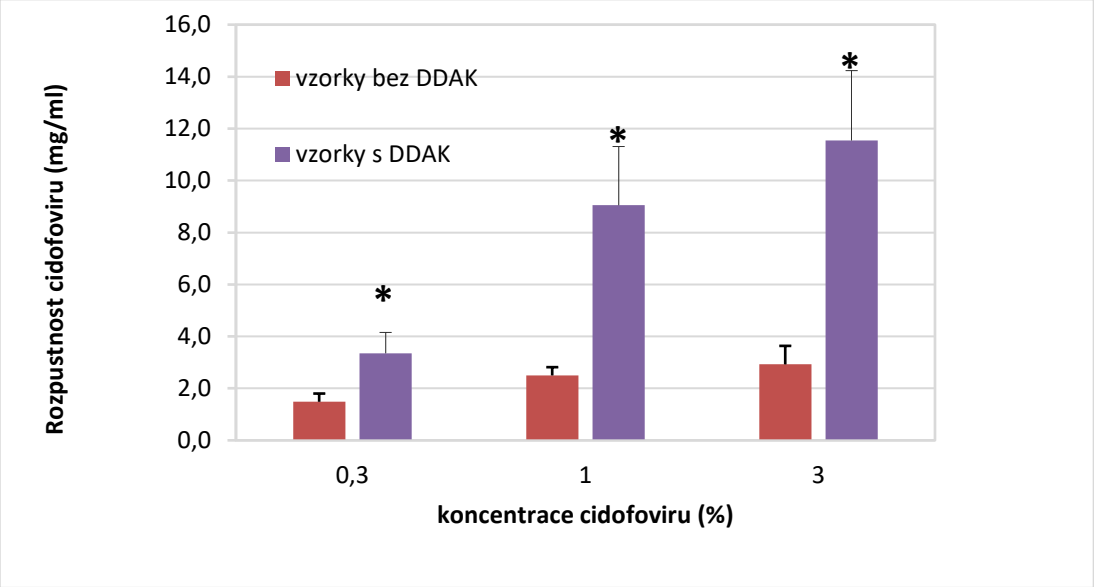


*Graf 1. Elektrická impedance zdravé a poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot, směrodatná odchylka je vyznačena chybovými úsečkami (n= 10-13). Statistická významnost vlivu poškození kůže na impedanci je vyznačena symbolem *.*

Průměr hodnot impedance zdravé kůže byl 27,9 ± 4,2 kΩ x cm^2. U kůže poškozené byl průměr naměřených hodnot signifikantně nižší (20,5 ± 5,8 kΩ x cm^2).

4.2. Rozpustnost CDV v roztoku

Průměrná rozpustnost CDV v donorových vzorcích bez DDAK a s DDAK je znázorněna v grafu 2.



*Graf 2. Rozpustnost CDV v donorových vzorcích. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot a chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (n= 10-13). Statistická významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu je vyznačena symbolem *.*

Rozpustnost CDV v 0,3% donorovém vzorku byla 1,5 ± 1,5 mg/ml Ve vzorku o stejné koncentraci s přídavkem DDAK byla naměřena rozpustnost 3,4 ± 0,8 mg/ml. DDAK tedy zvyšuje rozpustnost CDV v roztoku o koncentraci 0,3 % přibližně dvakrát, toto zvýšení rozpustnosti po přidání DDAK je statisticky významné a vedlo k úplnému rozpuštění zmíněného množství CDV.

Rozpustnost CDV v 1% donorovém vzorku byla 2,5 ± 0,3 mg/ml; což je vyšší hodnota v porovnání se vzorkem o koncentraci 0,3 %, a toto zvýšení je statisticky významné. Rozpustnost se mírně zvyšuje pravděpodobně vlivem měnícího se pH v důsledku přidávání CDV do vzorku. Ve vzorku o stejné koncentraci s přídavkem 1% DDAK byla stanovena rozpustnost 9,1 ± 2,3 mg/ml. V tomto případě zvyšoval DDAK rozpustnost CDV přibližně 3x a toto rozpustnosti po přidání DDAK je statisticky významné. V obou případech se jednalo o suspenzi.

Rozpustnost CDV v 3% donorovém vzorku byla 2,9 ± 0,7 mg/ml; ve vzorku o stejné koncentraci CDV s 1% přídavkem DDAK byla naměřena rozpustnost 11,5 ± 2,7 mg/ml; což je

přibližně 3x více než ve vzorku bez DDAK a toto zvýšení rozpustnosti po přidání DDAK je statisticky významné. V obou případech se opět jednalo o suspenzi.

Ve všech případech byla rozpustnost CDV výrazně vyšší v těch donorových vzorcích, do kterých byl přidán 1% akcelerant DDAK. Lze tedy říct, že DDAK zvyšuje rozpustnost CDV v donorovém vzorku, přibližně 2-3krát.

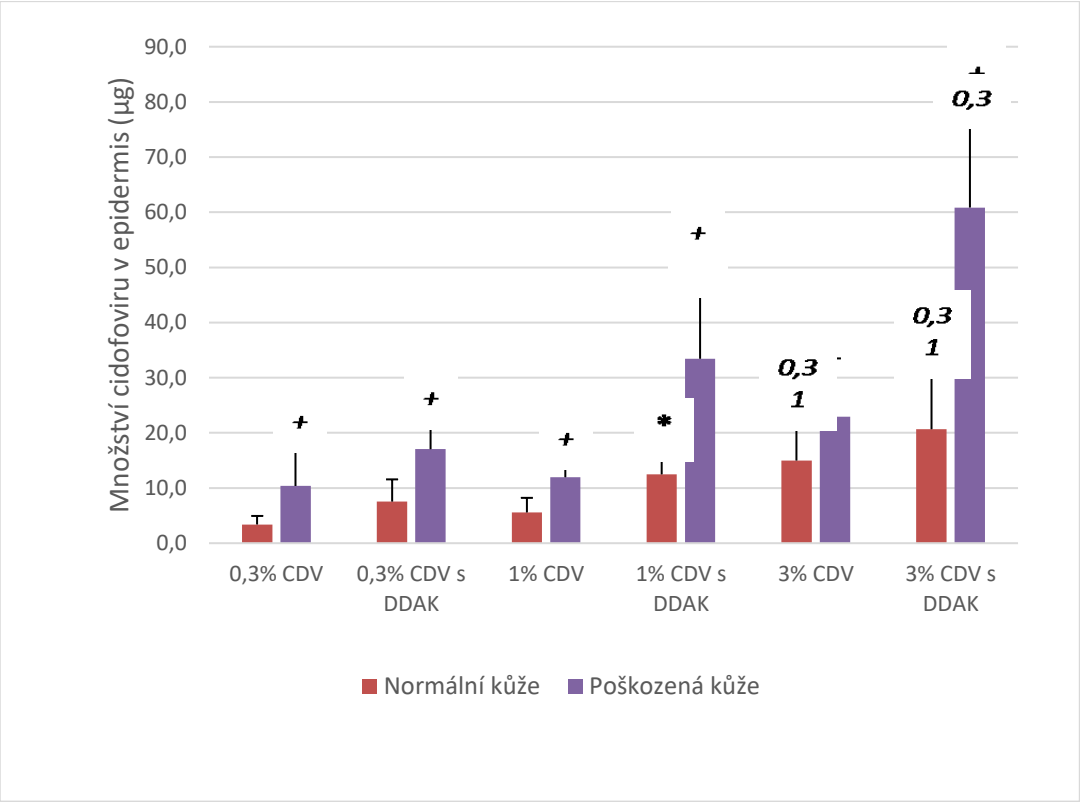
4.3. PERMEAČNÍ POKUSY

Při permeačních pokusech byly sledovány tři základní veličiny-množství, koncentrace a dostupnost CDV ve sledovaném vzorku zdravé a poškozené kůže. Koncentrace CDV v kůži byla určena jako poměr množství CDV a hmotnosti části kůže, ze které byl izolován. Dostupnost vyjadřuje, kolik procent z celkového naneseného CDV prošlo do konkrétní části kůže. Dále byl u všech hodnot sledován vliv akcelerantu (akcelerační poměr), vliv koncentrace CDV v donoru a vliv poškození kůže.

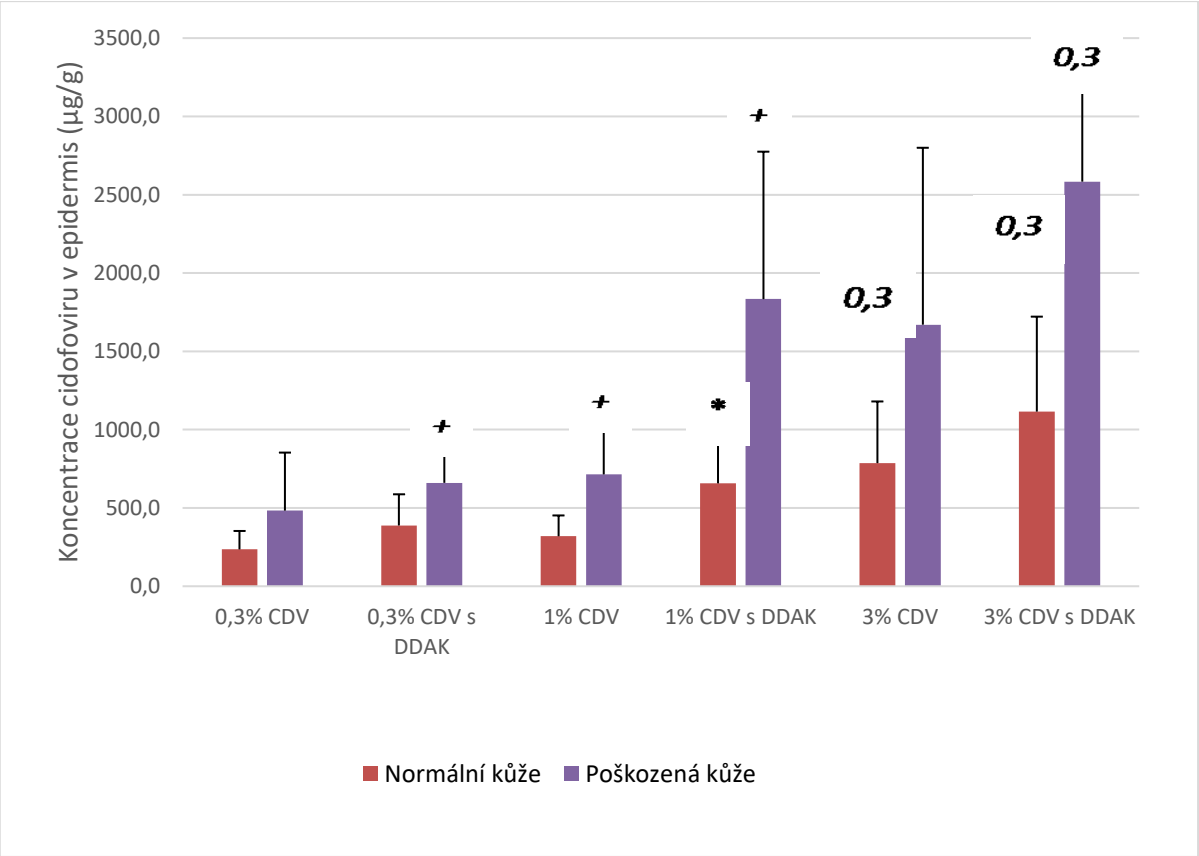
Akcelerační poměr udává změnu množství, koncentrace a dostupnosti CDV v kůži po přidání akcelerantu DDAK k donorovému vzorku. Vliv koncentrace určuje poměr hmotnosti, koncentrace anebo dostupnosti sledovaného vzorku vůči vzorku s nižší koncentrací a vliv poškození určuje, jak se všechny tyto veličiny změní, pokud dojde k poškození kůže.

4.3.1. EPIDERMIS

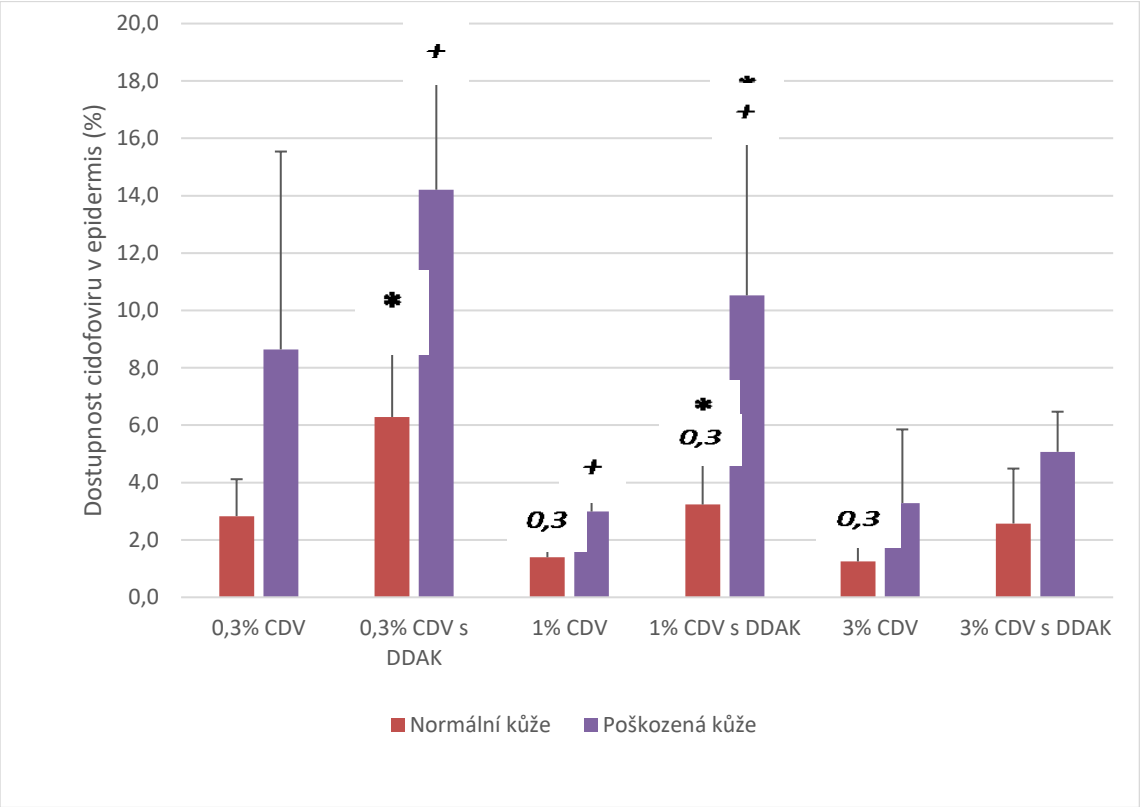
Množství CDV v epidermis zdravé i poškozené kůže zjištěné při permeačních pokusech, jeho koncentrace a dostupnost je znázorněna v následujících grafech 3, 4 a 5. Slovní popis hodnot zobrazených v těchto grafech je uveden níže.



*Graf 3. Množství CDV v epidermis zdravé i poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot množství CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži .*



*Graf 4. Koncentrace CDV v epidermis zdravé i poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr hodnot koncentrace CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži.*



*Graf 5. Dostupnost CDV v epidermis zdravé a poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr vypočtených hodnot dostupnosti CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži.*

4.3.1.1. EPIDERMIS ZDRAVÉ KŮŽE

4.3.1.1.1. DONOROVÉ VZORKY O KONCENTRACI 0,3 % CDV

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV na zdravou kůži bylo v stanoveno 3,4±1,5 µg CDV (kompletní popis postupu viz výše). Pokud toto množství vztáhneme na hmotnost analyzované tkáně, dostaneme výslednou koncentraci CDV v epidermis, jejíž hodnota je 236 ± 117 µg na 1 g kůže. Dostupnost CDV, tedy procento aplikované dávky nalezené v epidermis byla pro vzorky s touto koncentrací CDV 2,8 ± 1,3 %.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k tomuto vzorku došlo nejen ke zvýšení rozpustnosti CDV (viz výše), ale i ke zvýšení množství CDV v kůži, jeho koncentrace i dostupnosti. Množství CDV po aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV s 1 % DDAK bylo 7,5 ± 5,6 µg. Akcelerační poměr měl v tomto případě hodnotu 2,2 a vliv akcelerantu na kumulaci CDV v kůži byl statisticky významný. Koncentrace CDV se po přidání akcelerantu také zvýšila, a to na hodnotu 388 ±

199 µg CDV na 1 g kůže. Vliv akcelerantu v tomto případě nebyl statisticky významný. Dostupnost CDV z donorového vzorku se po přidání akcelerantu zvýšila oproti vzorkům bez DDAK přibližně 2,2krát (na 6,3 ± 3,4 % z celkového aplikovaného množství CDV), vliv akcelerantu byl v tomto případě opět statisticky významný.

4.3.1.1.2. Donorové vzorky o koncentraci 1 % CDV

Po aplikaci 40 µl 1% CDV bylo v epidermis po 24hodinové inkubaci naměřeno 5,6 ± 2,6 µg CDV, což je 1,6krát více, než po aplikaci roztoku 0,3%. Vztaženo na hmotnost analyzované tkáně byla výsledná koncentrace CDV v epidermis 320 ± 133 µg na 1 g kůže, což je hodnota 1,4krát vyšší než po aplikaci 0,3% roztoku CDV. Dostupnost CDV byla po použití donorových vzorků s 1% koncentrací CDV pouze 1,4 ± 0,7 %, což je oproti 0,3 % vzorku CDV poloviční hodnota CDV.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k donorovému vzorku bylo v epidermis stanoveno 12,5 ± 6,4 µg CDV. Akcelerant tedy zvýšil množství CDV v epidermis 2,2krát a toto zvýšení bylo statisticky významné. Zároveň došlo jak ke zvýšení koncentrace na 657 ± 305 µg na 1 g kůže, což je statisticky významné (zvýšení 2,1krát), tak i dostupnosti, která byla statisticky významně zvýšena na hodnotu 3,2 ± 1,7 % (více jak dvojnásobný nárůst oproti vzorkům bez akcelerantu).

4.3.1.1.3. Donorové vzorky o koncentraci 3 % CDV

Množství v epidermis po 24hodinové aplikaci 40 µl 3% roztoku CDV bylo 15,0 ± 7,4 µg. To je 4,4krát více, než po aplikaci 1% vzorků. Vliv zvýšení koncentrace CDV je u této hodnoty statisticky významný jak v porovnání s 0,3% vzorky, tak i v porovnání se vzorky 1%. Koncentrace CDV v epidermis se oproti 0,3% vzorkům také zvýšila, a to 3,3krát na hodnotu 786,6 ± 393,4 µg na 1 g kůže, a toto zvýšení vůči vzorkům s oběma nižšími koncentracemi je opět statisticky významné. Dostupnost je v tomto případě velmi nízká, epidermis se dostává pouze 1,2 % CDV z aplikované dávky, což je nejnižší dostupnost ze všech sledovaných vzorků. Tato dostupnost je například oproti 0,3% vzorkům méně než poloviční (rozdíl je statisticky významný).

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k 3% vzorkům CDV, došlo ke zvýšení množství léčiva v epidermis 1,4krát; a to na hodnotu 20,7 ± 11,2 µg. Nárůst množství CDV vlivem zvýšení jeho koncentrace v donoru byl i u vzorků s DDAK statisticky významný vůči oběma koncentracím. Oproti roztoku s nejnižší koncentrací CDV byla kumulace CDV zvýšena 2,7krát. Koncentrace CDV v kůži u 3% vzorků vzrostla po přidání akcelerantu 1,4krát, na hodnotu 1115,3 ± 606,3 µg na 1 g kůže. Oproti množství CDV po 24hodinové aplikaci donorových vzorků s desetinovou koncentrací léčiva a stejnou koncentrací DDAK je koncentrace po aplikaci 3% vzorku CDV 4,7krátx vyšší, a tento rozdíl je statisticky významný. Dostupnost CDV se po přidání akcelerantu také zvýšila (2,1krát), na hodnotu 2,6 ± 1,9 %. Zvýšení koncentrace CDV v donorovém vzorku ovšem nemá vliv na zvýšení dostupnosti, dostupnost CDV v 3% vzorku je téměř shodná s dostupností z 0,3% roztoku bez DDAK.

4.3.1.2. EPIDERMIS POŠKOZENÉ KŮŽE

4.3.1.2.1. DONOROVÉ VZORKY O KONCENTRACI 0,3 % CDV

Po 24hodinové aplikace 40 µl 0,3% CDV v 60% propylenglykolu byla zjištěna v epidermis kumulace 10,4 ± 8,3 µg CDV, což je oproti výsledkům na zdravé kůži trojnásobná hodnota a vliv poškození na prostup CDV do epidermis je statisticky významný. Koncentrace CDV v epidermis poškozené kůže (483,2 ± 370,2 µg/g) je oproti kůži zdravé přibližně dvojnásobná. Dostupnost CDV, tedy procento aplikované dávky nalezené v epidermis, byla pro vzorky s 0,3% koncentrací CDV 8,6 ± 6,9 %. Jedná se přibližně o trojnásobek oproti kůži zdravé.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k 0,3% suspenzi CDV došlo opět k rozpuštění léčiva v donoru a ke zvýšení množství CDV v kůži, jeho koncentrace i dostupnosti. Množství CDV v kůži po aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV s 1% DDAK bylo 17,0 ± 5,3 µg, což je 1,6x více, než ve stejném vzorku bez akcelerantu. V porovnání s kůží zdravé došlo vlivem poškození k více než trojnásobnému zvýšení kumulace CDV v epidermis a tento rozdíl je statisticky významný. Koncentrace CDV se po přidání akcelerantu také zvýšila, a to na hodnotu 660,3 ± 207,2 µg/g, což je téměř 2krát více než u kůže zdravé a tento rozdíl je statisticky významný. Dostupnost po přidání akcelerantu se zvýšila na 14,2 ± 4,4 CDV (1,6krát více než u donoru bez akcelerantu). Poškození kůže v tomto případě vedlo k 2,3krát vyšší dostupnosti CDV a má na tento parametr statisticky významný vliv.

4.3.1.2.2. DONOROVÉ VZORKY O KONCENTRACI 1 % CDV

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 1% roztoku CDV jsme v epidermis po našli 12,0 ± 3,7 µg CDV, což je 1,2x více, než po aplikaci 0,3% roztoku. Statisticky významný je v tomto případě vliv poškození, který má hodnotu 2,1. Koncentrace CDV v epidermis po aplikaci 1% donorového vzorku je 714,5 ± 291,2 µg CDV na 1 g epidermis, což je hodnota 1,5krát vyšší než po aplikaci 0,3% roztoku CDV, a více než dvojnásobná (statisticky významná hodnota), pokud porovnáme tento vzorek se vzorkem kůže zdravé. Dostupnost CDV byla pro vzorky s touto koncentrací CDV pouze 3,0±0,9 %, což je přibližně třetinová hodnota oproti hodnotě při použití 0,3% roztoku CDV. V porovnání se zdravou kůží se hodnota zvýšila dvojnásobně (statisticky významné). I přes toto zvýšení je hodnota dostupnosti nejnižší ze všech sledovaných vzorků poškozené kůže, prostupnost CDV poškozenou kůží je tedy v této koncentraci velmi nízká.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k donorovému vzorku jsme nalezly v epidermis 33,4 ± 15,2 µg CDV, akcelerant tedy zvýšil množství CDV 2,8krát a toto zvýšení je statisticky významné. Vůči vzorku s nižší koncentrací je množství CDV zvýšeno dvakrát. Vliv poškození je v tomto případě statisticky významný, v porovnání s zdravé kůži je hodnota téměř třikrát vyšší. Zároveň došlo ke zvýšení koncentrace CDV v epidermis na 1834,0 ± 940,8 µg/g, což je statisticky významné zvýšení (2,6krát). Vůči 0,3% vzorku bez akcelerantu je koncentrace CDV zvýšena 2,8krát a stejně velký je i vliv poškození, který je statisticky významný. Dostupnost

má v tomto případě hodnotu 10,5 ± 5,8 %. Akcelerant tedy zvýšil prostupnost CDV do epidermis 3,5krát. Tento rozdíl je statisticky významný, stejně jako vliv poškození, jehož hodnota byla 3,3. Ovšem oproti vzorku s nižší koncentrací (0,3% CDV) byla hodnota snížena přibližně o pětinu.

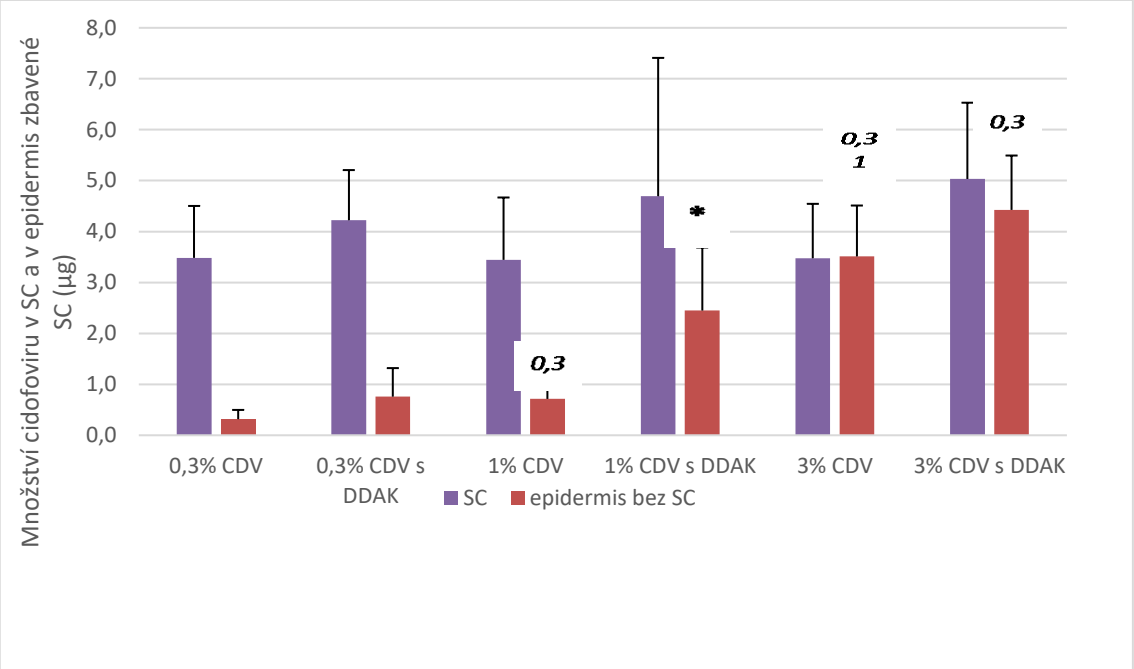
4.3.1.1.3. Donorové vzorky o koncentraci 3 % CDV

Množství CDV po 24hodinové aplikaci 40 µl 3% CDV bylo 22,9 ± 10,6 µg, což je 2,2krát více, než bylo nalezeno v 0,3% vzorcích. Koncentrace CDV se oproti 0,3% vzorkům také zvýšila, a to 3,5 krát na hodnotu 1670,2 ± 1129,6 µg CDV na 1 g kůže. Dostupnost je v tomto případě 3,3 ± 2,6% z aplikované dávky, tato dostupnost je méně než poloviční oproti 0,3% vzorkům a tento rozdíl je statisticky významný. Vliv poškození byl u koncentrace i dostupnosti roven přibližně 2 a není statisticky významný.

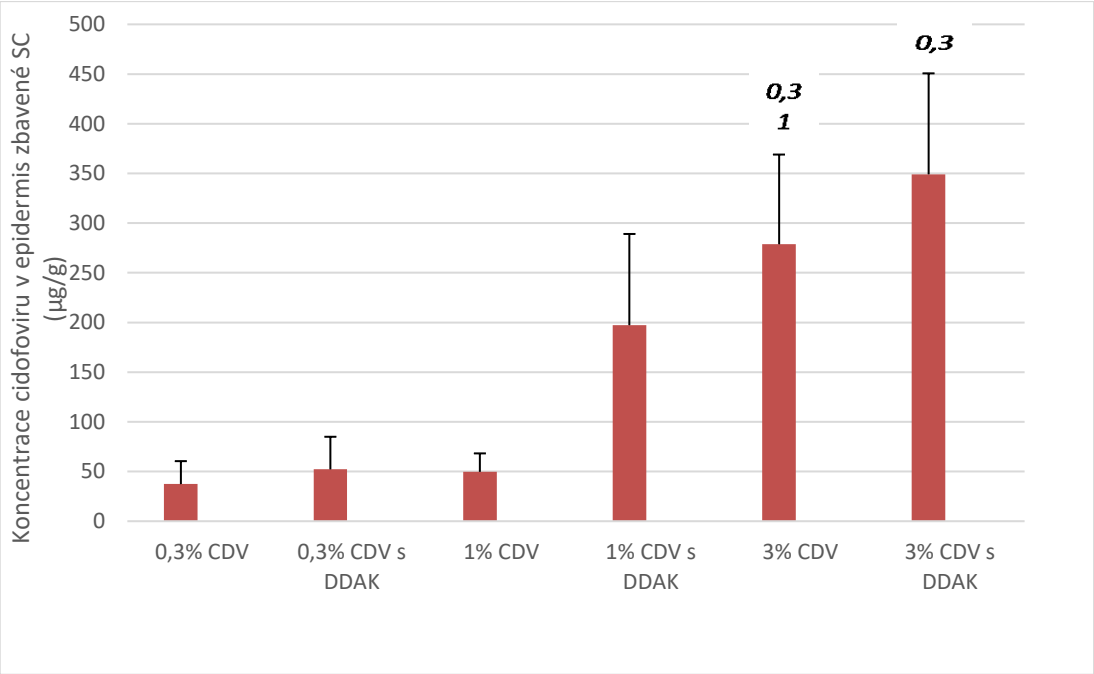
Po přidání akcelerantu se množství CDV v epidermis poškozené kůže zvýšilo na 60,9 ± 16,8µg, což je téměř třikrát více než bez akcelerantu. Vliv poškození je také téměř roven 3 a je statisticky významný. Oproti vzorkům s koncentrací 0,3 % CDV bylo množství nalezeného CDV statisticky významně zvýšeno více než trojnásobně. Koncentrace v těchto vzorcích byla 2583,6 ± 642,5 µg na 1 g kůže, při akceleračním poměru 1,5. Vliv zvyšující se koncentrace je zde také dobře pozorovatelný, oproti 0,3% vzorkům s akcelerantem je koncentrace téměř čtyřnásobná (statisticky významná hodnota). Vliv poškození je 2,3 a není statisticky významný. Dostupnost je v tomto případě 5,1 ± 1,4 %, což je téměř poloviční hodnota oprosti 0,3% vzorkům bez akcelerantu. Akcelerační poměr je v tomto případě nízký, pouze 1,5. Vliv poškození má hodnotu 2 a není stejně jako akcelerační poměr statisticky významný.

4.3.1.3. STRATUM CORNEUM A „ŽIVÁ“ EPIDERMIS ZDRAVÉ KŮŽE

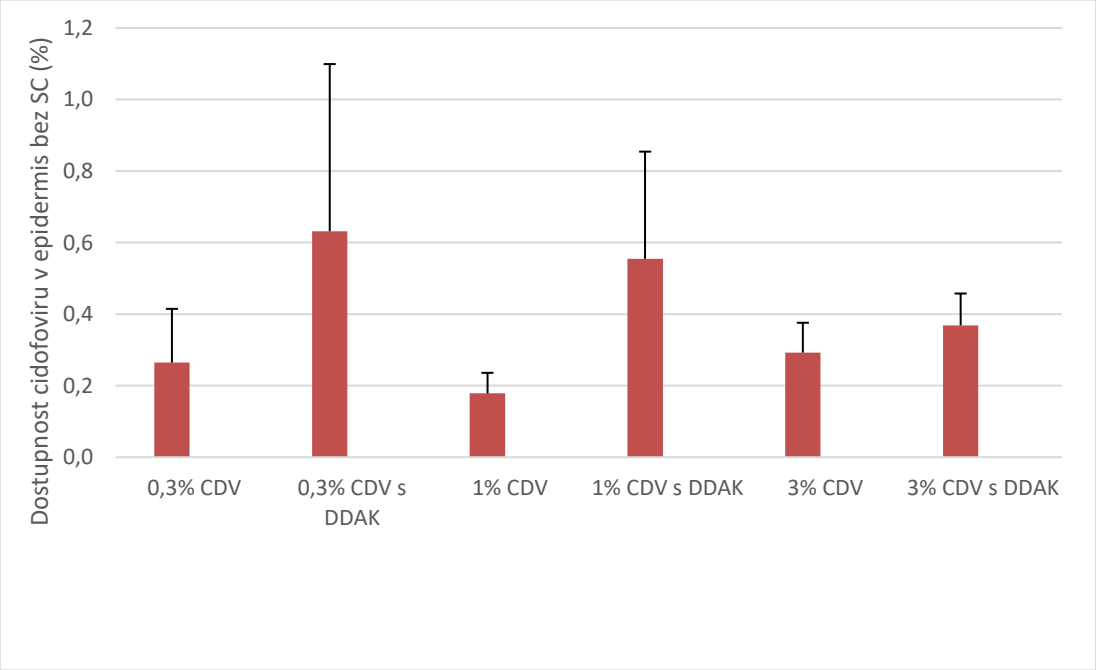
Další část práce byla zaměřena na stanovení množství CDV v nejsvrchnějších vrstvách epidermis (*stratum corneum*) a ve vrstvách hlubších. Graf 6 znázorňuje množství CDV ve *stratum corneum* a v nižších vrstvách epidermis, na grafu 7 je v procentech znázorněno, jak velká část CDV zůstávala v jednotlivých vrstvách ve *stratum corneum* a jaké množství prošlo do hlubších vrstev epidermis. Na grafu 8 lze pozorovat, jaké bylo množství CDV v jednotlivých vrstvách *stratum corneum*.



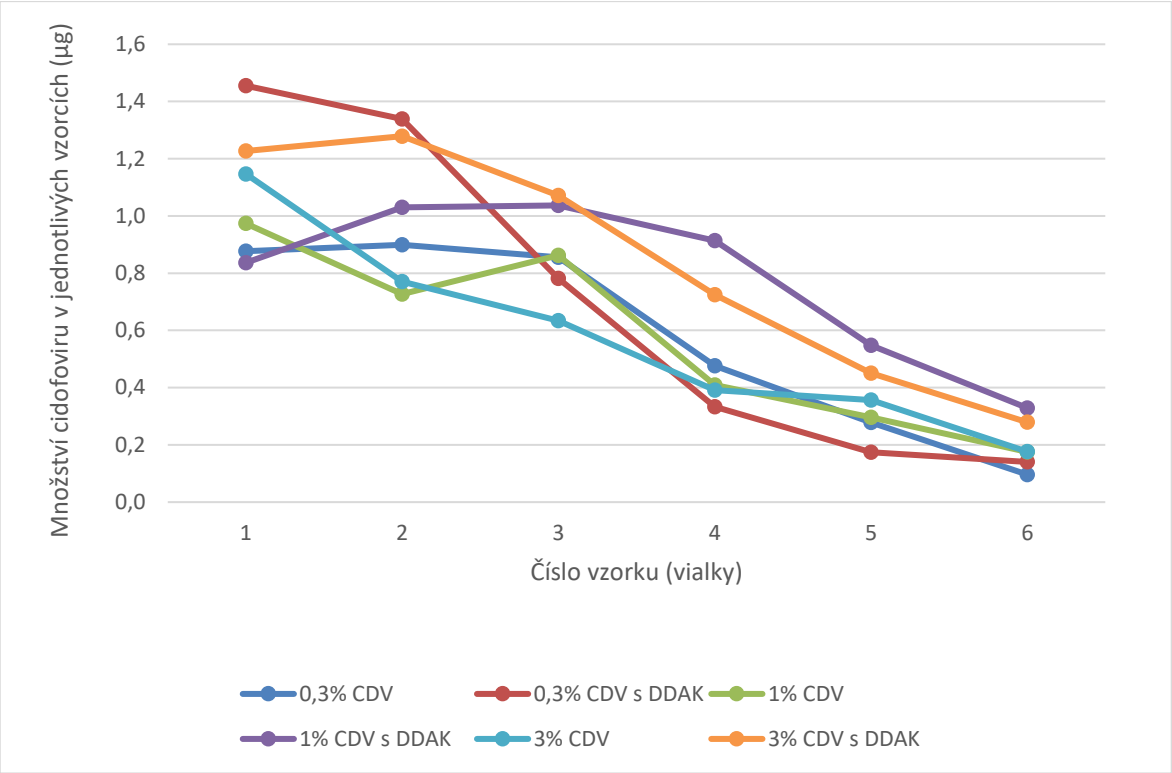
Graf 6. Množství CDV ve stratum corneum a v nižších vrstvách epidermis po odstranění stratum corneum. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot množství CDV, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími čísly: číslo 0,3 značí statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV .



Graf 7. Koncentrace CDV v epidermis bez SC. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot koncentrace CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími čísly: číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV .



Graf 8. Dostupnost CDV v epidermis bez SC. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot množství CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami.



Graf 8: Množství CDV v jednotlivých vzorcích se stripy stratum corneum, do vzorků byly stripy rozděleny následovně: Do první vialky byl umístěn 1. a 2. strip, do druhé vialky 3. a 4. strip, do třetí vialky 5. - 7. strip, do čtvrté vialky 8. - 10. strip, do páté vialky 11. - 15. strip a do šesté vialky 16. - 20. strip. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot.

4.3.1.3.1. Stratum corneum

Množství CDV ve *stratum corneum* nalezené ve vzorcích kůže na něž byly aplikovány donorové vzorky bez akcelerantu bylo velmi podobné (3,5 ± 1,0 µg pro 0,3% donorový vzorek, 3,4 ± 1,2 µg pro 1% donorový vzorek a 3,5 ± 1,1 µg pro 3% donorový vzorek). Velmi podobné bylo rozložení CDV v jednotlivých stripech, které klesalo v rozmezí 1,1 ± 0,3 µg v nejvsvrchnějším stripu po 24hodinové aplikaci donorového vzorku s koncentrací 3 % CDV, až k hodnotě 0,1 ± 0,1 µg v nejníže položeném, šestém stripu vzorku kůže, získaného po 24hodinové aplikaci donorového vzorku s koncentrací 0,3 % CDV.

Pokud byl k donorovým vzorkům přidán akcelerant, bylo celkové množství CDV ve všech stripech *stratum corneum* 4,2 ± 1,0 µg pro při aplikaci donorových vzorků s 0,3% koncentrací CDV, 4,7 ± 2,7 µg při použití donorových vzorků s 1% koncentrací a nejvyšší množství 5,0 ± 0,5 µg při použití vzorků 3%. V nejsvrchnější vrstvě bylo nejvíce CDV při použití donorového vzorku s koncentrací 0,3 % CDV. Zde bylo naměřeno 1,5 ± 0,6 µg CDV. V dalších stripech ale začalo množství CDV oproti vzorkům s vyšší koncentrací klesat, ve čtvrtém a pátem stripu bylo nejnižší ze všech sledovaných vzorků a v posledním stripu dosáhlo nejnižší hodnoty ze všech vzorků s akcelerantem (0,1 ± 0,1 µg). U vzorků kůže připravených za použití

donorového vzorku s koncentrací 1 % CDV bylo množství v prvním stripu velice nízké, pouze 0,8 ± 0,6 µg, v následujících dvou stripech se zvyšovalo až k hodnotě 1,0 ± 0,6 µg a poté začalo klesat až k hodnotě 0,3 ± 0,2µg. Ve vzorcích připravených za použití donorového vzorku s koncentrací 3 % CDV, bylo množství CDV v nejsvrchnějším stripu také nejdříve nižší než v u vzorků připravených z 0,3% donorových vzorků, ve druhém stripu se toto množství zvýšilo až na 1,3±0,3 µg a poté také postupně klesalo až k hodnotě 0,5 ± 0,2 µg.

4.3.1.3.2. EPIDERMIS BEZ STRATUM CORNEUM

Jak vyplývá z grafu 6, množství CDV v epidermis s odstraněným *stratum corneum* (dále SC) bylo velmi malé, a zvyšovalo se s rostoucí koncentrací CDV a také s přídavkem akcelerantu.

Po 24hodinovéodinové aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV jsme a ostripování bylo stanoveno v epidermis 0,3 ± 0,2 µg CDV (kompletní popis postupu viz výše), což je prakticky desetinové množství oproti množství CDV přítomném v neostripované epidermis. Když byla koncentrace CDV v donorovém vzorku zvýšena na 1 %, vzrostlo i množství CDV v epidermis zbavené SC více než 2krát, na hodnotu 0,7 ± 0,2 µg, (rozdíl je statisticky významný). Po zvýšení koncentrace donorového vzorku na 3 % CDV, vzrostlo množství CDV v 11krát, na 3,5 ± 1,0 µg, což je opět statisticky významný rozdíl.

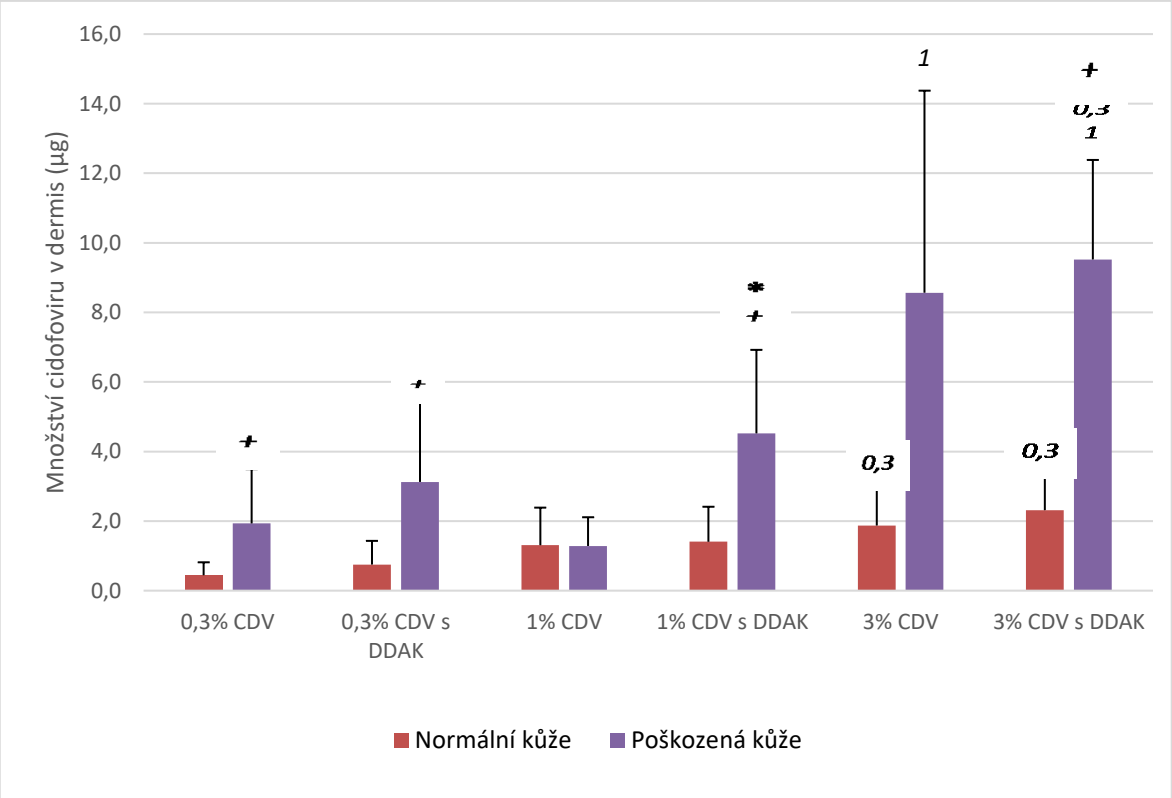
Po přidání 1 % akcelerantu k donorovým vzorku došlo ke zvýšení množství CDV a to 2,4krát u vzorků s 0,3 % CDV na hodnotu 0,8 ± 0,2 µg; 3,4krát a statisticky významně na hodnotu 2,4 ± 1,2 µg při použití donorových vzorků s 1 % CDV a nakonec 1,3krát na hodnotu 4,4 ± 1,1 µg použití donorových vzorků se 3 % CDV.

Vztažením na hmotnost analyzované tkáně získáme koncentraci CDV. Byl zde sledován stejný trend jako při sledování celkového množství CDV. Docházelo ke zvyšování koncentrace s rostoucí koncentrací CDV v donorovém vzorku a s přidáním akcelerantu.

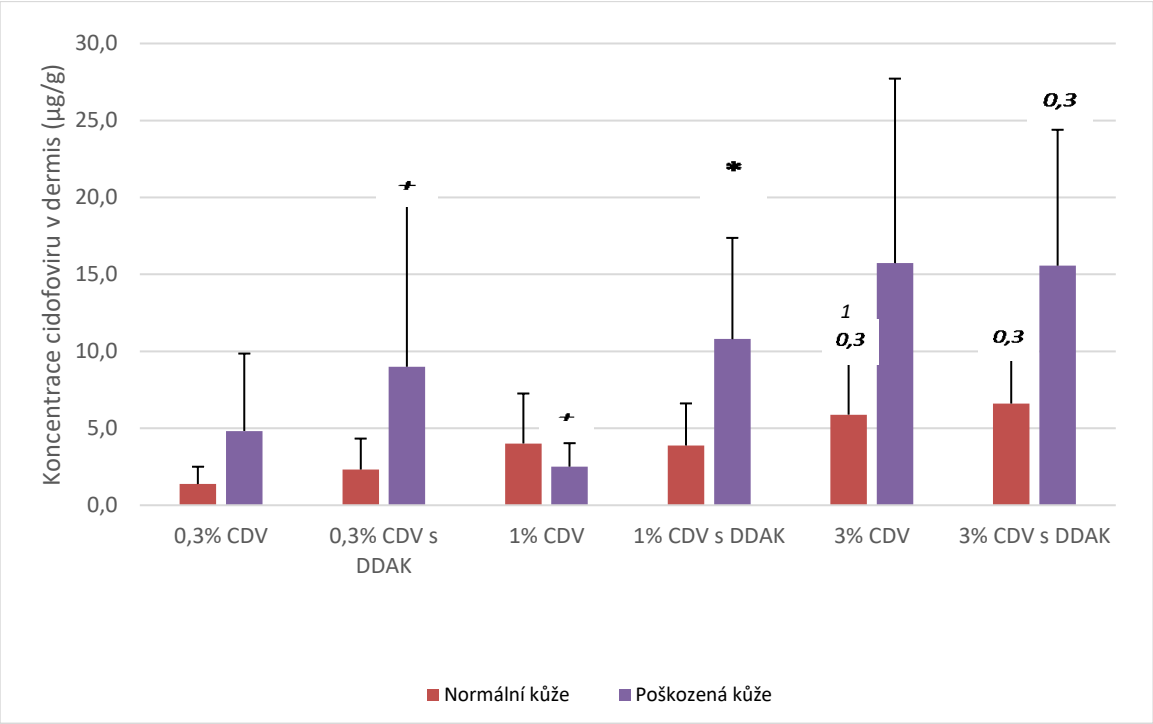
Dostupnost CDV v epidermis zbavené SC se měnila v závislosti na koncentraci CDV v donorových vzorcích a přidání akcelerantu velice podobně jako ve výše popsaných výsledcích u epidermis se stratem corneem, pouze s tím rozdílem, že hodnoty byly významně nižší. Nejvyšší hodnoty dostupnosti aplikované dávky CDV bylo dosaženo při použití 0,3% roztoku CDV s přídavkem 1% akcelerantu, zde byla dostupnost 0,6 ± 0,5%.

4.3.2. DERMIS

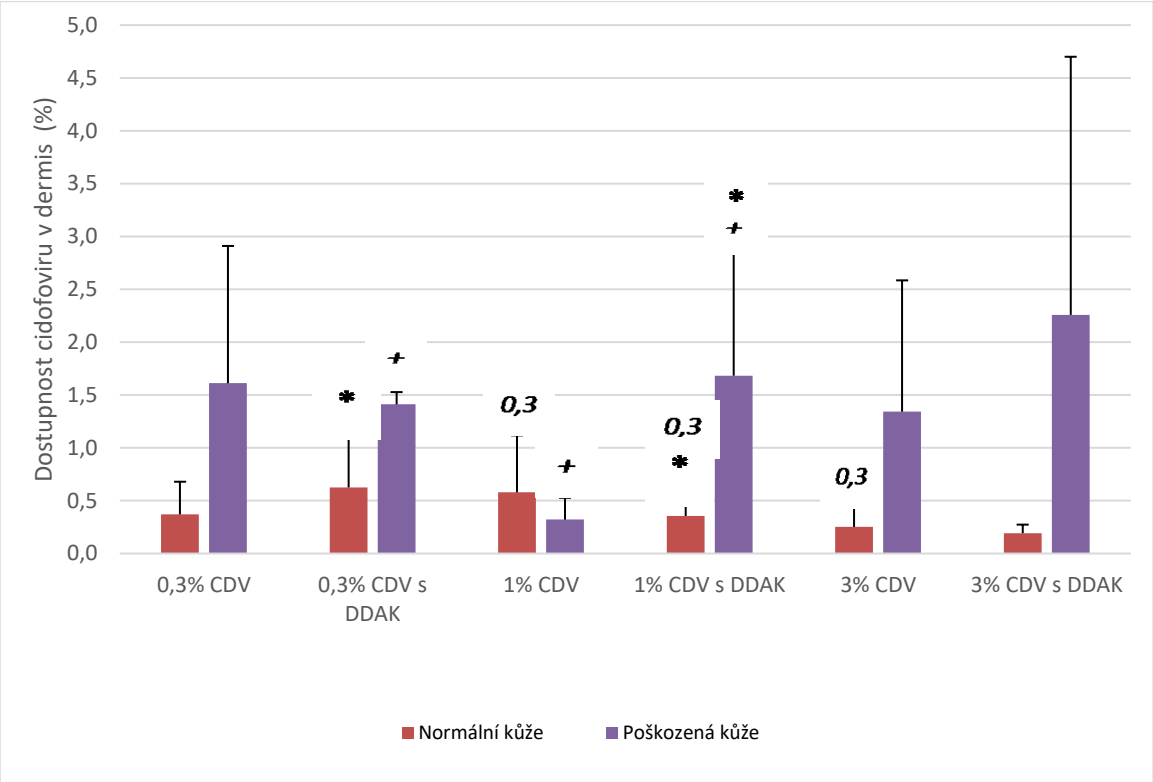
Množství, koncentrace a dostupnost CDV v dermis kůže zdravé i poškozené znázorňují následující grafy 9, 10 a 11.



*Graf 9. Množství CDV v dermis zdravé a poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot množství CDV v dermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži.*



*Graf 10. Koncentrace CDV v dermis zdravé a poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot koncentrace CDV v dermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži .*



*Graf 11. Dostupnost CDV v dermis zdravé a poškozené kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot dostupnosti CDV v dermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži .*

4.3.2.1. Dermis zdravé kůže

4.3.2.1.1. Donorové vzorky o koncentraci 0,3 % CDV

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV na vzorek kůže, bylo v dermis stanoveno 4 ± 0,4 ng CDV. Vztaženo na hmotnost tkáně, koncentrace CDV byla 1,4±1,1 µg na 1 g kůže. Dostupnost CDV, tedy % aplikované dávky nalezené v dermis, byla pro vzorky s touto koncentrací CDV 0,4±0,3 %.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k tomuto donoru došlo ke zvýšení množství CDV nalezeného v dermis, jeho koncentace i dostupnosti. Množství CDV v dermis po aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV s 1% DDAK bylo 0,8±0,7 µg, což je téměř 2krát více než u vzorků bez akcelerantu. Akcelerační poměr měl v tomto případě hodnotu 1,7 a nebyl statisticky významný. Koncentrace CDV se po přidání akcelerantu také zvýšila, a to na hodnotu 2,3±2,0 µg CDV na 1g kůže. Vliv akcelerantu v tomto případě také nebyl statisticky významný. Dostupnost se po

přidání akcelerantu zvýšila na 0,6±0,6 % z celkového aplikovaného množství CDV, akcelerant tedy zvýšil dostupnost CDV v dermis 1,7krát a tento rozdíl je statisticky významný.

4.3.2.1.2. Donorové vzorky o koncentraci 1 % CDV

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 1% roztoku CDV bylo v dermis stanoveno 1,3 ± 1,1 µg CDV, což je 2,9krát více, než po aplikaci roztoku 0,3%. Vztaženo na hmotnost analyzované tkáně, výsledná koncentrace v dermis byla 4,0 ± 3,2 µg na 1 g kůže, což je hodnota 2,9krát vyšší, než po aplikaci 0,3% roztoku CDV. Dostupnost CDV byla pro vzorky s touto koncentrací CDV pouze 0,6 ± 0,5 %, což je 1,6násobná hodnota oproti hodnotě vzorku s 0,3%CDV a toto zvýšení je statisticky významné.

Po přidání 1 % akcelerantu DDAK k donorovému vzorku bylo v dermis stanoveno 1,4 ± 1,0 µg CDV, akcelerant tedy zvýšil množství CDV 1,1krát. Koncentrace a dostupnost se ovšem po přidání akcelerantu paradoxně snížily, a to na hodnoty 3,9 ± 2,7 µg na 1 g dermis a 0,4 ± 0,2 %, snížení dostupnosti je statisticky významné.

4.3.1.1.3. Donorové vzorky o koncentraci 3 % CDV

Množství CDV po aplikaci 40 µl 3% roztoku CDV a 24 hodinové inkubaci bylo 1,9 ± 1,6 µg, což je 4,2krát více než bylo nalezeno v 0,3% vzorcích a vliv zvýšení koncentrace u této hodnoty statisticky významný. Koncentrace CDV se oproti 0,3% vzorkům také zvýšila, a to 4,3krát na hodnotu 5,9 ± 3,5 µg na 1 g kůže, a toto zvýšení vůči vzorkům s oběma nižšími koncentracemi je statisticky významné. Dostupnost je v tomto případě pouze 0,3 % z aplikované dávky, což je statisticky významné snížení oproti 0,3% vzorkům.

Po přidání 1% akcelerantu DDAK k 3% vzorkům, došlo ke zvýšení množství nalezeného CDV 1,2krát, a to na hodnotu 2,3 ± 1,0 µg. Zvýšení množství CDV vlivem zvýšení koncentrace bylo statisticky významné vůči vzorku s 1% koncentrací CDV. Koncentrace CDV v kůži se také zvýšila po přidání akcelerantu 1,1krát, na hodnotu 6,6 ± 3,1 µg na 1 g kůže. Oproti hodnotám nalezeným u donorových vzorků s desetkrát nižší koncentrací CDV a stejnou koncentrací akcelerantu DDAK, je nalezená koncentrace po aplikaci 3% vzorku CDV 4,8krát vyšší, a tento rozdíl je statisticky významný. Dostupnost CDV se po přidání akcelerantu snížila na hodnotu 0,2 ± 0,1 %.

4.3.2.2. Dermis poškozené kůže

4.3.2.2.1. Donorové vzorky o koncentraci 0,3 % CDV

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV bylo v dermis stanoveno 1,9 ± 1,6 µg CDV. Což je více než čtyřnásobná hodnota oproti vzorku kůže nepoškozené a tento vliv poškození je statisticky významný. Naměřená koncentrace CDV v dermis byla 4,8 ± 5,0 µg/g, a je více

než trojnásobná oproti kůži zdravé. Dostupnost CDV, tedy % aplikované dávky nalezené v epidermis byla pro vzorky s touto koncentrací CDV 1,6 ± 1,3 %, což je čtyřnásobně více, než v případě kůže zdravé.

Po přidání 1 % akcelerantu DDAK k tomuto roztoku došlo ke zvýšení množství CDV nalezeného v kůži a s tím spojené koncentrace, dostupnost byla ovšem nižší než u vzorků bez akcelerantu. Množství CDV po aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV s 1 % DDAK bylo 3,1 ± 2,3 µg, což je 1,6krát více, než ve stejném vzorku bez akcelerantu. V porovnání s kůží zdravou došlo vlivem poškození o zvýšení více než čtyřnásobné a tento rozdíl je statisticky významný. Koncentrace CDV se po přidání akcelerantu také zvýšila, a to na hodnotu 9,0 ± 10,5 µg/g, což je více než čtyřikrát vyšší hodnota než u kůže zdravé a tento rozdíl je statisticky významný. Dostupnost po přidání akcelerantu se snížila na 1,4 ± 0,1 %. V porovnání s kůží zdravou došlo ke zvýšení 2,3krát a tento rozdíl je statisticky významný.

4.3.1.2.2. Donorové vzorky o koncentraci 1 % CDV

Po aplikaci 40 µl 1% roztoku CDV a po 24hodinové inkubaci našli bylo v epidermis stanoveno 1,3 ± 0,8µg CDV, což je stejně, jako u kůže nepoškozené. Koncentrace byla 2,5 ± 1,5 µg CDV na 1 g kůže, což je hodnota o polovinu nižší než po aplikaci 0,3% roztoku CDV, a téměř poloviční oproti kůži zdravé (statisticky významná hodnota). Dostupnost CDV, tedy % aplikované dávky nalezené v epidermis byla pro vzorky s touto koncentrací CDV pouze 0,3 ± 0,2 %, což je přibližně pětinová hodnota oproti hodnotě při použití 0,3% roztoku CDV. V porovnání se zdravou kůží se hodnota dostupnosti snížila na polovinu (statisticky významné).

Po přidání akcelerantu vzrostlo nalezené množství 3,5krát (statisticky významně) na hodnotu 4,5 ± 2,4 µg. Tato hodnota je více než trojnásobná v porovnání s hodnotami nalezenými u vzorků zdravé kůže. Tento rozdíl je statisticky významný. Koncentrace vzrostla přidáním akcelerantu na 10,8 ± 6,6 µg CDV na 1 g kůže, při akceleračním poměru 4,3. Vliv poškození je v tomto případě statisticky významný, v porovnání s kůží zdravou je hodnota koncentrace zvýšena téměř třikrát. Vliv akcelerantu byl statisticky významný také u zvýšení dostupnosti, jejíž hodnota byla 1,7 ± 1,2 %. V porovnání s kůží zdravou, došlo ke zvýšení dostupnosti téměř pětinásobnému.

4.3.2.2.3. Donorové vzorky o koncentraci 3 % CDV

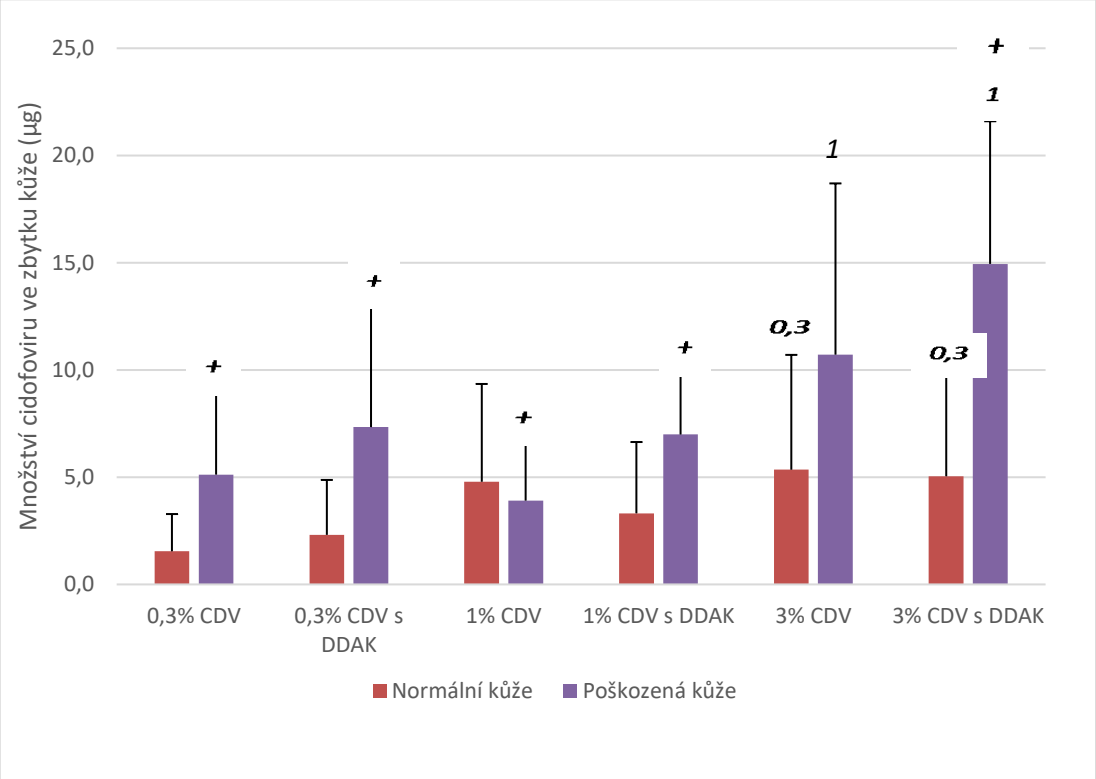
Množství CDV po 24hodinové aplikaci 40 µl 3% roztoku CDV stanovené v dermis bylo 8,6 ± 5,8 µg, což je 4,4krát více, než bylo nalezeno v 1% vzorcích. Koncentrace CDV také zvýšila, a to na hodnotu 15,7 ± 12,0 µg CDV na 1 g kůže. Dostupnost je v tomto případě 1,3 ± 1,2 % a je nižší než dostupnost po aplikaci 0,3% roztoku.

Po přidání akcelerantu se množství CDV v epidermis poškozené kůže zvýšilo na 9,5 ± 2,9 µg, což není statisticky významným zvýšením. Vliv poškození je roven 4,1 a je statisticky

významný. Oproti vzorkům s koncentrací 0,3 % CDV a bez akcelerantu bylo množství zvýšeno téměř pětinásobně (statisticky významná hodnota). Koncentrace v těchto vzorcích byla 15,6 ± 8,8 µg na 1 g kůže. Vliv zvyšující se koncentrace je zde také dobře pozorovatelný, oproti 0,3% vzorkům bez akcelerantu je koncentrace více než pětinásobná (statisticky významná hodnota). Dostupnost byla po přidání akcelerantu zvýšena na hodnotu 2,3 ± 2,4 % a toto zvýšení není statisticky významné.

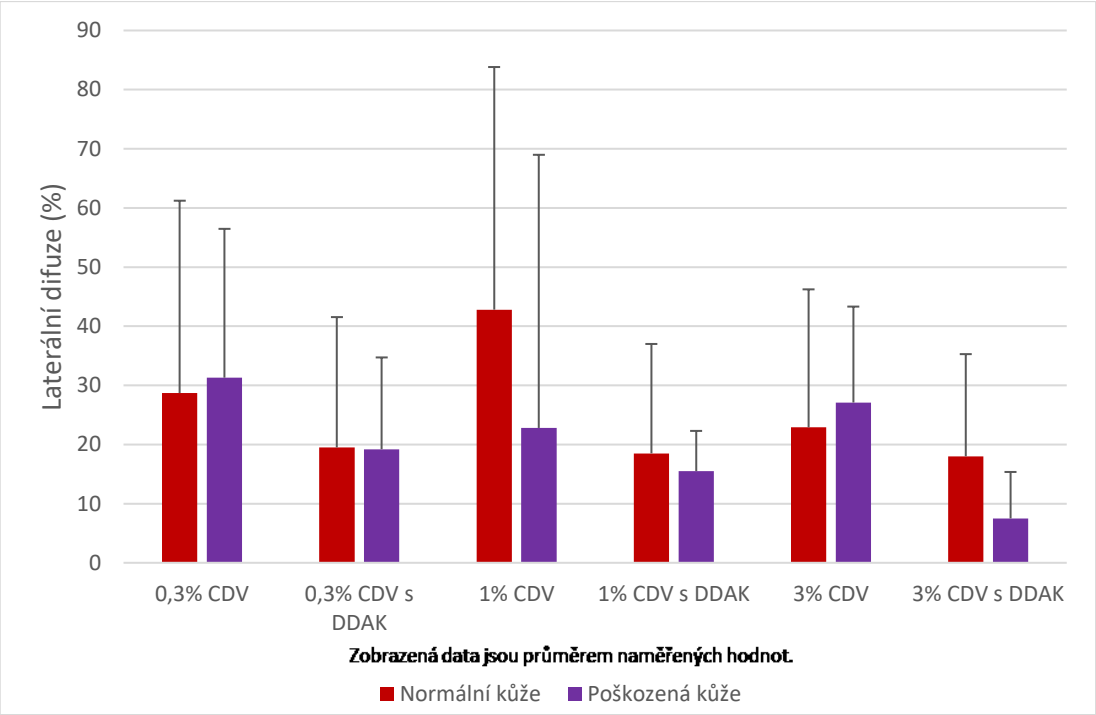
4.3.3. Zbytek kůže

V následujícím grafu 12 je znázorněno množství CDV, které bylo nalezeno ve zbytku kůže, tzn. v části kůže, která zůstala po vyseknutí permeační plochy, který byl použit pro výše popsané pokusy. Šlo tedy o to, stanovit množství CDV, které laterálně difundovalo do kůže mimo vymezenou 2cm^2 permeační plochu kůže.



*Graf 12 Množství CDV nalezené ve zbytku kůže. Data jsou zobrazena jako průměr naměřených hodnot množství CDV v epidermis, směrodatná odchylka (n= 10-13) je vyznačena chybovými úsečkami. Statisticky významné hodnoty, kde p<0,05 jsou označeny následujícími symboly a čísly: symbol * značí statistickou významnost vůči stejnému vzorku bez akcelerantu; číslo 0,3 pak statistickou významnost vůči vzorku s 0,3% CDV, číslo 1 značí statistickou významnost vůči vzorku s 1% CDV a symbol + značí statistickou významnost vůči nepoškozené kůži.*

Dále je toto množství porovnáno s celkovým vstřebaným množstvím CDV a tento poměr je ukazatelem laterální difuze – donorový vzorek s obsahem CDV byl nanesen pouze na plochu 2 cm^2, který byl vyseknut. Množství nalezené v okolí vyseknuté části je tedy množstvím, které přešlo do okolí naneseného vzorku. Graf 13 tedy ukazuje, kolik procent z celkově vstřebaného CDV difundovalo během prostupu kůží do okolí aplikačního místa (permeační plochy).



Graf 13. Laterální difuze. Zobrazená data jsou průměrem naměřených hodnot.

4.3.3.1. LATERÁLNÍ DIFUZE V ZDRAVÉ KŮŽI

Po 24hodinové aplikaci 40 µl 0,3% roztoku CDV na zdravou kůži bylo pod v kůží v těsném okolí aplikačního místa nalezeno 1,5 ± 1,7 µg CDV, což představuje 28,7 % z celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu k donorovému vzorku bylo nalezeno množství 2,3 ± 2,6 µg, odpovídající 19,5 % celkově vstřebaného CDV.

V případě aplikaci donorového vzorku s vyšší koncentrací CDV (1 %) bylo ve zbytku kůže nalezeno 4,8 ± 4,6 µg léčiva, což odpovídá 42,8 % celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu kleslo nalezené množství CDV na 3,3 ± 3,3 µg. Toto množství odpovídá 18,5 % z celkově vstřebaného CDV.

Při použití donorových vzorků s nejvyšší koncentrací CDV, 3 %, bylo v kůži nalezeno 5,3 ± 5,4 µg CDV, což představuje 22,9 % v celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu došlo ke snížení množství CDV na 5,0 ± 4,8µg, což odpovídá 18,0 % celkem vstřebaného CDV.

4.3.3.2. LATERÁLNÍ DIFUZE V POŠKOZENÉ KŮŽI

Po nanesení 40 µl 0,3% roztoku CDV bez akcelerantu bylo v kůži v těsném okoli aplikačního místa nalezeno množství 5,1 ± 4,1 µg CDV, což odpovídá 31,3 % celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu stouplo množství CDV na 7,3 ± 5,9 µg, odpovídající 19,2 % celkem vstřebaného CDV.

Při zvýšení koncentrace CDV na 1% v donorovém vzorku nedošlo ke zvýšení množství CDV nalezeného v kůži v okolí aplikačního místa. V tomto případě bylo nalezeno množství CDV 3,9 ± 7,9 µg, což odpovídá 22,8 % celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu vzrostlo množství nelezeného CDV na 7,0 ± 3,2 µg, odpovídající 15,5 % celkem vstřebaného CDV.

Při použití donorového vzorku s nejvyšší koncentrací, 3 % CDV, bylo ve vzorku kůže nalezeno 10,7 ± 8,0 µg, což odpovídá 21,7 % celkem vstřebaného CDV. Po přidání akcelerantu vzrostlo množství CDV na 14,9 ± 6,7 µg, odpovídající 17,5 % celkem vstřebaného CDV.

5. DISKUZE

Rozpustnost CDV byla ve všech případech výrazně zvýšena v těch donorových vzorcích, do kterých byl přidán akcelerant DDAK. Lze tedy říci, že DDAK zvyšuje rozpustnost CDV v donorovém vzorku přibližně 2-3x. To bylo velmi názorně demonstrováno v případě donorového vzorku s 0,3% koncentrací CDV. Pokud donorový vzorek obsahoval pouze léčivo, byl suspenzního charakteru. Po přidání akcelerantu se ovšem rozpustnost CDV zvýšila a tento donor již byl roztokem.

Analýza obsahu CDV ve *stratum corneum* naznačila, že pro množství CDV, který při průchodu do hlubších vrstev epidermis zůstane ve *stratum corneum*, není koncentrace donorového vzorku zásadní (pozn. platí pro námi analyzované koncentrace, 0,3%; 1% a 3% roztok). S přídavkem akcelerantu sice vzrostlo množství CDV ve *stratum corneum* asi 1,3krát a změnilo se rozložení CDV v jednotlivých vrstvách *stratum corneum*, ale celkově lze říci, že byl u všech vzorků obsah CDV ve *stratum corneum* relativně podobný.

Množství, koncentrace i dostupnost CDV v živé epidermis (tj. epidermis bez SC bylo 5-10krát nižší než v epidermis, z níž nebylo *stratum corneum* odstraněno. Z toho lze usuzovat, že je CDV ve *stratum corneum* zadržován, což je v souladu s jeho hydrofilní povahou.

Množství CDV nalezené v epidermis a v dermis zdravé i poškozené kůže rostlo jak se vzrůstající koncentrací CDV v donorovém vzorku,a tak přídavkem akcelerantu. Stejně tak rostla i koncentrace CDV v těchto vrstvách kůže. Tento trend byl velmi podobný zvyšování rozpustnosti přídavkem akcelerantu a proto předpokládáme, že i v tomto případě mělo největší podíl na zvýšení množství a koncentrace CDV v tkáni zvýšení jeho rozpustnosti v donorovém vzorku akcelerantem. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo po aplikaci 3% roztoku CDV s přídavkem akcelerantu, a to 1115,3 µg na gram kůže zdravé a 2583,6 µg na gram kůže poškozené.

Pokud budeme hodnotit dostupnost CDV v jednotlivých částech kůže, nejsou již výsledky tak jednoznačné. Zvyšování množství CDV nalezeného v kůži nevedlo vždy ke zvyšování jeho dostupnosti, která odpovídá poměru tohoto množství k množství celkem aplikovanému. Nejvyšší dostupnosti v epidermis dosahoval 0.3% donorový roztok CDV s přídavkem CDV1 % akcelerantu. V tomto případě dosahovala dostupnost CDV v epidermis více než 6 % pro vzorek kůže zdravé a více než 14 % pro vzorek kůže poškozené. Naopak v dermis zajišťoval tento donor nižší koncentrace CDV než bez použití akcelerantu, což může být způsobeno faktem, že většina vstřebaného léčiva zůstala ve svrchních vrstvách kůže. Nejvyšších hodnot dostupnosti v dermis pak dosáhl donorový vzorek s přídavkem 3% CDV a s 1% akcelerantu. Dostupnost v dermis ovšem není pro praktické použití tak zásadní jako v epidermis.

Dalším přínosem použití akcelerantu byl jeho vliv na laterální difuzi CDV. Ačkoliv semnožství CDV, který difundoval do okolí aplikačního místa s přidáním akcelerantu zvyšovalo, množství CDVv místě aplikace rostlo výrazněji. V celkovém poměru ke vstřebanému CDV pak množství laterálně difundovaného CDV při použití akcelerantu klesalo. Autorka předpokládá, že tento

fakt mohl být způsoben tím, že akcelerant usnadnil prostup CDV přímo v místě aplikace a proto nebylo léčivo nuceno difundovat v tak velkém množství do okolí aplikace.

Při porovnání získaných dat s daty získanými při použití radioaktivně značeného CDV u králíků [29], je dostupnost ve zdravé kůži po aplikaci u člověka vyšší než u králíků (a to jak u donorových vzorků s akcelerantem, tak bez něj).Pokud ovšem bude sledována dostupnost v kůži poškozené, byly zjištěny vyšší hodnoty u králíků, a to přibližně 10krát při použití donorového vzorku bez akcelerantu a přibližně 3krát při použití donorového vzorku s akcelerantem.

6. ZÁVĚR

V této práci byla studována topická aplikace CDV a ovlivnění jeho prostupnosti kůží přídavkem permeačního akcelerantu DDAK. CDV byl použit ve vzorcích se třemi různými koncentracemi (0,3%; 1% a 3%) a to s přídavkem 1 % akcelerantu nebo bez něj. Zkoumáno bylo jeho celkové množství, koncentrace a dostupnost v kůži po topické aplikaci na zdravou a poškozenou lidskou kůži.

Nejvyšších hodnot koncentrace v epidermis dosahoval vzorek 3% CDV s přídavkem akcelerantu, a to jak v kůži zdravé, tak i poškozené. Co se týče dostupnosti v epidermis, ta byla nejlepší u vzorku s 0,3 % CDV s přídavkem akcelerantu opět ve zdravé i poškozené kůži.

Vzhledem k významnému vlivu akcelerantu na prostupnost CDV do zdravé i poškozené kůže a jeho nízké toxicitě, považuji kombinaci CDV a akcelerantu za velmi slibnou pro použití v léčivých prostředcích pro lokální aplikaci, jelikož přídavek akcelerantu by mohl snížit množství potřebného CDV a tím i cenu léčivého přípravku.

Otázkou ovšem zůstává přesná koncentrace CDV, kterou bude potřeba zvolit, aby množství CDV, který pronikne do epidermis, bylo dostatečné pro jeho optimální antivirotický účinek.

6. POUŽITÉ ZKRATKY

ANP – acyklické nukleosidfosfonáty

CDV – cidofovir

cPr-PMEDAP - 9-(2-fosfonylmethoxyethyl)-N^6-cyklopropyl-2,6-diaminopurin

DDAK - dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové

DDAIP- dodecylester 2-dimethylaminopropanové

SC – stratum corneum

7. LITERATURA

[1] K. C. Cundy, G. Lynch, and W. A. Lee, "Bioavaibility and metabolism of cidofovir following topical administration to rabits," *Antiviral Res.*, vol. 35, pp. 113–122, 1997.

[2] Kotingová L. and Borská L., "Testování transdermální absorpce chemických látek," *Chem. Listy*, vol. 103, pp. 533–539, 2009.

[3] R. Čihák, *Anatomie 3*, 2. ed. Praha: Grada Publishing s.r.o., 2004, pp.571-589

[4] "THE LAYERS OF HUMAN SKIN." [Online]. Available: http://www.skin-remedies.com/skin.html. [Accessed: 09-Dec-2015].

[5] K. Vávrová and A. Hrabálek, "Role ceramidů v kůži," *Prakt. lékárenství*, pp. 55–58, 2006.

[6] P. Vávrová, "Lze překonat kožní bariéru?," *Prakt. lékárenství*, pp. 8–11, 2005.

[7] G. K. Menon and a M. Kligman, "Barrier functions of human skin: a holistic view.," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 22, no. 4, pp. 178–89, 2009.

[8] S. Barrier, M. R. Prausnitz, P. M. Elias, T. J. Franz, M. Schmuth, and J. Tsai, "Stratum Corneum Structure and Organization," 2012.

[9] G. K. Menon, G. W. Cleary, and M. E. Lane, "The structure and function of the stratum corneum.," *Int. J. Pharm.*, vol. 435, no. 1, pp. 3–9, 2012.

[10] A. Rougier, D. Dupuis, and C. Lotte, "In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption," J. Investig. Dermatol, vol. 81, no. 3, pp. 275–278, 1983.

[11] M. R. Prausnitz and R. Langer, "Transdermal drug delivery.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, pp. 1261–1268, 2008.

[12] M. R. Prausnitz, P. M. Elias, and T. J. Franz, *Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery*. 2012.

[13] P. W. Wertz and B. Van Den Bergh, "Review The physical , chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers," ChemPhys Lipids. vol. 91, pp. 85–96, 1998.

[14] M. K. Macháčková, "Bariérová funkce kůže – nový pohled při péči o dětskou pokožku," *Pediatr. pro praxi*, vol. 13, no. 1, pp. 12–14, 2012.

[15] J. Jungersted, L. Hellgren, J. Høgh, T. Drachmann, G. Jemec, and T. Agner, "Ceramides and Barrier Function in Healthy Skin," *Acta Derm. Venereol.*, vol. 90, no. 4, pp. 350–353, 2010.

[16] A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Šklubalová, and O. Farsa, "AKCELERANTY TRANSDERMALNI PENETRACE," *Chem. Listy*, vol. 119, pp. 107–119, 1999.

[17] K. Vávrová, K. Lorencová, J. Klimentová, J. Novotný, A. Holý, and A. Hrabálek, "Transdermal and dermal delivery of adefovir: Effects of pH and permeation enhancers," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 2, pp. 597–604, 2008.

[18] J. Novotný, P. Kovaríková, M. Novotný, B. Janůsová, A. Hrabálek, and K. Vávrová, "Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination.," *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 811–21, 2009.

[19] B. Janůšová, B. Školová, K. Tükörová, L. Wojnarová, T. Šimůnek, P. Mladěnka, T. Filipský, M. Říha, J. Roh, K. Palát, A. Hrabálek, and K. Vávrová, "Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers," *J. Control. Release*, vol. 165, no. 2, pp. 91–100, 2013.

[20] K. Vávrová, K. Lorencová, J. Novotný, A. Holý, and A. Hrabálek, "Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: influence of pH, ion-pairing and skin species.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, no. 3, pp. 901–7, 2008.

[21] K. Vávrová, P. Kovaříková, B. Skolová, M. Líbalová, J. Roh, R. Cáp, A. Holý, and A. Hrabálek, "Enhanced topical and transdermal delivery of antineoplastic and antiviral acyclic nucleoside phosphonate cPr-PMEDAP.," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 12, pp. 3105–15, 2011.

[22] K. C. Cundy, "Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir.," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 36, no. 2, pp. 127–43, 1999.

[23] A. Holy, "Phosphonomethoxyalkyl Analogs of Nucleotides," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 9, no. 31, pp. 2567–2592, 2003.

[24] K. C. Cundy, Li ZH, M. J. M. Hitchcock, and W. a. Lee, "Pharmakokinetics of cidofovir in monkeys: evidence for prolonged elimination phase representing phosphorylated drug," *Drug Metab Dispos*, vol. 35, pp. 113–22, 1996.

[25] L. Naesens, R. Snoeck, and E. De Clercq, "HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogs: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections.," *Antivir. Chem. Chemother.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–23, 1997.

[26] A. Holý, "Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies.," *Antiviral Res.*, vol. 71, no. 2–3, pp. 248–53, 2006.

[27] J. R. Toro, S. Sanchez, G. Turiansky, and A. Blauvelt, "Topical cidofovir for the treatment of dermatologic conditions: verruca, condyloma, intraepithelial neoplasia, herpes simplex and its potential use in smallpox," *Dermatol. Clin.*, vol. 21, no. 2, pp. 301–309, 2003.

[28] K. C. Cundy, B. Petty, J. Flaherty, P. Fisher, M. Polis, and M. Wachsman, "Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 39, pp. 1247–52, 1995.

[29] E. J. Zabawski and C. J. Cockerell, "Topical and intralesional cidofovir : A review of pharmacology and therapeutic effects," *J Am Acad Dermatol, vol 39, no. 5.*, pp. 741–745, 1998.

[30] Fernández-Morano T, J. Del Boz, B. González-Carrascosa, M Tortajada, and M. De Troya, "Topical cidofovir for viral warts in children.," *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, vol. 25, pp. 1487–9, 2011.

[31] S. Santoyo and E. G. De Jalo, “Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC,” *J Pharmaceut Biomed* vol. 29, pp. 819–826, 2002.

[32] A. Holy and E. De Clercq, “Efficacy of (S) -1- (3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl) Cytosine in Various Models of Herpes Simplex Virus Infection in Mice,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 35, no. 4, pp. 701–706, 1991.

[33] E. J. Zabawski, “A review of Topical and Intralesional Cidofovir,” *Dermatol. Online J.*, vol. 6, 2000.

[34] “Cidofovir price.” [Online]. Available: http://www.abmole.com/products/cidofovir.html. [Accessed: 09-Dec-2015]