

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra farmaceutické technologie



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Biofarmaceutické aspekty makromolekulárních nosičů  
pro systémovou sublingvální aplikaci léčiv

Biopharmaceutical aspects of macromolecular carriers  
for systemic sublingual drug delivery

**Mgr. Pavel Berka**

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

Hradec Králové, 2019



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

V Hradci Králové 2.8.2019

Pavel Berka



## **Poděkování**

Chtěl bych tímto poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné rady, pomoc, trpělivost a přátelský přístup v průběhu mého celého doktorského studia.

Dále bych rád poděkoval kolegům z Instar Technologies a.s., především Denise Stránské a Petru Vrbatovi a také všem spolupracovníkům na Katedře farmaceutické technologie, kteří mi v průběhu doktorského studia pomohli.

Děkuji společnosti Elmarco s.r.o. za přístrojovou a materiální výpomoc.

Děkuji grantovým agenturám za finanční podporu a možnosti prezentace výsledků práce na mezinárodních konferencích. Práce byla podpořena grantem Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 401, programem PRVOUK 190/11/1110-3 a grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy 530812/2012.

Many thanks go also to friends and colleagues from King's College, London, especially to Marek K. Lachmann, who encouraged me to “not give up and finish this s\*\*\*\*” and to Marlise Araújo dos Santos for her relentless infectious optimism.

V neposlední řadě děkuji celé rodině za mimořádnou trpělivost, vstřícnost a všestrannou podporu.

# OBSAH

ABSTRAKT	8
ABSTRACT	9
PŘEDMLUVA	10
1. ÚVOD	12
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	15
3. TEORETICKÁ ČÁST	16
3.1 Sublingvální (SL) podání léčiv	16
3.1.1 Ústní sliznice jako permeační bariéra	16
3.1.2 Makromolekulární sublingvální léčiva	20
3.1.3 Nízkomolekulární sublingvální léčiva	21
3.1.4 Lékové formy pro sublingvální podání	21
3.1.5 Typy oromukosálních lékových forem	22
3.1.6 Podání v nanovláknenných nosičích	23
3.1.7 Využití nanovláken při transmukosálním podání léčiv	23
3.2 Nanovláknna	24
3.2.1 Elektrospining	25
3.3 In vitro testování průniku	25
3.3.1 Metody přípravy slizničních membrán prasete	26
3.3.2 Sublingvální vs. bukální sliznice	31
3.4 Studované látky	31
3.4.1 Dextrany	31
3.4.2 FITC dextrany	42
3.4.3 Albumin	49
3.4.4 Kofein	62
3.5 Polymery použité pro přípravu nanovláken s BSA	63
3.5.1 Polyvinylalkohol (PVA)	63
3.5.2 Polyethylenoxid (PEO)	63
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	64
4.1 Materiál	64
4.1.1 Permeanty	64
4.1.2 Polymery pro přípravu nanovláken	64
4.1.3 Látky pro přípravu pufrů	64
4.1.4 Rozpouštědla	64
4.1.5 Látky pro přípravu mikroskopických preparátů	65
4.1.6 Ostatní	65
4.2 Přístroje a zařízení	65
4.3 Metody	66
4.3.1 Příprava sublingválních membrán	66
4.3.2 Permeační experimenty in vitro	67
4.3.3 Stanovení permeantů	68
4.3.4 Ošetření naměřených dat	68

4.3.5	Testování integrity membrán .....	69
4.3.6	Příprava nanovlákných membrán .....	70
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	71
5.1	Nová metoda přípravy sublingválních membrán .....	71
5.2	Permeační experimenty .....	73
5.3	Měření impedance .....	79
5.4	Mikroskopie .....	80
5.5	Albumin.....	82
5.6	Porovnání průniku dextranů a albuminu .....	86
6.	ZÁVĚRY .....	88
7.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	89
8.	SEZNAM TABULEK .....	91
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	91
10.	SEZNAM GRAFŮ .....	92
11.	LITERATURA .....	93
12.	SEZNAM PRACÍ .....	118
13.	PŘÍLOHY .....	121

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Kandidát: Mgr. Pavel Berka

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Název disertační práce: Biofarmaceutické aspekty makromolekulárních nosičů pro systémovou sublingvální aplikaci léčiv

Hlavním cílem práce bylo experimentálně ověřit hypotézu o možnosti sublingvální permeace makromolekul jako nosiče léčiv. K tomuto účelu byly vyhledány a vyhodnoceny informace o sublingvální cestě podání léčiv a vytvořen náhled na metodiky zpracování sublingválních i bukalních membrán pro potřeby *in vitro* pokusů. Z nalezených literárních dat vyplynul úkol navrhnout a ověřit novou metodiku zpracování a uchování sublingválních membrán vhodných pro permeační pokusy.

Nová metodika spočívá v šokovém zmrazení („flash freezing“) vypreparovaných membrán kompletního epitelálního složení, se zachovanou *lamina propria* i částí vazivového podloží. Zmrazení membrán pomocí kapalného dusíku (-180 °C) bylo provedeno bez kryoprotektiv, aby nedošlo k ovlivnění permeabilních vlastností membrány, pouze s předchozí fixací proteinových struktur azidem sodným. Pro srovnání byly membrány zmrazeny („frozen“) také pomalým konvenčním zmrazením na -20°C.

Při mikroskopickém vyšetření nejevily čerstvá („fresh“) ani šokovým zmrazením zpracovaná membrána známky poškození, a to v případě šokově zmražené membrány ani po následném čtyřtýdenním uchování v běžné mrazničce při -20 °C. K orientačnímu, prvotnímu hodnocení bariérových vlastností takto zpracovaných membrán byla použita metoda měření impedance a permeabilních *in vitro* dat pro malou ve vodě rozpustnou molekulu kofeinu. Hodnoty zdánlivého permečního koeficientu  $P_{app}$  kofeinu získané pro čerstvou, konvenčně zmrazenou (-20°C) i šokově zmrazenou (-180 °C) membránu neprokázaly rozdíl. Měření impedance a mikroskopické snímky nicméně ukázaly u konvenčně zmražených membrán značné narušení struktury.

K podstatnějšímu ověření integrity a *in vitro* permeability sublingválních membrán byly použity fluorescenčně značené dextransy rozdílných molekulových hmotností FD4, FD 20, FD40 a FD70. Naměřená data opět potvrdila shodu bariérových vlastností čerstvé i šokově zmražené membrány a použitelnost obou pro permeační pokusy. Bohužel se při těchto pokusech ukázalo, že dextransy nejsou vhodnými nosiči léčiv pro sublingvální způsob podání, neboť procházely přes membránu velice pomalu.

Proto jsme vyzkoušeli i jiný vzorový makromolekulární nosič léčiv, albumin. Elektrosponingem byly připraveny nanovláknenné stripy s obsahem fluorescenčně značeného albuminu. Otázkou bylo, zda se albumin z nanovláken uvolní a bude schopen i další permeace. Ukázalo se, že oba kroky albumin z nanovláken zvládne, a to na prokazatelně vyšší úrovni než z roztoku shodné výchozí koncentrace albuminu. V podobě nanovláknenného přípravku může být albumin za reálných *in vivo* podmínek při sublingválním podání chráněn proti ředění slinami a následnému spolknutí. Vzhledem k tomu bude skutečná permeace albuminu z nanovláken ještě mnohem vyšší než u roztoku analogického složení. Albumin v nanovláknenném přípravku se tak může stát vhodným nosičem pro malé molekuly léčiv při jejich neinvazivním systémovém sublingválním podání.

**Klíčová slova:** sublingvální aplikace léčiv, nanovláknna, albumin, dextransy



# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical technology

Candidate: Mgr. Pavel Berka

Supervisor: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Title of Doctoral Thesis: Biopharmaceutical aspects of macromolecular carriers for systemic sublingual drug delivery

The primary aim of this work was to experimentally verify the hypothesis on sublingual permeation of macromolecules as drug carriers. Literature data about the sublingual route of drug administration and methods of sublingual and buccal membrane processing for *in vitro* experiments were reviewed for this purpose. The task to design and verify a new methodology of processing and preservation of sublingual membranes suitable for permeation experiments resulted from this literature review.

The new methodology of the “flash freezing” membranes uses the prepared membranes with complete epithelial composition, including the *lamina propria* and part of the fibrous substrate. Rapid membrane freezing with liquid nitrogen (-180 °C) was performed without cryoprotectants to avoid affecting membrane permeability, with only preliminary fixation of protein structures with sodium azide. For comparison, membranes were also frozen by conventional slow freezing to -20 °C and declared as “frozen” membranes.

Neither “fresh” nor “flash frozen” membranes showed signs of damage under microscopic examination, even after subsequent four weeks storage in a conventional freezer at -20 °C. Impedance and *in vitro* permeability of caffeine as small water-soluble molecule was used for initial evaluation of barrier properties of such treated membranes. The apparent permeation coefficient  $P_{app}$  values for caffeine, obtained on the “fresh”, conventionally “frozen” (-20 °C) and “flash frozen” (-180 °C) membranes did not show any difference. However, impedance and microscopic techniques have shown significant structural deterioration in conventionally “frozen” membranes.

FITC-labelled dextrans of different molecular weights (FD4, FD20, FD40, and FD70) were used to substantially verify the integrity and *in vitro* permeability of the sublingual membranes. Again, the measured data confirmed similar barrier properties of the “fresh” and “flash frozen” membranes and their usability for permeation experiments. Unfortunately, these experiments have shown that dextrans are not suitable drug carriers for the sublingual route of administration since they have passed through the membrane very slowly.

Therefore, we tried another macromolecular model carrier - albumin. Nanofiber strips containing FITC-labelled albumin were prepared by electrospinning. The question was whether albumin would be released from the nanofibers and would be capable of further permeation. It turned out that nanofiber albumin can handle both steps at a demonstrably higher level than from a solution of the same initial albumin concentration. In the form of a nanofibrous formulation, albumin can be protected from saliva dilution and subsequent swallowing after sublingual administration under real *in vivo* conditions. Accordingly, the actual permeation of albumin from nanofiber preparation will be much higher than that of albumin from a solution of similar composition. Thus, albumin in the nanofibrous formulation can become a suitable carrier for small drug molecules for non-invasive systemic sublingual administration.

# PŘEDMLUVA

Počátky této disertační práce spadají do období po roce 2004, kdy na pracovišti katedry farmaceutické technologie FaF UK dozrály teoretické i konkrétní materiální podmínky pro zadání a vlastní experimenty této práce. Při realizaci přístupů k orální transmukosální aplikaci léčiv bylo v plné míře navázáno na dlouholeté zkušenosti pracoviště v oblasti transdermální aplikace léčiv. Nově započatý výzkumný směr vycházel z myšlenky využít výhod, které může (trans)oromukosální podání oproti transdermálnímu nabídnout. Jedná se zejména o několik řádů vyšší permeabilitu biologické membrány jak bukalní, tak zejména sublingvální. Některé podstatné pozitivní vlastnosti přitom zůstávají srovnatelné, například pokud jde o praktickou manipulační dosažitelnost aplikační lokality pacientem.

Studium problematiky orální transmukosální aplikace bylo od počátku spojeno s řešením dvou principiálních, a přitom kritických oblastí.

První oblastí bylo získávání, zpracování a uchovávání biologických membrán ústní dutiny se zachovanými, tj. nemodifikovanými bariérovými vlastnostmi pro zachování vysoké relevance výsledků *in vitro*, resp. *ex vivo* pokusů s následnými pokusy a výsledky *in vivo*. Základní informace a výsledky tohoto hledání, totiž návrh a ověření použitelné metodiky zpracování sublingválních membrán pro další experimentální práce jsou obsahem částí 5.1 až 5.4 této disertace.

Druhou oblastí bylo nalezení vhodného přístupu k tomu, jak omezit interakce sublingválně či bukalně podávaných léčiv (aktivních látek, API) se slinami, které za fyziologických podmínek v aplikační lokalitě průběžně omývají povrch sliznice. K tomuto jevu u běžně používaných lékových forem dochází, s následným odplavováním léčiva, zkracováním retenčního času pro kontakt léčiva s optimální absorpční plochou ústní sliznice a tím s rychlým snižováním koncentrace léčiva potřebné pro efektivní interakci s absorpčním povrchem. Tímto povrchem je mikrovrstva slin, mukusu a nekeratinisovaná plocha sublingvální či bukalní sliznice (nikoli sliznice gingivální, případně palatální). Pro řešení této problematiky se jeví jako nejperspektivnější nanovláknenné nosiče léčiv. S využitím výhodných vlastností nanorozměrných soustav, avšak bez rizika nežádoucí aglomerace individuálních částic, mohou modifikovaná nanovláknna přivádět na absorpční plochu molekuly léčiva. Může

se přitom jednat jak o terapeuticky či diagnosticky a profylakticky zajímavé makromolekuly typu proteinů, glykolipidů apod., nebo nanočásticové nosiče s vhodně navázanými nízkomolekulárními léčivými – např. dextransy, či albumin. Jako technologii schopnou i v průmyslovém měřítku produkovat nanovláknem uvažovaných vlastností byla vybrána technologie elektrospinningu, se kterou kolem roku 2005 vstoupila na trh firma Elmarco s.r.o., Liberec. Výsledky prací s nanovláknem, na nichž jsem se spoluautorsky podílel, nověji i s podporou firmy InStar Technologies a.s., Liberec, jsou obsahem kapitoly **5.5 Albumin** této disertace.

Teoretické základy a první experimentální výsledky disertace byly získány v době mého působení na FaF UK v Hradci Králové, později rovněž na pracovišti firmy InStar Technologies v Liberci, která problematiku nanovláknem nosičů léčiv rozvíjí a kam jsem v roce 2014 nastoupil a mohl práci finalizovat.

# 1. ÚVOD

V oblasti tvorby lékových forem pro systémovou aplikaci léčiv existuje zajímavý a dosud poněkud opomíjený prostor zejména pro neinvasivní transmukosální podání. Není nutné připomínat, že při systémovém podání léčiv perorální cestou, tedy přes gastrointestinální trakt (GIT), stejně jako při podání cestou rektální (také vlastně patří k transintestinálním), ale i cestou inhalační, musí léčivo (aktivní látka, API) při svém vstupu do krevního nebo lymfatického oběhu vždy překonat nějakou slizniční bariéru.

Sliznice GIT je k takovému procesu funkčně vybavena nejlépe, ale v řadě důležitých případech není pro API použitelná, neboť GIT je pro mnoho látek příliš agresivním prostředím. Sliznice dýchacího traktu je sice plošně nejrozsáhlejší, avšak v zásadě je vybavena pro jiné funkce a obtížně se také u tohoto podání stanovuje dávka. Ještě dříve byla jako místo pro systémové dodávání léčiv zkoumána mnoha výzkumnými skupinami cesta nasální, která dosáhla nevelkého komerčního uplatnění jen u několika léčiv, zejména v podobě kapek a dávkovaných sprejů. Potenciální podráždění a nevratné poškození ciliárního účinku nosní dutiny při dlouhodobějším podávání léčiv na nosní sliznici, stejně jako velká variabilita mukosální sekrece (i intraindividuální) však významně ovlivňují absorpci léčiva a praktickou využitelnost této aplikační cesty.

Před asi 20 lety si zajistily opětovnou pozornost obě varianty orální transmukosální aplikace. „Orální transmukosální“ přitom jako termín souhrnně označuje systémové podání léčiva na základě jeho přechodu přes bukalní nebo sublingvální sliznici do krevní, resp. lymfatické cirkulace. Tento typ systémového podávání léků je dnes považován za účinnou alternativu vhodnou jak pro aplikaci nízkomolekulárních léčiv s potřebou rychlého nástupu účinku v případě sublingválního podání, tak k řízenému podání léčiv s dlouhodobějším nástupem svého efektu v případě prevažujícího využití transbukální cesty<sup>1</sup>. Kromě toho je zejména sublingvální podání považováno za slibnou aplikační variantu pro některé biomakromolekuly typu peptidů a proteinů, rovněž pro nukleotidy, enzymy, hormony, antigeny a vakcíny<sup>2-5</sup>.

Sublingvální i bukalní aplikační cesty mají oproti stávajícímu perorálnímu podávání léčiv několik důležitých výhod. Léčivá látka se vyhýbá kyselému prostředí v žaludku a enzymatickému štěpení v dalších částech GIT, vyhýbá se změnám při průchodu přes

vlastní sliznici GIT a ani po vstřebání do krve či lymfy není bezprostředně metabolizována v játrech<sup>6,7</sup>.

Parenterální aplikace (i.v, s.c., i.m., apod.) se také vyhýbají problémům s GIT podáním, ale i pokud vynecháme nevýhody dané inherentní invazivitou (bolestivost), tak jsou navíc vesměs spojena s technologickými problémy a náročnými požadavky na sterilitu a metodiku podávání (např. i.v. smí léčivo podávat pouze zdravotnický proškolený personál), v jejich důsledku potom také relativně vyšší cenou.

K dalším výhodám sublingvální a bukalní cesty podání léčiv patří skutečnost, že je snadno a dobře aplikačně dostupná pro pacienty, případně také jejich pečovatele<sup>8</sup>. Jak umístění, tak odstranění nečiní v tomto případě u většiny aplikačních soustav problémy<sup>9</sup>. Tenké a dobře permeabilní nekeratinizované oblasti orální sliznice jsou dokonale vaskularizovány krevními a lymfatickými cévami, na povrchích těchto sliznic jsou (zejména u člověka) přítomna pouze malá množství enzymů (sublingvální amyláza, lipáza), hodnoty acidity v ústní dutině jsou blízké neutrálnímu pH (cca 6,8), a takové prostředí tedy molekulu léčiva vážněji neohrožuje<sup>10</sup>. Orální sliznice jsou na rozdíl od nosních sliznic poměrně odolné, nespádno se poškozují a přitom se rychle opravují a hojí<sup>11</sup>.

Na druhou stranu, k nevýhodám orálních transmukosálních cest patří relativně omezená plocha pro absorpci léčiv, což umožňuje systémové podávání pouze malých jednotlivých dávek (obvykle v miligramech na jednu dávku) a celkově nízkou denní dávkou léčivé látky (několik desítek miligramů). Vylučování slin s následným ředěním léčiva slinami a jejich dalším odplavováním (včetně léčiva) do dalších úseků GIT se zkracuje časový interval, který je v ústní dutině k dispozici pro efektivní kontakt a absorpci léčiva se sliznicí<sup>12</sup>. Tato nevýhoda může být částečně řešena zvýšením přilnavosti formulací mukoadhezivního přípravku<sup>13,14</sup> nebo využitím vhodného chemického akceleraantu či enhanceru<sup>7</sup>.

Biofarmaceutické důvody k vývoji orálních transmukozálních soustav pro podávání léků jsou podrobně popsány nejen ve výše uvedených monografiích<sup>8,9,15</sup>, ale průběžně aktualizovány v rozsáhlých přehledných člancích<sup>7,16-18</sup>, zde zůstanou zmíněny pouze stručně.

Je ovšem nutné podotknout, že ani nejnovější přehledy z této oblasti však v daných souvislostech neobsahují ve větším rozsahu informace o průchodnosti dextranových nosičů (viz kapitoly **3.4.1.5 Dextrany jako nosiče léčiv** a **3.4.2 FITC dextrany**) ani o nanovláknenných nosičích. Také proto jsou výsledky finálních experimentů této disertační práce směřující k využití nanovláken s albuminem pro sublingvální podání v kapitole **5.5 Albumin** zajímavé.

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

1. Shrnout a vyhodnotit informace o sublingválním podávání léčiv
2. Zpracovat stručný přehled metodik přípravy sublingválních, resp. bukálních membrán pro *in vitro* permeační experimenty
3. Zpracovat informace o dextransích, jejich využití jako excipientu, léčiva i jako permeačních markerů
4. Připravit přehled informací o albuminu, zejména s přihlédnutím k jeho využití jako nosiče léčiv
5. Upravit a ověřit metodiku přípravy sublingválních membrán pro permeační experimenty
6. Experimentálně vyhodnotit možnosti využití sublingválního průniku dextranů o různých molekulových hmotnostech pro permeačních testování
7. Experimentálně ověřit hypotézu o možnosti sublingvální permeace albuminu jako vzorového nosiče léčiv za pomoci nanovlákných aplikačních soustav

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

Biofarmaceutické přístupy k tvorbě léčivých přípravků respektují látkové, strukturální složení a celkové uspořádání biologických bariér, se kterými má po aplikaci dané léčivo přicházet do kontaktu, respektive které bude muset překonat. Dále budou postupně popsány čtyři důležité dílčí oblasti, kterých se problematika sublingválního podání léčiv konkrétně týká. Jedná se o charakteristiku orální sliznice pro podání léčiv, přípravu sublingválních membrán pro *in vitro* permeační pokusy, dextranů nejen jako nosičů léčiv, ale i permeačních markerů pro různé membrány a možnosti využití albuminu jakožto nosiče léčiv.

#### 3.1 Sublingvální (SL) podání léčiv

##### 3.1.1 Ústní sliznice jako permeační bariéra

Současný pohled na ústní sliznici jako místo pro systémovou aplikaci látek popisuje jak morfologickou, tak enzymatickou povahu oromukozální sliznice. Ústní epitel slouží převážně jako bariéra vůči průniku exogenních látek a k ochraně níže položených tkání před potenciálně škodlivými materiály a mikroorganismy.

Histologicky i funkčně lze orální sliznici rozdělit na tři hlavní oblasti. Měkká nekeratinizovaná oblast sliznice zaujímá asi 60 % celkové plochy, tužší mastikatorní (žvýkací) sliznice asi jednu čtvrtinu a specializovaná sliznice zbylých 15 % vnitřní plochy úst. Mastikatorní část sliznice pokrývá keratinizované oblasti tvrdého patra a gingivy, je málo permeabilní pro léčiva a jako plocha pro případné systémové podávání léčiv není sledována.<sup>12</sup>

Nekeratinizovaná sliznice se nachází jak na bukalní, tak na sublingvální části ústní dutiny. Není vystavována žvýkací aktivitě, je tenčí než ostatní dva typy a je pro absorpci léčiva vhodná. Pro transmukozální aplikaci léčiv jsou využívány obě oblasti, bukalní i sublingvální. Při bukalním podávání jsou léčiva umístována na volnou vnitřní stěnu tváře v ústní dutině nebo do prostoru mezi tváří a dásní. Sublingválně se léčiva podávají pod jazyk, tedy na dno úst nebo na spodní stranu jazyka.<sup>19</sup>

Absorpční charakteristiky, podobnosti a rozdíly mezi bukalní a sublingvální sliznicí jsou shrnuty v **Tabulka 1**.



**Tabulka 1:** Srovnání vlastností bukální a sublingvální sliznice relevantních při podání léčiv. Adaptováno z Ref. <sup>19</sup>

Sliznice	Bukální	Sublingvální
Umístění	Vnitřní tvář, bukální váček mezi tváře a dásní	Pod jazykem (dno úst)
Vlastnosti sliznice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nekeratinizovaná</li> <li>• Tloušťka 500–800 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>• 40–50 vrstev buněk</li> <li>• Relativně imobilní sliznice</li> <li>• Méně vaskularizována</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nekeratinizovaná</li> <li>• Tloušťka 100–200 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>• 8–12 vrstev buněk</li> <li>• Relativně mobilní sliznice</li> <li>• Vysoce vaskularizována</li> </ul>
Permeabilita (absolutní rychlost permeace):		
- vody	$579 \pm 16 \times 10^{-7} \text{ cm/min}$	$973 \pm 16 \times 10^{-7} \text{ cm/min}$
- ovalbuminu	$178 \pm 9 \times 10^{-7} \text{ cm/min}$	$426 \pm 53 \times 10^{-7} \text{ cm/min}$
Plocha:		
- dospělí	$50,2 \pm 2,9 \text{ cm}^2$	$26,5 \pm 4,2 \text{ cm}^2$
- děti (5 let)	$30,1 \pm 3,1 \text{ cm}^2$	$15,9 \pm 3,8 \text{ cm}^2$
Podání léčiv	Lokální a systémové	Systémové
Výhody	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prodloužené uvolňování, chronická systémová terapie</li> <li>• Vysoká tolerance vůči potenciálním alergenům, nevratnému podráždění nebo poškození</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rychlý nástup účinku pro akutní léčbu</li> <li>• Léčiva pro krátkodobé podání</li> </ul>
Nevýhody	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vymývání slinami (saliva wash-out)</li> <li>• Reflexní polykání</li> <li>• Problémy udržení léku na místě podání</li> <li>• Nižší biologická dostupnost: mohou být zapotřebí zesilovače penetrace, mukoadhezivní polymery nebo inhibitory enzymů</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vymývání slinami (saliva wash-out)</li> <li>• Reflexní polykání</li> <li>• Problémy udržet lék v kontaktu s povrchem sliznice</li> <li>• Problémy při aplikaci, nedostatek hladké nepohyblivé plochy</li> </ul>

Sublingvální sliznice představuje plochu asi 26 cm<sup>2</sup>, tj. asi osminu celkové plochy ústní dutiny (cca 200 cm<sup>2</sup>). Z ústní sliznice je nejtenčí sublingvální sliznice (100 µm až 200 µm), která není keratinizovaná a její úplná regenerace, tedy vývoj buněk od oddělení z bazální membrány do uvolnění do ústní dutiny, trvá přibližně dvacet dní<sup>12</sup>, je tedy poněkud rychlejší, než je tomu u membrány kožní. Je velmi dobře perfundovaná; krevní zásobením dolní dutiny ústní zajišťuje externí karotidovou tepna a průtok krve sublingvální částí je asi 0,97 mL/min/cm<sup>2</sup>.<sup>20</sup>

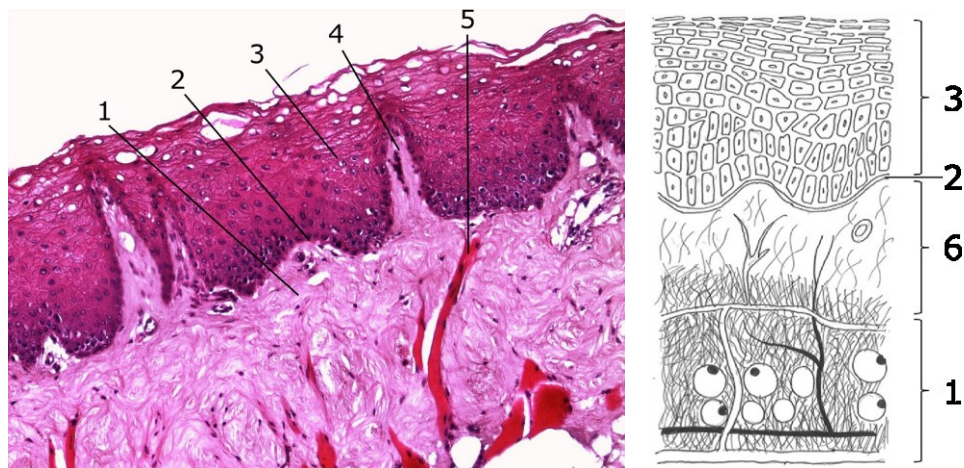
Povrch ústního epitelu je pokryt a zvlhčen slinami. Slinné žlázy v ústní dutině (sublingvální, submandibulární, příušní) produkují 0,5-2 litrů slin za den. Tyto zajišťují v ústní dutině relativně stabilní prostředí s hodnotou pH přibližně 6,8 (s omezenou pufrační kapacitou) a obsahují různá množství enzymů a hlenu. Hlen (mukus) je viskoelastický hydrogel tvořený vodou a glykoproteinem mucinem (1% - 5%), který výrazně ovlivňuje mukoadhezivní vlastnosti v ústní dutině.<sup>12,20</sup>

Sliny kontinuálně čistí všechny povrchy ústní dutiny a mohou významně ovlivňovat dodávání léčiva touto cestou ředěním léčiva, možnou degradací léčiv vlivem enzymů nebo odplavením léčiva z absorpčního povrchu (tzv. „salivary wash-out“).<sup>12</sup>

Sliznice dutiny ústní (**Obrázek 1**) má následující součásti:

- submukózu (1) - dolní část *lamina propria* obsahující kapiláry (5) a inervaci
- *lamina propria* (6)- pojivová tkáň, kolagenová vlákna, krevní a lymfatické kapiláry
- bazální membránu (2) – s buňkami schopnými dělení, které diferencují a tvoří epitelové buňky
- orální epitel (3) - vrstevnatý dlaždicový epitelem; sublingvální a část bukální oblasti není keratinizovaná; je oddělen od *lamina propria* bazální membránou

Mukózu v dutině ústní lze rozdělit na sublingvální, která se nachází ve spodní straně jazyka a dolní části dutiny ústní pod jazykem, bukální na spodní straně tváře a rtů a gingivální.<sup>20</sup>

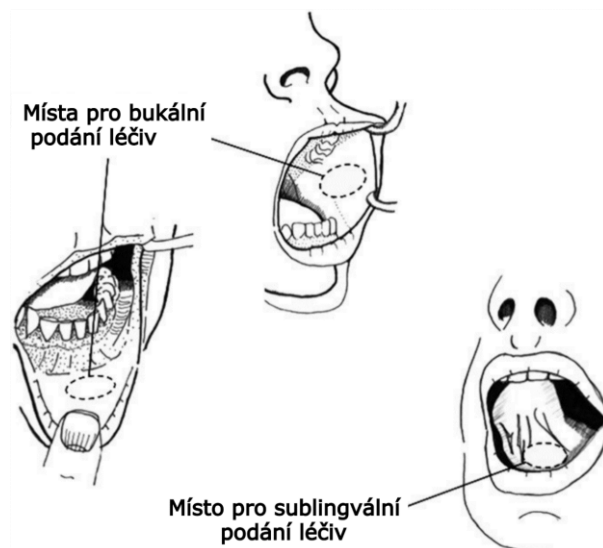


**Obrázek 1:** Snímek sublingvální membrány (1 = submukóza, 2 = bazální membrána, 3 = epitel, 4 = papila, 5 = kapilára, 6 = *lamina propria*). Obrázek vpravo adaptován z Ref.<sup>19</sup>

Největší odpor průchodu aktivních látek klade přibližně druhá čtvrtina profilu ústního epitelu, která je zřejmě hlavní řídicí etáží, která určuje průchod látek přes sublingvální slizniční bariéru.

Transportní cesty se tradičně rozdělují na extracelulární, tedy v mezibuněčných prostorech epitelu, a intracelulární vedoucí tělem epiteliálních buněk. Extracelulární cesta je určena především pro látky rozpustné ve vodě, zejména nízkomolekulární. Při průchodu touto cestou se vždy jedná se o pasivní transport na základě koncentračního gradientu. Díky přítomnosti lipidických překážek v mezibuněčném prostoru, pocházejících z membránou krytých zrnček (MCG), je ovšem pasivní transport aktivních látek hydrofilní povahy někdy komplikován.

Při intracelulárním přechodu membránou jsou možné tři různé transportní mechanismy (*pasivní difúze, přenašeče a endocytóza*). Cesta pasivní difúze závisí na lipofilitě materiálu, rozdělovacím koeficientu mezi lipofilními a hydrofilními oblastmi a na difúzním koeficientu látky v mezibuněčném prostoru.<sup>21</sup> U léčiv, která ve vodném prostředí ionizují, platí to, že v méně ionizované formě difundují přes sliznici efektivněji.<sup>7</sup>



**Obrázek 2:** Místa pro bukální a sublingvální podání léčiv. Adaptováno z Ref. <sup>19</sup>

Základní charakteristika sublingvální aplikace léčiv byla zmíněna v úvodu. Rychlý prostup enzymaticky nezměněného léčiva do periferní krve i krátká cesta léčiva krevním oběhem do srdce, ale i CNS byly prokázány pro trinitrát glycerolu a nikotin již před 150 lety.<sup>22</sup> Odplavování (saliva wash-out) a ředění léčiva slinami omezuje časový úsek jeho retence v ústní dutině, léčivo odchází z místa aplikace dále do GIT. Tento jev je u řady lékových forem typický, zejména u roztoků ale i u rychle se rozpouštějících lyofilizovaných tablet, případně filmů, tělísek typu „wafers“ (oplatků). To omezuje jejich využití pro léčiva, která by jinak mohla být s výhodou touto cestou podávána.<sup>12</sup> Proto je snahou tyto nevýhody mohou být částečně kompenzovat použitím mukoadhezivních lékových forem<sup>13,14</sup> nebo chemických enhancerů absorpce.<sup>7</sup>

### 3.1.2 Makromolekulární sublingvální léčiva

Sublingvální podání makromolekulárních látek bylo dlouho zpochybňováno. Historický úspěch, který koncem 50. let minulého století zaznamenalo orální, resp. perorální podávání Sabinovy vakcíny proti poliomyelitidě, zdůraznil výhody tohoto neinvazivního podání, zejména snadnost, ale i účinnost podávání vakcín. Od roku 1961 jsou pro prevenci poliomyelitidy k dispozici monovalentní, později trivalentní verze vakcíny. Orální, tedy i sublingvální vakcíny mají mnoho výhod, především eliminují riziko kontaminace krve. Vakcíny navíc nemusejí být tekuté, jako léčiva v pevném stavu jsou stabilnější, méně náchylné k poškození v obalu při přepravě nebo

ke znehodnocení při skladování. Mnohem vyšší stabilita vakcín v suchém stavu snižuje potřebu chladového řetězce od výroby až po aplikaci, což teoreticky výrazně snižuje celkové náklady na vakcinační programy. Také proto je snahou tyto výhody neinvazivní vakcinace přes neporušené sliznice využít, na druhou stranu to komplikuje komerční strategie firem. V daném směru se jeví slibnou hlavně aplikační cesta sublingvální, proto se jí zejména v poslední dekádě zabývá řada prací. Z nich je možné zmínit například autory Kweon et al.<sup>23</sup>, Seth et al.<sup>24</sup>, Amorij et al.<sup>25</sup>, Kraan et al.<sup>3,26</sup>, v roce 2017 publikovali zajímavou práci na dané téma Mašek et al.<sup>27</sup> Přípravky pro sublingvální alergenovou imunoterapii (SLIT) jsou i v ČR asi 10 let k dispozici.

Z ostatních typů makromolekulárních látek, na které se v současné době soustřeďuje zájem, se nejčastěji uvádí různé obměny insulínu, umožňující upravovat glykémii. Dle databáze Micromedex®<sup>28</sup> jsou však kromě SLIT<sup>29</sup> dnes pro oromukozální podávání makromolekul schváleny pouze tři léčivé přípravky, jeden pro podání modifikovaného inzulínu a dvou vakcín.

### **3.1.3 Nízkomolekulární sublingvální léčiva**

Sublingvální systémové podání aktivních látek je považováno za historicky prokázané již od starověku. Tradičně se tykalo například opioidní látek používaných proti bolesti a psychoaktivních drog. Léčiva tohoto zaměření jsou v moderní podobě sublingválně podávána i dnes. K těmto a dalším skupinám léčiv patří dnes asi dvacet látek, například jde o sublingvální fentanyl, triptany proti migréně (sumatriptan, rizatriptan), kardiovaskulární léčiva (kaptopril) a některá další (apomorfín, asenapin, buprenorfín, naloxon, doxepin, ergoloid, ergotamin, glyceryltrinitrát, isosorbid dinitrát, ondansetron, midazolam, nikotin, prochlorperazin, testosteron, zolpidem, tadalafil, aj.).<sup>28</sup> Databáze Micromedex®<sup>28</sup> nověji zmiňuje například octreoid (při akromegalii) epinefrin (při anafylaxi) nebo riluzal (při ALS). Důvody až dosud relativně omezeného počtu léčiv jsou spojeny nejen se strategiemi farmaceutických firem, ale také s výše uvedenými nevýhodami, zejména ředěním a polykáním léčiva, tedy bez účinné oromukozální absorpce.

### **3.1.4 Lékové formy pro sublingvální podání**

Vývoj lékových forem pro efektivní podávání léků na orální sliznice je podrobně popisován v četných monografiích,<sup>8,9,15</sup> i nedávných přehledových člancích.<sup>7,16–18</sup>

V současné době existuje řada sublingválních lékových forem od tekutých, vesměs aplikovaných v podobě sprejů (včetně dávkovatelných), po sublingvální tablety (včetně lyofilizovaných a mukoadhezivních), filmů, stripů a již zmíněných oplatků, proužků z nanovláken<sup>30,31</sup>, až po tištěné filmy.<sup>32</sup> Většina sublingválních léčiv, tedy asi dvacet, které jsou v současné době dostupné ve farmaceutické distribuci, je deklarována jako orální, případně orodisperzní film.

V této oblasti probíhá nejen biofarmaceutický a technologický výzkum a vývoj, ale upřesňuje se také dosud poněkud nepřehledná terminologie. Značný nárůst informací momentálně vyúsťuje v situaci, kdy často navzájem kolidují lékopisné snahy v Evropě a USA. Není cílem této práce tuto problematiku podrobněji zpracovávat, činí to například výše zmiňované nebo další přehledné práce a nejstručnější formou také následující odstavec.

### 3.1.5 Typy oromukosálních lékových forem

U většiny oromukosálních léčiv deklarovaných pro systémové podání není v principu jasné, bude-li se léčivá látka vstřebávat na tom oromukosálním povrchu, pro který byla primárně aplikována. Léčivo podané bukálně (viz např. **Obrázek 2**) přijde velmi pravděpodobně poměrně brzy do kontaktu s více permeabilní sliznicí sublingvální. Z toho důvodu se jeví klasifikace většiny lékových forem na bukální a sublingvální spíše jako úřední. U většiny lékových forem po aplikaci totiž dochází k dispergaci a rozpuštění léčiva působením slin, a to s přispěním pohybu úst vede k rozprostření léčiva po velkém povrchu. Tento děj vede ke snížení koncentrace potřebné pro účinnou pasivní difúzi, což je většinou spojeno se snížením systémového efektu.

Nehledě na zmíněnou skutečnost je možné v současné době bez výhrad, jen s malou úpravou, přijmout rozdělení oromukosálních lékových forem, jak je podrobněji prezentováno v přehledové publikaci Barua et al. (2016).<sup>33</sup>

1. Neadhesivní: rychle rozpustné tablety, mikroporézní dutá vlákna, žvýkací gumy.
2. Mukoadhesivní: a) pevné: tablety, žvýkací tablety, oplatky, disky, prášky  
b) proužky, filmy: dvouvrstvé, vícevrstvé  
c) polotuhé: adhezivní gely, adhezivní masti, pasty, emulze, polštářky  
d) kapalné: roztoky, emulze (případně ve sprejích)

### 3.1.6 Podání v nanovláknenných nosičích

Z uvedených typů aplikačních soustav stojí za zvláštní zmínku nanovláknenné nosiče léčiv. Ty mohou tradičně uváděné nevýhody stávajících lékových forem vyřešit nejen pro lokální podání léčiva s malou molekulou, ale i pro podání systémové, jak bylo vícekrát ukázáno (např. Thakkar et al.<sup>34</sup>, Vrbata et al.<sup>31</sup>), a to i pro některé makromolekuly. Při správném výběru excipientů mají schopnost udržovat léčivo na sublingválním či bukálním absorpčním místě v maximální koncentraci po dobu dostatečnou pro absorpci léčiva. Mohou zabránit rychlému ředění a polykání léčiva, zejména pokud je využito pokrytí vhodnou ochrannou vrstvou. Proto mají lepší potenciál kontrolovat mikroprostředí na místě aplikace než stávající lékové formy.<sup>35</sup>

Vzhledem k výhodným vlastnostem (trans)oromukosálního podání je ve srovnání s perorální či parenterální aplikační cestou je tato sublingvální, případně bukální, cesta již několik let předmětem zájmu řady farmaceutických společností (např. Tesa-Labtec, LTS Lohmann, MonosolRx). Jsou zaměřeny především na technologie lití a roztírání polymerních soustav, bez využití zvláštních vlastností soustav nanovláken.

### 3.1.7 Využití nanovláken při transmukosálním podání léčiv

Nanovláknenná membrána se svou charakteristikou, tedy flexibilitou, možností využívat různé typy polymeru či možnosti nést velké množství rozdílných léčiv, jistě řadí ke konkurenčnímu materiálu pro tenké orálně rozpustné filmy. V uplynulých letech bylo publikováno nemalé množství výsledků týkajících se nanovláken jako nosiče léčiv pro transmukosální podání.<sup>36–39</sup> Téměř 100 % publikovaných výsledků ovšem pochází z laboratorní výroby nanovláken, převážně tryskovým způsobem, které je ovšem velmi vzdálené průmyslové aplikaci. V roce 2012 byl udělen patent č. CZ 303244 společnosti ELMARCO a Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové týkající se transmukosálního podání léčiv pomocí nanovláknenné matrice vyrobené průmyslovou technologií Nanospider™.<sup>40</sup> Tento patent popisuje přístup ke skladbě produktu tak, aby bylo zabráněno vymývání léčiva do slin, přesněji řečeno jedná se multikompozitní produkt, který obsahuje membránu dopovanou léčivou látkou, která z jedné strany může být překryta mukoadhezivní vrstvou a z druhé strany vrstvou krycí-omezeně či vůbec nerozpustnou v dutině ústní.

### 3.2 Nanovlákná

Nanotechnologie prodělávají od konce dvacátého století velký rozvoj ve sféře akademického výzkumu a vývoje, návazně také v oblasti průmyslové a komerční. Odpovídá tomu dnes již velmi rozsáhlá časopisecká, knižní i patentová literatura, počet publikačních výstupů přitom neustále roste. Podle nejjednodušší a široce akceptované definice se nanomateriály vyznačují alespoň jedním externím rozměrem v oblasti 1 až 100 nanometrů.<sup>41</sup> Vykazují neobvyklé fyzikálně-chemické vlastnosti související zejména s velmi vysokou hodnotou poměru velikosti jejich specifického povrchu k objemu (větší než  $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ ).<sup>41</sup> Mohou mít velmi odlišné geometrické uspořádání a vnější i vnitřní strukturu, terminologicky se dosud jednoznačně neukotvily.

Z velikostních a tvarových variant nanomateriálů popisovaných v souvislosti s podáváním léčiv lze uvést například bezrozměrné nanotečky (nanodots), jednorozměrné nanočástice (nanoparticles), nanodrátky (nanowires), nanotrubičky (nanotubes) nebo a nanolupínky (nanochips), ale také dendrimery a některé liposomy. Zvláště zajímavou podskupinu nanomateriálů představují nanovlákná (nanofibers, nanofibres), zejména polymerní, z nichž se připravují různě komponované vrstvy. Nanovlákná jsou považována za vhodné nosiče pro léčiva patřící do BCS tříd II a IV s obecně nízkou rozpustností a problematickou biologickou dostupností.<sup>42,43</sup>

Existuje několik možných metod přípravy polymerních nanovláken, z nichž některé zůstávají v oblasti laboratorní přípravy, jiné se podařilo vyvinout do úrovně vhodné k průmyslové produkci.

Ačkoliv tyto problémy a metody přípravy nosičů nanovláknenných léčiv byly diskutovány po celá desetiletí, zásadně úspěšné technologické řešení, které by přinášelo terapeutické výsledky, není dosud k dispozici. Hlavním důvodem je, že získávané výsledky jsou téměř vždy založeny na technikách elektrospinningu prováděných pouze v laboratorním měřítku, nikoliv na dobře škálovatelné elektrospinning technologii. Výjimkou je dosud především technologie NanoSpider<sup>TM</sup>.<sup>44-46</sup>



### 3.2.1 Elektrospining

Elektrospining (ES), neboli elektrostatické zvlákňování, je proces tvorby ultrajemných polymerních vláken pomocí působení silného elektrického pole mezi zvlákňovací a sběrnou elektrodou na roztok nebo taveninu polymeru. Vznikají tak vlákna o průměrech nejčastěji 100 nm až 1000 nm, ale byly popsány i vlákna o průměrech 30 nm či 10 000 nm.<sup>47</sup> Vlákna jsou zachytávána před sběrnou elektrodou (kolektorem) na substrát (podkladovou textilií, tzv. spunbond, případně na papír). Finální tloušťku nanovlákněné vrstvy lze definovat rychlostí posunu podkladového substrátu.

Elektrostatické síly v průběhu ES musí být dostatečně velké, aby překonaly povrchové napětí dané kapaliny a mohlo dojít ke vzniku Taylorova kužele.<sup>48</sup> Z toho pak vylétává proud polymeru, který za letu schne a následně tvoří nanovlákna.<sup>47</sup>

Podle typu zvlákňovací elektrody můžeme ES rozdělit na zvlákňování z jehly a bezjehelné zvlákňování. Princip bezjehelného zvlákňování, kdy se tvoří velké množství Taylorových kuželů najednou, patentoval před patnácti lety prof. O. Jirsák z Technické univerzity v Liberci<sup>45</sup> a pro průmyslové provedení úspěšně rozpracovali v podobě zařízení Nanospider™ v tamní firmě Elmarco.<sup>49</sup>

Díky tomu se přípravu nanovláken stala z původně finančně a procesně velmi náročného procesu relativně nenákladným a dnes již i dobře proveditelným výrobním postupem.

### 3.3 *In vitro* testování průniku léčiv membránami

Sublingvální nebo bukální permeabilita léčiva se obvykle testuje *in vitro* na prasečích sliznicích, nejčastěji ve Franzových buňkách, původně vyvinutých pro studie permeace přes kůži, jak bylo popsáno dříve.<sup>9,11,50</sup> Tato membrána má podobné histologické složení a vlastnosti jako lidská orální sliznice, a její permeabilní vlastnosti jsou srovnatelné.<sup>51</sup>

Vzhledem k tomu, že nejvýznamnějším způsobem transportu léčiv přes sublingvální membránu je pasivní difúze,<sup>12</sup> a proto většinou není nutné v *in vitro*, resp. *ex vivo* pokusech zachovávat (či imitovat) vitální metabolickou aktivitu této membrány. Z důvodu dostupnosti zdrojů zvířat se sublingvální membrána prasete stává se pro dané experimenty membránou nejpoužívanější a je považována za budoucí tzv. zlatý

standard. K tomu bude ovšem nutné sjednotit v první řadě postupy k jejímu získávání, zpracování a uchovávání. Současný stav zatím neumožňuje přímo a s dostatečnou věrohodností srovnávat naměřená a publikovaná data nejen v rámci *in vitro*, respektive *ex vivo* experimentů, ale neumožňuje ani získat odpovídající *in vitro/in vivo* korelace.

### 3.3.1 Metody přípravy slizničních membrán prasete

Anatomické, fyziologické a metabolické vlastnosti sublingvální a bukální sliznice člověka a prasete jsou velmi podobné.<sup>52</sup> Prasečí sliznice je také na určitých místech nekeratinizovaná, má podobnou tloušťku, složení i permeabilitu.<sup>15,53,54</sup> Permeaci řady léčiv prasečí bukální sliznicí jako modelu pro transmukozální aplikaci se věnovali M. Sattar a spol.<sup>11</sup> Histochemické hodnocení prasečí sliznice ukázalo, že epitel zůstává zřetelně vitální až 9 hodin po smrti. Při použití 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitroimidazoliumbromidu (MTT) jako testovacího agens byla vitalita bukální sliznice prasete zaznamenána ještě po 12 hodinách po odběru vzorků tkáně. Proto bylo pro *in vitro* permeační experimenty doporučeno ukončovat je do 9–12 hodin po usmrcení zvířat.<sup>55</sup>

Získání separované epiteliální membrány separací od podkladové tkáně lze dosáhnout chemicky, chirurgicky nebo pomocí tepla. Tradiční chemický způsob zahrnuje odštěpení podkladové tkáně pomocí kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Má tu výhodu, že epitel lze získat jako celek, jako jeden epiteliální kompartment. Není však jisté, do jaké míry jsou po chemickém ošetření ovlivněny bariérové funkce sliznice. *Lamina propria* připojující epitel k pojivové tkáni se může během chemického ošetření oddělit a její vliv na difúzi tak nebude z experimentů zřejmý.<sup>53</sup>

Chirurgickou separací lze použít k izolaci podkladové tkáně buď pomocí nůžek nebo dermatomováním svrchní části sliznice.<sup>51</sup> Výhodou této preparační metody je skutečnost, že slizniční bariéra není poškozena chemicky a že zahrnuje i bazální vrstvu. Dermatomovaná tkáň má poměrně velkou tloušťku, a nese poměrně velké množství pojivové tkáně.

Při tepelné separaci epitelu od podkladové tkáně se sliznice umísťuje do pufry (obvykle Krebs) o teplotě 60 °C po dobu cca 1 minuty, epitel se po této době odloupne. Platí zde opět stejná námitka jako v předchozím případě chemické separace. Získaná epiteliální

membrána může být výhodná pro studium interakcí látek s jejími strukturami, avšak pro posouzení permeability mukosální sliznice jako celku sloužit nemůže.

Zcela čerstvá sliznice není vždy dostupná ani v případě sublingvální membrány prasete. Pro její získávání, zpracování a skladování byla popsána řada postupů. Údaje o vlastnostech membrán získaných těmito postupy jsou ovšem často rozporuplné. V popisech získávání membrán pro *in vitro* pokusy někdy chybějí údaje, některé si protirečí, některé vyvolávají pochybnosti o zajištění integrity či intaktnosti získaných membrán. Situaci dokumentuje následující výběr z nejzajímavějších publikací.

Srovnání mezi čerstvými vzorky a těmi, které byly skladovány při  $-80^{\circ}\text{C}$ , publikovali již v roce 1989 C.A Lesch et al.<sup>54</sup> Neodhalili žádný významný vliv na permeabilitní konstantu  $K_p$  v důsledku zmrazení. Kromě toho hodnoty  $K_p$  získané pro lidské tkáně se významně nelišily od hodnot prasat, s výjimkou dna v ústech, které bylo pro člověka propustnější než v prasečí tkáni.

Srovnání mezi čerstvými vzorky sublingvální sliznice a vzorky kryogenně chráněnými ponořením po dobu 2 hodin do glycerolu 85% a pomalu ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) zmrazené na  $-80^{\circ}\text{C}$  a uchovávané v biomrazničce při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  neprokázalo žádný významný vliv na propustnost pro malé molekuly.<sup>11,56</sup>

### **3.3.1.1 Tepelné zpracování**

Obvykle používaná několikaminutová (přibližně 4 až 6 minut) expozice slizniční membrány při  $60^{\circ}\text{C}$  až  $65^{\circ}\text{C}$  během standardního čistícího procesu vyžadovaného na jatkách velmi pravděpodobně poškozuje sublingvální membránu nevratnými změnami proteinů i lipidových struktur.<sup>57</sup> Tyto morfologické změny nejsou pozorovatelné ani okem, ani světelnou mikroskopií, ani permeačním testováním malých molekul. Je ale více než pravděpodobné, že jsou limitujícím faktorem pro větší molekuly – např. proteiny či polysacharidy.

Z tohoto důvodu bylo také formulováno zadání jednoho z úkolů experimentu ve smyslu maximálního omezení tepelné expozice membrán před *in vitro* permeačním pokusem.

Vlivu zmrazení na propustnost ústní sliznice bylo také věnováno několik publikací.

Pro získání prvotních preformulačních a později zejména preklinických informací o uvolňování a oromukosální permeaci léčiv jsou důležité experimenty *in vitro*.

Tradičně používají excidovanou tkáň savců, proto jsou někdy jsou označovány metody *ex vivo*. Méně často využívají membrány syntetické.

Je zajímavé, že na rozdíl od jiných biologických bariér, například BBB (blood-brain barrier), bylo dosud jen málo úsilí věnováno výzkumu bariéry, která odděluje sliny, sliznice a součásti krevního systému. Bariéra krev-slina (BSB blood-saliva barrier) je definována hlavně epitelem ústní dutiny.<sup>58</sup>

Až v posledních letech se stalo cílem řady studií modelování orálních epitelů *in vitro* pomocí buněčných monovrstev i vícevrstevných konstruktů. Za využití postupů tkáňového inženýrství byla vyvinuta řada *in vitro* modelů BSB, ale ani v tomto případě, stejně jako u excidovaných sliznic, nebyly ustanoveny žádné standardizované modely.<sup>58</sup> Navíc epitel různých oblastí v ústní dutině (jazyk, gingiva, bukální) vykazuje významně odlišné bariérové vlastnosti. Teprve poměrně nedávno byly vyvinuty kultivačně produkované buněčné a tkáňové membrány, které by měly imitovat bariérové vlastnosti sublingvální nebo bukální tkáně. Struktura těchto membrán se pohybuje od keratinizovaných po nekeratinizované, mají různý počet vrstev a různou permeabilitu, slouží především ke studiu vnitřních mechanismů i patologických stavů sliznic.

Pokud jde o membrány ze zvířecích zdrojů, pak platí, že mají ve srovnání s lidskou bukální membránou obvykle nižší permeabilitu. Je to dáno tím, že u většiny zvířecích druhů jsou tyto membrány keratinizovány. Na rozdíl od člověka má většina laboratorních zvířat orální sliznici zcela keratinizovanou, a proto také není pro preformulační a preklinické studie léčiv vhodná. Například potkan nebo křeček mají bukální sliznici s velmi silně keratinizovanou. Jediný laboratorní hlodavec, který má nekeratinizovanou slizniční výstelku podobnou lidské tkáni je králík. Její preparace je ovšem obtížná z důvodu ostrého přechodu na keratinizovanou tkáň a celkově malé plochy.

V současné době většina studií *in vitro* zkoumajících oromukosální absorpci léčiva používá bukální sliznice prasete, která se většinou získává z čelistní a podčelistní oblasti. Dle typického protokolu jsou tyto tkáně odebírány ihned po usmrcení zvířat a transportovány do laboratoře v Krebsově pufru (nebo jiných roztocích) udržovaném při 4 °C. Zpočátku se bukální sliznice i s pojivovou tkání separuje od tkáně svalové, někdy se dále odstraňuje pojivová tkáň. Takto zpracované membrány se potom až do

použití uchovávají v chladném (4 °C) pufru (obvykle izotonizovaný Krebsův pufr). Nevýhodou využití sliznice této oblasti je skutečnost, že se od sublingvální liší jak tloušťkou, tak permeabilitními vlastnostmi. Pro snadnější získávání se převážná většina prací zabývá sliznicí bukální.

Značně důležitá je skutečnost, že při odběru tkání z jatek se také opomíjí skutečnost, že jateční zvíře prochází podle zpracovatelských pokynů hned po porážce relativně agresivním čistícím procesem. Při něm se využívá tlaková voda bez chemických přísad o teplotě 60 °C až 65 °C. Tento postup do značné míry snižuje bakteriální osídlení dostupných povrchů zvířete a následnou kontaminaci při zpracování masa. Je vyladěn tak, aby pro další potravinářské zpracování nepoškozoval kůži, ale současně znamená značnou teplotní zátěž pro sliznice.

Nedostatek v standardizaci metod používaných ke studiu (trans)oromukosální permeace způsobuje, že čerpání smysluplných srovnání z vědecké literatury je jen obtížné. K ilustraci stávající situace jsou níže uvedeny dva typické popisy.

Čerstvá bukální tkáň prasat (stáří 3 měsíce) získaná z jatek byla transportována v izotonickém roztoku do laboratoře. Pokusy na tkáni začaly do 2 hodin po smrti zvířete. Bukální sliznice byla pečlivě separována chirurgickými nůžkami. Pro zajištění reprodukovatelnosti byla nekeratinizovaná bukální sliznice vždy odebrána ze stejné oblasti tváře. Tloušťka řezu se pohybovala od 1 do 1,1 mm.<sup>59</sup>

Prasečí maxilla (z 5 měsíců starého prasete o hmotnosti přibližně 75–80 kg) byla z místních jatek převezena do laboratoře chladném izotonickém fosfátovém pufru (pH 7,4) s ledem. Tento krok netrval déle než 45 minut. Do 2 hodin po porážce byly vzorky sliznice pomocí skalpelu odděleny od tkáně, opláchnuty fyziologickým roztokem a poté odstraněny části sliznice s jakýmkoli viditelným poškozením. Neporušená sliznice byla ponořena do deionizované vody při 65 °C po dobu 60 sekund a epitel byl opatrně oddělen od pojivové tkáně.<sup>60</sup> Bylo uvedeno, že tento postup neovlivňuje integritu epitelu bukální sliznice. V mírných modifikacích lze tento postup nalézt v celé řadě dalších prací. Přitom se obvykle uvádí, že tento postup neovlivňuje integritu epitelu bukální sliznice.

Po prostudování výše uvedených prací bylo zřejmé, že jejich závěry nelze považovat za jednoznačné<sup>56</sup>. Z tohoto poznání vznikla formulace druhého experimentu zaměřená

na šokové zmrazení tenké vrstvy sublingvální membrány, při kterém by hypoteticky nemuselo dojít k nežádoucím procesům popisovaným při pomalém chlazení, totiž porušení buněk vykrytalizovanými látkami a vytvořením krystalků ledu.

### **3.3.1.2 Kryoprotektanty**

Důležitou procedurou je dlouhodobější uchovávání vzorků vypreparované slizniční membrány, které je obvykle spojeno se zmražením membrány. Problematikou se podrobněji v poslední době zabývala práce, z níž je vhodné volně citovat.<sup>56</sup> Několik studií ukázalo, že zmrazení nemá významný vliv na propustnost buňkové sliznice, zatímco jiné zjistily, že zmrazení mělo účinek na permeabilitu.

Tvorba ledových krystalů během zmrazování může způsobit poškození buněk v důsledku buněčného stresu a deformace; dále tvorba ledových krystalů vede ke zvýšení koncentrace rozpuštěných látek, což může způsobit jejich precipitaci a změny pH, a může také vést k poškození tkáně. Je známo několik kryoprotektiv a navrženy různé mechanismy působení kryoprotektantů: (1) interakce (vodíková vazba) s polárními molekulami, např. náhrada vody a vody (2), oba mechanismy vedou ke snížené tvorbě ledových krystalů a tím ke snížení poškození tkáně, zatímco mechanismem dimethylsulfoxidu (DMSO) je (3) tvorba pórů v buněčných membránách.<sup>61</sup> DMSO vykazuje výjimečně vysokou rozpustnost jak pro hydrofilní, tak pro hydrofobní sloučeniny, navíc zvyšuje průnik léčiva.

Kryoprotektanty lze klasifikovat také podle jejich schopnosti proniknout buněčnou membránou na intracelulární nebo extracelulární. Může být výhodné oba typy kombinovat. Při zmrazování prasečí buňkové sliznice v kombinaci s DMSO a hovězím sérovým albuminem (BSA) byly použity v kombinaci glycerol (intracelulární) a sacharóza (extracelulární). Glycerol má nízkou buněčnou toxicitu a může tvořit vodíkové vazby k molekulám vody, čímž snižuje riziko tvorby ledových krystalů. Bylo prokázáno, že sacharóza kromě vodíkových vazeb s vodou interaguje s fosfolipidy a stabilizuje buněčné membrány během vysokých koncentrací rozpuštěných látek v důsledku tvorby ledových krystalů. Upřednostňují se neredukující cukry (sacharóza).

Pro maximální životaschopnost buněk se přitom doporučuje nízká rychlost chlazení.<sup>62</sup>

Jedním z nejúčinnějších a široce používaných kryoprotektivních médií je glycerol. Kryoprotektivní postup založený pro potřeby tkáňových bank obnáší použití

85% glycerolu.<sup>63</sup> Bezprostředně po separaci, byly epitelové tkáně z palatálních (keratinizovaných sliznic) a bukálních (nekeratinizovaných sliznic) ponořeny po dobu 2 hodin do 85% glycerolu za mírného promíchávání. Po uplynutí této doby byl glycerol nahrazen čerstvým glycerolem a vzorky epitelu byly zmrazeny ve standardním mrazáku (-20 ° C) nebo v biomrazničce (-80 °C). Zmrazovací postup byl prováděn pomalou rychlostí přibližně -1 ° C /min-1. Všechny experimenty byly prováděny s použitím tkání alespoň ze tří zvířat.

Protože jsou kryoprotektanty po použití ve sliznici přítomny, zůstávají v ní po neurčitou dobu i v permeačních *in vitro* pokusech. Pravděpodobně tedy ovlivňují intracelulární i mezibuněčné prostory uvnitř membrány, což také nějakým způsobem ovlivňuje sublingvální permeabilitu.

Z uvedeného názoru vyplynul úkol vyzkoušet šokové zmrazení tenké sublingvální membrány bez použití kryoprotektivních látek. Jako kompenzaci z hlediska možných strukturálních změn bylo navrženo předchozí fixování proteinových struktur azidem sodným.

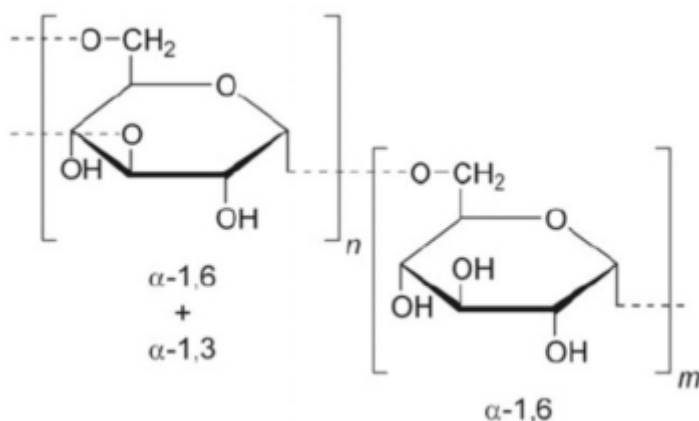
### **3.3.2 Sublingvální vs. bukální sliznice**

Je nutné zdůraznit, že téměř všechny publikované údaje a závěry se dosud týkají prasečí **bukální** sliznice. Navíc také postupy přípravy membrán popsané v různých experimentech jsou odlišné. Lze předpokládat, že tyto metodické problémy popsané pro případ bukální sliznice budou velmi podobné i pro sublingvální sliznici, i když asi nikoli zcela identické. Morfologické a fyziologické rozdíly zde mohou hrát určitou roli.

## **3.4 Studované látky**

### **3.4.1 Dextrany**

Dextrany jsou hydrofilní, ve vodě rozpustné rozvětvené polysacharidy složené z glukózových jednotek (polyglukany) – viz **Obrázek 3**. Přírodní dextrany mají většinou molekulovou hmotnost 9 MDa až 500 MDa s vysokým stupněm polydispersity<sup>64</sup>. Komerčně jsou běžně dostupné dextrany s průměrnou molekulovou hmotností 1 až 2000 kDa<sup>65</sup>. V hlavním řetězci těchto makromolekul jsou hexosové jednotky spojeny vazbou  $\alpha$ -(1→6) a boční větve jsou připojeny vazbami  $\alpha$ -(1→3).<sup>64,66,67</sup>



**Obrázek 3:** Struktura dextransu<sup>66</sup>

Dextran byl poprvé identifikován Louisem Pasteurem jako mikrobiální produkt ve víně<sup>68</sup>. Dextransy jsou syntetizovány ze sacharózy různými bakteriemi rodů *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Streptococcus* z čeledi *Lactobacillaceae*<sup>67</sup>. Ve vodě rozpustné dextransy nerozpustné mutany tvořené *Streptococcus spp.* (hlavně *S. mutans*) vytváří protektivní matici pro kolonie kariogenních bakterií v zubním plaku<sup>64,69</sup>. Průmyslově se využívají hlavně dextransy produkované *Leuconostoc mesenteroides* (dále *Lm*). Stupeň větvení závisí na použitém bakteriálním kmeni, nejčastější dextran produkovaný *Lm* NRRL B-512(F) má stupeň větvení cca 5%<sup>70</sup>. Dextransy jsou komerčně dostupné ve velké šíři molekulových hmotností, od 1 kDa do 2 MDa (hydrodynamický průměr od 1 nm do 54 nm – viz **Tabulka 2**)<sup>71,72</sup>.

**Tabulka 2:** Molekulární rozměry dextransu B512. Adaptováno z Ref.<sup>73</sup> dle Ref.<sup>70</sup>

MW [kDa]	Gyrační poloměr [nm]	Hydrodynamický poloměr [nm]
2 000	38.0	27.0
1 000	27.5	19.9
500	20.0	14.7
200	13.0	9.5
100	9.5	6.9
70	8.0	5.8
50	6.8	5.0
40	6.2	4.5
10		2.4



### 3.4.1.1 Průmyslová výroba dextranů

Většina hlavních producentů dextranů v současnosti používá metodu založenou na kultuře kmenů *Lm* NRRL B512 (F) nebo B512 v přítomnosti sacharózy<sup>64</sup>. Kromě toho, že sacharóza slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy, indukuje produkci enzymu dextransukrasy. Speciální nutriční požadavky pro kultivaci jsou splněny kombinací složek komplexních médií, například kvasničných extraktů, kyselých hydrolyzovaných kaseinů, kukuřičných likérů nebo sladových výtažků s přidáním peptonu nebo tryptonového bujónu<sup>74</sup>.

V praxi probíhá proces fermentace pro získání vysokomolekulárních dextranů většinou při teplotě 25 °C. Při nižších teplotách se zvyšuje podíl nízkomolekulárního dextranu, zatímco při vyšších teplotách dochází k většímu větvení. Další z parametrů ovlivňujících rozvětvení a průměrnou molekulovou hmotnost výsledného produktu je koncentrace sacharózy. S rostoucím obsahem sacharózy se snižuje jak stupeň rozvětvení, tak výtěžek vysokomolekulárního dextranu; optimální podmínky jsou 2–10% koncentrace sacharózy s jejím kontinuálním doplňováním. Po 24 až 48 hodinách fermentace se viskózní kultivační kapalina vysráží v ethanolu nebo methanolu. Získaný nativní dextran má molekulovou hmotnost až 0,5 GDa s poměrně širokou distribucí.<sup>75</sup>

Dextran může být také produkován bez buněk enzymaticky s použitím buněčných supernatantů, které obsahují dextransukrasu<sup>76</sup>. Nízké hladiny dextranu s vysokou molekulovou hmotností, polyethylenglykolu (PEG) nebo neiontových detergentů přitom stabilizují enzym. Nejvyšší aktivita dextransukrasy po purifikaci se dosahuje metodou rozdělávání fází s použitím vodných roztoků dextranu a PEG 6000<sup>77</sup>. Tento postup je jednoduchý, levný a méně časově náročný než jiné způsoby čištění zahrnující ultrafiltraci a chromatografii.

Řízenou hydrolýzou a opakovanou další frakcionací nativního dextranu se získávají produkty s požadovanou molekulovou hmotností nejen pro farmaceutické a klinické, ale i technické využití<sup>64</sup>. Změna koncentrace kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové, doby a teploty hydrolýzy a povahy a poměru precipitátu (alkoholu / vody) pro separaci fází umožňuje kontrolu výsledných průměrných molekulových hmotností získávaných dextranů.

V poslední době byla vyvinuta nová frakcionační metoda, nazývaná kontinuální spinová frakcionace, která zlepšuje účinnost separačního procesu <sup>78</sup>. Použití zvlákňovacích trysek usnadňuje přenos rozpustných, nízkomolekulárních polymerních frakcí do extrakčního činidla do té míry, že úspěšná frakcionace proběhne i u koncentrovaných polymerních roztoků. Přitom může být významně snížena i polydisperzita. Mezi atraktivní alternativní metody výroby dextranových frakcí patří použití dextranas, tedy enzymů degradujících řetězec <sup>79</sup> a akceptorové reakce ukončující řetězec.<sup>80</sup>

### **3.4.1.2 Využití dextranů mimo medicínu**

Dextrany se běžně využívají v různých průmyslových odvětvích. Zesíťované dextrany se používají pro gelovou filtraci pod označením Sephadex „Separation Pharmacia dextran“ <sup>81</sup>. Vzhledem k úzké distribuci molekulové hmotnosti se specifické frakce používají jako standardy pro stanovení molekulové hmotnosti pomocí SEC. Dextrany v rentgenových a jiných fotografických emulzích zlepšují účinnost stříbra bez ztráty jemnosti zrna. Díky svým hydratačním vlastnostem se používají také jako přísada pro kosmetiku a v pekařských výrobcích. Zvýšení teploty tání po přidání nativního dextranu se využívá u zmrazených mléčných výrobků <sup>64</sup>. Vodného dvoufázového systému dextran - PEG se osvědčil při separaci směsi biomolekul a subcelulárních částic,<sup>77,82,83</sup> například při enzymaticky katalyzované syntéze peptidů <sup>84</sup>.

### **3.4.1.3 Medicínské využití dextranu**

V lékařství jsou využívány pro své antitrombotické vlastnosti. Dextrany snižují agregaci erytrocytů a adhezivitu krevních destiček <sup>85</sup>. Větší molekuly pak uplatňují své osmotické vlastnosti a využívají se k léčbě hypovolémie, v současnosti jsou však nahrazovány hydroxyethylškrobem (HES).

Klinické dextrany s molekulovou hmotností 40, 60 a 70 kDa (označované jako dextran 40, 60 a 70) v 6% nebo 10% vodných roztocích jsou v současné době používané pro náhradu mírných ztrát krve. Polymer v podstatě nahrazuje krevní proteiny, např. albuminy, ve smyslu zvýšení či udržení koloidního osmotického tlaku potřebného pro bilanční rovnováhu tekutin intersticiálního prostoru a plazmy. Vzhledem k nízké antigenicitě a vysoké rozpustnosti ve vodě je pro klinické použití vhodný dextran produkovaný linií *Lm* NRRL B-512 (F). Vysoké procento glykosidických vazeb

$\alpha$ -(1→6) v dextransch je zodpovědné za biologickou stabilitu v krevním oběhu člověka<sup>64</sup>.

Antitrombotický účinek dextranů se využívá při profylaktické léčbě hluboké žilní trombózy a pooperační plicní embolie. Dextran 40 zlepšuje průtok krve, což je pravděpodobně způsobeno snížením viskozity krve a inhibicí agregace erytrocytů.

Anafylaktické reakce (DIAR = dextran induced anaphylactoid reactions) se vyskytují u méně než 1% pacientů po infuzi dextranu, navíc je lze omezit podáním dextranu s nízkou molekulovou hmotností (Dextran 1, Mw 1000 Da) jako monovalentního haptenu<sup>86</sup>. Tento nežádoucí účinek je natolik závažný, že vedl ke stažení některých parenterálních přípravků z trhu, například Imferon® byl stažen FDA v roce 1990. Upozornění na riziko alergických reakcí zřejmě bude uváděno v informaci pro pacienty (příbalovém letáku) u parenterálních a inhalačních přípravků obsahujících dextransy.<sup>87</sup>

Dextran 70 je na seznamu esenciálních léčiv WHO (WHO Model List of Essential Medicines<sup>88</sup>). Dextransy se také využívají v očních kapkách jako lubrikant a pro stabilizaci některých iontů v infúzních roztocích<sup>64</sup>.

Přítomnost dextranu ve vodných roztocích napomáhá udržet příznivé fyziologické prostředí v důsledku koloidního osmotického tlaku. Proto se používají při uchovávání životaschopných orgánů např. pro transplantace<sup>64,89</sup> a jako složky pro oční formulace, jako jsou umělé slzy<sup>90</sup>.

Dextran je schopen zabránit opsonizaci proteiny, a proto se používá pro modifikace povrchů, např. potahování feritových částic pro hypertermickou léčbu rakoviny. Vodný dvoufázový systém dextranů a PEG se osvědčil pro separaci směsí biomolekul a subcelulárních částic, například při syntéze peptidů katalyzované enzymem<sup>64,91</sup>.

#### **3.4.1.4 Farmakokinetika dextranů**

Farmakokinetika dextranů po systémové aplikaci byla podrobně studována již v padesátých letech minulého století<sup>92,93</sup> a její parametry jsou vysoce závislé na molekulové hmotnosti. Velké dextransy (Mw > 40 kDa) jsou ledvinami vylučovány jen pomalu a zůstávají v těle po řadu týdnů, zatímco malé dextransy (Mw < 20 kDa) jsou z těla vyloučeny rychle<sup>94,95</sup>. Kromě velikosti molekuly a podané dávky ovlivňuje osud dextranu v organismu také jejich náboj. Pozitivně nabitě radioaktivně značené dextransy

se rychle vylučovaly z plazmy myši s nádorem a hromadily se ve tkáních, včetně jater<sup>96</sup>. Negativně nabitě dextrany však setrvaly v systémové cirkulaci déle a méně pronikaly do tkání. Pomalejší eliminace aniontových dextranů je přičítána negativním nábojům na většině biologických membrán, které brání průchodu podobně nabitých molekul<sup>97,98</sup>.

V této souvislosti stojí za zmínku, že molekula fluoresceinu má při fyziologickém pH záporný náboj. Nicméně stupeň substituce ve značených FITC-dextranech je velmi nízký (0.003-0.008 molu fluoresceinu na mol glukózy), takže lze předpokládat, že se kinetika FITC-dextranů nebude lišit od neutrálních dextranů<sup>95</sup>.

#### **3.4.1.5 Dextrany jako nosiče léčiv**

Díky jejich farmakokinetickým vlastnostem a současně velkému počtu volných hydroxylových skupin, které mohou být snadno konjugovány s léčivy (včetně peptidů a proteinů) a to jednak přímo nebo pomocí linkeru, jsou dextrany považovány za ideální nosiče pro systémovou aplikaci léčiv s možností cílení na specifická místa účinku jak pasivně, tak aktivními mechanismy<sup>64,95</sup>. Výhodou dextranů je také jejich biokompatibilita a biodegradabilita<sup>99</sup>.

Vazbou na dextran lze dosáhnout různých vylepšení vlastností léčiva<sup>100</sup>, například zvýšení rozpustnosti (např. u oxytocinu<sup>101</sup>), zvýšení vychytávání v lymfatických uzlinách (bleomycin<sup>102</sup>), zvýšení terapeutického účinku (isometamidium<sup>103</sup>), snížení nefrotoxicity (gentamicin<sup>104</sup>), cílení do jater (acyclovir<sup>105</sup>), zvýšení analgetického a antipyretického účinku při snížení ulcerogenicity (flurbiprofen a suprofen<sup>106</sup>), snížení hepatotoxicity a ulcerogenicity (valproát<sup>107</sup>).

Vazbou enzymů na dextran lze zvýšit jejich stabilitu při fyziologickém pH i jejich termální stabilitu, prodloužit jejich biologický poločas a snížit riziko výskytu alergických reakcí při opakovaném podání<sup>108</sup>.

#### **3.4.1.6 Způsoby navázání léčiva na dextranový řetězec**

Léčiva obsahující skupinu schopnou reakce s volnými hydroxylovými skupinami dextranu (např. karboxylové kyseliny) mohou být připojena přímou esterifikací<sup>95</sup>. Tuto metodu použila například skupina Larsen et al. k připojení různých nesteroidních

antiflogistik (NSAIDs): naproxenu<sup>109</sup>, indomethacinu<sup>110</sup>, diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu a fenoprofenu<sup>111</sup>.

Pro připojení léčiv bez přímo reagujících skupin je třeba molekulu dextranu nejprve aktivovat. To lze provést několika způsoby:

- a) oxidací s jodistanem sodným s následnou tvorbou Schiffovy báze s aminoskupinou. Relativně nestabilní vazbu lze stabilizovat redukcí s borohydridem sodným. Tento způsob se využívá pro navázání peptidů (např. enzymů) a proteinů. Takto byly navázány např. chymotrypsin<sup>112</sup>, insulin<sup>113</sup> i některé malé molekuly jako daunorubicin<sup>114</sup>.
- b) reakcí s halogenkyany a následnou reakcí s aminoskupinou navazovaného léčiva. Tento způsob byl použit pro navázání např. insulinu<sup>115</sup>, aprotininu<sup>116</sup> a sójového inhibitoru trypsinu<sup>117,118</sup> a také ampicilinu<sup>115</sup>
- c) aktivací fosgenem pro připojení léčiv s hydroxy- a amino- skupinami za tvorby karbonátu resp. karbamátu (urethanu). Touto metodou byl k molekule dextranu připojen například insulin<sup>119</sup>.

Kromě přímého napojení léčiva k dextranovému řetězci se využívá i tzv. linkerů a to hlavně ze dvou důvodů:

- a) k připojení léčiv neobsahujících skupiny reagující s dextranem (např. kortikosteroidy methylprednisolon a dexamethason byly připojeny pomocí kys. jantarové, resp. glutarové<sup>120</sup>).
- b) k řízení uvolňování navázaných léčiv pomocí změn pH nebo enzymatického štěpení, např. Larsen et al. ukázali, že uvolňování metronidazolu z dextran-metronidazolu závisí na použitém linkeru<sup>121</sup>. V jiné studii bylo zkoumáno uvolňování mitomycinu C.<sup>122</sup>

#### **3.4.1.7 Příklady**

Od sedmdesátých let minulého století byly zkoumány konjugáty dextranů s různými léčivy. Nejvíce příkladů by se pravděpodobně našlo ve výzkumu **protinádorových léčiv**: antracyklin doxorubicin<sup>114,123–125</sup>, protilátky<sup>126–128</sup>, ara-C<sup>129</sup>, asparaginasa<sup>130</sup>, methotrexát<sup>131,132</sup>, mitomycin C<sup>122</sup>, cisplatin<sup>133–135</sup>, magnetické nanočástice pro léčbu nádorů pomocí hypertermie<sup>136,137</sup>, radionuklidy <sup>125</sup>I<sup>138</sup> a <sup>99m</sup>Tc.<sup>139</sup>

Další skupinou jsou již zmínené **NSAIDs** (naproxen<sup>109</sup>, indomethacin<sup>110</sup>, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen a fenoprofen<sup>111</sup>), jejichž konjugáty s dextranem připravené Larsenem et al. uvolňovaly léčivo po perorálním podání v tlustém střevě.<sup>140,141</sup>

Na podobném principu bylo zkoušeno také cílení **kortikosteroidů** methylprednisonu<sup>142</sup> a dexamethasonu<sup>143,144</sup> vazbou na dextran pro léčbu Crohnovy choroby.

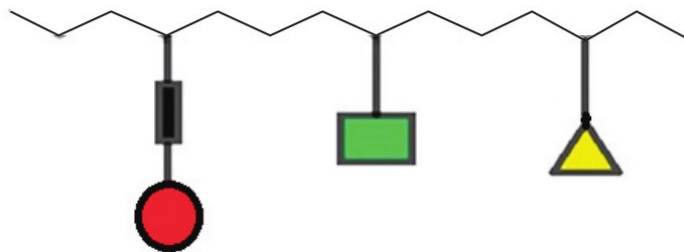
Z dalších látek vázaných na dextrany lze uvést

- **enzymy, proteiny a peptidy** ( $\alpha$ -amylasa, arginasa, asparaginasa, karboxypeptidasa, katalasa,  $\beta$ -galaktosidasa, hyaluronidasa, NAD<sup>+</sup>, streptokinasa, papain,  $\alpha$ -chymotrypsin<sup>112</sup> a trypsin<sup>145</sup>, glutathion<sup>146</sup>, hemoglobin<sup>147</sup>, insulin<sup>113,115,119</sup>),
- **antibiotika** (ampicilin<sup>115</sup>, penicilin<sup>148</sup>, polymyxin B<sup>149</sup>, streptomycin<sup>150</sup>),
- **imunosupresiva** (methylprednison<sup>151–153</sup>, takrolimus<sup>154</sup>).

K **léčbě leishmaniázy** byl zkoušen komplex dextranu a hydroxidu antimonného<sup>155</sup>, k **léčbě anémie** a deficiencie železa se používá komplex dextranu a hydroxidu železitého<sup>156–158</sup>. Komplexy technecia <sup>99m</sup>Tc s dextranem byly zkoušeny v kardioangiografii<sup>159</sup>, k diagnostice enteropatie se ztrátou proteinů<sup>160</sup>, gastrointestinálního krvácení, ulcerativní kolitidy<sup>161</sup> a zánětu<sup>162</sup>. Jako kontrastní látky pro magnetickou resonanci (MRI) byly zkoušeny paramagnetické cheláty gadolinia s diethylenetriaminpentaocetovou kyselinou (DTPA) a dextranu<sup>163</sup>, i superparamagnetické částice oxidu železa.<sup>164</sup>

#### **3.4.1.8 Pokročilejší kombinace:**

Na dextran lze navázat i více různých látek, například kombinaci léčiva, připojeného přes pH senzitivní linker a protilátku, zajišťující vychytávání v cílové tkáni (podobně jako na **Obrázek 4**), např. kombinace methotrexátu a anti-HLA IgG1 protilátky navázaných na dextranovém řetězci<sup>131</sup>. Chau et. al připravili konjugát dextranu s methotrexátem navázaným přes peptidový linker (Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly), štěpitelný matricovými metaloproteinasy II (MMP-2) a IX (MMP-9), které jsou ve zvýšené míře exprimovány v nádorech<sup>165</sup>.



**Obrázek 4:** Ringsdorfův model polymerního proléčiva: léčivo (**červený** kruh) navázáno přes spojku (**černý** svislý obdélník; spacer / linker) na polymerní kostru, na kterou je dále navázána solubilizační složka (**zelený** obdélník) a naváděcí část (**žlutý** trojúhelník; targeting moiety). Adaptováno z Ref. <sup>166</sup>

#### 3.4.1.8.1 Nanočástice s dextransy

Využití dextranů při přípravě nanočástic shrnuje v přehledném článku např. Liu et al. <sup>167</sup>: Do nanočástic připravených komplexací dextran sulfátu a chitosanu enkapsulovali Sarmiento et al. (2006) <sup>168</sup> insulin a Tiyaboonchai et al. <sup>169</sup> amfotericin B; dextran s navázanými poly( $\epsilon$ -kaprolakton)ovými (PCL) řetězci využili k přípravě nanočástic Gref et al. (2002) <sup>170</sup> a Lemarchand et al. (2004) <sup>91</sup>; dextran s navázanými poly(methyl metakrylát)ovými (PMMA) řetězci použil k přípravě nanočástic Passirani et al. <sup>171</sup>; nanočástice z dextranu s navázanými poly(isobutyl kyanoakrylát)ovými (PIBCA) řetězci připravili Bertholon et al. (2006) <sup>172</sup> a Chauvierre et al. <sup>173</sup>.

#### 3.4.1.8.2 Liposomy s dextransy

Přípravu liposomů s dextransy shrnuje v přehledovém článku Mufamadi et al. <sup>174</sup>: Liposomy s interleukinem-2 v injektabilním dextranovém hydrogelu připravil De Groot et al. (2002) <sup>175</sup>; Stenekes et al. (2000) enkapsulovali liposomy do dextranových mikrosfér, ze kterých se uvolňovaly po dobu až 100 dní <sup>176</sup>; Liptay et al. (1998) zkoušeli transfekční aktivitu rDNA enkapsulované v kationických liposomech s dextransy <sup>177</sup>. Dextransy byly zkoušeny i pro přípravu „stealth“ liposomů, ale PEG se ukázaly jako lepší, protože mají ohebnější řetězec. <sup>178</sup>.

#### 3.4.1.9 Léčiva na trhu

V aktuálním seznamu všech registrovaných humánních léčivých přípravků (včetně specifických léčebných programů, s výjimkou homeopatik) v České Republice <sup>179</sup> není v současnosti (tj. k 28.7.2019) uveden **žádný** léčivý přípravek s ATC kódem B05AA05 (Krevní deriváty, frakce plazmatických bílkovin, náhrady plazmy – Dextran).

Mezi přípravky pro *i.v.* podání železa pod ATC kódem B03AC (Parenterální přípravky obsahující trojmocné železo), kde jsou zařazeny komplexy železa se sacharidy (isomaltosid, karboxymaltóza, glukonát a sacharóza) se komplexy s dextranskem také nevyskytují. Žádný v současné době registrovaný přípravek s dextranskem se v tomto seznamu nepodařilo najít ani pod žádným z názvů uvedených v **Tabulka 3**.

V seznamu aktuálně registrovaných veterinárních léčivých přípravků<sup>180</sup> se podařilo ke dnešnímu dni nalézt tři s účinnou látkou „Dextraferranum“: Ferribion, Gafervit a Gafervit mitte, žádný aktuálně registrovaný přípravek s účinnou látkou „Dextranum“, ani s další nabízenou možností „DEAE-dextran“ (diethylaminoethyl-dextran).

Používání intravenózních přípravků obsahujících komplexy železa s dextranskem v humánní léčbě ustupuje do pozadí kvůli riziku závažných alergických reakcí, nicméně zůstávají používána ve veterinární medicíně, např. u anémie selat z nedostatku železa.<sup>181</sup>

Ústup od jejich používání však mohl být způsoben nesprávným vyhodnocením srovnávacích studií, jak uvádí Auerbach a Macdougall: „Na základě všech prospektivních a intrainstitucionálních retrospektivních studií jsou s výjimkou komplexu železa s vysokomolekulárním dextranskem zbývající formulace bezpečné a pravděpodobně mnohem bezpečnější, než si většina lékařů uvědomuje.“<sup>182</sup>

Feraheme® je léčivo pro léčbu deficiencie železa intravenózní infuzí, obsahující ferumoxytol. Ferumoxytol je nestechiometrický magnetit (superparamagnetický oxid železa) potažený karboxymethyletherem sorbitol–dextranskem (PSC; polyglucose sorbitol carboxymethyl ether). Hlavní řetězec PSC (polyglucose sorbitol carboxymethyl ether) sestává z molekul glukózy spojených  $\alpha$ -(1→6) glykosidickými vazbami,  $C_6H_{11}O_5-$  ( $C_6H_{11}O_5$ )<sub>60</sub> se 14 ( $C_2H_2O_2Na$ ) karboxylátovými skupinami<sup>183</sup>. Koloidní částice mají průměr 17–31 nm. Sumární chemický vzorec Feraheme® je  $Fe_{5874}O_{8752}-C_{11719}H_{18682}O_{9933}Na_{414}$  se zdánlivou molekulovou hmotností 750 kDa.<sup>184</sup>



**Tabulka 3:** Nanočásticové přípravky s dextranem uvedené na trh<sup>182,185–191</sup>

Název (firma)	Přípravek	Indikace / benefit	Rok schválení FDA
INFeD® (Sanofi Avertis) Infufer (Sabex) CosmoFer (Pharmacosmos / B. Braun) Feosol (GlaxoSmithKline) Imferon (Sanofi-Aventis) Proferdex (New River Pharmaceuticals)	Fe dextran (Mw 165 kDa)	deficit Fe při CKD / umožňuje zvýšení dávky Fe	1957 - 2009**
DexIron®/Dexferrum® (Sanofi Avertis / American Regent)	Fe dextran (Mw 265 kDa)	deficit Fe při CKD / umožňuje zvýšení dávky Fe	1957 - 2009**
Feraheme® (AMAG Pharmaceuticals) Rienso®	Ferumoxytol* (Mw 750 kDa, 30nm)	deficit Fe při CKD / umožňuje zvýšení dávky Fe	2009
		deficit Fe / umožňuje zvýšení dávky Fe	2018
		kontrastní látka pro MRI / zlepšení kontrastu	??
Feridex®/Endorem® (AMAG Pharmaceuticals)	SPION potažené dextranem (80-150 nm)	kontrastní látka pro MRI / zlepšení kontrastu	1996 - 2008**
Ferucarbotran Resovist® (Bayer) Cliavist™ (Bayer) Ferrixan	SPION potažené karboxydextranem (60 nm)	kontrastní látka pro MRI / zlepšení kontrastu, vychytávání v RES	?? - 2009**
Sinarem® Combidx®	USPIO potažené dextranem (20-40 nm)	kontrastní látka pro MRI / zlepšení kontrastu	2005 - 2007**

\* SPIO potažené modifikovaným dextranem (PSC = polyglucose sorbitol carboxymethyl ether);

\*\* kolem roku 2009 staženy z trhu (kvůli riziku závažných alergických reakcí);  
CKD = chronické renální poškození (chronic kidney disease); MRI = zobrazování magnetickou  
rezonancí; SPIO = superparamagnetické částice oxidů železa; USPIO = Ultrasmall  
SuperParamagnetic Iron Oxide

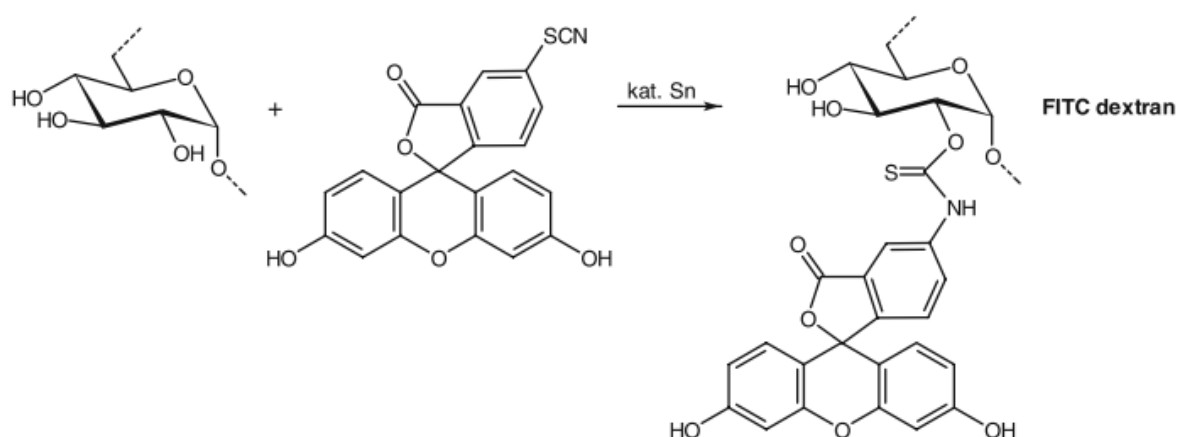
### 3.4.1.10 Permeabilita dextranů

Ukazuje se tedy, že dextransy mají mnoho využití, které se navíc po úpravách dá nadále rozšířit. V souladu s tématem práce se zaměříme na studium jejich permeability, neboť jsou použitelné jako nosiče léčiv.

### 3.4.2 FITC dextransy

Nedocenitelné služby při studiu mikrocirkulace a permeability poskytují fluorescenčně značené dextransy různých molekulových hmotností s různými substituenty, které jsou komerčně dostupné. Fluorescein isothiokyanát (FITC) dextran se v tomto odvětví výzkumu dobře zavedl již od 70. let 20. století.

Isothiokyanátová skupina fluoresceinu se kovalentně váže na dextran za vzniku nízko substituovaného FITC dextranu (stupeň substituce (DS) 0.004–0.01), viz **Obrázek 5**



**Obrázek 5:** Příprava fluorescenčně značených dextranů (FITC dextransy) pomocí fluorescein isothiokyanátu. Převzato z Ref. <sup>192</sup> dle Ref. <sup>64</sup>

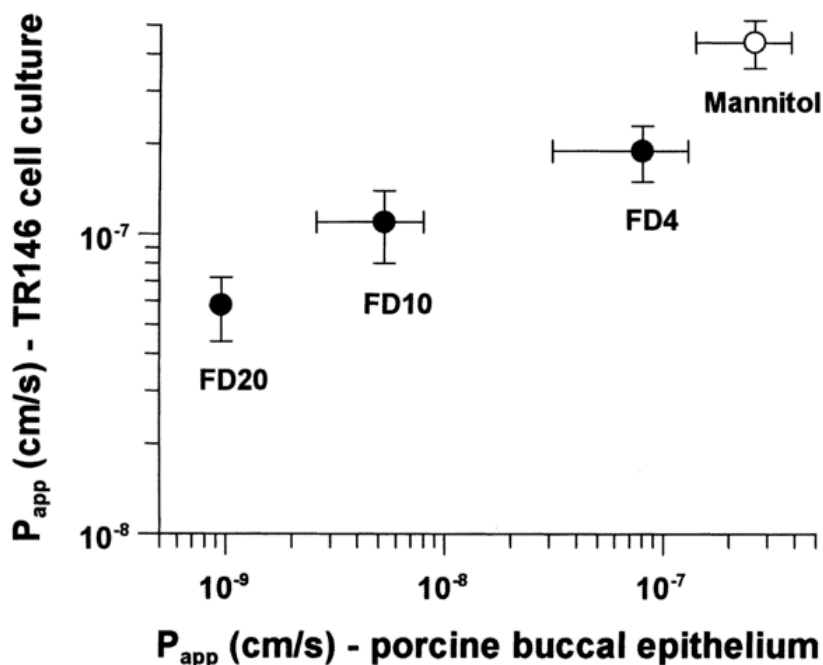
#### 3.4.2.1 Permeace FITC dextranů přes ústní sliznici

Již Tolo a Jonsen v roce 1975 zjistili, že přes králičí orální mukózu *in vitro* prochází radioaktivně značené dextransy až do velikosti 70 kDa. <sup>193</sup> Většina následujících měření v oblasti ústní dutiny se prováděla na bukálních membránách.

Hoogstraate et al. (1996) <sup>194,195</sup> zkoumali průnik FITC-dextranu 4,4 kDa (FD4) přes prasečí bukální sliznici *in vivo*, s glykodeoxycholátem sodným jako enhancerem (resp. urychlovačem). Bukální podání 200  $\mu$ L 20 mM roztoku FD4 v „Hill Top komůrce“ vedlo v průběhu 4 hodin k hodnotám absolutní biologické dostupnosti na úrovni 1,8%. Současné podávání 10 mM (0,45% m/v) glykodeoxycholátu zvýšilo biologickou dostupnost FD4 až na 12,7%. Po aplikaci bylo pozorováno rychlé dosažení ustáleného stavu, který trval až do odstranění permeační komůrky. V případě podání 39 mM roztoku peptidu buserelinu (1,2 kDa) vedlo současné podání 10 mM glykodeoxycholátu ke zvýšení biologické dostupnosti z 1,0% na 5,3%.

Van der Bijl et al. (1998) <sup>196</sup> porovnávali průchod FD4 a FD12 přes lidskou vaginální a bukální membránu *in vitro*. FD4 procházel přes obě porovnávané membrány podobně, FD12 procházel přes bukální sliznici významně rychleji než přes vaginální membránu.

Nielsen et al. (1999) <sup>197</sup> nechali procházet FITC-dextrany o různé velikosti (4 kDa až 40 kDa) přes buněčnou kulturu TR146, jako *in vitro* model lidské bukální sliznice a porovnali získané hodnoty zdánlivých permeačních koeficientů  $P_{app}$  s hodnotami z prasečí bukální sliznice, také při použití glykocholátu jako urychlovače absorpce. Hodnoty  $P_{app}$  jak přes prasečí bukální sliznici *in vitro* (FD4:  $8 \cdot 10^{-8}$  cm/s, FD10:  $0,5 \cdot 10^{-8}$  cm/s a FD40:  $0,1 \cdot 10^{-8}$  cm/s), tak přes buněčnou kulturu TR146 (FD4:  $19 \cdot 10^{-8}$  cm/s, FD10:  $11 \cdot 10^{-8}$  cm/s a FD40:  $0,65 \cdot 10^{-8}$  cm/s) lineárně klesaly s rostoucí Mw FITC-dextranu (viz **Obrázek 6**) Buněčná kultura TR146 byla zřetelně propustnější než prasečí bukální sliznice a zvýšení Mw FITC-dextranu u ní vedlo k menšímu snížení propustnosti než přes prasečí bukální sliznici.



**Obrázek 6:** Logaritmičké znázornění vztahu zdánlivých permeačních koeficientů  $P_{app}$  14C-mannitolu (○) a FITC-dextranů (●) FD4, FD10 a FD20 přes prasečí bukální epitel (osa X) a buněčnou kulturu TR146 (osa Y). Adaptováno z Ref. <sup>197</sup>

Junginger et al. (1999) <sup>2</sup> zkoušeli měřit průnik FITC dextranů 4,4 kDa, 9,4 kDa, 19,6 kDa a 35,6 kDa přes prasečí bukální sliznici *in vitro*. Čerstvé vzorky sliznice byly do

laboratoře transportovány v Krebsově pufru o pH 7,5, doba mezi porážkou zvířat a zahájením permeačního experimentu byla cca 2 hodiny. Permeace probíhala přes plochu 0,75 cm<sup>2</sup> dermatomované membrány o tloušťce cca 500 μm v Ussingových komůrkách při 34 °C. Hodnoty permeačního koeficientu pro FD4:  $1,12 \cdot 10^{-8}$  cm/s; pro FD10:  $2,96 \cdot 10^{-8}$  cm/s, ale signifikantně se od sebe nelišily; pro FD20 a FD40 byly naměřené hodnoty pod detekčním limitem  $0,05 \cdot 10^{-8}$  cm/s. Konfokální mikroskopie ukázala, že FITC dextrany FD4 a FD10 procházejí přes bukální sliznici hlavně paracelulární cestou.

Patel et al. (2013) <sup>198,199</sup> zvýšili průchod fluorescenčně značených dextranů (3 kDa a 10 kDa), parvalbuminu (12 kDa) a bovinního sérového albuminu (BSA, 66 kDa) přes prasečí bukální membránu a přes vrstvy polymerních hydrogelů *in vitro* pomocí iontoforézy cca 30 až 40krát. Vzorčky prasečí bukální membrány byly uloženy při -70°C, další detaily o jejich zpracování autoři neuvádějí. Naměřené hodnoty difuzních koeficientů pro FD3:  $3,13 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup>/s, FD10:  $2,50 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup>/s a 12kDa parvalbumin:  $2,10 \cdot 10^{-13}$  m<sup>2</sup>/s. Průchod BSA bukální membránou nebyl potvrzen.

Goswami et al. (2009) <sup>41</sup> použili FITC dextran 20 kDa (FD20) při studii průchodu různých velkých polyethylenglykolů (PEGs) jako marker integrity sublingválních a bukálních prasečích membrán. Membránu považují za porušenou, pokud projde více než 0.6% FD20 za hodinu. Membrány uchovávali ve fosfátovém pufru o pH 7,4, chirurgickými nůžkami odstranili přebytečnou tkáň tak, aby získali membránu o tloušťce 450 až 550 μm a použili ji v permeačním experimentu do 2 hodin od porážky zvířete (tj. čerstvé). Podobně jakožto marker integrity zpracovávaných membrán již FD20 používali Nicolazzo et al. (2003) <sup>200</sup> při pokusech s permeací kofeinu a estradiolu přes různě zpracované membrány.

Lze shrnout, že permeabilita větších dextranů přes neporušené membrány je tedy velmi limitovaná, což z větších dextranů činí dobrý marker integrity při permeabilitních pokusech s menšími látkami. A i nejmenší FD4 prochází bukálními membránami jen obtížně, byť se jeho podání dá zlepšit pomocí urychlovačů.

### **3.4.2.2 Permeace FITC dextranů přes kůži**

Nejmenší fluorescenčně značený dextran FD4 byl také testován pro průchod přes kůži, a i když sám o sobě neprochází, tak je možné jeho transdermální průnik zesílit,

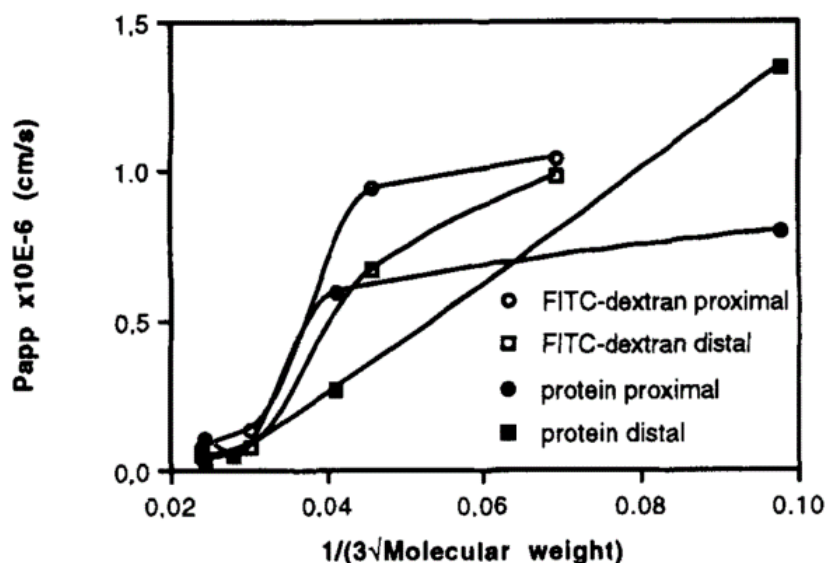
například použitím sonoforézy a mikrojehel, jak ukázal ve své studii Pamornpathomkul et al. 2015<sup>201</sup> přes prasečí kůži *in vitro* ve Franzových difúzních celách.

Suarato et al. (2018)<sup>202</sup> vyzkoušeli průchod FD4 přes myší kůži *in vitro* v novém kompaktním typu difúzní komůrky vyrobené 3D tiskem, umožňující sledování průchodu fluorescenčně značených molekul v reálném čase pomocí invertovaného mikroskopu. Vypočtená difuzivita FD4 byla cca  $2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ .

### 3.4.2.3 Permeace FITC dextranů přes střevní stěnu

I když průchod přes kůži není pro většinu dextranu možný, průchod přes střevní stěnu je naopak snadnější než přes bukální sliznice.

Pantzar et al. (1993)<sup>203</sup> porovnávali průnik FITC-dextranů o velikostech od 3 kDa do 70 kDa a proteinů o různé velikosti molekuly, konkrétně vasopresinu (1,1 kDa),  $\alpha$ -laktalbuminu (14,5 kDa), ovalbuminu (45 kDa) a bovinního sérového albuminu (BSA, 67 kDa), přes stěnu různých úseků potkaního tenkého střeva *in vitro* v Ussingových komůrkách. Průchod sliznicí byl nepřímo úměrný molekulové hmotnosti. Hodnoty zdánlivých permeačních koeficientů  $P_{app}$  získané u těchto dvou typů makromolekul byly pro odpovídající molekulové hmotnosti podobné (viz **Obrázek 7**). Dextrany byly navrženy k využití jako markerů odrážejících průchod proteinů přes střevní membrány.



**Obrázek 7:** Vztah zdánlivých permeačních koeficientů ( $P_{app}$ ) přes potkaní tenké střevo *in vitro* pro dextrany (prázdné) a proteiny (plné) a jejich molekulové hmotnosti

(uvedené jako  $(\sqrt[3]{Mw})^{-1}$ ) v distálním (čtverce) a proximálním (kruhy) směru. Adaptováno z Ref. <sup>203</sup>

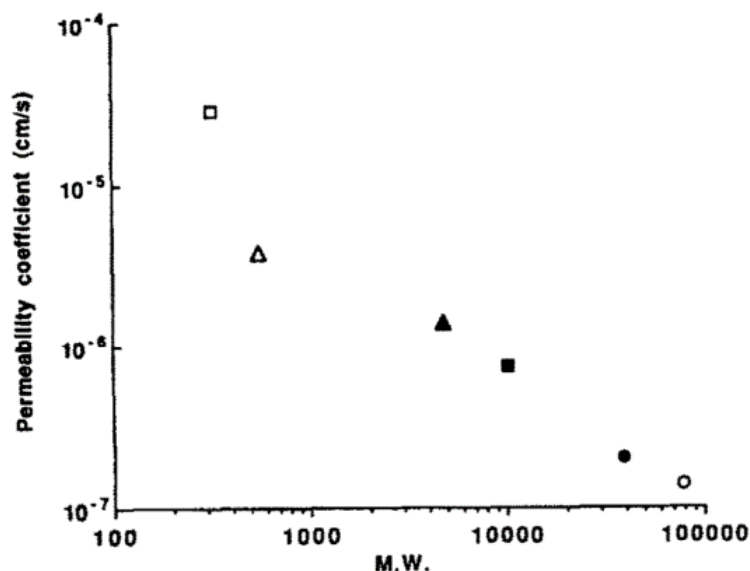
Makhlof et al. (2011) <sup>204</sup> zvýšili průnik FD4 přes monovrstvu CaCo-2 buněk *in vitro* i přes potkaní střevo *in vivo* pomocí nanočástic. Hodnota zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$  FD4 přes vrstvu CaCo-2 buněk při podání v nanočásticích ze sperminu a kyseliny polyakrylové činila  $6,57 \cdot 10^{-7}$  cm/s, což bylo cca 5,56krát více než při aplikaci volného FD4 ( $1,18 \cdot 10^{-7}$  cm/s). Při *in vivo* pokusu zvýšilo podání FD4 v nanočásticích relativní intenzitu fluorescence na basolaterální straně stěny potkaního ilea po 2h cca 20krát a ještě po 8h cca 7krát oproti orálnímu podání roztoku FD4.

Karavasili et al. (2015) <sup>205</sup> studovali zvýšení průchodu FD4 přes monovrstvu střevních CaCo-2 buněk a tohoto dextransu a radioaktivně značeného BSA přes potkaní jejunum. Hodnota  $P_{app}$  přes CaCo-2 buňky ( $0,82 \cdot 10^{-6}$  cm/s) byla při podání s lipidům-podobnými peptidy zvýšena 5krát až 7,6krát. V přítomnosti lipidu-podobného peptidu ac-A6D-COOH prošlo přes potkaní jejunum za 120 minut 3,46 % FITC-dextran a 2,61 % BSA, zatímco bez tohoto peptidu prošlo jen 2,33 % FITC dextransu a 1,99 % BSA.

#### **3.4.2.4 Permeace FITC dextransů přes nosní sliznici**

Nosní sliznice je dalším možným vstupem do krevního oběhu, kterého by mohlo být využito pro transport léčiv pomocí dextransového nosiče.

Kubo et al. (1994) <sup>206</sup> studovali průchod propranolol hydrochloridu, kromoglykátu sodného, FITC dextransů o různé velikosti (FD4 (4,4 kDa); FD10 (9,4 kDa); FD40 (35,6 kDa) a FD70 (71,2 kDa)), a přes králičí nosní sliznici *in vitro* v Ussingových komůrkách po 6 h a naměřili jejich hodnoty koeficientu permeability (cm/s)  $2,554 \cdot 10^{-5}$ ;  $3,428 \cdot 10^{-6}$ ;  $1,275 \cdot 10^{-6}$ ;  $0,677 \cdot 10^{-6}$ ;  $0,181 \cdot 10^{-6}$  a  $0,126 \cdot 10^{-6}$  (viz **Obrázek 8**). Také zkoumali vliv vybraných enhancerů permeability (glykocholátu sodného, taurocholátu sodného, deoxycholátu sodného a taurodihydrofusidátu sodného) na průchod FD10. Všechny urychlovače rychle snížily hodnotu transmukosálního elektrického odporu. Deoxycholát a taurodihydrofusidát sodný zvýšily průnik FD10 více než ostatní dva urychlovače, ale také více poškodily řasinkový epitel.



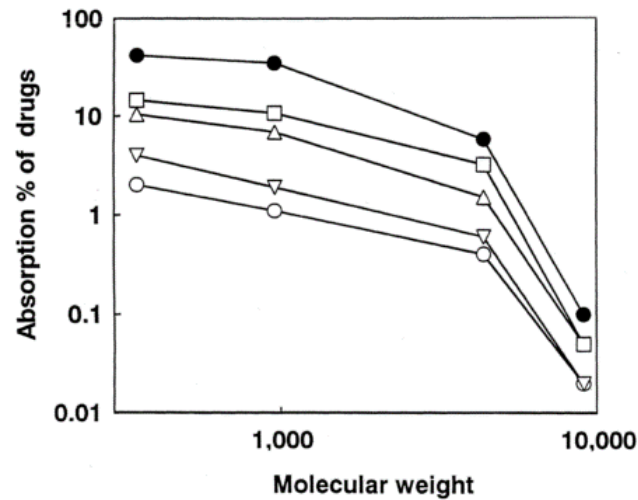
**Obrázek 8:** Vztah molekulové hmotnosti a zdánlivých permeačních koeficientů přes králičí nosní sliznici *in vitro* pro propranolol hydrochlorid (□), cromoglykát sodný (Δ), FD4 (▲), FD10 (■), FD40 (○) a FD70 (●). Adaptováno z Ref. <sup>206</sup>.

Schmidt et al. (1998) <sup>207</sup> shrnuli poznatky ze studií z *in vitro* modelů prostupu různých látek přes nosní sliznici. Hodnota koeficientu permeability FD4 přes lidské primární buněčné kultury ( $1,8 \cdot 10^{-7}$  cm/s) <sup>208</sup> byla nižší než přes králičí nosní epitel *in vitro* ( $2-3 \cdot 10^{-6}$  cm/s) <sup>206,209</sup>.

### 3.4.2.5 Srovnání permeace FITC dextranů přes různé membrány

Z předchozích odstavců vyplývá, že fluorescenčně značené dextrany procházejí rozdílnými sliznicemi rozdílně rychle.

Yamamoto et al. (2001) <sup>210</sup> zkoumali průchod fenolové červeně, tropanové modři, FITC dextranů 4 kDa a 10 kDa přes různé sliznice potkana *in vivo*. Přes bukální sliznici se během 4 hodin absorbovalo 0,4 % FD4 a 0,02 % FD10, což bylo nejméně ze zkoumaných sliznic. Vzestupně podle množství absorbovaného FD4: bukální < tlusté střevo < nosní < tenké střevo < plicní (viz **Obrázek 9**).



**Obrázek 9:** Srovnání propustnosti léčiv s různou molekulovou hmotností přes rozdílné sliznice (plicní (●), nosní (Δ), bukální (○), tenké střevo (□) a tlusté střevo (▽)). Upraveno dle Ref. <sup>210</sup>.

Když doplníme do seznamu ještě kožní membránu a zmíněné výsledky z předchozích odstavců (viz **Tabulka 4**), lze shrnout, že:

- i) permeabilita dextranů je nepřímo úměrná molekulové hmotnosti; dále
- ii) membrány jsou nejpropustnější v pořadí  
plicní > tenké střevo > nosní > tlusté střevo > bukální > kožní ;  
a nakonec
- iii) výzkum permeace v ústní dutině se zaměřil pouze na bukální membrány, přičemž sublinguální sliznice je stále poměrně neprobádanou možností transportu.



**Tabulka 4:** Přehled naměřených hodnot zdánlivého permeabilního koeficientu ( $P_{app}$ ) přes různé membrány

membrána	dextran	$P_{app}$ [cm/s]	Reference
prasečí bukální	FD4	$8 \cdot 10^{-8}$	197
	FD10	$5 \cdot 10^{-9}$	197
	FD40	$1 \cdot 10^{-9}$	197
	FD4	$1,12 \cdot 10^{-8}$	2
	FD10	$2,96 \cdot 10^{-8}$	2
	FD20	$< 5 \cdot 10^{-10}$	2
	FD40	$< 5 \cdot 10^{-10}$	2
CaCo-2	FD4	$1,18 \cdot 10^{-7}$	204
	FD4 + NP	$6,57 \cdot 10^{-7}$	204
	FD4	$8,2 \cdot 10^{-7}$	205
králíčí nosní	FD4	$1,275 \cdot 10^{-6}$	206
	FD10	$0,677 \cdot 10^{-6}$	206
	FD40	$0,181 \cdot 10^{-6}$	206
	FD70	$0,126 \cdot 10^{-6}$	206

### 3.4.3 Albumin

Název albuminu vychází ze staroněmeckého označení pro bílkovinu „*albumen*“, které pochází z latinského *albus* (bílý), značící jeho přítomnost ve vaječném bílku.<sup>211,212</sup> Označení albumen se stále používá pro vaječný bílek, urinární proteiny a pro šnečí sekret.<sup>212</sup> Přítomnost bílkoviny (albuminu) v moči lidí s onemocněním ledvin zaznamenal ve svých Aforismech již Hippokrates<sup>213</sup>, Paracelsus jej v 16. století vysrážel z moči kyselinou octovou a ke konci 18. století se totéž podařilo Frederiku Dekkersovi zahříváním<sup>212</sup>.

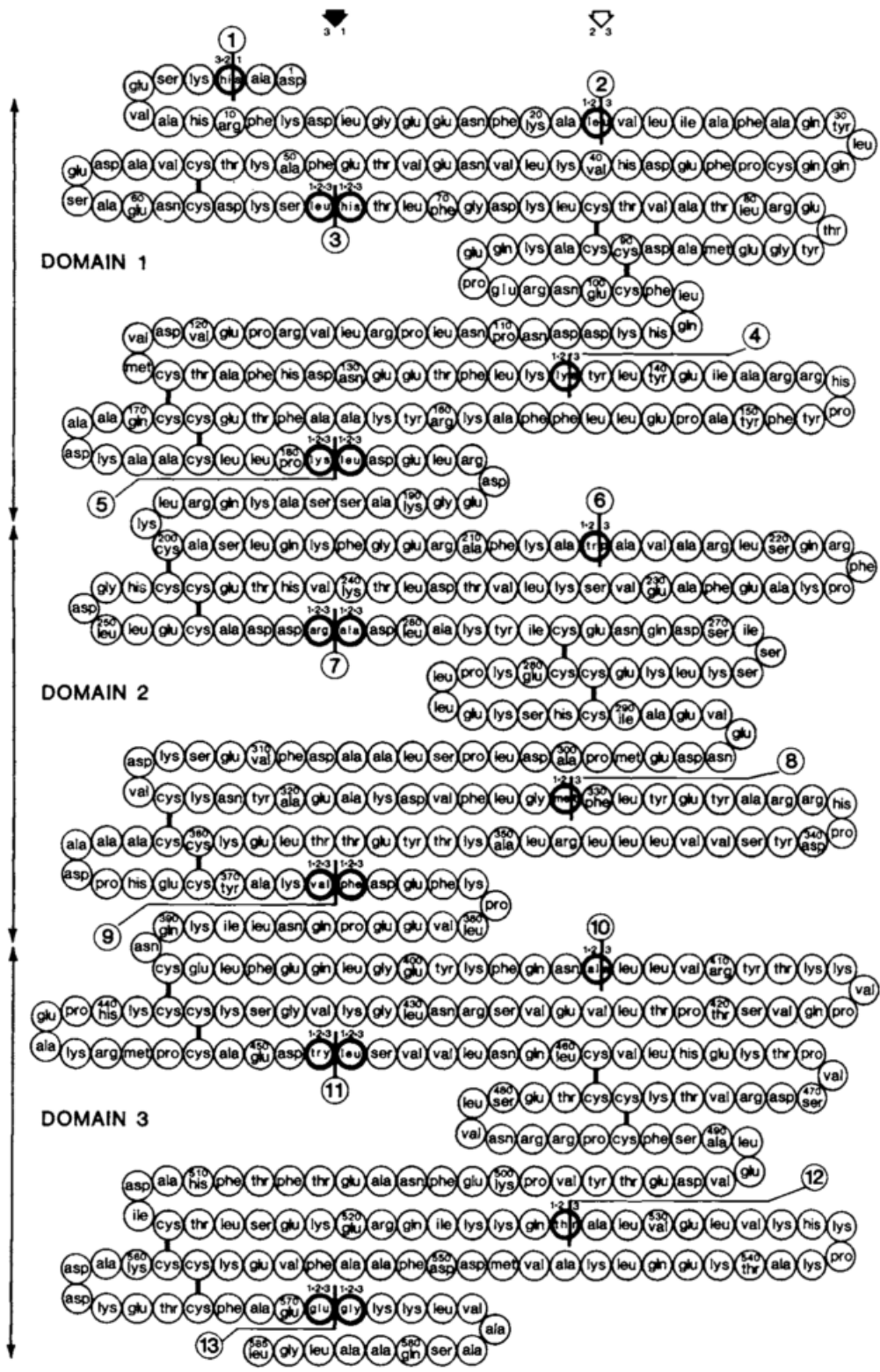
#### 3.4.3.1 Vlastnosti, syntéza, struktura

Albuminy zahrnují skupinu globulárních proteinů, z nichž nejčastější jsou sérové albuminy. Jejich přibližná molekulová hmotnost činí 67 kDa, všechny jsou rozpustné ve vodě, mírně rozpustné v koncentrovaných roztocích solí, tak jako ostatní bílkoviny jsou denaturovány teplem.

Lidský sérový albumin představuje přibližně 55% všech bílkovin obsažených v krevní plazmě, tj. 35-50 g/L krevní plazmy, koncentrace ostatních hlavních plazmatických proteinů jsou mnohem nižší (fibrinogen 2–4,5 g/L, globuliny celkem 20–25 g/L transferin ~2.5–3.5 mg/mL, normální laboratorní hodnota celkové koncentrace plasmatických proteinů je cca 65–85 g/L<sup>214,215</sup>.

Albumin je syntetizován v játrech<sup>212,216</sup>, je tvořen pouze z aminokyselin, není glykosylovaný. Biologický poločas lidského sérového albuminu (Human Serum Albumin, HSA) je poměrně dlouhý, činí přibližně 19 dnů a představuje nejméně 10% celkové jaterní proteosyntézy. To znamená, že játra zdravého člověka vytvoří 10–15 g albuminu denně<sup>212</sup>, což představuje asi 0.4 mg/h/g jaterní tkáň.<sup>216</sup> Za určitých podmínek se rychlost syntézy HSA v játrech může zvýšit 3 až 4krát.

Molekulová hmotnost HSA vypočtená z jeho složení je 66 438 Da<sup>212</sup>. Pořadí aminokyselin HSA (viz **Obrázek 10**) poprvé objasnili Meloun et al. (1975) v Praze<sup>217</sup> a Behrens et al. (1975)<sup>218</sup> v Austinu (Texas, USA) a téměř současně se totéž, ale u bovinního sérového albuminu (BSA), podařilo Brownovi et al. (1975)<sup>219</sup>, také v Austinu (Texas, USA). HSA je tvořený třemi alfa-helikálními doménami. Vykrytalizován byl v interakci s více než 80 ligandy<sup>220</sup>. Jen v databázi Drugbank má záznamy o interakci se skoro 300 léčivy<sup>221</sup>.



Obrázek 10: Sekvence aminokyselin HSA Adaptováno z Ref. <sup>222</sup> dle Ref. <sup>212</sup>

Izoelektrický bod HSA je  $pI = 4,7$  <sup>212</sup>.

### 3.4.3.2 Využití HSA v klinické praxi

Sérový albumin váže vodu, jeho hlavní funkcí je regulace onkotického tlaku krve, odpovídá za cca 70% plasmatického koloidního tlaku krve<sup>223</sup>. Za druhé světové války byl zkoušen jako stabilnější a méně antigenní náhrada krevní plazmy. Z důvodu větší dostupnosti hovězí krve byl nejprve zkoušen BSA, ale po úmrtí několika pacientů na sérovou nemoc byla pozornost přesunuta na HSA. Procedura pro jeho izolaci frakcionací studeným ethanolem byla během války vyvíjena Cohnem et al. a po válce převedena do průmyslového měřítka.<sup>212,224</sup>

Kromě náhrady krve se HSA klinicky využívá při léčbě hypovolemie, šoku, popálenin, ztráty krve, traumat, krvácení, kardiopulmonárního bypassu, syndromu akutní respirační tísně, hemodialýze, akutním selhání jater, chronickém onemocnění jater, jako podpora výživy, při resuscitaci a hypoalbuminémii.<sup>211</sup>

HSA je také cenným biomarkerem mnoha nemocí, včetně rakoviny, revmatoidní artritidy, ischemie, postmenopauzální obezity, závažné akutní reakce hostitele na štěp a také při onemocněních, která vyžadují monitorování glykemické kontroly.<sup>211</sup>

### 3.4.3.3 Rekombinantní rHSA

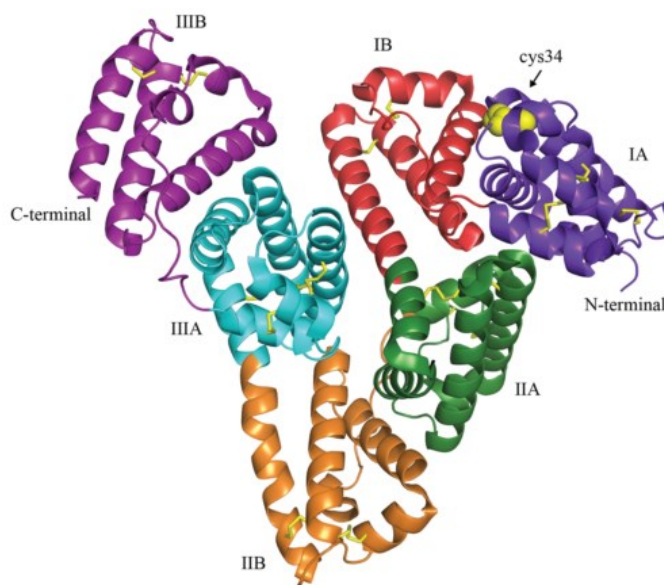
Jako alternativa získávání HSA z krve je vyvíjena a zkoušena také biotechnologická produkce rekombinantního rHSA (Recombunin® (Novozymes Biopharma), Albagen™ (New Century Pharmaceuticals), Recombinant human albumin (Akron Biotech + Sigma-Aldrich)<sup>225,226</sup>) na různých organismech: *Escherichia coli*<sup>227</sup>, *Bacillus subtilis*<sup>228</sup>, *Hansenula polymorpha*<sup>229</sup>, *Kluyveromyces lactis*<sup>230</sup>, *Pichia pastoris*<sup>231,232</sup>, *Saccharomyces cerevisiae*<sup>233</sup>, transgenních rostlinách<sup>234-238</sup> i transgenních živočišných<sup>239</sup>. Jako nejslibnější systémy pro produkci rekombinantního rHSA se zatím jeví kvasinky *P. pastoris* a transgenní rýže.<sup>211,232,237</sup>

### 3.4.3.4 Vazebná místa na HSA

Albumin je díky své unikátní struktuře a celkově velkému povrchu výborným transportním proteinem mnoha látek špatně rozpustných ve vodě. Jeho tři domény (viz **Obrázek 11**) disponují velkým počtem míst, kam se mohou případné ligandy navázat.

Albumin je schopen vázat velké množství nízkomolekulárních látek, slouží jako přenašeč iontů, mastných kyselin, hormonů, bilirubinu i léčiv<sup>212</sup>. Ze všech možných druhů ligandů jsou albuminem nejsilněji a nejspecifičtější vázány hydrofobní organické anionty o velikosti 100 až 600 Da. Pro různé mastné kyseliny má několik vazebných míst o různé afinitě<sup>240</sup>. Albumin obsahuje dvě vazebná místa pro bilirubin s různou afinitou. Molekula albuminu může současně vázat 25 až 50 molekul bilirubinu. Mezi další látky vázané na sérový albumin patří kationty (např.  $\text{Ca}^{2+}$  (46 % z celkové plazmatické koncentrace),  $\text{Mg}^{2+}$  (33 %),  $\text{Zn}^{2+}$  (65 %),  $\text{Cu}^{2+}$  (10 %),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Au}^+$  a  $\text{Pt}^{2+}$ ), hem, oxid dusný, aminokyseliny (Trp, Cys), hormony (T3, T4, steroidní hormony, prostaglandiny), urobilin, soli žlučových kyselin, glukóza, fruktóza<sup>240,241</sup>. Z tohoto důvodu se sérový albumin někdy označuje jako 'molekula-taxi'<sup>240</sup>.

Na molekule albuminu bylo identifikováno několik vazebných míst, kam se váží léčiva: drug site I = warfarin binding site v doméně II, drug site II = benzodiazepine binding site v doméně III a drug site III v doméně I. Některá léčiva se mohou vázat na více místech s různou afinitou. Kromě příkladů, které jsou uvedeny v **Tabulka 5** se na albumin váží také penicilin, sulfonamidy, digoxin, clofibrát, fenytoin, rtuť atd.<sup>212,240–242</sup>. Kompetice léčiv o vazebná místa na molekule albuminu může způsobit zvýšení koncentrace volné formy jednoho z léčiv nebo obou, což ovlivňuje jejich aktivitu<sup>243</sup>.



**Obrázek 11:** 3D struktura HSA s vyznačenými doménami (IA purpurová, IB červená, IIA zelená, IIB oranžová, IIIA modrá a IIIB fialová); žluté čáry představují disulfidické můstky a žluté koule zobrazují polohu cysteinu Cys 34 v doméně IA. Adaptováno z Ref.<sup>244</sup>

**Tabulka 5: Příklady exogenních ligandů (léčiv), vážících se na albumin<sup>240,242</sup>**

Doména I	Doména II	Doména III
9-aminocamptothecin	Azapropazon	Diazepam
Bicalutamid	Diflunisal	Diflunisal
Camptothecin	Halothan	Halothan
Etoposid	Ibuprofen	Ibuprofen
Idarubicin	Indomethacin	Propofol
Kys. Fusidová	Kys. salicylová	
Lidokain	Kys. skořicová	
Naproxen	Fenylbutazon	
Teniposid	Warfarin	
Warfarin	Zidovudin	

### 3.4.3.5 Vazba albuminu na receptory

Albumin se také váže na specifické receptorové proteiny.

#### 3.4.3.5.1 Gp60

Gp60 (známý jako albondin) je exprimován v kontinuálním endotelu a má velmi vysokou afinitu k albuminu.

Tento receptor hraje úlohu v transcytóze albuminu prostřednictvím tvorby kaveol. Po interakci s receptorem Gp60 albumin indukuje fosforylaci kaveolinu-1, což je rozhodující krok při tvorbě kaveol, prostřednictvím aktivace signální dráhy Src-kinázy. Dochází také k aktivaci endoteliální syntázy oxidu dusnatého a regulaci vaskulární tonu prostřednictvím oxidu dusnatého. Nedávno bylo prokázáno, že receptor Gp60 je exprimován také v plicním epitelu, kde zprostředkovává transalveolární transport albuminu.

Z hlediska podávání léků je tento receptor důležitý nejen proto, že může zprostředkovat transport léčiv navázaných na albumin přes dvě hlavní biologické bariéry (epiteliální a endotelová bariéra), ale také proto, že je nadměrně exprimován na rakovinných buňkách, což se dá využít pro cílenou dopravu léčiv. V poslední době se zkoumá předpoklad, že by také mohl zvyšovat vychytávání anorganických nanočástic pokrytých albuminem do nádorů.<sup>240,242</sup>

#### 3.4.3.5.2 *SPARC*

Také známý jako antiadhesin, osteonectin, BM-40 a 43K protein, SPARC (secernovaný protein kyselý, bohatý na cystein) je protein tvořený buňkami mnoha fenotypů a může interagovat jak s buněčným povrchem, tak s extracelulární matricí, čímž inhibuje buněčnou adhezi. Tento receptor má klíčovou úlohu v embryonálním vývoji a v dospělých organismech je exprimován ve tkáních s rychlou obnovou, stejně jako při poranění a patologických stavech.

Ukázalo se, že SPARC může modulovat účinek různých růstových faktorů a jeho aktivace korelovala se zástavou buněčného cyklu G1. Jeho struktura je velmi podobná struktuře Gp60, i když byly identifikovány významné rozdíly v N-terminální oblasti těchto receptorů. Jeho exprese je spojena s patofyziologickými stavy zahrnující remodelaci extracelulární matrix, včetně rakoviny a procesů neoangiogeneze. Také bylo prokázáno, že SPARC ovlivňuje morfologii endotelových buněk a vaskulární permeabilitu pravděpodobně modulací exprese F-aktinu, což zase zvyšuje tvorbu mezibuněčné mezery v cévách a paracelulární extravazaci makromolekul. Jeho nadměrná exprese při nádorových onemocněních byla navržena jako prognostický nástroj a byla korelována s účinností albuminových nosičů při inhibici proliferace nádorových buněk. Nedávno byla navržena platforma pro dodávání mannosylovaného albuminu schopná cílit jak SPARC, tak CD206, aby byl poskytnut účinnější způsob, jak cílit na nádorové buňky rezistentní na léčiva a přeprogramovat makrofágy asociované s nádorem, které nadměrně exprimují receptor manózy.<sup>240,242</sup>

#### 3.4.3.5.3 *Gp18 a gp30*

Gp30 a Gp18 jsou scavenger receptory (lapače) charakterizované vysokou afinitou k poškozenému albuminu (neenzymatická glykosylace, oxidace a fixace). Tyto receptory jsou exprimovány v různých buňkách a podílejí se na endo-lysozomální sekvestraci a katabolismu tohoto proteinu.<sup>240,242</sup>

#### 3.4.3.5.4 *FcRn*

Neonatální Fc receptor pro IgG (FcRn, také známý jako Brambellův receptor) je transmembránový protein složený z  $\beta$ 2-mikroglobulinu (B2M) a  $\alpha$ -řetězce komplexu MHC třídy I. Tento protein byl velmi dobře charakterizován pro svou úlohu při záchraně IgG mateřského zdroje a při přenosu pasivní humorální imunity z matky na

plod prostřednictvím syncytiotrofoblastů placenty nebo z mléka přes enterocyty duodena. Účinné cílení tohoto receptoru bylo nedávno indikováno jako klíčové pro budoucí generaci albuminových nosičů určených pro perorální podání, protože může být exprimován ve střevním epitelu. Nejdůležitějším působením FcRn je vracení albuminu do krevního oběhu po jeho internalizaci, chrání jej tak před endolysozomální degradací, a tím umožňuje jeho opětovné zavedení do oběhu. Myši postrádající tento receptor vykazovaly vyšší degradaci albuminu s následným snížením jeho poločasu rozpadu, což ukazuje, že receptory FcRn mohou chránit albumin před degradací. Tento receptor je exprimován v mnoha tkáních (například žaludečním a ledvinovém epitelu) a v různých fagocytárních buňkách. Jsou v něj vkládány naděje pro vývoj účinnějších vakcín, které by také mohly být schopny překonat epiteliální biologické bariéry.<sup>240,242</sup>

#### *3.4.3.5.5 Cubilin, megalin*

Cubilin je velký periferní membránový endocyt oplazmatický receptor, který řídí selektivní membránový apikální přenos proteinů. Je přítomen jednak v tenkém střevě, kde slouží k resorpci vnitřního faktoru komplexu vitamínu B12, a také v proximálním ledvinném tubulu, kde reguluje reabsorpci filtrovaných proteinů, a to především albuminu, transferinu, proteinu vázajícího vitamín D a dalších významných plazmatických faktorů. V ledvině i ve střevě se na zpětné resorpci proteinů účastní spolu s dalším endocyt oplazmatickým receptorem megalinem. Studie na megalin-deficientních myších i lidech ukázaly sníženou tubulární reabsorpci albuminu<sup>240</sup>.

#### **3.4.3.6 Metody přípravy albuminových nanočástic**

Pro přípravu albuminových nanočástic byly použity metody založené na desolvataci (koacervaci), emulgaci, termální gelaci, nanosprejovém sušení, samouspořádání (self-assembly) a nab<sup>TM</sup>-technologie<sup>245</sup>.

##### *3.4.3.6.1 Desolvatace (koacervace)*

Při desolvatační metodě přípravy jsou nanočástice získány kontinuálním přikapáváním ethanolu k vodnému roztoku albuminu (pH 5,5) za stálého míchání až do zakalení roztoku. Během přidávání ethanolu do roztoku je albumin separován v důsledku snížení jeho rozpustnosti<sup>246</sup>. Částice albuminu, které nejsou dostatečně stabilizovány, by se mohly následně po dispergaci ve vodě znovu rozpustit. Proto jsou koacerváty následně zesíťovány glutaraldehydem, kde se aminoskupiny v lysinových zbytcích a argininové



skupiny v guanidinových postranních řetězcích albuminu solidifikují kondenzační reakcí s aldehydovou skupinou glutaraldehydu.<sup>245</sup>

Příprava HSA nanočástic desolvatací byla optimalizována Weberem et al.<sup>247</sup>. Velikost částic je ovlivňována hlavně množstvím přidaného desolvatačního činidla a nikoli síťovadla (crosslinkeru). Jako jeden z hlavních faktorů určujících výslednou velikost částic byla identifikována také hodnota pH roztoku HSA, kdy vyšší hodnoty pH vedly k menším nanočásticím. Změnou tohoto parametru lze měnit velikost nanočástic v rozmezí 150 až 280 nm<sup>246</sup>. Metoda desolvatace řízené čerpadlem zavedená Langerem et al.<sup>246</sup> umožňuje připravit částice o požadované velikosti s úzkou distribucí.

Langer et al.<sup>248</sup> připravili čerpadlem řízenou desolvatací s následnou diferenciální centrifugací monodisperzní nanočástice i z rekombinantního HSA (rHSA) exprimovaného v kvasinkách *Pichia pastoris*.

#### 3.4.3.6.2 Emulgace

Emulgační metoda se pro přípravu polymerních nanočástic používá relativně často. Albuminové nanosféry připravené emulgací se stabilizují tepelně nebo chemicky<sup>249,250</sup>. Albuminové nanosféry (300 nm-1000 nm) byly připraveny vysokorychlostní homogenizací olejové fáze (např. bavlníkového oleje) obsahujícího kapičky albuminu a poté tepelně stabilizovány zahříváním na 175 až 180 °C po dobu 10 minut [64]. Směs byla ochlazena a po snížení její viskozity zředěním ethyletherem z ní byly nanočástice separovány centrifugací. Alternativně byly albuminové nanočástice stabilizovány zesíťováním 2,3-butadienem nebo formaldehydem<sup>250,251</sup>.

Problémy emulgační techniky zahrnují používání organických rozpouštědel a nutnost odstranění jak reziduí olejů, tak povrchově aktivních látek. Tepelná stabilizace je navíc použitelná pouze u léčiv, která nejsou citlivá na teplo. Hlavním problémem však zůstává toxicita síťovacích činidel používaných při chemické stabilizaci<sup>251</sup>.

#### 3.4.3.6.3 Termální gelace

Tepelná gelace je postupný proces, který zahrnuje nejprve teplem indukované rozvinutí molekuly albuminu s následnými interakcemi protein-protein (tvorba vodíkových vazeb a disulfidických můstků, elektrostatické a hydrofobní interakce)<sup>252-254</sup>. Yu et al. touto metodou vytvořili sférické core-shell nanogely (100 nm), když smíchali roztoky

ovalbuminu a lysozymu při pH 5,3 s následnou úpravou hodnoty pH na 10,3 mícháním a zahříváním <sup>252</sup>.

Boye et al. popsali gelaci BSA ve studii vlivu teploty a prostředí (pH, NaCl, glukóza, sacharóza, glukóza, cystein, močovina, NEM = N-ethylmaleimid, SDS = dodecylsírán sodný) na strukturu BSA <sup>254</sup>.

Qi et al. vytvořili biokompatibilní nanočástice BSA–dextran–chitosanu zahříváním směsi chitosanu a konjugátů BSA – dextranu <sup>253</sup>. Molekuly BSA tvoří gelové jádro nanočástic, zatímco chitosanové řetězce jsou částečně zachyceny v jádru nanočástic elektrostatickými interakcemi mezi kladně nabitým chitosanem a záporně nabitým BSA. Poté byl na takto připravené nanočástic uchycen doxorubicin na základě elektrostatických a hydrofobních interakcí po změně pH 7,4. <sup>253</sup>.

#### *3.4.3.6.4 Nano–sprejové sušení*

Na rozdíl od běžných sprejových sušáren využívajících pro tvorbu kapek trysky a rotační atomizéry, nové nano–sprejové sušárny využívají piezoelektricky řízená ultrazvukovou frekvencí (80–140 kHz) vibrující síta s přesnou velikostí otvorů (4,0 μm, 5,5 μm nebo 7,0 μm). Vytvořené nanočástice jsou s účinností až 99% zachyceny pomocí elektrostatického odlučovače, sestávajícího z uzemněné hvězdicové katody a válcovité sběrné anody za použití vysokého napětí (17 kV) <sup>255</sup>. Nano–sprejové sušení nabízí výhodu sušení a tvorby částic v jednostupňovém kontinuálním a škálovatelném procesu. Kromě toho lze připravit částice o různé velikosti a objemové hustotě jednoduchou úpravou procesních parametrů nebo konfigurace nano–sprejové sušárny <sup>256</sup>.

Lee a kol. optimalizovali přípravu hladkých sférických nanočástic (460 nm) při použití síta se 4,0 μm otvory z roztoku 0,1% w/v BSA s přídavkem 0,05% w/v Tweenu 80, rychlosti průtoku sušicího média (dusíku) 150 L/min o vstupní teplotě 120 °C <sup>257</sup>.

#### *3.4.3.6.5 Self-assembly*

Zvýšením hydrofobicity albuminu přidáním lipofilního léčiva a snížením primárních aminových skupin na jeho povrchu lze využít k samovolnému uspořádání HSA a tvorbě polymerních micel <sup>258</sup>. Xu a kol. takto připravili micely HSA pro cílené podání doxorubicinu. Jádro bylo tvořeno albuminem konjugovaným s doxorubicinem prostřednictvím disulfidových vazeb. Na toto jádro byl adsorbován další doxorubicin.

Tento proces vedl k vzniku multimerních albuminových agregátů o velikosti asi 30 nm, obsahujících asi 50 molekul doxorubicinu na jednu molekulu albuminu <sup>258</sup>.

Gong et al. zvýšili lipofilicitu BSA navázáním oktylových řetězců a vytvořili z takto modifikovaného albuminu core-shell nanomicely, do kterých poté naložili paklitaxel díky synergistickému efektu micelární enkapsulace a vazebné interakce mezi paklitaxelem a modifikovaným albuminem <sup>259</sup>.

#### 3.4.3.6.6 „Nanoparticle albumin-bound“ technologie (nab<sup>TM</sup>-technologie)

Společnost American Bioscience, Inc. vyvinula unikátní nanočásticovou technologii na bázi albuminu (nab<sup>TM</sup>-technologie) pro enkapsulaci lipofilních léčiv do nanočástic. Léčivo se smísí s vodným roztokem HSA a prochází pod vysokým tlakem štěrbinou za vzniku nanočástic albuminu léčiva v rozmezí velikostí 100–200 nm <sup>260,261</sup>. Na rozdíl od metod desolvace nebo emulgace nab<sup>TM</sup>-technologie nevyžaduje použití povrchově aktivní látek nebo polymerních materiálů <sup>260,261</sup>.

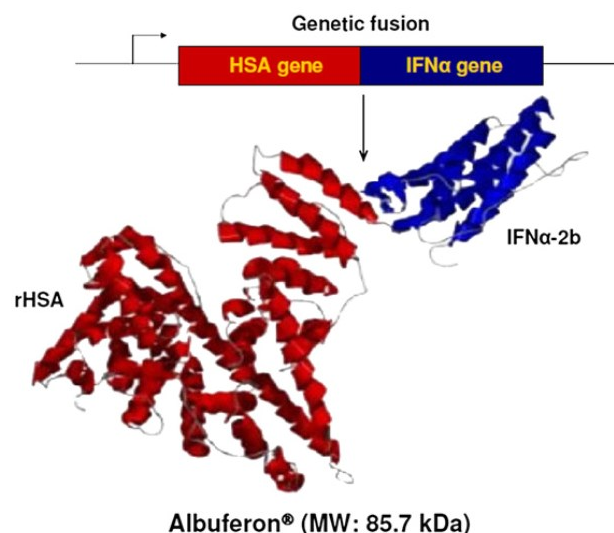
Abraxane® (nab-paklitaxel; albuminové nanočástice s paklitaxelem) s přibližným průměrem 130 nm je prvním chemoterapeutikem na bázi nanotechnologií schváleným FDA pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu. Schválení Abraxane® lze považovat za mezník nejen pro technologii dodávání léčiv na bázi albuminu, ale také pro nanomedicínu <sup>262–265</sup>.

Kim et al. využili nab<sup>TM</sup>-technologie k přípravě nanočástic HSA s kurkuminem (CCM-HSA-NP) o velikosti 130–150 nm pro intravenózní podání. CCM-HSA-NP vykazovaly výrazně vyšší rozpustnost ve vodě než kurkumin <sup>266</sup>.

V současné době se vyvíjí několik léčiv, založených na nab<sup>TM</sup> technologii, včetně ABI-008 (nab-docetaxel) a ABI-009 (nab-rapamycin) <sup>261</sup>.

#### 3.4.3.7 Albumin jako nosič – typy vazeb

Možnosti navázání léčiv na albumin jako nosič shrnul relativně nedávno v přehledovém článku Kratz (2008)<sup>225</sup> Léčiva lze navázat nekovalentně i kovalentně, dokonce lze pomocí genové manipulace připravit rekombinantní fúzní proteiny HSA s biologicky aktivními peptidy s prodlouženou dobou cirkulace (viz **Obrázek 12**)<sup>211,267</sup>.



**Obrázek 12:** 3D struktura Albuferonu® - fúzního proteinu rekombinantního lidského sérového albuminu (rHSA) s interferonem  $\alpha$ -2b (IFN $\alpha$ -2b), Genetic fusion = genetická fúze, HSA gene = gen HSA, IFN $\alpha$  gene = gen IFN $\alpha$ -2b). Adaptováno z Ref. <sup>214</sup>.

### 3.4.3.8 Albumin jako nosič - léčiva v distribuci

V polovině devadesátých let začalo několik výzkumných skupin zkoumat potenciál albuminu jako nosného proteinu, a to buď pro zacílení léků na zanícenou nebo maligní tkáň nebo prodloužení jejich poločasu. Výsledkem tohoto úsilí jsou již některé přípravky k dispozici na trhu a přípravky v pokročilém stadiu klinického zkoušení.<sup>268</sup>

Dvě základní technologie založené na albuminu, které byly vyvinuty v posledních 15-20 letech jsou:

- a) lipofilní léčivé látky a HSA jsou protlačeny pod vysokým tlakem tryskou tak, že vytvoří nanočástice albuminu a léčiva
- b) peptidy nebo proléčiva se podávají intravenózně a váží se *in situ* na cirkulující albumin fyzikálně, nebo kovalentně.

#### 3.4.3.8.1 Levemir®

Novo Nordisk vyvinul nový inzulínový analog pro léčbu diabetu, v němž se kyselina myristová váže na lysin v poloze B29. Levemir® (inzulín detemir) byl schválen v roce 2004 pro léčbu diabetes mellitus 1. a 2. typu. Je podáván subkutánně jako roztok rozpustný ve vodě s předvídatelným a prodlouženým farmakokinetickým profilem,

který činí přípravek Levemir® vhodnou základní komponentou v režimu léčby bazálním bolusem s trváním působení přibližně 26 hodin. V roce 2013 dosáhly tržby Levemiru® více než 1,8 miliardy USD.<sup>268</sup>

#### 3.4.3.8.2 Victoza®

GLP-1- (7-37) je derivatizován kyselinou palmitovou, v ε-aminoskupině lysinu zavedené na N-terminální pozici kyseliny glutamové v peptidové sekvenci GLP-1. Výsledný nový lék liraglutid (Victoza®) je derivátem GLP-1 vázajícím se na albumin, který je díky tomu stabilizován proti metabolické degradaci a po subkutánním podání má plazmatický poločas 11-15 hodin. Victoza® byla schválena v Evropě v roce 2009 a v USA v roce 2010 a to především na léčbu diabetu 2. typu. Tržby dosáhly v roce 2013 více než 1,7 miliardy USD.<sup>268</sup>

#### 3.4.3.8.3 Tresiba®

Novým přípravkem společnosti Novo Nordisk je inzulin degludec (Tresiba®), následník Levemiru®. Rozdíl je v tom, že kyselina palmitová je konjugována přes gamma-L-glutamyl spacer na lysin v poloze B29 molekuly inzulinu. Inzulin degludec je velmi dlouho působící bazální inzulinový analog s dobu trvání účinku až 40 hodin. Byl schválen v Japonsku na konci roku 2012 a v Evropě na začátku roku 2013. Ve Spojených státech FDA požádal o další studie potenciální kardiovaskulární toxicity před schválením pro trh.<sup>268</sup>

#### 3.4.3.8.4 Abraxane®

Abraxane® je první systém pro dodávání léčiv na bázi albuminu schválený pro použití v onkologii. Byl schválen počátkem roku 2005 pro léčbu metastatického karcinomu prsu ve Spojených státech a mezitím také v Evropě, Číně, Rusku a několika dalších zemích. V roce 2010 získala Abraxane® společnost Celgene Corporation a prošla registrací u nemalobuněčného karcinomu plic, metastatického karcinomu pankreatu a metastatického melanomu, stejně jako rozšířených aplikací pro karcinom prsu a byla zkoumána pro léčbu rakoviny močového měchýře a vaječníků.<sup>268</sup>

### 3.4.3.9 Albumin jako nosič – klinické zkoušky a výzkum

Aktivní a dokončené klinické studie léčiv, využívajících albumin jako nosič, hlavně pro léčbu nádorů (paklitaxel a rapamycin) a testy s albuminovými nanočásticemi například

s albendazolem (antiparazitikum), dasatinibem (léčba leukémie), gemcitabinem (léčba rakoviny slinivky) uvádí v přehledu Parodi et al. (2019).<sup>242</sup> Jedním z nadějných kandidátů je i aldoxorubicin

#### 3.4.3.9.1 Aldoxorubicin (= INNO-206, DOX-EMCH)

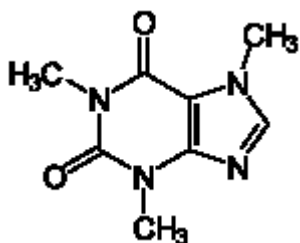
Aldoxorubicin (AlDox), dříve známý jako INNO-206, je proléčivem vázajícím na albuminu protinádorovou látku doxorubicin (Dox), který je derivatizován hydrazidem 3,3'-N- ( $\epsilon$ -maleimidokapronové kyseliny) jako linkerem (EMCH). Při intravenózním podání se AlDox primárně, ale nikoliv výhradně, váže na volný thiol na cysteinu-34 (Cys-34) endogenního albuminu.<sup>269</sup>

Aldoxorubicin je v současné době hodnocen v klinických zkouškách proti různým druhům nádorů. Ve fázi III jsou testy léčby sarkomu měkkých tkání, ve fázi II jsou testy léčby rakoviny malých plicních buněk a ve fázi I kombinovaná léčba s imunoterapií proti rakovině slinivky, trojitě negativní rakovině prsu a rakovině tlustého střeva.<sup>270</sup>

Yousefpour et al. <sup>271</sup> ukázali, že navázání doxorubicinu na peptid, který se váže na albumin cíleně (albumin-binding protein domain, ABD) je několikanásobně účinnější než pouze preferenční vazba na albumin jako u aldoxorubicinu.

### 3.4.4 Kofein

Kofein (1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion, molekulární vzorec:  $C_8H_{10}N_4O_2$ , Mw 194,19 48 Da; rozpustnost ve vodě: 2,16 g/100 mL)<sup>272</sup> je alkaloid z rostliny *Coffea arabica*, česky kávovník arabský), který příznivě stimuluje CNS a srdeční činnost (viz **Obrázek 13**). Kofein je pravděpodobně nejrozšířenějším stimulantem na světě.



**Obrázek 13: Strukturní vzorec kofeinu**

Pro výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a snadnou dostupnost je kofein často používán jako modelové léčivo pro testování permeability různých biologických membrán, od kůže, přes slizniční membrány (včetně sublingvální) po buněčné monovrstvy (CaCo-2).<sup>273-276</sup>

### **3.5 Polymery použité pro přípravu nanovláken s BSA**

#### **3.5.1 Polyvinylalkohol (PVA)**

PVA je ve vodě rozpustný syntetický polymer. Vyrábí se hydrolyzou z polyvinylacetátu a výsledný polymer tak může obsahovat karboxylové skupiny, což má také vliv na jeho vlastnosti<sup>277</sup>. Je biokompatibilní a má také dobré bioadhezivní vlastnosti. Komerčně je dostupný v molekulových hmotnostech 20 kDa - 200 kDa, jako bílý až krémový granulovaný prášek. Ve farmacii se používá hlavně v lokálních přípravcích (stabilizátor emulzí, viskozifiant v očních přípravcích, složka transdermálních náplastí)<sup>277</sup>. Nanovlákná vyrobená z PVA jsou rychle rozpustná ve vodě a tudíž citlivá na vlhkost. K potlačení této vlastnosti se používá síťování různými multifunkčními činidly schopnými reagovat s hydroxylovými skupinami (glyoxalem, kyselinou fosforečnou nebo kyselinou maleinovou)<sup>278,279</sup>.

#### **3.5.2 Polyethylenoxid (PEO)**

PEO je syntetický polymer, dostupný v mnoha molekulových hmotnostech. Do hmotnosti 20 kDa je kapalný a je označován jako polyethylenglykol (PEG). PEO s molekulovou hmotností mezi 0,1 až 5 MDa je již tuhá látka<sup>277</sup>. Hustota PEO se pohybuje v rozmezí 1,15-1,26 g/cm<sup>3</sup>.<sup>277</sup> PEO je rozpustný ve vodě, ale i ve vybraných polárních i nepolárních rozpouštědlech (aceton, alkoholy, toluen).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Permeanty

Fluorescein isothiokyanát (FITC)-dextransy	Sigma Aldrich, ČR
FD4 – $M_w = 3,3$ kDa;	
FD20 - $M_w = 16,8$ kDa;	
FD40 - $M_w = 38,5$ kDa;	
FD70 - $M_w = 70$ kDa)	
FITC-albumin	Sigma Aldrich, ČR
Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA, 66 kDa)	Sigma Aldrich, ČR
Kofein	Dr. Kulich Pharma, ČR

#### 4.1.2 Polymery pro přípravu nanovláken

Polyvinylalkohol (PVA, type Z 220, viskozita 4% (m/m) roztoku při 20°C: 11.5 – 15 mPas)	Nippon Gohsei, Japonsko
Polyethylenoxid (PEO, 400 kDa) ...	Scientific Polymer Products, USA

#### 4.1.3 Látky pro přípravu pufřů

(donorových, akceptorových, pro HPLC)

Kyselina mravenčí ...	Penta Chemicals, ČR
Kyselina fosforečná ...	Penta Chemicals, ČR
Hydrogenfosforečnan draselný ...	Penta Chemicals, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný ...	Penta Chemicals, ČR
Chlorid sodný ...	Dr. Kulich Pharma, ČR
Azid sodný ...	Chemapol, ČR

#### 4.1.4 Rozpouštědla

Acetonitril (HPLC grade)	Applichem, USA
Ethanol (96%) ...	Penta Chemicals, ČR
Metanol (HPLC grade) ...	Sigma Aldrich, ČR
Čištěná voda ...	FaF UK, Hradec Králové, ČR



#### 4.1.5 Látky pro přípravu mikroskopických preparátů

Hematoxylin ...	Lachema, ČR
Eosin Y ...	Sigma Aldrich, ČR
Formalin ...	Sigma Aldrich, ČR
Xylen ...	Dr. Kulich Pharma, ČR

#### 4.1.6 Ostatní

Tekutý dusík ...	Linde Gas, ČR
Čerstvé prasečí jazyky ...	Maso Planá, ČR

#### 4.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Pioneer PA430	Ohaus, USA
Elektronická váha Pioneer PA 413	Ohaus, USA
Analytické váhy Discovery DV 215CD	Ohaus, USA
Analytické váhy XSE105DU	Mettler Toledo, Švýcarsko
Váhy ME 2002	Mettler Toledo, Švýcarsko
Laboratorní předvážky 440-45N	Kern, Německo
Automatické pipety Fisherbrand	Fisher Scientific, USA
Elektronický časovač Fisher – TM 110	Fisher Scientific, USA
Magnetická míchačka Hei-Standard	Heidolph, Německo
Ultrazvuková lázeň UC002PC	Tesla, ČR
Vodní lázeň (termostat) Grant JB5	Fisher Scientific, UK
Vodní lázeň Julabo TW 20	Julabo GmbH, Německo
Ponorná magnetická vícemístná míchačka Variomag Telesystem	Fisher Scientific, UK
Digitální pH metr 209 L	Gryf, ČR
pH metr FG 2 s elektrodou LE 438	Mettler Toledo, Švýcarsko
Zařízení na ES Nanospider™ NS 1WS500U	Elmarco, ČR
LCR metr 4080	Conrad Electronic, Německo
Skenovací elektronový mikroskop (SEM) Phenom-Pure	Phenom World, Nizozemí
Fluorescenční mikroskop BX 51	Olympus, Japonsko

Luminiscenční spektrofotometr

Aminco Bowman Series 2

Aminco Bowman, USA

Kapalinový chromatograf (HPLC) 1260 series

Agilent Technologies, USA

- pumpa - Quat. Pump (G1311B)
- autosampler s termostatem Sampler (G1329B)
- kolonový prostor Column Comp. (G1316A),
- DAD detektor (G4212B)
- FLD detektor

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Příprava sublingválních membrán

Kousky membrán byly získány ze spodní části čerstvých prasečích jazyků (*Sus scrofa*, var. *domestica*). Po porážce (směsí oxidu uhličitého se vzduchem) byly neporušené vyříznuté jazyky opatrně opláchnuty/osprchovány vlažnou vodou (36–38 °C), uloženy do plastových sáčků a zchlazeny na 4–6 °C. Z jatek do fakultní laboratoře byly transportovány přibližně 3 hodiny v mobilním chladicím boxu (2–8 °C).

Většina svalové tkáně byla poté odříznuta / odstraněna. Výsledná cca 2 mm silná membrána se zbývající svalovinou byla ponořena na cca 20 minut do zchlazeného (4-6 °C) fyziologického roztoku s přídatkem 0,002% azidu sodného (pro prezervaci a fixaci proteinové struktury). Mukózy byly poté jemně chirurgickým skalpelem zbaveny zbývající svaloviny a částečně i submukózy. Takto připravené sublingvální membrány měly tloušťku cca 0,4 mm až 0,6 mm. Zpracované membrány byly opět krátce uloženy ve fyziologickém roztoku s přídatkem 0,002% azidu sodného.

Před samotnými permeačními experimenty byly membrány rozděleny na přibližně čtvercové části o velikosti potřebné ke spolehlivé fixaci a uchyceny mezi donorový a akceptorový oddíl Franzovy permeační cely. Celková plocha dostupná pro permeace látek činila většinou 1 cm<sup>2</sup>, případně 2 cm<sup>2</sup>.

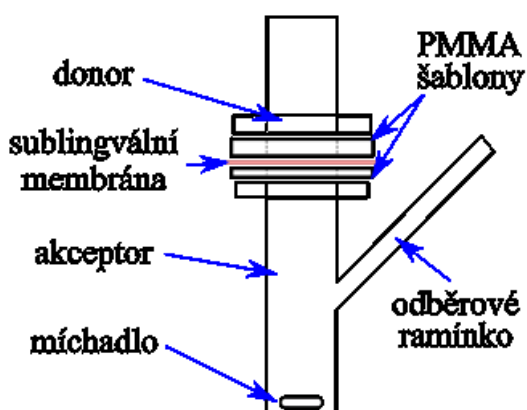
Membrány, které nebyly ihned využity pro permeační experimenty, byly zamraženy a následně uchovány při teplotě -15 °C až -25 °C.

- „Fresh“, tj. „čerstvé“ membrány byly použity pro permeační experiment ihned po preparaci. Od porážky donora do začátku permeačního experimentu uplynulo maximálně 8 hodin.
- „Flash frozen“, tj. „bleskově zmrazené“ membrány byly po osušení uloženy do plastového sáčku a ponořeny na 1 minutu do tekutého dusíku (-180 °C) a poté uloženy do mrazáku (-15 °C až -25 °C).
- „Frozen, tj. „zmrazené“ membrány byly po osušení a zatavení do plastového sáčku uloženy do mrazáku (-15 °C až -25 °C).

Po uchycení membrán ve Franzových celách byly membrány po doplnění akceptorové fáze ekvilibrovány 15 minut v lázni při 37°C.

#### 4.3.2 Permeační experimenty *in vitro*

Plocha přístupná pro permeaci byla 1 cm<sup>2</sup>. Isotonizovaný fosfátový pufr o pH 7,4 byl použit jako akceptorová fáze. Akceptorová fáze byla míchána magnetickým míchadlem, cely byly temperovány ve vodní lázni na 37,0 ± 0,5 °C. Testy permeace dextranů byly prováděny s disperzemi příslušných dextranů (FD4, FD20, FD40 nebo FD70) ve fosfátovém pufru o pH 6,8, obsahujícím 0,5% kofeinu jako markeru permeability. Vzorky akceptorové fáze (0,6 mL) byly odebírány v předem naplánovaných časech během 24 hodin a doplňovány čerstvým pufrém. Odebrané vzorky byly před analýzou uchovávány v lednici (2 °C až 8 °C). Pokusy byly opakovány minimálně 3x.



**Obrázek 14:** Schema Franzovy difúzní cely a sestava Franzových permeačních cel ve vodní lázni

### 4.3.3 Stanovení permeantů

#### 4.3.3.1 *Kofein*

Stanovení kofeinu bylo provedeno na HPLC Agilent 1200 za následujících podmínek: mobilní fáze: směs voda:metanol (75:25, V/V) s přidavkem 2 mL/L kys. mravenčí. Průtoková rychlost byla 1,5 ml/min, retenční čas píku kofeinu 5,75 minuty. Separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse plus C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm) při teplotě 25 °C. Vlnová délka pro detekci byla nastavena na 272 nm.

#### 4.3.3.2 *FITC-Dextrany*

Stanovení fluorescenčně značených dextranů (FD4, FD20, FD40 a FD70) bylo provedeno na spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2 (ThermoFisher, USA). Excitační vlnová délka byla nastavena na 419 nm, emisní vlnová délka na 529 nm. Kalibrační standardy dextranů byly rozpuštěny v akceptorovém pufru o pH 7,4.

#### 4.3.3.3 *FITC-BSA*

Stanovení fluorescenčně značeného bovinního sérového albuminu (FITC-BSA) bylo provedeno na HPLC Agilent 1200 s FLD detektorem bez chromatografické kolony. Excitační vlnová délka byla nastavena na 495 nm a emisní vlnová délka na 523 nm. Kalibrační standardy byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru o pH 7,4.

### 4.3.4 Ošetření naměřených dat

Primární naměřená data z permeačních experimentů získaná z HPLC pomocí software Agilent ChemStation Rev.C.01.06 (Agilent Technologies, USA) nebo ze spektrofluorimetrické analýzy byla dále korigována na odebrané a nahrazené objemy akceptorové fáze v šabloně v programu MS Excel. Takto upravená data byla otestována na přítomnost odlehlých hodnot pomocí Dean-Dixonova Q-testu. Korigovaná data byla přepočtena na množství množství permeantu, které prošlo přes 1 cm<sup>2</sup> sublingvální mukózy za čas. Kumulativní množství permeantu, které prošlo přes sublingvální membránu v čase, bylo vyneseno do grafu, nalezena lineární část křivky a proložena přímkou.

Zdánlivý permeační koeficient  $P_{app}$  byl vypočítán podle vzorce:

$$P_{app} = (dQ / dt) / (C_0 \cdot A) \quad (1)$$

ve kterém:  $dQ / dt$  je směrnice lineární části kumulativní křivky,  
 $C_0$  je počáteční koncentrace permeantu v donoru,  
a  $A$  (1.0 cm<sup>2</sup>) je plocha dostupná pro permeaci.

Permeační koeficienty byly spočítány z lineární části křivky a jsou prezentovány jako průměry  $\pm$  směrodatná odchylka (SD); počet opakování  $n$  je uveden v příslušných grafech. Statistická významnost byla prověřena pomocí t-testu.

### 4.3.5 Testování integrity membrán

#### 4.3.5.1 Měření impedance

Impedance byla měřena před a po provedení permeačních experimentů pomocí LCR metru 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo; s měřicím rozsahem 20  $\Omega$ –10 M $\Omega$ , který byl provozován v paralelním módu se střídavou frekvencí 120 Hz. Druhá sada impedančních dat byla naměřena po ukončení permeačního experimentu (tj. po 24 hodinách). Impedance byla měřena na vzorcích sublingvální membrány ve Franzových difúzních celách po 15-ti minutovém ustálení, kdy byla akceptorová část naplněna akceptorovou fází a donorová část 0,5 mL fosfátového pufru o pH 6,8 a cely byly temperovány ve vodní lázni na 37°C. Počáteční impedance sublingvální membrány [ $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ ] byla měřena 3x v 5-ti sekundových intervalech na dvou elektrodách z nerezové oceli zasunutých do donorové, resp. akceptorové části cely. Po změření počáteční impedance byl pufr z donorové části odsát pomocí vatového tampónu a nahrazen příslušným donorovým roztokem.

#### **4.3.5.2 Mikroskopie**

Odebrané vzorky sublingvální membrány byly před provedením mikroskopického pozorování pomalu rozmrazeny při 37 °C. Poté byly vloženy do 10% formalinu, pomalu dehydratovány v roztocích ethanolu se zvyšující se koncentrací (40%, 60%, 85% a 94%), pak krátce v xylenu a zality do parafínu. Nakonec byly nařezány na mikrotomu na 6 µm tenké plátky a obarveny směsí hematoxylinu a eosinu. Takto zpracované vzorky byly pozorovány pod optickým mikroskopem Olympus AX70 (Olympus Ltd., Japan) při 100x a 400x zvětšení.

#### **4.3.6 Příprava nanovláknenných membrán**

Nanovláknenné membrány byly připraveny elektrospinningem (ES) z roztoků polymerů pomocí InStrip technologie, založené na beztryskovém zvlákňování na upraveném zařízení NanoSpider™ NS 8S1600U device (Elmarco, Liberec, Česká Republika).

Roztok pro ES obsahoval polyvinyl alkohol (PVA) a polyetylenoxid (PEO) v poměru 94:6. Oba zmíněné polymery byly separátně rozpuštěny v čištěné vodě a poté míchány dokud nevznikl čirý viskózní roztok. Konečná koncentrace polymerů v roztoku byla 11% (10,3% PVA a 0,7% PEO). Roztok byl zvodiven přidávkou 0,15 % chloridu sodného. Směs FITC-BSA a BSA (1:1) byla přidána do vzniku homogenního roztoku obsahujícího 8,5 % směsi BSA na sušinu. Zvlákňování probíhalo ze strunové elektrody, vzdálenost ke sběrné elektrodě (kolektoru) byla nastavena na 16 cm. Po aplikaci vysokého napětí (60 kV) se vytvořená nanovláknna zachytávala ve formě netkané nanovláknenné membrány na nosné textilií (tzv. spunbondu) překrývajícím sběrnou elektrodu. Rychlost pohybu spunbondu určuje výslednou gramáž nanovláknenné vrstvy (v tomto případě cca. 12.5 g/m<sup>2</sup>).

##### **4.3.6.1 Skenovací elektronová mikroskopie**

Morfologie vyrobených vláken byla zobrazena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) značky Phenom Pure Desktop SEM (PhenomWorld, Nizozemí). Měření vzorků probíhalo ve společnosti InStar Technologies a.s.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Základním cílem disertační práce bylo zjistit, jak velkou reálnou šanci pro průchod přes sublingvální membránu mají makromolekulární látky, které by se daly využít buď jako nosiče nízkomolekulárních léčiv nebo které vykazují vlastní léčebný účinek. Z rešerše stávajících prací publikovaných v této oblasti vyplynulo, že otázek v tomto směru je poměrně dost.

První pochybnosti spočívaly v reprodukovatelnosti *in vitro/ex vivo* experimentů využívajících k ověření průchodu látek přes sublingvální prasečí slizniční bariéru. Dosud publikované informace jsou nejednoznačné v tom smyslu, že tuto membránu zpracovávají a uchovávají různými postupy (viz **3.3.1 Metody přípravy slizničních membrán prasete**).

### 5.1 Nová metoda přípravy sublingválních membrán

Nejprve jsme potřebovali zkontrolovat kvalitu preparovaných prasečích sublingválních membrán preparovaných pro potřeby permeačních pokusů. Vzhledem k možným změnám ke kterým musí docházet v důsledku náročného standardního čistícího po porážce zvířat, jsme v tomto ohledu požádali místní jatka o vyjímku.

1. Všechny dostupné povrchy zvířat jsou dle stávajících norem vystaveny sprchování vodou o teplotě 60 °C až 65°C po dobu 4 až 6 minut. To představuje expozici, která je s ohledem na odolnost bílkovinných a lipidických struktur pro návazné permeační experimenty zcela nevhodná. Nepochybně totiž musí docházet nejen ke koagulaci bílkovin ale i změnám ve stavu lipidických součástí, jsou-li alespoň částečně strukturovány. Dosáhli jsme úpravu porážkového protokolu, tak aby prasata nebyla po porážce spařena a membrány nebyly vystaveny teplotě nad 38 °C.
2. Pro zachování proteinových struktur jsme ještě před dalšími kroky využili tradičního postupu jejich fixace v roztocích 0,002% azidu sodného izotonizovaných chloridem sodným.

Po sejmutí membrány ze spodního povrchu jazyka pomocí pinzety a skalpelu, bylo odstraněno asi 95 % svalové tkáně. Přitom byla ponechávána vrstva vaziva tak, aby nebyla porušena *lamina propria*. Takto by měly být zachovány

v jednom celku všechny etáže sliznice, které se *in vivo* podílejí na ovlivnění permeace látek před jejich přechodem do krevních nebo lymfatických kapilár.

3. Následně byly membrány zpracovány třemi rozdílnými způsoby:

- „Fresh”, tj. „čerstvé“ sublingvální membrány fixované azidem sodným. Permeační pokusy na nich byly zahajovány maximálně do 8 hodin od porážky zvířete.
- „Flash frozen”, tj. „bleskově zmražené“ membrány byly po preparaci osušeny, zataveny v evakuovaných polyethylenových sáčkách a rychle zmrazeny ponořením do tekutého dusíku (-180 °C) a poté uchovávány v mrazáku (-15 °C až -25 °C). Vzhledem k tloušťce membrán došlo k jejich kompletnímu promrznutí během cca 2 sekund, ponechány v dusíku byly cca 50 sekund. V dalších pokusech ověřovanou hypotézou bylo, že rychlá a dramatická změna teploty neumožní uvnitř sliznice tvorbu ani krystalků vody ani vysrážení či vykrytalování v ní přítomných látek. Součástí dané úvahy bylo i to, že následné uložení takto zpracovaných membrán v běžném mrazáku uchová po nejbližší dobu několika týdnů (cca čtyř) membrány v tomto stavu bez podstatnějších změn.
- „Frozen”, tj. „zmražené“ membrány byly přímo uloženy v mrazáku (-15 °C až -25 °C), ponechány promrznout jen pomalu, bez předchozího rychlého zamražení v tekutém dusíku.

4. Další podstatná změna oproti obvyklým postupům přípravy sublingválních a bukálních membrán spočívala ve vynechání doporučeného ošetření membrány kryoprotektivy. Jakkoli nezpochybňujeme jejich význam při uchovávání životaschopných tkání v tkáňových bankách, pro účely permeačních pokusů se nám použití kryoprotektiv jeví jako do značné míry pochybné. Důvody, které opravňují k tomuto postoji jsou následující:

Použití intracelulárních kryoprotektiv založených na glycerolu vyžaduje několikahodinovou expozici zpracovávané tkáně, aby mohlo kryoprotektivum difúzí prostoupit do jejích struktur. To by samo o sobě překážku neznamenal. Problémem se při permeačních pokusech se stává odstranění vpraveného glycerolu ven z příslušné tkáně. Jeho ponechání ve tkáni je arteficiální. A představa, že bude vhodné macerovat sublingvální membránu, třeba jen 2 hodiny, před vlastním pokusem, resp. před aplikací donorových vzorků



s obsahem jakéhokoli léčiva, se jeví z hlediska následné kvantifikace permeačních parametrů také jako neudržitelná.

Použití dimethylsulfoxidu (DMSO) jako často používaného kryoprotektiva je také pro dané účely vyloučeno, toto činidlo zabraňuje sice tvorbě krystalků uvnitř tkání a jejich buněk, zároveň však otvírá póry v buněčných stěnách a je vlastně samo o sobě účinným urychlovačem permeace v biologických tkáních. Obdobné a další námitky lze upatnit i u použití dalších intracelulárních kryoprotektiv i jejich směsí s intercelulárními (sacharóza, albumin). Všechny tyto látky by s prováděnými experimenty mohly interferovat.

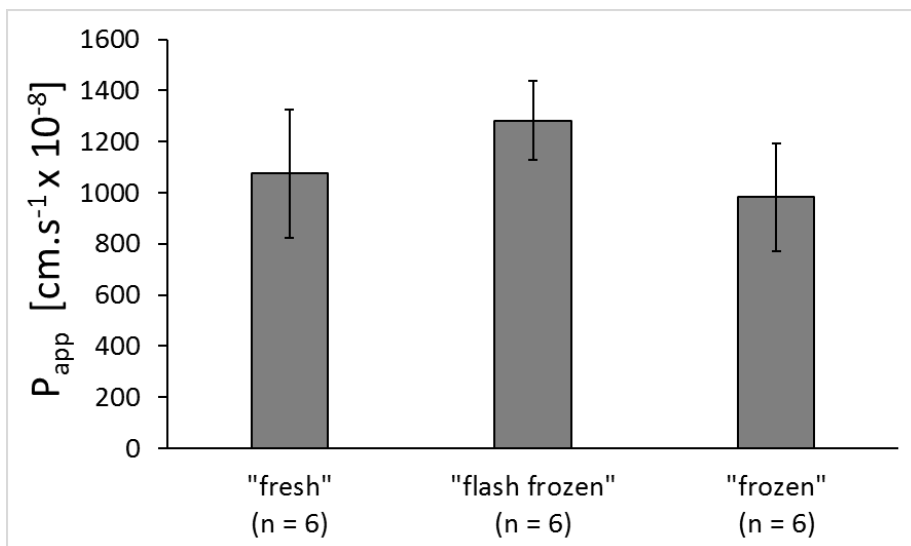
## 5.2 Permeační experimenty

Cesty průniku molekul přes sublingvální membránu byly v literatuře diskutovány od 90. let minulého století několikrát. Je již všeobecně uznávanou skutečností, že hydrofilní látky pronikají paracelulární cestou, zatímco lipofilní transcelulární cestou<sup>200</sup>. Aby se hydrofilní molekula dostala do systémové cirkulace, musí po přechodu sublingválním epitelem překonat malou vzdálenost extracelulární cestou, projít přes úsek *lamina propria* a dále přes endotel krevních kapilár nebo stěnu lymfatického systému.

Většinu bioaktivních proteinů i nosičů léčiv představují látky hydrofilní. Proto jsme v permeačních pokusech s dextransy paralelně po dobu prvních čtyř hodin pokusů využili kofein jako marker transmembránové permeability pro hydrofilní molekuly. Jako markery integrity i permeability byly použity také fluorescenčně značené dextransy molekulových hmotností od 4kDa do 70.

Výsledky z permeace kofeinu ukazují, že všechny naměřené hodnoty zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$  u různě zpracovaných membrán jsou přibližně stejného řádu ( $P_{app} \sim 1100 \times 10^{-8}$  cm/s), a pohybují se ve velmi podobném intervalu a statisticky významně se neliší ( $p = 0.05$ ) (**Graf 1**).

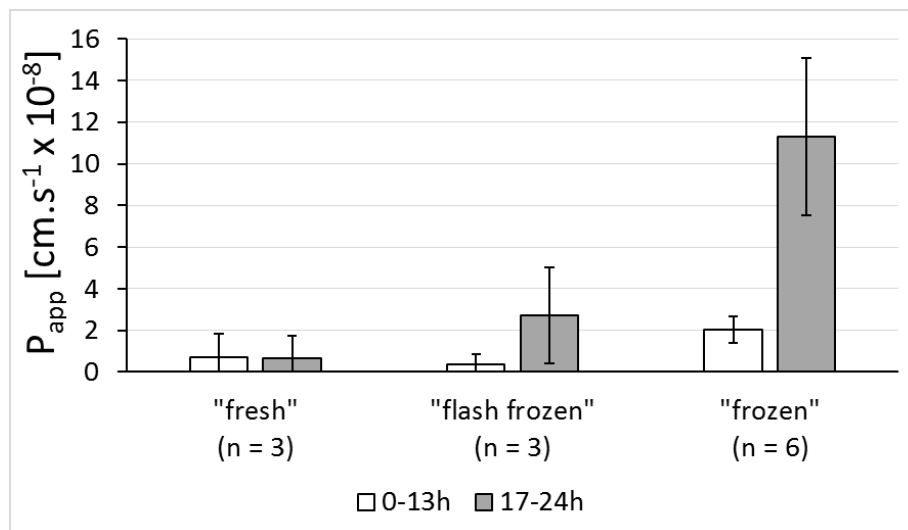
Navíc tyto výsledky odpovídají hodnotě z literatury nalezené pro sublingvální permeabilitu kofeinu ( $P_{app} = 1\,520 \pm 310 \times 10^{-8}$  cm/s (Goswami et al. 2013)<sup>280</sup>).



**Graf 1:** Porovnání hodnot zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$  kofeinu *in vitro* přes různé zpracované prasečí sublingvální membrány

Ukazuje se tedy, že kofein jako ve vodě rozpustná látka bez tendence k akumulaci v transportních cestách není schopen rozlišit mezi sublingválními membránami zpracovanými třemi různými způsoby. Je třeba zmínit, že podobnost hodnot permeability kofeinu u čerstvých a u zmražených bukalních membrán zaznamenal i Nicolazzo et al.<sup>200</sup>, kteří jako kontrolu použili záměrně proděravěné membrány.

Po zjištění podobnosti hodnot permeability kofeinu přes membrány ošetřené všemi třemi typy zpracování jsme se zaměřili na analýzu výsledků permeability dextranů. Nejprve jsme zkoumali permeabilitu FD20 na všech třech typech membrán (**Graf 2**) a poté jsme studovali permeabilitu dalších dextranů (**Graf 5**).



**Graf 2:** Zdánlivé permeační koeficienty  $P_{app}$  dextransu FD20 přes různě ošetřené sublingvální membrány *in vitro* do 13 hodiny a po 17 hodině probíhajícího experimentu

Výsledky z permeace dextransu FD20 vykazují vysokou variabilitu naměřených dat. Permeabilita přes "fresh" a "flash frozen" membrány je v úseku do 13 hodin od začátku experimentu velmi podobná. To znamená, že bariérové vlastnosti "flash frozen" membrán pravděpodobně není negativně ovlivněna ani šokovým zmrazením v tekutém dusíku, ani následným uchováváním v mrazicím boxu při cca  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

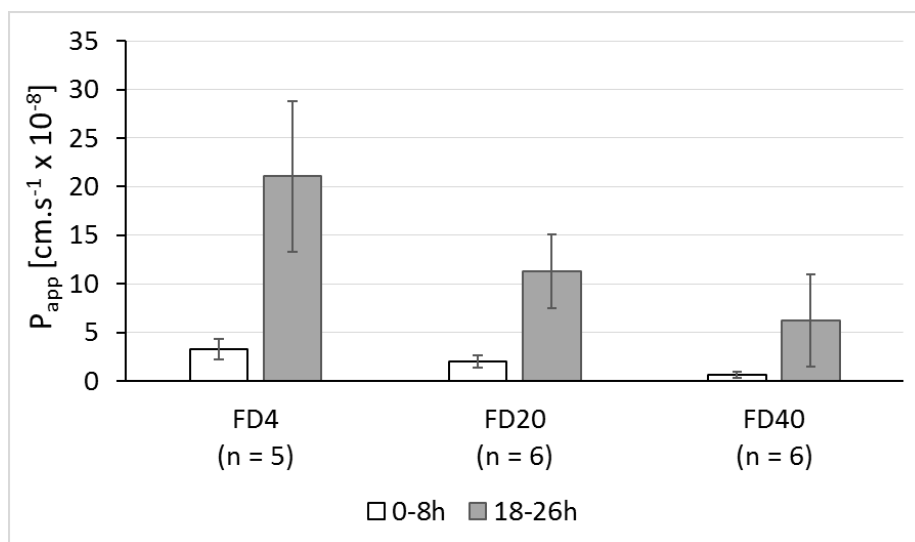
Navíc se ukazuje, že absence použití kryoprotekčního činidla zřejmě pro permeační pokusy nijak nevádí, alespoň pokud jde o permeanty rozpustné ve vodě a tedy procházející slizniční membránou paracelulárně. Přitom je nutné opět zdůraznit, že pro hodnověrné *in vitro/ex vivo* permeační experimenty není v těchto a podobných případech rozhodující vitalita mukosálních buněk. Vitální procesy se odehrávají uvnitř buněk sluznice a do nich hydrofilní léčivo vstupovat vesměs ani nemá. Submikroskopické proteinové struktury sublingvální membrány jsou ošetřeny azidem sodným a mikroskopická struktura zůstává prakticky neporušena, jak dokumentují mikroskopické snímky (viz **Obrázek 15 a–e**).

Uvedené konstatování platí pro vymezený časový úsek permeačního pokusu, po 17. hodině průběhu experimentu jsou již zřetelně viditelné rozdíly v bariérových vlastnostech. Hodnoty  $P_{app}$  se u obou typů zmrazených membrán markantně zvýšily. Nicméně i tak je dobré zaznamenat, že u „frozen“ membrán byly naměřeny téměř o řád vyšší hodnoty zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$  než u membrán z „flash frozen“ zpracování.

Uvedené výsledky ukazují, že „flash freezing“, tj. ošetření bleskovým tenkých membrán zmrazením v tekutém dusíku, představuje pro zpracování sublingválních membrán praktický a relativně snadno použitelný způsob, jak je připravit uchovávat s dobře zachovalými bariérovými vlastnostmi pro *in vitro* studie sublingválního podání léčiv, alespoň pokud jde o léčiva hydrofilní.

Získané výsledky zároveň potvrdily, že je dextran FD20 dobrým markerem integrity membrán<sup>200</sup>, neboť na méně poškozených membránách, tj. „fresh“ a „flash frozen“, hodnoty jeho zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$  nepřekročily  $2 \cdot 10^{-8}$  cm/s a podle hodnoty  $P_{app}$  lze tedy snadno odlišit neporušenou a narušenou membránu.

Dextrany lze nicméně použít nejen pro testování permeability a integrity membrán, ale navíc také k odhadu molekulové hmotnosti limitující průchod přes sublingvální membránu. Výsledky permeačních experimentů s dextrany FD4, FD20 a FD40 přes sublingvální membrány zmražené bez použití tekutého dusíku (tj. „frozen“) jsou uvedeny na **Graf 3**.

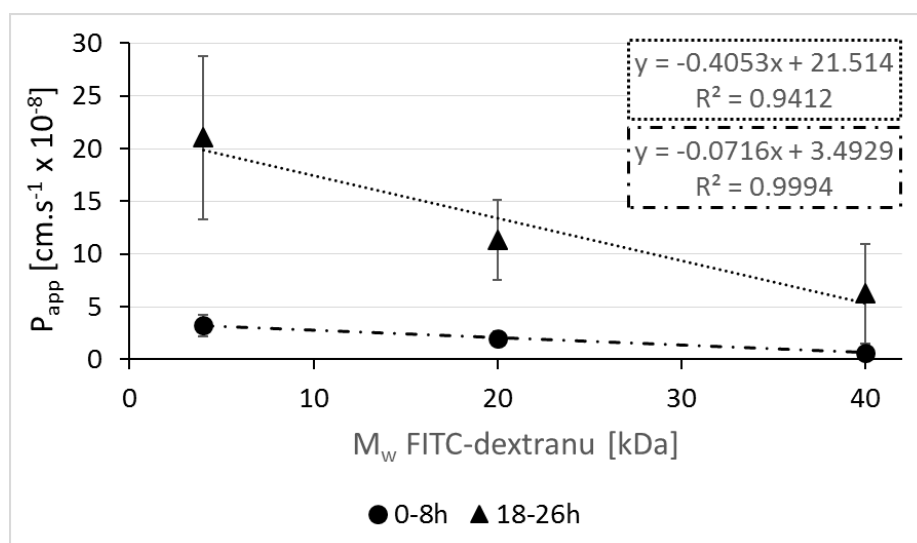


**Graf 3:** Zdánlivé permeační koeficienty  $P_{app}$  dextranů FD4, FD20 a FD70 přes sublingvální membrány zmražené bez tekutého dusíku („frozen“) *in vitro* do 8. hodiny a po 18. hodině probíhajícího experimentu

Zde se ukazuje, že se stoupající molekulovou hmotností klesala hodnota zdánlivého permeačního koeficientu  $P_{app}$ . Hodnoty  $P_{app}$  z pozdějších hodin permeačního pokusu jsou navíc cca 6krát až 10krát vyšší než hodnoty  $P_{app}$  z prvních 8 hodin permeačního koeficientu. Vzhledem k narušení „frozen“ membrán (viz níže) je vidět, že permeace

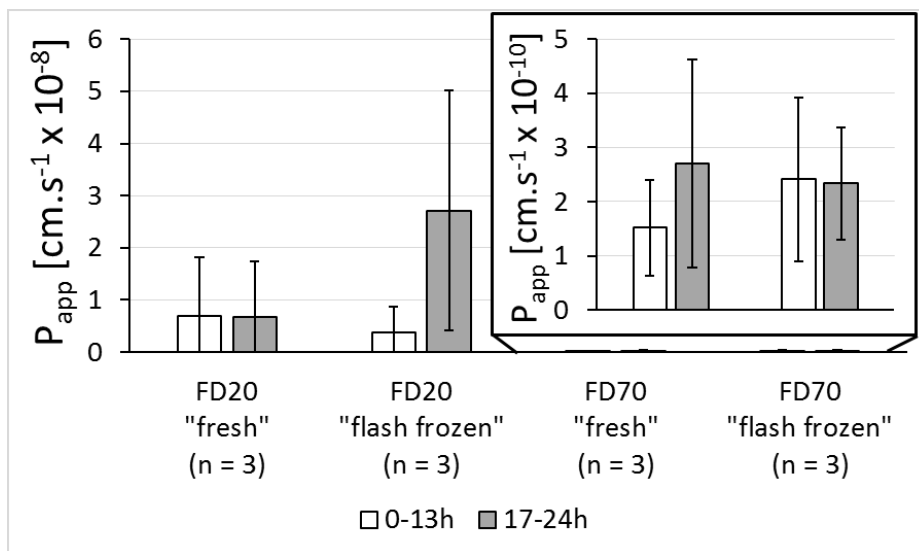
narušenou membránou s nárůstem molekulové hmotnosti o řád klesne jen na pětinu, či desetinu (viz **Graf 4**).

Tyto výsledky tedy ukázaly, že pouhým pomalým zmrazením za běžných podmínek v mrazáku jsou sublingvální membrány po rozmrazení poškozeny. Permeační bariéra u sublingvální nekeratinizované membrány neleží v nejsvrchnějších, již se poněkud odlupujících se vrstvách buněk epitelu, ale hlouběji. Je zřejmé, že tato etáž permeační bariéry je již na počátku pokusu poškozena a toto její poškození se v jeho průběhu dále dramaticky zvyrazňuje. Tato skutečnost sama o sobě není nikterak překvapivá, pro zaměření této práce je ovšem důležitá z toho důvodu, že uspořádání pokusu umožnilo takové poškození odhalit.



**Graf 4:** Vztah mezi molekulovou hmotností  $M_w$  a zdánlivým permeačním koeficientem  $P_{app}$  dextranů FD4, FD20 a FD70 přes “frozen” membrány *in vitro* do 8. hodiny a po 18. hodině probíhajícího experimentu

Naproti tomu permeace přes nenarušené membrány je na velikost mnohem citlivější, jak ukazuje **Graf 5** s výsledky získanými při použití dextranu o nejvyšší molekulové hmotnosti (FD70).



**Graf 5:** Zdánlivé permeační koeficienty  $P_{app}$  dextranů FD20 a FD70 přes různě ošetřené sublingvální membrány *in vitro* do 13 hodiny a po 17 hodině probíhajícího experimentu

Hodnoty permeability pro FD70 na „fresh” i „flash frozen” sublingválních membránách jsou opět podobné, nicméně naměřené hodnoty  $P_{app}$  se pohybují až kolem  $2 \cdot 10^{-10}$  cm/s.

Toto zjištění je důležité samo o sobě. Lze je totiž interpretovat tak, že „flash frozen“ membrána není procesem zpracování, tedy šokovým zmrazením poškozena na bariérových vlastnostech pro použité permeanty. Ukazuje se, že pokles permeability dextranů u nenarušených membrán má mnohem strmější závislost na molekulární hmotnosti, než u narušené „frozen“, jak je uvedeno v předchozím textu. Tento fakt může souviset s menším výskytem dostatečně velkých pórů, kterými by dextransy mohly v nenarušených membránách procházet.

Zajímavé je ovšem také to, že se hodnoty  $P_{app}$  signifikantně nezvýšily ani po delším časovém úseku *in vitro* permeace. Při bližším pohledu to může také znamenat, že FD70 není v daném případě dobrým markerem integrity, neboť není schopen rozlišit mezi „fresh” a „flash frozen” sublingválními membránami.

Skutečnost, že jsme pro „flash frozen” membrány zaznamenali pro FD20 po 17 hodinách vyšší propustnost, pravděpodobně svědčí o změnách, které kroky šokového zmrazení a rozmrazení v membránách zanechaly a po delší době expozice v permeačním pokusu se projeví. Přihlédneme-li k tomu, že je dosti nepravděpodobné, že by při sublingválním způsobu podání v praxi mohl být léčivý přípravek na aplikovaném místě po dobu delší než 1 hodinu, je zachování bariérové

rezistence „flash frozen“ membrán v *in vitro/ex vivo* pokusech po dobu cca 6 až 8 hodin více než uspokojivé.

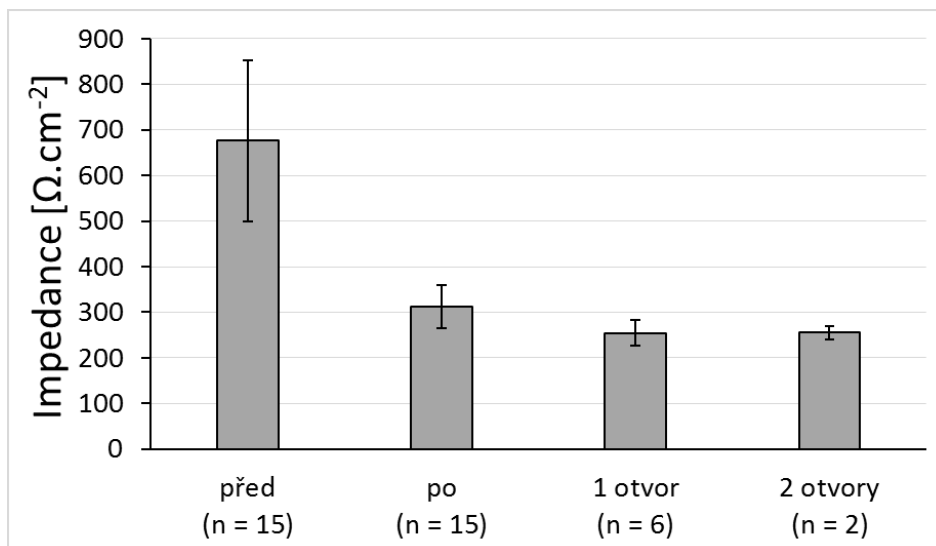
Přestože byla prezentovaná data získána jen ve třech opakováních, bylo možné z nich usoudit, že potvrzují použitelnost “flash frozen” sublingválních membrán pro půldenní testování permeability látek až do molekulové hmotnosti blízké FD70 (tj. cca 70 kDa), například albuminu (Mw 67 kDa, viz sekce **5.5 Albumin** níže).

### **5.3 Měření impedance**

K analýze zvýšené permeability zmražených “frozen” sublingválních membrán, bylo také provedeno zhodnocení jejich integrity pomocí měření impedance. Membrána byla vyhodnocena jako neporušená, pokud hodnota odporu, naměřená na začátku permeačního experimentu, byla vyšší než  $500 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ . Platnost takto zvolené hodnoty byla ověřena i měřením na membránách záměrně navíc proděravěnými hypodermickými jehlami, kde naměřené hodnoty impedance dosáhly jen k cca  $250 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ .

Hodnoty impedance “frozen” membrán naměřené na začátku permeačního experimentu se mezi jednotlivými vzorky velmi lišily, pravděpodobně také kvůli různým tloušťkám ručně skalpelem vypreparovaných vzorků. V každém případě lze říci, že hodnoty impedance naměřené na konci permeačního experimentu nicméně klesly až na úroveň hodnot naměřených na záměrně proděravěných membránách (**Graf 6**). U testovaných „frozen“ sublingválních membrán se toto chování dá jednoduše vysvětlit tím, že sublingvální membrány utrpěly během permeačního experimentu poškození, které by mohlo vysvětlit výše zmiňované zvýšené hodnoty permeability dextranu FD20 naměřené po 17 hodinách permeačního experimentu. Uvedené výsledky ovšem znamenaly především to, že měření impedance nepřináší v daném kontextu žádné použitelné informace.

Proto lze formulovat dílčí závěr v tom smyslu, že ačkoli k impedančním měřením existuje poměrně rozsáhlá literatura, zejména v souvislosti s vlastnostmi kožní bariéry, není tato metoda v případě sublingválních membrán nikterak přínosná.



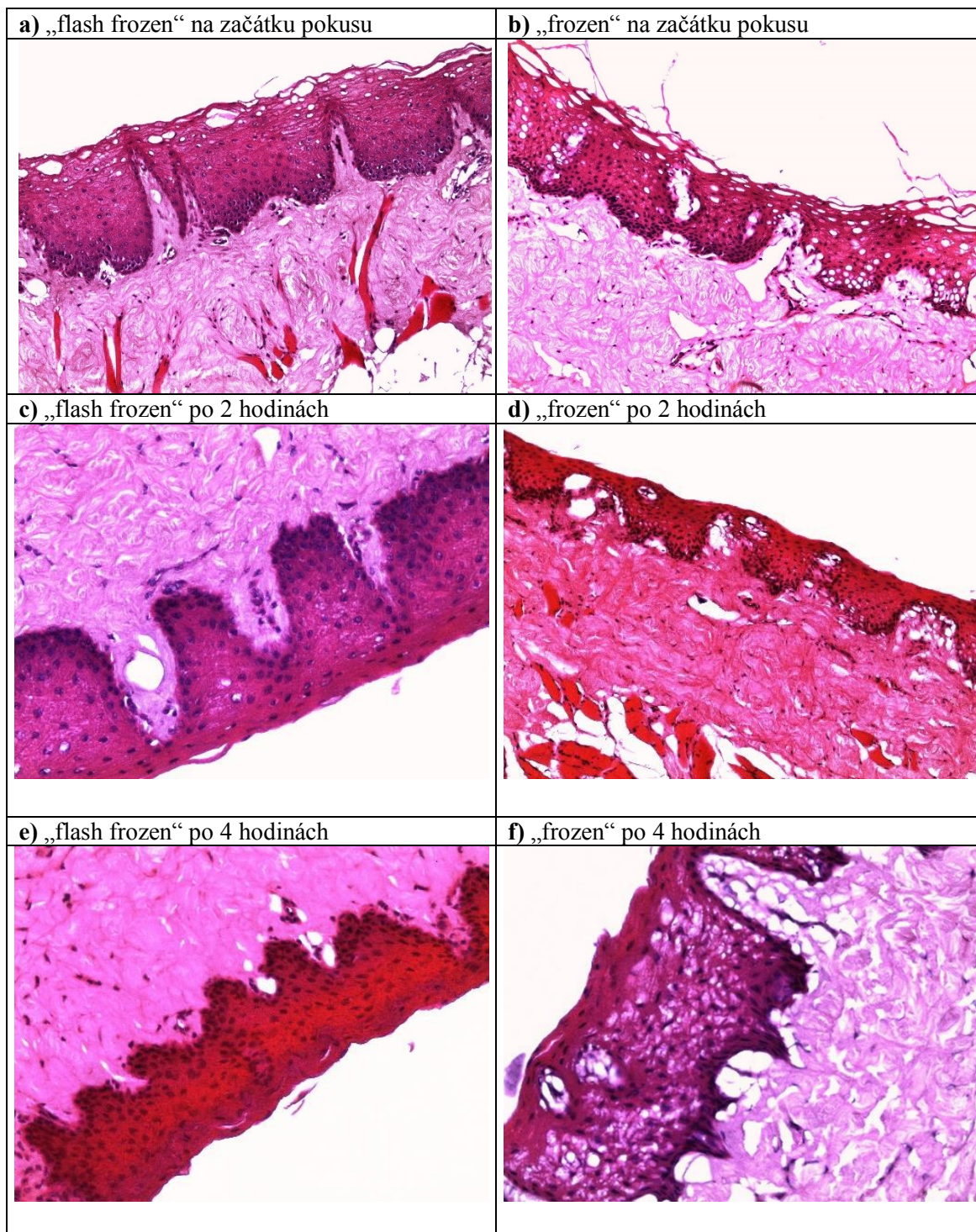
**Graf 6:** Hodnoty impedance naměřené na “frozen” sublingválních membránách před a po 24 hodinách permeačního experimentu a na záměrně proděravěných membránách.

## 5.4 Mikroskopie

Rozdíly mezi „frozen” a „flash frozen” sublingválními membránami byly sledovány také mikroskopicky. **Obrázek 15** prezentuje typické výsledky. Na levé části obrázku je vidět, že epitel u vzorků "flash frozen" membrány si zachoval neporušenou morfoloii a mikroskopicky chápanou integritu. Snímky ukazují stratifikovaný epitel na vnějším (apikálním) povrchu s těsně přiléhajícími buňkami uspořádanými v pravidelných hlubších vrstvách; papily jsou naplněny pojivem. Rozhraní mezi epitelem a *lamina propria* a vrstvou pojivové tkáně jsou těsně přilehlé, téměř bez bublin nebo spár. Tudíž považujeme “flash frozen” membrány z mikroskopického hlediska za neporušené.

Naproti tomu vzorky „frozen” membrán ukazují mnoho strukturních defektů, deskvamaci a diskonekce v celé ploše s prázdnými místy mezi jednotlivými buňkami. Membrána s takto poškozenou morfoloii se tudíž jako řádná bariéra chovat nemůže, což vysvětluje mnohem vyšší naměřené hodnoty permeability v experimentech s makromolekulárními dextransy u „frozen” sublingválních membrán. Při pohledu z detailnější úrovně, kterou nepřímo charakterizuje porozita měřená permeabilitou kofeinu, vychází tato pro mukosální membrány srovnatelně. V návaznosti na měření impedance lze ale také říci, že pokud jde o transmukosální pohyb malých iontů, jsou oba typy membrán srovnatelné, rozdílnost jejich bariérových vlastností se uplatňují až u větších entit.





**Obrázek 15:** Mikroskopické snímky rozmražených “flash frozen” (vlevo) a “frozen” (vpravo) sublingválních membrán (**a, b, d:** zvětšeno 100krát, **c, e, f:** zvětšeno 400krát). Porovnání stavu “flash frozen” a “frozen” sublingválních membrán na začátku, po 2 a po 4 hodinách permeačního pokusu.

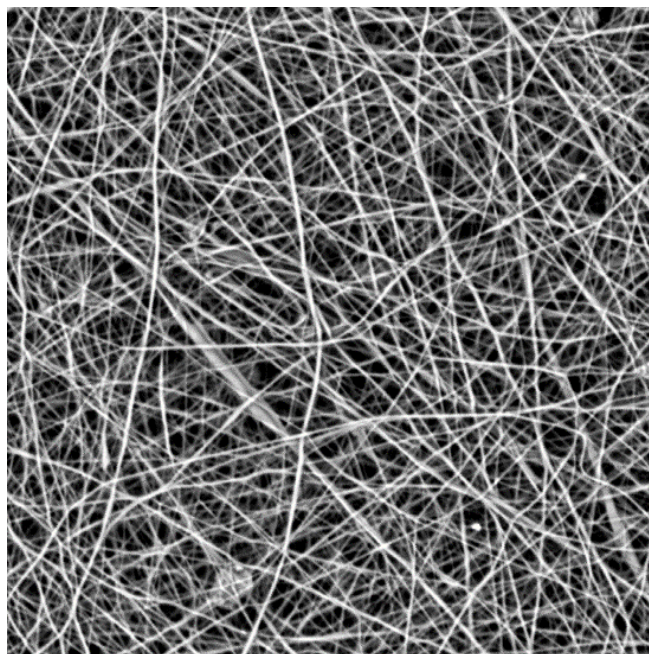
## 5.5 Albumin

Výše zmíněné dextransy nebyly použity pouze k testování integrity membrány, ale i se současným cílem určit molekulovou hmotnost limitující průchod makromolekul sublingvální membránou. Otázkou bylo, je-li limitujícím parametrem pro průchod molekulová hmotnost permeantu, nebo zda záleží i na dalších parametrech.

Fluorescenčně značený albumin (FITC-BSA) je svou molekulovou hmotností cca 67 kDa podobný dextranu FD70, který prakticky neprocházel. Albumin jako protein s několika vazebnými místy pro různé typy ligandů může sloužit jako téměř univerzální nosič mnoha různých nízkomolekulárních léčiv. Navíc o něm lze uvažovat jako o modelové látce pro podání proteinových biomakromolekul, které mají vlastní farmakologickou nebo imunologickou aktivitu.

Protože je dosti nepravděpodobné, že by při sublingválním způsobu podání v praxi mohl být léčivý přípravek na místě podání po dobu delší než 1 hodinu, což je výrazně více než čas kontaktu léčiva v ústní dutině bez odplavení do GIT, zaměřili jsme se také na využití nanotechnologie, která by nám umožnila dobu retence léčiva a tedy dobu absorpce při jeho sublingválním podání prodloužit.

Podařilo se nám připravit nanovlákná s bovinním sérovým albuminem pomocí dobře škálovatelné technologie elektrospinningu, v úpravě vyhovující farmaceutickým požadavkům na produkci léčiv, konkrétněji vrstvených nanovláknenných přípravků pro jednodávkové sublingvální podání. Mikroskopický snímek (**Obrázek 16**) ukazuje nanovláknennou strukturu s obsahem obsahem 30 % hm. albuminu a FITC albuminu (9:1). Je zdařilá nejen pokud jde o stejnorodost a průměr nanovláken, ale i absenci ztuhlých kapének a jiných nežádoucích útvarů na vláknech.

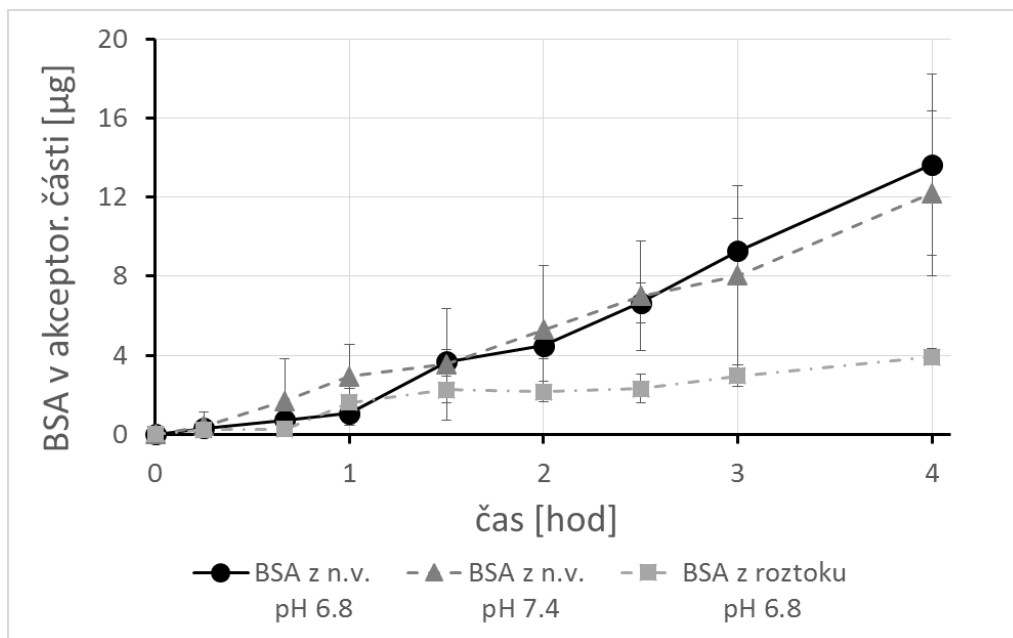


**Obrázek 16:** SEM snímek PVA nanovláken obsahujících FITC-BSA (5000x zvětšeno)

Volba nanovláknenné soustavy pro albumin vycházela z představy, že právě tato nejlépe umožní mukoadhezivní aplikaci léčiva při zachování výhod jeho individuálního nanorozměrného charakteru jako podmínky důležité pro jeho následnou pasivní transmukosální cestu. Je známo, že jedním z hlavních problémů částicových nanorozměrných soustav je jejich fyzikálně daná tendence k shlukování do mnohem rozměrnějších útvarů, které ovšem vykazují zcela jiné vlastnosti nejen při průniku bariérami. V nanovlákněch mohou být molekuly léčiva proti těmto aglomeračním tendencím uchráněna a pravděpodobně mohou být po uvolnění z nanovláknů k dispozici pro absorpci jako relativně samostatné jednotky.

Hypotézou vhodnou k ověření bylo tudíž primární ověření toho, jestli albumin jako makromolekula zafixovaná s několika dalšími excipienty do struktury nanovláknů bude schopná se z této soustavy uvolnit a procházet biologickou membránou, v níž jí nebudou k dispozici žádné přenašeče.

Testovali jsme, zda připravené nanovláknenné „stripy“ uvolní FITC-BSA a nechají jej projít přes sublingvální membránu *in vitro* podobně jako by procházel z roztoků FITC-BSA. Výsledky prezentují **Graf 7**, ukazující průběh permeace FITC-BSA přes „fresh“ sublingvální membránu *in vitro* a **Graf 8**, na kterém jsou zobrazeny hlavní výsledky permeačních pokusů.



**Graf 7:** Průběh permeace FITC-BSA přes “fresh” sublingvální membránu *in vitro*

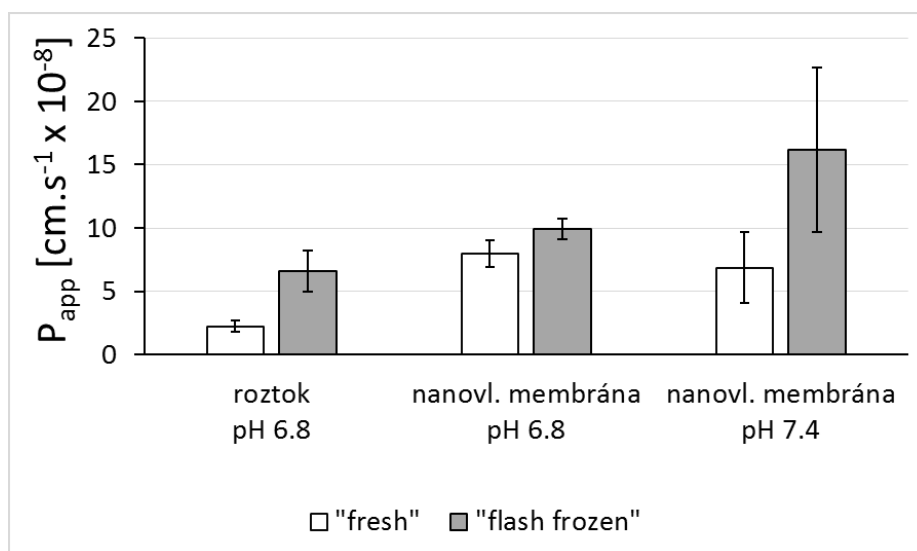
Znázorněné průběhy průniku albuminu přes sublingvální membránu dokládají následující skutečnosti:

1. Data prezentovaná pro průnik albuminu z nanovláken mají sice větší variabilitu, než údaje o jeho permeaci z roztoku, v každém případě ukazují, že se albumin z nanovláken nejen uvolnil, ale také sublingvální membránou pronikal.
2. O poznání hůře, i když statisticky neprůkazně, proniká albumin z donorového prostředí o pH 6,8 (tedy pokud jde o aciditu bližšího obvyklým hodnotám v ústní dutině) než pH z prostředí o pH 7,4. Je možné uvažovat o tom, že při kyselejším pH je albumin vzhledem k jeho pI 4,8 méně ionizován a proto prochází membránou snadněji, avšak počet získaných hodnot není pro takové tvrzení dostatečný.
3. Naopak, poměrně překvapivě a mnohem průkazněji se jeví výsledek porovnání dat permeace albuminu uvolněného z nanovláken a permeace z roztoku o stejné koncentraci součástí, které v donorovém prostoru vzniknou po rozpuštění nanovláken.
4. FITC-BSA z nanovláken procházel přes membránu asi dvakrát rychleji než FITC-BSA z roztoku, pravděpodobně díky tomu, že jej nanovlákná udržela v bližším kontaktu s povrchem sublingvální membrány, což zřejmě zvýšilo koncentrační gradient a tím i celkovou difúzi přes membránu.



Navíc je zde také vhodné připomenout, že uspořádání *in vitro* experimentu oproti situaci při reálném podání *in vivo* silně zvýhodnilo podání albuminu v roztoku ve smyslu udržení jeho koncentrace na exponované ploše sublingvální membrány po celou dobu trvání experimentu téměř konstantní, tedy bez vlivu jinak reálného odplavování roztoku slinami (saliva wash-out). To by při podání *in vivo* vedlo k rychlému snížení koncentrace léčiva (řádově během několika sekund) a dále k jeho polknutí a tím odstranění z místa podání (řádově do několika minut).

Jinými slovy, podáním vodného roztoku albuminu pod jazyk, tím spíše do bukálního prostoru, průnik albuminu do systémové cirkulace nehrozí. Naopak při podání albuminu v nanovlákněném vícevrstevném „stripu“ (s krycí vrstvou bránící odplavení léčiva slinami) udržujícím kontakt s povrchem membrány by se albumin s léčivem mohl udržet na místě podání v dostatečné koncentraci ale i po dobu až několika hodin systémově pronikat přes sublingvální membránu.

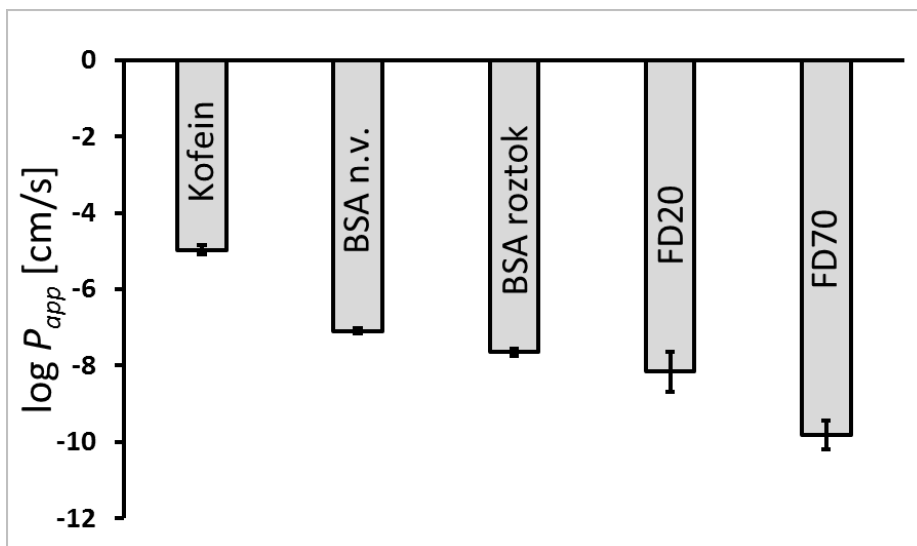


**Graf 8:** Zdánlivé permeační koeficienty  $P_{app}$  FITC-BSA přes různě ošetřené sublingvální membrány *in vitro* do 4. hodiny

Při porovnání permeace přes „fresh“ i „flash frozen“ sublingvální membrány procházel FITC-BSA v rámci čtyřhodinového experimentu podobnou rychlostí (**Graf 8**), zejména z donorových vzorků pufrovaných na pH 6.8, jejichž variabilita je také nejnižší. Silnější závěry data neumožňují, v každém případě potvrzují sublingvální permeabilitu albuminu.

## 5.6 Porovnání průniku dextranů a albuminu

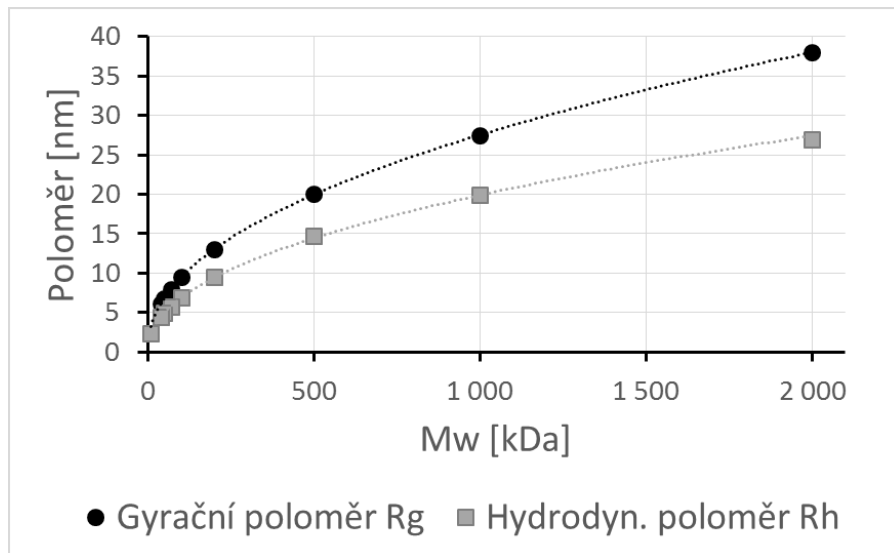
Za významnou zmínku určitě stojí i skutečnost, že fluorescenčně značený FITC-BSA procházel o tři řády rychleji ( $P_{app} \sim 1 \cdot 10^{-7}$  cm/s) než dextran FD70 ( $P_{app} \sim 1 \cdot 10^{-10}$  cm/s) o zhruba stejné molekulové hmotnosti (**Graf 9**). V tomto kontextu tedy není pro permeaci molekulová hmotnost jediným kritériem.



**Graf 9:** Porovnání logaritmičeských hodnot naměřených zdánlivých permeačních koeficientů  $P_{app}$  přes “fresh” sublingvální membrány *in vitro*

Makromolekuly různého typu se od sebe liší i velikostí, tvarem, kompaktností, (hydrodynamickým) průměrem a povrchovým nábojem. Tyto parametry navíc nejsou konstantní, mohou se měnit v závislosti na prostředí, ve kterém se daná molekula zrovna nachází (teplota, pH, interakce s dalšími látkami), včetně prostředí uvnitř biologických systémů.

Pokud porovnáme gyrační poloměr FITC-BSA ( $R_g \sim 3,21$  nm)<sup>281</sup> s FD70 ( $R_g \sim 8,0$  nm) a FD20 ( $R_g \sim 4,5$  nm) (viz **Graf 10**, data z de Belder 2003)<sup>70</sup>, můžeme dojít k závěru, že v daném kontextu jde o relevantnější parametr než je molekulová hmotnost.



**Graf 10:** Porovnání gyračních ( $R_g$ ) a hydrodynamických ( $R_h$ ) poloměrů dextranů o různé molekulové hmotnosti ( $M_w$ ). Data z de Belder 2003 <sup>70</sup>.

Na základě našich výsledků lze tedy odvodit, že nanovlákněné přípravky s albuminem (jako nosičem léčiva) by se mohly uplatnit jako zajímavá možnost pro sublingvální přípravky s řízeným uvolňováním, zvláště pokud budou mít i vhodnou krycí vrstvu bránící léčivo proti odplavení slinami.

## 6. ZÁVĚRY

V základním rámci se práce věnuje možnému sublinguálnímu podání léčiv za pomoci makromolekulárních nosičů.

1. Z přehledu literárních informací o sublingválním systémovém podávání léčiv vyplývá, že prostor pro výzkum a vývoj přípravků k systémové neinvazivní aplikaci mají zejména vysoce účinné látky, neboť jejich dávka je při tomto způsobu podání značně omezena.
2. Metodiky přípravy sublingválních, resp. bukálních membrán pro *in vitro* permeační experimenty jsou překvapivě nestandardní, často jen nepřesně popsané. Proto je obtížné údaje z dílčích publikovaných prací vzájemně srovnávat.
3. Nově navržená metodika šokového zmrazení bez použití kryoprotektiv byla hodnocena mikroskopii membrán, testováním impedance a permeace a to jak hydrofilní nízkomolekulární látkou, kofeinem, tak i dextransy molekulové hmotnosti od 4 kDa do 70 kDa. Výsledky ukázaly na použitelnost navrženého nového a snadno proveditelného protokolu přípravy sublingválních membrán pro *in vitro* permeační pokusy.
4. Odborná literatura poskytuje dostatek informací o vlastnostech dextransů potřebných k hodnocení integrity oromukosálních membrán, nicméně překvapivě málo studií se zaměřilo na sublingvální membrány.
5. Dextransy, jejichž sortiment umožňuje v daném kontextu ověřovat různé permeační aspekty, nebudou jako nosiče léčiv prakticky použitelné, avšak jako permeační markery se zcela osvědčily.
6. Albumin může sloužit jako široce použitelný nosič léčiv, ale zmínky o jeho možném využití pro systémové sublingvální podání léčiv nebyly v dostupné literatuře nalezeny.
7. Experimentálně se podařilo ověřit hypotézu o možnosti sublinguální permeace albuminu za pomoci nanovlákných aplikačních soustav, které prodlouží dobu podání na místě tak, aby mohl albumin z nanovláken proniknout skrz sublingvální membránu. Nanovlákné aplikační soustavy by se tak mohly uplatnit jako zajímavá možnost pro sublingvální přípravky s řízeným uvolňováním, zvláště pokud budou mít i vhodnou krycí vrstvu bránící léčivo proti odplavení slinami („salivary wash-out“).



## 7. POUŽITÉ ZKRATKY

ALS	amyotrofická laterální skleróza	FDA	Food and Drug Administration
API	léčivo (aktivní látka)	rDNA	rekombinantní DNA
ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv	FLD	fluorescence detector
B2M	b2-mikroglobulin	GIT	gastrointestinální trakt
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém	GLP-1	glukagon-like peptid
BSA	bovinní sérový albumin	Gp18 a gp30	scavenger receptory
CaCo-2	buněčné monovrstvy z kolorektálního karcinomu	Gp60	albondin (receptor)
CCM-HSA-NP	nanočástice HSA s kurkuminem	HES	hydroxyethylškrob
CKD	chronické renální poškození (chronic kidney disease)	HLA	Human Leucocyte Antigen
CNS	centrální nervová soustava	HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
Da	dalton	HSA	lidský sérový albumin (Human Serum Albumin)
DAD	diode-array detector	rHSA	rekombinantní HSA
DIAR	dextran induced anaphylactoid reactions	Hz	hertz
DMSO	dimethylsulfoxid	IFN $\alpha$ -2b	interferon $\alpha$ -2b
DNA	deoxyribonukleová kyselina	IgG	imunoglobulin G
rDNA	rekombinantní DNA	Kp	konstanta permeability
DS	stupeň substituce, degree of substitution	<i>Lm</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
DTPA	s diethylentriaminpentaoctovou kyselinou	MCG	membránu kryjící zrněčka (membrane coating granules)
EDTA	kyseliny ethylendiamintetraoctové	MHC	hlavní histokompatibilní komplex
EMCH	hydrazide 3,3'-N-( $\epsilon$ -maleimido)kapronové kyseliny	mM	milimol
EPR	enhanced permeability and retention	MMP-2	matricová metaloproteinasa II
ES	elektrospining	MMP-9	matricová metaloproteinasa IX
FA1-FA7	vazebná místa albuminu pro mastné kyseliny	MRI	zobrazování magnetickou resonancí
FcRn	neonatální Fc receptor pro IgG (Brambellův receptor)	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid

Mw	molekulová hmotnost	PSC	karboxymethylether sorbitol–dextranu (polyglucose sorbitol carboxymethyl ether)
NAD+	nikotinamidadenindinukleotid	PVA	polyvinylalkohol
NEM	N–ethylmaleimid	SD	směrodatná odchylka
NP	nanočástice (nanoparticles)	SDS	dodecylsírán sodný
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika	SEC	size-exclusion chromatography
Papp	zdánlivý permeační koeficient	SL	sublingvální
PCL	poly(ε–kaprolakton)	SLIT	sublingvální alergénová imunoterapie
PEG	polyethylenglykol	SPARC	secernovaný protein kyselý, bohatý na cystein
PEO	polyethylenoxid	SPIO	superparamagnetické částice oxidů železa
pH	pH (vodíkový exponent)	USPIO	Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide
pI	isoelektrický bod	V	volt
PIBCA	poly(isobutyl kyanoakrylát)	WHO	World Health Organisation
PMMA	poly(methyl metakrylát)	Ω	ohm

<b>Zkratky fluorescenčně značených molekul</b>	
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FD	FITC-dextran
FD10	FD s Mw 10 kDa
FD12	FD s Mw 12 kDa
FD3	FD s Mw 3 kDa
FD4	FD s Mw 4 kDa
FD40	FD s Mw 40 kDa
FD70	FD s Mw 70 kDa

<b>Zkratky aminokyselin</b>	
Cys	cystein
Pro	prolin
Val	valin
Leu	leucin
Gly	glycin
Ile	isoleucin
Trp	tryptofan

U fyzikálních jednotek jsou použity běžné předpony soustavy SI  
(kDa, MDa, GDa; kΩ, MΩ; kV; kHz; mM; nm, mm, cm; mL)

## 8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání vlastností bukalní a sublingvální sliznice relevantních při podání léčiv. Adaptováno z Ref. <sup>19</sup> .....	17
Tabulka 2: Molekulární rozměry dextransu B512. Adaptováno z Ref. <sup>73</sup> dle Ref. <sup>70</sup> .....	32
Tabulka 3: Nanočásticové přípravky s dextransem uvedené na trh <sup>182,185–191</sup> .....	41
Tabulka 4: Přehled naměřených hodnot zdánlivého permeabilního koeficientu ( $P_{app}$ ) přes různé membrány .....	49
Tabulka 5: Příklady exogenních ligandů (léčiv), vážících se na albumin <sup>241,243</sup> .....	54

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Snímek sublingvální membrány (1 = submukóza, 2 = bazální membrána, 3 = epitel, 4 = papila, 5 = kapilára, 6 = lamina propria). Obrázek vpravo adaptován z Ref. <sup>19</sup> .....	19
Obrázek 2: Místa pro bukalní a sublingvální podání léčiv. Adaptováno z Ref. <sup>19</sup> .....	20
Obrázek 3: Struktura dextransu <sup>66</sup> .....	32
Obrázek 4: Ringsdorfův model polymerního proléčiva: léčivo (červený kruh) navázáno přes spojku (černý svislý obdélník; spacer / linker) na polymerní kostru, na kterou je dále navázána solubilizační složka (zelený obdélník) a naváděcí část (žlutý trojúhelník; targeting moiety). Adaptováno z Ref. <sup>166</sup> .....	39
Obrázek 5: Příprava fluorescenčně značených dextransů (FITC dextransy) pomocí fluorescein isothyokyanátu. Převzato z Ref. <sup>192</sup> dle Ref. <sup>64</sup> .....	42
Obrázek 6: Logaritmické znázornění vztahu zdánlivých permeačních koeficientů $P_{app}$ 14C-mannitolu (○) a FITC-dextransů (●) FD4, FD10 a FD20 přes prasečí bukalní epitel (osa X) a buněčnou kulturu TR146 (osa Y). Adaptováno z Ref. <sup>197</sup> .....	43
Obrázek 7: Vztah zdánlivých permeačních koeficientů ( $P_{app}$ ) přes potkaní tenké střevo <i>in vitro</i> pro dextransy (prázdné) a proteiny (plné) a jejich molekulové hmotnosti (uvedené jako $(\sqrt[3]{Mw})^{-1}$ ) v distálním (čtverce) a proximálním (kruhy) směru. Adaptováno z Ref. <sup>203</sup> .....	45
Obrázek 8: Vztah molekulové hmotnosti a zdánlivých permeačních koeficientů přes králičí nasální sliznici <i>in vitro</i> pro propranolol hydrochlorid (□), kromoglykát sodný (Δ), FD4 (▲), FD10 (■), FD40 (○) a FD70 (●). Adaptováno z Ref. <sup>206</sup> .....	47
Obrázek 9: Srovnání propustnosti léčiv s různou molekulovou hmotností přes rozdílné sliznice (plicní (●), nosní (Δ), bukalní (○), tenké střevo (□) a tlusté střevo (▽). Upraveno dle Ref. <sup>210</sup> ..	48
Obrázek 10: Sekvence aminokyselin HSA Adaptováno z Ref. <sup>222</sup> dle Ref. <sup>212</sup> .....	51
Obrázek 12: 3D struktura HSA s vyznačenými doménami (IA purpurová, IB červená, IIA zelená, IIB oranžová, IIIA modrá a IIIB fialová); žluté čáry představují disulfidické můstky a žluté koule zobrazují polohu cysteinu Cys 34 v doméně IA. Adaptováno z Ref. <sup>245</sup> .....	53

Obrázek 11: 3D struktura Albuferonu® - fúzního proteinu rekombinantního lidského sérového albuminu (rHSA) s interferonem $\alpha$ -2b (IFN $\alpha$ -2b), Genetic fusion = genetická fúze, HSA gene = gen HSA, IFN $\alpha$ gene = gen IFN $\alpha$ -2b). Adaptováno z Ref. <sup>214</sup> .....	60
Obrázek 13: Strukturální vzorec kofeinu.....	63
Obrázek 14: Schema Franzovy difúzní cely a sestava Franzových permeačních cel ve vodní lázni.....	67
Obrázek 15: Mikroskopické snímky rozmražených “flash frozen” (vlevo) a “frozen” (vpravo) sublingválních membrán (a, b, d: zvětšeno 100krát, c, e, f: zvětšeno 400krát). Porovnání stavu “flash frozen” a “frozen” sublingválních membrán na začátku, po 2 a po 4 hodinách permeačního pokusu.....	81
Obrázek 16: SEM snímek PVA nanovláken obsahujících FITC-BSA (5000krát zvětšeno).....	83

## 10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Porovnání hodnot zdánlivého permeačního koeficientu $P_{app}$ kofeinu <i>in vitro</i> přes různě zpracované prasečí sublingvální membrány.....	74
Graf 2: Zdánlivé permeační koeficienty $P_{app}$ dextransu FD20 přes různě ošetřené sublingvální membrány <i>in vitro</i> do 13 hodiny a po 17 hodině probíhajícího experimentu.....	75
Graf 3: Zdánlivé permeační koeficienty $P_{app}$ dextransů FD4, FD20 a FD70 přes sublingvální membrány zmrazené bez tekutého dusíku (“frozen”) <i>in vitro</i> do 8. hodiny a po 18. hodině probíhajícího experimentu.....	76
Graf 4: Vztah mezi molekulovou hmotností $M_w$ a zdánlivým permeačním koeficientem $P_{app}$ dextransů FD4, FD20 a FD70 přes “frozen” membrány <i>in vitro</i> do 8. hodiny a po 18. hodině probíhajícího experimentu.....	77
Graf 5: Zdánlivé permeační koeficienty $P_{app}$ dextransů FD20 a FD70 přes různě ošetřené sublingvální membrány <i>in vitro</i> do 13 hodiny a po 17 hodině probíhajícího experimentu.....	78
Graf 6: Hodnoty impedance naměřené na “frozen” sublingválních membránách před a po 24 hodinách permeačního experimentu a na záměrně proděravěných membránách.....	80
Graf 7: Průběh permeace FITC-BSA přes “fresh” sublingvální membránu <i>in vitro</i> .....	84
Graf 8: Zdánlivé permeační koeficienty $P_{app}$ FITC-BSA přes různě ošetřené sublingvální membrány <i>in vitro</i> do 4. hodiny.....	85
Graf 9: Porovnání logaritmických hodnot naměřených zdánlivých permeačních koeficientů $P_{app}$ přes “fresh” sublingvální membrány <i>in vitro</i> .....	86
Graf 10: Porovnání gyračních ( $R_g$ ) a hydrodynamických ( $R_h$ ) poloměrů dextransů o různé molekulové hmotnosti ( $M_w$ ). Data z de Belder 2003 <sup>70</sup> .....	87

## 11. LITERATURA

1. HARRIS, David a Joseph R ROBINSON. Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1992, **81**(1), 1–10. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600810102
2. JUNGINGER, Hans E., Janet A. HOOGSTRAATE a J. Coos VERHOEF. Recent advances in buccal drug delivery and absorption - In vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **62**(1–2), 149–159. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(99)00032-2
3. KRAAN, Heleen, Hilde VRIELING, Cecil CZERKINSKY, Wim JISKOOT, Gideon KERSTEN a Jean Pierre AMORIJ. Buccal and sublingual vaccine delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **190**, 580–592. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.060
4. CASTRO, Pedro M., Pedro FONTE, Flávia SOUSA, Ana Raquel MADUREIRA, Bruno SARMENTO a Manuela E. PINTADO. Oral films as breakthrough tools for oral delivery of proteins/peptides. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **211**, 63–73. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.258
5. CASTRO, Pedro, Raquel MADUREIRA, Bruno SARMENTO a Manuela PINTADO. Tissue-based in vitro and ex vivo models for buccal permeability studies. In: Bruno SARMENTO, ed. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, s. 189–202.
6. SHRESTHA, Neha, Francisca ARAÚJO, Bruno SARMENTO, Jouni HIRVONEN a Hélder A. SANTOS. Cell-based in vitro models for buccal permeability studies. In: Bruno SARMENTO, ed. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, s. 31–40.
7. MADHAV, N. V Satheesh, Ashok K. SHAKYA, Pragati SHAKYA a Kuldeep SINGH. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* [online]. 2009, **140**(1), 2–11. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.07.016
8. RATHBONE, Michael John, Indiran PATHER a Sevda ŞENEL. Overview of Oral Mucosal Delivery. In: Michael J. RATHBONE, Sevda ŞENEL a Indiran PATHER, ed. *Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy*. Boston, MA: Springer, 2015, s. 17–29.
9. NICOLAZZO, Joseph A a Barrie C FINNIN. In vivo and in vitro models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. In: Carsten EHRHARDT a Kwang-Jin KIM, ed. *Drug Absorption Studies*. Boston, MA: Springer, 2008, s. 89–111.
10. VEUILLEZ, F, Y N KALIA, Y JACQUES, J DESHUSSES a P BURI. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2001, **51**(2), 93–109. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00144-2
11. SATTAR, Mohammed, Ossama M SAYED a Majella E LANE. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, **471**(1–2), 498–506 [vid. 2015-01-08]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.043

12. PATEL, Viralkumar F., Fang LIU a Marc B. BROWN. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, **153**(2), 106–116. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.027
13. MONTENEGRO-NICOLINI, Miguel a Javier O. MORALES. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2017, **18**(1), 3–14. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-016-0525-z
14. RUSSO, E., F. SELMIN, S. BALDASSARI, C. G.M. GENNARI, G. CAVIGLIOLI, F. CILURZO, P. MINGHETTI a B. PARODI. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2016, **32**(2016), 113–125. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2015.06.016
15. NIELSEN, Hanne Mørck. In vitro models of the human buccal epithelium: the TR146 cell culture model and the porcine in vitro model. In: Claus Michael LEHR, ed. *Cell Culture Models of Biological Barriers*. London: Taylor & Francis, 2002, s. 310–326.
16. MRSNY, Randall J. Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 247–253. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.017
17. HEARNDEN, Vanessa, Vidya SANKAR, Katrusha HULL, Danica Vidović JURAS, Martin GREENBERG, A. Ross KERR, Peter B. LOCKHART, Lauren L. PATTON, Stephen PORTER a Martin H. THORNHILL. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**(1), 16–28. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.02.008
18. BRANDL, Martin a Annette BAUER-BRANDL. Oromucosal drug delivery: Trends in in-vitro biopharmaceutical assessment of new chemical entities and formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **128**(August), 112–117. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2018.11.031
19. LAM, Jenny K.W. W, Yingying XU, Alan WORSLEY a Ian C.K. K WONG. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2014, **73**, 50–62. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2013.08.011
20. HILLERY, Anya M., Andrew W. LLOYD a James SWARBRICK. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists* [online]. B.m.: Taylor & Francis, 2001. ISBN 0203302761. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1061186021000040848>
21. SOOD, Sandeep, Steven J. SHIFF, Chung S. YANG a Xiaoxin CHEN. Selection of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs for oral cancer chemoprevention. *Oral Oncology* [online]. 2005, **41**(6), 562–567. ISSN 13688375. Dostupné z: doi:10.1016/j.oraloncology.2005.01.003
22. MURRELL, William. Nitro-Glycerine As A Remedy For Angina Pectoris. *The Lancet* [online]. 1879, **113**(2891), 113–115. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(02)42573-1
23. KWEON, Mi Na. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. *Cytokine* [online]. 2011, **54**(1), 1–5. ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/j.cyto.2010.12.014

24. SETH, Arjun, Il Gyu KONG, Su Hyun LEE, Jin Young YANG, Yong Soo LEE, Yeji KIM, Nani WIBOWO, Anton P J MIDDELBERG, Linda H L LUA a Mi Na KWEON. Modular virus-like particles for sublingual vaccination against group A streptococcus. *Vaccine* [online]. 2016, **34**(51), 6472–6480. ISSN 18732518. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2016.11.008
25. AMORIJ, Jean Pierre, Gideon F.A. KERSTEN, Vinay SALUJA, Wouter F. TONNIS, Wouter L.J. HINRICHS, Bram SLÜTTER, Suzanne M. BAL, Joke A. BOUWSTRA, Anke HUCKRIEDE a Wim JISKOOT. Towards tailored vaccine delivery: Needs, challenges and perspectives. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 363–376. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.039
26. KRAAN, Heleen, Peter SOEMA, Jean Pierre AMORIJ a Gideon KERSTEN. Intranasal and sublingual delivery of inactivated polio vaccine. *Vaccine* [online]. 2017, **35**(20), 2647–2653. ISSN 18732518. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2017.03.090
27. MAŠEK, Josef, Daniela LUBASOVÁ, Róbert LUKÁČ, Pavlína TURÁNEK-KNOTIGOVÁ, Pavel KULICH, Jana PLOCKOVÁ, Eliška MAŠKOVÁ, Lubomír PROCHÁZKA, Štěpán KOUDELKA, Nongnut SASITHORN, Jozsef GOMBOS, Eliška BARTHELDYOVÁ, František HUBATKA, Milan RAŠKA, Andrew D. MILLER a Jaroslav TURÁNEK. Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles - important step towards effective mucosal vaccines. *Journal of Controlled Release* [online]. 2017, **249**, 183–195. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.036
28. TRUVEN HEALTH ANALYTICS. *Micromedex(R)* [online]. 2019 [vid. 2019-07-01]. Dostupné z: <http://www.micromedexsolutions.com>
29. LIPIN, Rosa B. a Sarah K. WISE. SLIT Tablets for Polysensitized Allergic Rhinitis. *Current Otorhinolaryngology Reports* [online]. 2015, **3**(3), 180–185. ISSN 2167-583X. Dostupné z: doi:10.1007/s40136-015-0086-9
30. BORBÁS, Eniko, Attila BALOGH, Katalin BOCZ, Judit MÜLLER, Éva KISERDEI, Tamás VIGH, Bálint SINKÓ, Attila MAROSI, Attila HALÁSZ, Zoltán DOHÁNYOS, Lajos SZENTE, György T. BALOGH a Zsombor K. NAGY. In vitro dissolution-permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-based formulation of aripiprazole using µFlux™. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **491**(1–2), 180–189. ISSN 18733476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2015.06.019
31. VRBATA, Petr, Pavel BERKA, Denisa STRÁNSKÁ, Pavel DOLEŽAL, Marie MUSILOVÁ a Lucie ČIŽINSKÁ. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **457**(1), 168–176 [vid. 2014-10-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.085
32. WIMMER-TEUBENBACHER, M., C PLANCHETTE, H PICHLER, D MARKL, W.K. HSIAO, A PAUDEL a S STEGEMANN. Pharmaceutical-grade oral films as substrates for printed medicine. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **547**(1–2), 169–180. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.05.041
33. BARUA, Sonia, Hyeongmin KIM, Kanghee JO, Chang Won SEO, Tae Jun PARK, Kyung Bin LEE, Gyaie YUN, Kyungsoo OH a Jaehwi LEE. Drug delivery techniques for buccal route: formulation strategies and recent advances in dosage form design. *Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2016, **46**(7), 593–613. ISSN 2093-5552. Dostupné z: doi:10.1007/s40005-016-0281-9

34. THAKKAR, Shreya a Manju MISRA. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **107**(May), 148–167. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2017.07.001
35. MORALES, Javier O. a David J. BRAYDEN. Buccal delivery of small molecules and biologics: of mucoadhesive polymers, films, and nanoparticles. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2017, **36**, 22–28. ISSN 14714973. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2017.07.011
36. SINGH, Harmanpreet, Rahul SHARMA, Munish JOSHI, Tarun GARG, Amit Kumar GOYAL a Goutam RATH. Transmucosal delivery of Docetaxel by mucoadhesive polymeric nanofibers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2015, **43**(4), 263–269. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2014.885442
37. SHARMA, A., A. GUPTA, G. RATH, A. GOYAL, R. B. MATHUR a S. R. DHAKATE. Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2013, **1**(27), 3410. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/c3tb20487a
38. GREWAL, Harleen, Sanjay R. DHAKATE, Amit K. GOYAL, Tanmay S. MARKANDEYWAR, Basant MALIK a Goutam RATH. Development of Transmucosal Patch Using Nanofibers. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* [online]. 2012, **40**(1–2), 146–150. ISSN 1073-1199. Dostupné z: doi:10.3109/10731199.2011.637924
39. TORRES-MARTINEZ, Erick José, José Manuel CORNEJO BRAVO, Aracely SERRANO MEDINA, Graciela Lizeth PÉREZ GONZÁLEZ a Luis Jesús VILLARREAL GÓMEZ. A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. *Current Drug Delivery* [online]. 2018, **15**(10), 1360–1374. ISSN 15672018. Dostupné z: doi:10.2174/1567201815666180723114326
40. STRÁNSKÁ, Denisa, Adéla KLABANOVÁ, Pavel DOLEŽAL, Petr VRBATA, Pavel BERKA a Marie MUSILOVÁ. Nosič pro oromukosální, zejména sublingvální aplikaci fyziologicky aktivních látek. CZ201124A3. 2011.
41. GOSWAMI, Tarun, Bhaskara R. JASTI a Xiaoling LI. Estimation of the theoretical pore sizes of the porcine oral mucosa for permeation of hydrophilic permeants. *Archives of Oral Biology* [online]. 2009, **54**(6), 577–582 [vid. 2019-02-24]. ISSN 0003-9969. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2009.03.001
42. BABITHA, S., Lakra RACHITA, K. KARTHIKEYAN, Ekambaram SHOBA, Indrakumar JANANI, Balan POORNIMA a K. PURNA SAI. Electrospun protein nanofibers in healthcare: A review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **523**(1), 52–90. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.013
43. PAAVER, Urve, Jyrki HEINÄMÄKI, Ivo LAIDMÄE, Andres LUST, Jekaterina KOZLOVA, Elen SILLASTE, Kalle KIRSIMÄE, Peep VESKI a Karin KOGERMANN. Electrospun nanofibers as a potential controlled-release solid dispersion system for poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **479**(1), 252–260. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.024
44. BLAKNEY, Anna K, Cameron BALL, Emily A KROGSTAD a Kim A WOODROW. Electrospun fibers for vaginal anti-HIV drug delivery. *Antiviral research* [online]. 2013, **100 Suppl**, S9-16 [vid. 2014-10-15]. ISSN 1872-9096. Dostupné z: doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.022



45. JIRSAK, O., F. SANETRNIK, D. LUKAS, K. KOTEK, L. MARTINOVA a J. CHALOUPEK. A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. WO2005024101A1. 2005.
46. STRÁNSKÁ, Denisa, Pavel BERKA a Pavel DOLEŽAL. Validace výroby jednodávkových medikovaných nanovlákných přípravků produkovaných elektrospinningem. *Chemické listy*. 2019, **113**, 337–342.
47. RUTLEDGE, Gregory C. a Sergey V. FRIDRIKH. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, **59**(14), 1384–1391. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.04.020
48. TUCKER, Nick, Jonathan J STANGER, Mark P STAIGER, Hussam RAZZAQ a Kathleen HOFMAN. The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of engineered fibers and fabrics*. 2012, **7**(2\_suppl), 155892501200702S10. ISSN 1558-9250.
49. MARES, Ladislav, David PETRAS, Denisa STRANSKA a Miroslav MALY. A METHOD AND DEVICE FOR PRODUCTION OF NANOFIBRES THROUGH ELECTROSTATIC SPINNING OF SOLUTIONS OR MELTS OF POLYMERS. WO 2007/054039 A1. 2008.
50. PATEL, Viralkumar F., Fang LIU a Marc B. BROWN. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(3), 746–756. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.026
51. KULKARNI, Upendra, Ravichandran MAHALINGAM, Indiran PATHER, Xiaoling LI a Bhaskara JASTI. Porcine buccal mucosa as in vitro model: Effect of biological and experimental variables. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, **99**(3), 1265–1277. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21907
52. COLLINS, P, J LAFFOON a C A SQUIER. Comparative structure of porcine oral epithelium. In: *Journal of Dental Research*. CONF. B.m.: AMER ASSOC DENTAL RESEARCH 1619 DUKE ST, ALEXANDRIA, VA 22314, 1981, s. 543. ISBN 0022-0345.
53. SQUIER, C A a B K HALL. In-vitro permeability of porcine oral mucosa after epithelial separation, stripping and hydration. *Archives of oral biology*. 1985, **30**(6), 485–491. ISSN 0003-9969.
54. LESCH, C A, C A SQUIER, A CRUCHLEY, D M WILLIAMS a P SPEIGHT. The permeability of human oral mucosa and skin to water. *Journal of dental research*. 1989, **68**(9), 1345–1349. ISSN 0022-0345.
55. IMBERT, Delphine a Christopher CULLANDER. Buccal mucosa in vitro experiments: I. Confocal imaging of vital staining and MTT assays for the determination of tissue viability. *Journal of controlled release*. 1999, **58**(1), 39–50. ISSN 0168-3659.
56. MARXEN, Eva, Mary Carlos AXELSEN, Anne Marie Lyng PEDERSEN a Jette JACOBSEN. Effect of cryoprotectants for maintaining drug permeability barriers in porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **511**(1), 599–605. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.014

57. MURA, Paola, Serena ORLANDINI, Marzia CIRRI, Francesca MAESTRELLI, Natascia MENNINI, Giada CASELLA a Sandra FURLANETTO. A preliminary study for the development and optimization by experimental design of an in vitro method for prediction of drug buccal absorption. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **547**(1–2), 530–536. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.032
58. BIERBAUMER, Lisa, Uwe Yacine SCHWARZE, Reinhard GRUBER a Winfried NEUHAUS. Cell culture models of oral mucosal barriers: A review with a focus on applications, culture conditions and barrier properties. *Tissue Barriers* [online]. 2018, **6**(3), 1479568. ISSN 2168-8370. Dostupné z: doi:10.1080/21688370.2018.1479568
59. VEUILLEZ, F., F. Falson RIEG, R. H. GUY, J. DESHUSSES a P. BURI. Permeation of a myristoylated dipeptide across the buccal mucosa: Topological distribution and evaluation of tissue integrity. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **231**(1), 1–9. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(01)00850-X
60. FRANZ-MONTAN, Michelle, Luciano SERPE, Claudia Cristina Maia MARTINELLI, Camila Batista DA SILVA, Cleiton Pita DOS SANTOS, Pedro Duarte NOVAES, Maria Cristina VOLPATO, Eneida DE PAULA, Renata Fonseca Vianna LOPEZ, Francisco Carlos GROppo, Cleiton Pita Dos SANTOS, Pedro Duarte NOVAES, Maria Cristina VOLPATO, Eneida DE PAULA, Renata Fonseca Vianna LOPEZ a Francisco Carlos GROppo. Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **81**(2016), 52–59. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2015.09.021
61. NOTMAN, Rebecca, Massimo NORO, Brendan O'MALLEY a Jamshed ANWAR. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(43), 13982–13983. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja063363t
62. KEARNEY, John N. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clinics in dermatology*. 2005, **23**(4), 357–364. ISSN 0738-081X.
63. SCHIOZER, W A, A HARTINGER, G Henckel v DONNERSMARCK a W MÜHLBAUER. Composite grafts of autogenic cultured epidermis and glycerol-preserved allogeneic dermis for definitive coverage of full thickness burn wounds. *Burns*. 1994, **20**(6), 503–507. ISSN 0305-4179.
64. HEINZE, Thomas, Tim LIEBERT, Brigitte HEUBLEIN a Stephanie HORNIG. Functional Polymers Based on Dextran. In: Dieter KLEMM, ed. *Polysaccharides II* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, s. 199–292. ISBN 978-3-540-37102-1. Dostupné z: doi:10.1007/11776895
65. MERCK KGAA, DARMSTADT, Germany. *Dextran from Leuconostoc mesenteroides (Product Comparison Guide)* [online]. 2019 [vid. 2019-07-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/dextranfromleuconostocmesenteroides12345900454011>
66. HAN, Zheng a Guanshu LIU. Sugar-based biopolymers as novel imaging agents for molecular magnetic resonance imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2019, **11**(4), e1551. ISSN 19395116. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.1551

67. SIDEBOTHAM, Ramon L. Dextrans. In: R. Stuart TIPSON a Derek HORTON, ed. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 30* [online]. New York, San Francisco, London: Academic Press, 1974, s. 371–444. ISBN 978-0-12-007230-9. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2318(08)60268-1
68. PASTEUR, Louis. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bull. Soc. Chim. Paris*. 1861, **11**, 30–31.
69. STAAT, R H, T H GAWRONSKI a C F SCHACHTELE. Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. *Infection and immunity* [online]. 1973, **8**(6), 1009–16. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4594114>
70. DE BELDER, A. N. *Dextran - Handbook* [online]. Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences AB, 2003. Dostupné z: [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com)
71. ARMSTRONG, J.K., R.B. WENBY, H.J. MEISELMAN a T.C. FISHER. The Hydrodynamic Radii of Macromolecules and Their Effect on Red Blood Cell Aggregation. *Biophysical Journal* [online]. 2004, **87**(6), 4259–4270. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.104.047746
72. DREHER, Matthew R, Wenge LIU, Charles R MICHELICH, Mark W DEWHIRST, Fan YUAN a Ashutosh CHILKOTI. Tumor Vascular Permeability, Accumulation, and Penetration of Macromolecular Drug Carriers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2006, **98**(5), 335–344. ISSN 1460-2105. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/djj070
73. GRANATH, Kirsti A. Solution Properties of Branched Dextrans. *Journal of Colloid Science*. 1958, **13**, 308–328.
74. DE BELDER, Anthony N. Medical Applications of Dextran and Its Derivatives. In: Severian DUMITRIU, ed. *Polysaccharides in Medicinal Applications*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1996, s. 505–524.
75. BOVEY, F. A. Enzymatic polymerization. I. Molecular weight and branching during the formation of dextran. *Journal of Polymer Science* [online]. 1959, **35**(128), 167–182. ISSN 00223832. Dostupné z: doi:10.1002/pol.1959.1203512813
76. HEHRE, E. J. Production From Sucrose Of A-Sero-Logically Reactive Polysaccharide By A Sterile Bacterial Extract. *Science* [online]. 1941, **93**(2410), 237–238. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.93.2410.237
77. NIGAM, Manisha, Arun GOYAL a Sarvagya S. KATIYAR. High Yield Purification Of Dextranase from *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-512F by Phase Partitioning. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2006, **30**(1), 12–20. ISSN 0145-8884. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-4514.2005.00047.x
78. ECKELT, John, Rei SUGAYA a Bernhard A. WOLF. Large scale fractionation of pullulan and dextran. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2006, **63**(2), 205–209. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2005.08.026
79. KHALIKOVA, Elvira, Petri SUSI a Timo KORPELA. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2005, **69**(2), 306 LP-325. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.69.2.306-325.2005

80. PAUL, F., E. ORIOL, D. AURIOL a P. MONSAN. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydrate Research* [online]. 1986, **149**(2), 433–441. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(00)90063-6
81. PORATH, Jerker a Per FLODIN. Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature* [online]. 1959, **183**(4676), 1657–1659. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/1831657a0
82. VOBECKÁ, Lucie, Alexandr ROMANOV, Zdeněk SLOUKA, Pavel HASAL a Michal PŘIBYL. Optimization of aqueous two-phase systems for the production of 6-aminopenicillanic acid in integrated microfluidic reactors-separators. *New Biotechnology* [online]. 2018, **47**(July 2017), 73–79. ISSN 18764347. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2018.03.005
83. MARTIN, Nicolas. Dynamic synthetic cells based on liquid- liquid phase separation. *ChemBioChem* [online]. 2019, cbic.201900183. ISSN 1439-4227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201900183
84. PEI, Dong, Xing-Jun Jun XI, Xin-Yi Yi HUANG, Kai-Jun Jun QUAN, Jan-Teng Teng WEI, Ning-Li Li WANG a Duo-Long Long DI. Isolation of high-purity peptide Val-Val-Tyr-Pro from Globin Peptide using MCI gel column combined with high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(24), 4559–4566. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201800972
85. JONES, Chris I., David A. PAYNE, Paul D. HAYES, A. Ross NAYLOR, Peter R.F. BELL, Mathew M. THOMPSON a Alison H. GOODALL. The antithrombotic effect of dextran-40 in man is due to enhanced fibrinolysis in vivo. *Journal of Vascular Surgery* [online]. 2008, **48**(3), 715–722. ISSN 07415214. Dostupné z: doi:10.1016/j.jvs.2008.04.008
86. LJUNGSTRÖM, Karl-Gösta. Safety of Dextran in Relation to Other Colloids – Ten Years Experience with Hapten Inhibition. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [online]. 1993, **20**(5), 206–210. ISSN 1660-3796. Dostupné z: doi:10.1159/000222845
87. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Information for the package leaflet regarding dextrans used as excipients in medicinal products for human use [online]. 2018, **44**(November), 1–14. Dostupné z: www.ema.europa.eu/contact
88. WHO. *World Health Organization Model List of Essential Medicines* [online]. 21th vyd. B.m.: World Health Organization, 2019. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>
89. KOKOTILO, Matthew S., Kimberly SCHLACHTER, Jodi CARTER, Aducio THIESEN, Rachel G. KHADAROO a Thomas A. CHURCHILL. Comparing the effects of Dextran 70 and Hydroxyethyl starch in an intestinal storage solution. *Cryobiology* [online]. 2010, **61**(3), 254–262. ISSN 00112240. Dostupné z: doi:10.1016/j.cryobiol.2010.09.002
90. ALCON PHARMACEUTICALS. *Tears Naturale II - souhrn údajů o přípravku* [online]. 2018 [vid. 2019-07-25]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC125403.pdf&type=spc&as=tears-naturale-ii-spc>

91. LEMARCHAND, Caroline, Ruxandra GREF a Patrick COUVREUR. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, **58**(2), 327–341. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2004.02.016
92. JAENIKE, John R. a Christine WATERHOUSE. Metabolic and Hemodynamic Changes Induced by the Prolonged Administration of Dextran. *Circulation* [online]. 1955, **11**(1), 1–13. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.11.1.1
93. ARTURSON, G. a G. WALLENIUS. The Intravascular Persistence of Dextran of Different Molecular Sizes in Normal Humans. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 1964, **16**(1), 76–80. ISSN 0036-5513. Dostupné z: doi:10.3109/00365516409060485
94. CHANG, R L, I F UEKI, J L TROY, W M DEEN, Ch R ROBERTSON a B M BRENNER. Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran. *Biophysical Journal*. 1975, **15**(9), 887–906. ISSN 0006-3495.
95. MEHVAR, Reza. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **69**(1), 1–25. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00302-3
96. TAKAKURA, Yoshinobu, Takuya FUJITA, Mitsuru HASHIDA a Hitoshi SEZAKI. Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice. *Pharmaceutical Research* [online]. 1990, **7**(4), 339–346. ISSN 07248741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1015807119753
97. NISHIDA, Koyo, Chiaki TONEGAWA, Sachi NAKANE, Yoshinobu TAKAKURA, Mitsuru HASHIDA a Hitoshi SEZAKI. Effect of electric charge on the hepatic uptake of macromolecules in the rat liver. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1990, **65**(1–2), 7–17. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(90)90003-M
98. NISHIDA, Koyo, Kiyoshi MIHARA, Toichi TAKINO, Sachi NAKANE, Yoshinobu TAKAKURA, Mitsuru HASHIDA a Hitoshi SEZAKI. Hepatic Disposition Characteristics of Electrically Charged Macromolecules in Rat in Vivo and in the Perfused Liver. *Pharmaceutical Research* [online]. 1991, **8**(4), 437–444. ISSN 07248741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1015886708598
99. PAN, Huaizhong a Jindřich KOPEČEK. Multifunctional Water-Soluble Polymers for Drug Delivery. In: Vladimir TORCHILIN, ed. *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers* [online]. New York, NY: Springer New York, 2008, s. 81–142. ISBN 978-0-387-76551-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-76554-9
100. DHANESHWAR, Suneela S., Mini KANDPAL, Neha GAIROLA a S.S. KADAM. Dextran: A promising macromolecular drug carrier. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2006, **68**(6), 705–714. ISSN 0250-474X. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.31000
101. SNELL, C R a D G SMYTH. Biologically active macromolecular forms of oxytocin. [8-Lysine]oxytocin as a suitable ligand. *Biochemical Journal* [online]. 1977, **165**(1), 43–47. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1650043
102. MURANISHI, Shozo, Yoshiteru TAKAHASHI, Mitsuru HASHIDA a Hitoshi SEZAKI. Effect of complexation with dextran sulfate on the lymphatic delivery of bleomycin following intrastitital administration. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* [online]. 1979, **2**(6), 383–390. ISSN 1881-1353. Dostupné z: doi:10.1248/bpb1978.2.383

103. ALIU, Y. Otaru a Abdulrahim SANNUSI. Isometamidium-dextran complex: therapeutic activity against *Trypanosoma vivax* infection in Zebu cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online]. 1979, **2**(4), 265–273. ISSN 0140-7783. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.1979.tb00400.x
104. KIKUCHI, Shinji, Asaichi INABA, Masayuki TAKAHASHI, Yukihiko ARAMAKI a Seishi TSUCHIYA. Decreased distribution of gentamicin in rat kidney by complexation with dextran sulfate. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1988, **42**(1–3), 193–198. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(88)90175-5
105. TU, Jiasheng, Sha ZHONG a Pengmei LI. Studies on acyclovir-dextran conjugate: synthesis and pharmacokinetics. *Drug development and industrial pharmacy* [online]. 2004, **30**(9), 959–65. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.1081/DDC-200037232
106. SHRIVASTAVA, Sushant K., D. K. JAIN, Prabhat K. SHRIVASTAVA a Piyush TRIVEDI. Flurbiprofen- and suprofen-dextran conjugates: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2009, **8**(3), 221–229. ISSN 15969827. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v8i3.44537
107. PRAVEEN, B, Prabhat SHRIVASTAVA a Sushant Kumar SHRIVASTAVA. In-Vitro release and pharmacological study of synthesized valproic acid-dextran conjugate. *Acta Pharmaceutica Scientia*. 2009, **51**(2). ISSN 2636-8552.
108. MARSHALL, J. John. Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1978, **3**(2), 79–83. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(78)80003-6
109. HARBOE, E, M JOHANSEN a C LARSEN. Macromolecular prodrugs. VI. Coupling of the highly lipophilic agent naproxen to dextrans and in vitro characterization of the conjugates. *Farmaci. Sci. Ed.* 1988, **16**, 73–85.
110. LARSEN, Claus. Macromolecular prodrugs. XIII. Determination of the ionization constant of dextran by potentiometric titration and from kinetic analysis of the hydrolysis of dextran indomethacin ester conjugates. *International journal of pharmaceutics*. 1989, **52**(1), 55–61. ISSN 0378-5173.
111. LARSEN, C a M JOHANSEN. Macromolecular Prodrugs. XI. Regeneration Rates Of Various Nsaid Compounds From Their Corresponding Dextran Ester Prodrugs In Aqueous Buffer And In Different Biological Media. *Acta Pharmaceutica Nordica*. 1989, **1**(2), 57–66. ISSN 1100-1801.
112. TORCHILIN, V P, E G TISCHENKO, V N SMIRNOV a E I CHAZOV. Immobilization of enzymes on slowly soluble carriers. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1977, **11**(2), 223–235. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.820110208
113. TORCHILIN, V P, E V IL'INA, A V MAZAEV, B S LEBEDEV, V N SMIRNOV a E I CHAZOV. Study of modified Sephadex-bound insulin in animal experiments. *Journal of Solid-Phase Biochemistry* [online]. 1977, **2**(3), 187–193. ISSN 0146-0641. Dostupné z: doi:10.1007/BF02996740
114. BERNSTEIN, A, E HURWITZ, R MARON, R ARNON, M SELA a M WILCHEK. Higher Antitumor Efficacy of Daunomycin When Linked to Dextran: In Vivo and In Vitro Studies 2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1978, **60**(2), 379–384. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/60.2.379

115. KÅGEDAL, L a STIG AKERSTRÖM. Binding of covalent proteins to polysaccharides by cyanogen bromide and organic cyanates. I. Preparation of soluble glycine-, insulin- and ampicillin-dextran. *Acta Chem Scand.* 1971, **25**(5), 1855–1859. ISSN 0001-5393.
116. ODYA, Charles E, Yehuda LEVIN, Ervin G ERDÖS a Carol J.G. ROBINSON. Soluble dextran complexes of Kallikrein, Bradykinin and enzyme inhibitors. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1978, **27**(2), 173–179. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(78)90297-6
117. TAKAKURA, Yoshinobu, Yoko KANEKO, Takuya FUJITA, Mitsuru HASHIDA, Hiroshi MAEDA a Hitoshi SEZAKI. Control of Pharmaceutical Properties of Soybean Trypsin Inhibitor by Conjugation with Dextran I: Synthesis and Characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1989, **78**(2), 117–121. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600780209
118. TAKAKURA, Yoshinobu, Takuya FUJITA, Mitsuru HASHIDA, Hiroshi MAEDA a Hitoshi SEZAKI. Control of pharmaceutical properties of soybean trypsin inhibitor by conjugation with dextran II: Biopharmaceutical and pharmacological properties. *Journal of pharmaceutical sciences* [online]. 1989, **78**(3), 219–222. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600780310
119. BARKER, S.A. A, Helen M DISNEY, P J SOHMTS a P.J. SOMERS. The reaction of dextran carbonate with amino acids and polypeptides. *Carbohydrate Research* [online]. 1972, **25**(1), 237–241. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(00)82764-0
120. SOYEZ, Heidi, Etienne SCHACHT a Sylvie VANDERKERKEN. The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1996, **21**(2), 81–106. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(96)00400-0
121. LARSEN, C, P KURTZHALS a M JOHANSEN. Macromolecular prodrugs. IX. The release kinetics of metronidazole from various dextran dicarboxylic acid hemiester conjugates in aqueous buffer, human plasma and in pig liver homogenate. *Acta pharmaceutica suecica* [online]. 1988, **25**(1), 1–14. ISSN 0001-6675. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/2458010>
122. TAKAKURA, Yoshinobu, Satoshi MATSUMOTO, Mitsuru HASHIDA a Hitoshi SEZAKI. Physicochemical properties and antitumor activities of polymeric prodrugs of mitomycin C with different regeneration rates. *Journal of Controlled Release* [online]. 1989, **10**(1), 97–105. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/0168-3659(89)90021-7
123. UEDA, Yasuo, Koji MUNECHIKA, Akihito KIKUKAWA, Yoshiaki KANO, Kouichi YAMANOUCHI a Kazumasa YOKOYAMA. Comparison of efficacy, toxicity and pharmacokinetics of free adriamycin and adriamycin linked to oxidized dextran in rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1989, **37**(6), 1639–1641. ISSN 0009-2363. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.37.1639
124. DANHAUSER-RIEDL, Susanne, Edith HAUSMANN, Hans-D SCHICK, Rita BENDER, Hermann DIETZFELBINGER, Johann RASTETTER a Axel-R HANAUSKE. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin (AD-70, DOX-OXD). *Investigational new drugs* [online]. 1993, **11**(2–3), 187–195. ISSN 0167-6997. Dostupné z: doi:10.1007/BF00874153

125. YANG, Mengsu, Hing Leung CHAN, Wing LAM a W.F FONG. Cytotoxicity and DNA binding characteristics of dextran-conjugated doxorubicins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1998, **1380**(3), 329–335. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(97)00161-X
126. FAGNANI, Roberto, Michael S HAGAN a Richard BARTHOLOMEW. Reduction of immunogenicity by covalent modification of murine and rabbit immunoglobulins with oxidized dextrans of low molecular weight. *Cancer research* [online]. 1990, **50**(12), 3638–3645. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/50/12/3638.abstract>
127. FAGNANI, R, S HALPERN a M HAGAN. Altered pharmacokinetic and tumour localization properties of Fab' fragments of a murine monoclonal anti-CEA antibody by covalent modification with low molecular weight dextran. *Nuclear medicine communications* [online]. 1995, **16**(5), 362–369. ISSN 0143-3636. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/7544884>
128. TAKASHINA, Ken-ichiro, Kazuya KITAMURA, Toshiharu YAMAGUCHI, Akinori NOGUCHI, Akira NOGUCHI, Hiroshi TSURUMI a Toshio TOSHIO. Comparative pharmacokinetic properties of murine monoclonal antibody A7 modified with neocarzinostatin, dextran and polyethylene glycol. *Japanese journal of cancer research*. 1991, **82**(10), 1145–1150. ISSN 0910-5050.
129. NISHIKAWA, Makiya, Akiko KAMIJO, Takuya FUJITA, Yoshinobu TAKAKURA, Hitoshi SEZAKI a Mitsuru HASHIDA. Synthesis and Pharmacokinetics of a New Liver-Specific Carrier, Glycosylated Carboxymethyl-Dextran, and Its Application to Drug Targeting. *Pharmaceutical Research* [online]. 1993, **10**(9), 1253–1261. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1018949109004
130. WILEMAN, Thomas E. Properties of asparaginase-dextran conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1991, **6**(2), 167–180. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(91)90039-F
131. MANABE, Yuichi, Teruhiko TSUBOTA, Yuro HARUTA, Kiyoshi KATAOKA, Morihiro OKAZAKI, Shigeru HAISA, Kunihiko NAKAMURA a Ikuro KIMURA. Production of a monoclonal antibody-methotrexate conjugate utilizing dextran T-40 and its biologic activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine* [online]. 1984, **104**(3), 445–454. ISSN 0022-2143. Dostupné z: doi:10.5555/uri:pii:002221438490101X
132. ONISHI, Hiraku a Tsuneji NAGAI. Novel Preparation of Decylenediamine-dextran T70 and Inhibitory Activity toward Dihydrofolate Reductase of Decylenediaminedextran T70-Methotrexate Conjugate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1987, **35**(3), 1183–1188. ISSN 0009-2363. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.35.1183
133. SCHECHTER, B, R PAUZNER, R ARNON a M WILCHEK. Cis-platinum (II) complexes of carboxymethyl-dextran as potential antitumor agents. I. Preparation and characterization. *Cancer biochemistry biophysics* [online]. 1986, **8**(4), 277–287. ISSN 0305-7232. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/2433021>
134. SCHECHTER, B, R PAUZNER, M WILCHEK a R ARNON. Cis-platinum (II) complexes of carboxymethyl-dextran as potential antitumor agents. II. In vitro and in vivo activity. *Cancer biochemistry biophysics* [online]. 1986, **8**(4), 289–298. ISSN 0305-7232. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/2433022>



135. NAKASHIMA, Mikiro, Katsuro ICHINOSE, Takashi KANEMATSU, Tatsunori MASUNAGA, Yuichi OHYA, Tatsuro OUCHI, Naoki TOMIYAMA, Hitoshi SASAKI a Masataka ICHIKAWA. In Vitro Characteristics and in Vivo Plasma Disposition of Cisplatin Conjugated with Oxidized and Dicarboxymethylated Dextran. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1999, **22**(7), 756–761. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.22.756
136. MITSUMORI, M., M. HIRAOKA, T. SHIBATA, Y. OKUNO, S. MASUNAGA, M. KOISHI, K. OKAJIMA, Y. NAGATA, Y. NISHIMURA, M. ABE, K. OHURA, M. HASEGAWA, H. NAGAE a Y. EBISAWA. Development of intra-arterial hyperthermia using a dextran-magnetite complex. *International Journal of Hyperthermia* [online]. 1994, **10**(6), 785–793. ISSN 0265-6736. Dostupné z: doi:10.3109/02656739409012371
137. MITSUMORI, Michihide, Masahiro HIRAOKA, Toru SHIBATA, Yoshishige OKUNO, Yasushi NAGATA, Yasumasa NISHIMURA, Mitsuyuki ABE, Masakatsu HASEGAWA, Hideo NAGAE a Yukihiro EBISAWA. Targeted hyperthermia using dextran magnetite complex: a new treatment modality for liver tumors. *Hepato-gastroenterology* [online]. 1996, **43**(12), 1431–1437. ISSN 0172-6390. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/8975944>
138. ANDERSSON, Annelie, Anders HOLMBERG, Jörgen CARLSSON, Jan CARLSSON, Jan PONTÉN a Bengt WESTERMARK. Binding of epidermal growth factor-dextran conjugates to cultured glioma cells. *International Journal of Cancer* [online]. 1991, **47**(3), 439–444. ISSN 00207136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.2910470322
139. BUE, Peter, Marcela MÁRQUEZ, Per-Uno MALMSTRÖM, Jan-Erik WESTLIN, Sten NILSSON a Anders R. HOLMBERG. The potential of radiolabeled EGF- dextran conjugates in the treatment of urinary bladder carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* [online]. 1997, **80**(S12), 2385–2389. ISSN 0008-543X. Dostupné z: doi:10.1002/(sici)1097-0142(19971215)80:12+<2385::aid-cnrcr8>3.3.co;2-y
140. HARBOE, Elin, Claus LARSEN, Marianne JOHANSEN a Henning Peter OLESEN. Macromolecular prodrugs. XIV. Absorption characteristics of naproxen after oral administration of a dextran T-70-naproxen ester prodrug in pigs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1989, **53**(2), 157–165. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(89)90239-1
141. LARSEN, C, B H JENSEN a H P OLESEN. Bioavailability of ketoprofen from orally administered ketoprofen-dextran ester prodrugs in the pig. *Acta pharmaceutica Nordica* [online]. 1991, **3**(2), 71–6. ISSN 1100-1801. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716910>
142. MCLEOD, A., D. FRIEND a T. TOZER. Synthesis and chemical stability of glucocorticoid-dextran esters: potential prodrugs for colon-specific delivery☆. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1993, **92**(1–3), 105–114. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(93)90269-L
143. MCLEOD, Andrew D., David R. FRIEND a Thomas N. TOZER. Glucocorticoid–Dextran Conjugates as Potential Prodrugs for Colon-Specific Delivery: Hydrolysis in Rat Gastrointestinal Tract Contents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1994, **83**(9), 1284–1288. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600830919
144. MCLEOD, Andrew D., Lorna TOLENTINO a Thomas N. TOZER. Glucocorticoid-dextran conjugates as potential prodrugs for colonspecific delivery: Steady-state pharmacokinetics in the rat. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* [online]. 1994, **15**(2), 151–161. ISSN 0142-2782. Dostupné z: doi:10.1002/bdd.2510150207

145. TORCHILIN, V.P. Immobilised enzymes as drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1987, **1**(1), 41–86. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(87)90068-8
146. KANEO, Yoshiharu, Yumie FUJIHARA, Tetsuro TANAKA, Yoko KOZAWA, Hideki MORI a Sadao IGUCHI. Intrahepatic Delivery of Glutathione by Conjugation to Dextran. *Pharmaceutical Research* [online]. 1989, **6**(12), 1025–1031. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1015922303051
147. TAM, S. C., J. BLUMENSTEIN a J. T. WONG. Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1976, **73**(6), 2128–2131. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.73.6.2128
148. CÎRSTEA, M, M CÎRJE, G SUHACIU, G PETEC a M MIHĂILEANU. Penicilloyl-dextran conjugates as reagents for skin testing in penicillin allergy. *Physiologie (Bucarest)* [online]. 1981, **18**(4), 241–5. ISSN 1011-6206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6175005>
149. BUCKLIN, S. E., P. LAKE, L. LOGDBERG a D. C. MORRISON. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1995, **39**(7), 1462–1466. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.7.1462
150. COESSENS, Veerle, Etienne SCHACHT a Dominique DOMURADO. Synthesis of polyglutamine and dextran conjugates of streptomycin with an acid-sensitive drug-carrier linkage. *Journal of Controlled Release* [online]. 1996, **38**(2–3), 141–150. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/0168-3659(95)00111-5
151. MEHVAR, Reza. Simultaneous analysis of dextran-methylprednisolone succinate, methylprednisolone succinate, and methylprednisolone by size-exclusion chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 1999, **19**(5), 785–792. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(98)00308-2
152. MEHVAR, Reza, Roger O DANN a Dean A HOGANSON. Kinetics of hydrolysis of dextran–methylprednisolone succinate, a macromolecular prodrug of methylprednisolone, in rat blood and liver lysosomes. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000, **68**(1), 53–61. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00234-0
153. CHIMALAKONDA, Anjaneya P. a Reza MEHVAR. Dextran-methylprednisolone succinate as a prodrug of methylprednisolone: Local immunosuppressive effects in liver after systemic administration to rats. *Pharmaceutical Research* [online]. 2003, **20**(2), 198–204. ISSN 07248741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1022358702643
154. YURA, Hiroshi, Norio YOSHIMURA, Takashi HAMASHIMA, Ken AKAMATSU, Makiya NISHIKAWA, Yoshinobu TAKAKURA a Mitsuru HASHIDA. Synthesis and pharmacokinetics of a novel macromolecular prodrug of Tacrolimus (FK506), FK506–dextran conjugate. *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **57**(1), 87–99. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(98)00150-3
155. MIKHAIL, J W, M T KHAYYAL a N I GIRGIS. Activity of antimony dextran glycoside (RL-712) against visceral leishmaniasis in the hamster. *Bulletin of the World Health Organization* [online]. 1969, **40**(2), 327–8. ISSN 0042-9686. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5306550>

156. HENDERSON, Perry A a Robert S HILLMAN. Characteristics of Iron Dextran Utilization in Man. *Blood* [online]. 1969, **34**(3), 357 LP-375. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/34/3/357.abstract>
157. BURNS, D L, E A MASCIOLI a B R BISTRIAN. Parenteral iron dextran therapy: a review. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* [online]. 1995, **11**(2), 163–8. ISSN 0899-9007. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647482>
158. SLOAND, James A., Mark A. SHELLY, Andrew FEIGIN, Paul BERNSTEIN a Rebeca D. MONK. A double-blind, placebo-controlled trial of intravenous iron dextran therapy in patients with ESRD and restless legs syndrome. *American Journal of Kidney Diseases* [online]. 2004, **43**(4), 663–670. ISSN 02726386. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2003.11.021
159. DANSEREAU, Raymond N. a Bruce R. LINE. Preparation of dextran 70 injection labeled with technetium 99m for use as a cardiac blood-pool imaging agent. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 1994, **51**(22), 2797–2800. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.1093/ajhp/51.22.2797
160. BHATNAGAR, Aseem, Ajay Kumar SINGH, Deepak LAHOTI, Thakuri SINGH a Chandra M KHANNA. Technetium-99m dextran: a promising new protein-losing enteropathy imaging agent. *European Journal of Nuclear Medicine* [online]. 1996, **23**(5), 575–578. ISSN 1619-7089. Dostupné z: doi:10.1007/BF00833395
161. BHATNAGAR, Aseem, Ajay Kumar SINGH, Deepak LAHOTI, Thakuri SINGH, S CHAKRAVARTY, H RAWAT, U P CHAUHAN a A MONDAL. Scintigraphic diagnosis of gastrointestinal bleeding with 99Tcm-dextran. *Nuclear medicine communications* [online]. 1996, **17**(10), 834–8. ISSN 0143-3636. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8951902>
162. BHATNAGAR, A, A K SINGH, T SINGH a L R SHANKAR. 99Tcm-dextran: a potential inflammation-seeking radiopharmaceutical. *Nuclear medicine communications* [online]. 1995, **16**(12), 1058–62. ISSN 0143-3636. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719988>
163. WANG, S C, M G WIKSTRÖM, D L WHITE, J KLAIVENESS, E HOLTZ, P RONGVED, M E MOSELEY a R C BRASCH. Evaluation of Gd-DTPA-labeled dextran as an intravascular MR contrast agent: imaging characteristics in normal rat tissues. *Radiology* [online]. 1990, **175**(2), 483–488. ISSN 0033-8419. Dostupné z: doi:10.1148/radiology.175.2.1691513
164. ANZAI, Y., S. MCLACHLAN, M. MORRIS, R. SAXTON a R. B. LUFKIN. Dextran-coated superparamagnetic iron oxide, an MR contrast agent for assessing lymph nodes in the head and neck. *American Journal of Neuroradiology*. 1994, **15**(1), 87–94. ISSN 01956108.
165. CHAU, Ying, Frederick E. TAN a Robert LANGER. Synthesis and Characterization of Dextran–Peptide–Methotrexate Conjugates for Tumor Targeting via Mediation by Matrix Metalloproteinase II and Matrix Metalloproteinase IX. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2004, **15**(4), 931–941. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc0499174
166. GANDHI, P M, A R CHABUKSWAR, S C JAGDALE a Review ARTICLE. Carriers for prodrug synthesis: A review. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **81**(3), 406–414. ISSN 0250474X (ISSN). Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068688449&partnerID=40&md5=ba15b4645884a46c1326e9104f7dc3df>

167. LIU, Zonghua, Yanpeng JIAO, Yifei WANG, Changren ZHOU a Ziyong ZHANG. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(15), 1650–1662. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.09.001
168. SARMENTO, Bruno, António RIBEIRO, Francisco VEIGA a Domingos FERREIRA. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2006, **53**(2), 193–202. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2006.09.012
169. TIYABOONCHAI, Waree a Nanteetip LIMPEANCHOB. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2007, **329**(1–2), 142–149. ISSN 0378-5173.
170. GREF, Ruxandra, Jaqueline RODRIGUES a Patrick COUVREUR. Polysaccharides Grafted with Polyesters: Novel Amphiphilic Copolymers for Biomedical Applications. *Macromolecules* [online]. 2002, **35**(27), 9861–9867. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma021132a
171. PASSIRANI, Catherine, Gillian BARRATT, Jean-Philippe DEVISSAGUET a Denis LABARRE. Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sciences* [online]. 1998, **62**(8), 775–785. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/S0024-3205(97)01175-2
172. BERTHOLON, Isabelle, Christine VAUTHIER a Denis LABARRE. Complement Activation by Core–Shell Poly(isobutylcyanoacrylate)–Polysaccharide Nanoparticles: Influences of Surface Morphology, Length, and Type of Polysaccharide. *Pharmaceutical Research* [online]. 2006, **23**(6), 1313–1323. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-006-0069-0
173. CHAUVIERRE, Cédric, Denis LABARRE, Patrick COUVREUR a Christine VAUTHIER. Novel Polysaccharide-Decorated Poly(Isobutyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* [online]. 2003, **20**(11), 1786–1793. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/B:PHAM.0000003376.57954.2a
174. MUFAMADI, Maluta S., Viness PILLAY, Yahya E. CHOONARA, Lisa C. DU TOIT, Girish MODI, Dinesh NAIDOO a Valence M. K. NDESENDO. A Review on Composite Liposomal Technologies for Specialized Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, **2011**, 1–19. ISSN 2090-3014. Dostupné z: doi:10.1155/2011/939851
175. DE GROOT, Cornelis J., Jenny A. CADÉE, Jan-Willem KOTEN, Wim E. HENNINK a Willem DEN OTTER. Therapeutic efficacy of IL-2-loaded hydrogels in a mouse tumor model. *International Journal of Cancer* [online]. 2002, **98**(1), 134–140. ISSN 00207136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.10167
176. STENEKES, R J, A E LOEBIS, C M FERNANDES, D J CROMMELIN a W E HENNINK. Controlled release of liposomes from biodegradable dextran microspheres: a novel delivery concept. *Pharmaceutical research* [online]. 2000, **17**(6), 690–5. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955842>
177. LIPTAY, Susanne, Hans WEIDENBACH, Guido ADLER a Roland M. SCHMID. Colon Epithelium Can Be Transiently Transfected with Liposomes, Calcium Phosphate Precipitation and DEAE Dextran in vivo. *Digestion* [online]. 1998, **59**(2), 142–147. ISSN 0012-2823. Dostupné z: doi:10.1159/000007479

178. IMMORDINO, Maria Laura, Franco DOSIO a Luigi CATTEL. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. 2006, **1**(3), 297–315.
179. SÚKL. *Číselník KLK - aktualizace 1.7.2019* [online]. 2019 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/file/89456\\_9\\_1/](http://www.sukl.cz/file/89456_9_1/)
180. ÚSKVBL. *Aktuálně registrované VLP* [online]. 2019 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-ulp/seznam-ulp/aktualne-registrovane-ulp/vyhledane-pipravky-ulp?navez=&latka=Dextraferranum&ciloveZvire=0&lekovaForma=0&datumOd=&datumDo=&regcislo=&drzitel=&baleni=&vydej=0&atcKod=&farmSkupina=0&>
181. BIOVETA. *Ferribion - SPC* [online]. 2013 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780092840.doc>
182. AUERBACH, Michael a Iain C. MACDOUGALL. Safety of intravenous iron formulations: Facts and folklore. *Blood Transfusion* [online]. 2014, **12**(3), 296–300. ISSN 17232007. Dostupné z: doi:10.2450/2014.0094-14
183. CRASTO, Anthony Melvin. *Ferumoxytol* [online]. 2013 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <https://newdrugapprovals.org/2013/03/08/snda-fda-accepts-amag-ferahemeferumoxytol-snda-for-review/>
184. AMAG PHARMACEUTICALS, Inc. *Feraheme(TM) ferumoxytol injection - highlights of prescribing information* [online]. 2018 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <http://www.feraheme.com/pdfs/Feraheme-Prescribing-Information.pdf>
185. BOBO, Daniel, Kye J. ROBINSON, Jiaul ISLAM, Kristofer J. THURECHT a Simon R. CORRIE. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research* [online]. 2016, **33**(10), 2373–2387. ISSN 1573904X. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-016-1958-5
186. PAI, Amy Barton a Adinoyi O GARBA. Ferumoxytol: a silver lining in the treatment of anemia of chronic kidney disease or another dark cloud? *Journal of blood medicine* [online]. 2012, **3**, 77–85. ISSN 1179-2736. Dostupné z: doi:10.2147/JBM.S29204
187. HENGERER, Arne a Jan GRIMM. Molecular magnetic resonance imaging. *Medical Solutions*. 2005, (September), 31–38.
188. VENTOLA, C Lee. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics (P&T)* [online]. 2017, **42**(12), 742–755. ISSN 1052-1372. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29234213>
189. DRUGBANK. *Iron Dextran* [online]. 2019 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00893>
190. DRUGBANK. *Ferumoxytol* [online]. 2019 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06215>
191. SABM. *Iron Table* [online]. 2018 [vid. 2019-07-28]. Dostupné z: [https://www.sabm.org/wp-content/uploads/2018/08/iron\\_table.pdf](https://www.sabm.org/wp-content/uploads/2018/08/iron_table.pdf)
192. DE BELDER, A.N. a Kirsti GRANATH. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. *Carbohydrate Research* [online]. 1973, **30**(2), 375–378. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(00)81824-8

193. TOLO, K a J JONSEN. In vitro penetration of tritiated dextrans through rabbit oral mucosa. *Archives of oral biology* [online]. 1975, **20**(7), 419--IN1 [vid. 2019-02-24]. ISSN 0003-9969. Dostupné z: doi:10.1016/0003-9969(75)90227-7
194. HOOGSTRAATE, A.J., J.C. VERHOEF, B. TUK, A. PIJPERS, L.A.M.G. VAN LEENGOED, J.H.M. VERHEIJDEN, H.E. JUNGINGER a H.E. BODDÉ. In-vivo Buccal Delivery of Fluorescein Isothiocyanate–Dextran 4400 with Glycodeoxycholate as an Absorption Enhancer in Pigs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1996, **85**(5), 457–460. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1021/js950129k
195. HOOGSTRAATE, A. J., J. C. VERHOEF, B. TUK, A. PIJPERS, L.A.M.G. VAN LEENGOED, J.H.M. VERHEIJDEN, H.E. JUNGINGER a H.E. BODDÉ. Buccal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran 4400 and the peptide drug busserelin with glycodeoxycholate as an absorption enhancer in pigs. *Journal of controlled release* [online]. 1996, **41**(1–2), 77–84. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01358-2
196. VAN DER BIJL, Pieter, Armored D. VAN EYK a Ivor O. C. THOMPSON. Penetration of human vaginal and buccal mucosa by 4.4-kd and 12-kd fluorescein-isothiocyanate-labeled dextrans Pieter. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1998, **85**(6), 686–691.
197. NIELSEN, Hanne Mørck, J. Coos VERHOEF, Maria PONEC a Margrethe Rømer RASSING. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: Permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextrans in the presence of sodium glycocholate. *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **60**(2–3), 223–233. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(99)00081-4
198. PATEL, Mangala P., Svetla T. CHURCHMAN, Alan T. CRUCHLEY, Michael BRADEN a David M. WILLIAMS. Delivery of macromolecules across oral mucosa from polymeric hydrogels is enhanced by electrophoresis (iontophoresis). *Dental Materials* [online]. 2013, **29**(11), e299–e307. ISSN 01095641. Dostupné z: doi:10.1016/j.dental.2013.09.003
199. PATEL, Mangala P., Svetla T. CHURCHMAN, Alan T. CRUCHLEY, Michael BRADEN a David M. WILLIAMS. Electrically induced transport of macromolecules through oral buccal mucosa. *Dental Materials* [online]. 2013, **29**(6), 674–681. ISSN 01095641. Dostupné z: doi:10.1016/j.dental.2013.03.016
200. NICOLAZZO, Joseph A., Barry L. REED a Barrie C. FINNIN. The Effect of Various In Vitro Conditions on the Permeability Characteristics of the Buccal Mucosa. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2003, **92**(12), 2399–2410. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.10505
201. PAMORNPATHEM, Boonnada, Sureewan DUANGJIT, Suvida LAOHAPATARAPANT, Theerasak ROJANARATA, Praneet OPANASOPIT a Tanasait NGAWHIRUNPAT. Transdermal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextrans using the combination of microneedles and low-frequency sonophoresis. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **10**(5), 415–424. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2015.05.002
202. SUARATO, Giulia, Raffaele SPANÒ, Rosalia BERTORELLI, Alberto DIASPRO, Athanassia ATHANASSIOU a Salvatore SURDO. 3D-Printed, Pocket-Size Diffusion Cells for Skin Permeation Investigation. *Proceedings* [online]. 2018, **2**(13), 945. Dostupné z: doi:10.3390/proceedings2130945

203. PANTZAR, N, B R WESTRÖM, a LUTS a S LUNDIN. Regional small-intestinal permeability in vitro to different-sized dextrans and proteins in the rat. *Scandinavian journal of gastroenterology* [online]. 1993, **28**(3), 205–11. ISSN 0036-5521. Dostupné z: doi:10.3109/00365529309096073
204. MAKHLOF, Abdallah, Martin WERLE, Yuichi TOZUKA a Hirofumi TAKEUCHI. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, **149**(1), 81–88. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.02.001
205. KARAVASILI, Christina, Marios SPANAKIS, Dionysia PAPAGIANNOPOULOU, Ioannis S. VIZIRIANAKIS, Dimitrios G. FATOUROS a Sotirios KOUTSOPOULOS. Bioactive Self-Assembling Lipid-Like Peptides as Permeation Enhancers for Oral Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **104**(7), 2304–2311. ISSN 15206017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24484
206. KUBO, Hiroyuki, Ken Ichi HOSOYA, Hideshi NATSUME, Kenji SUGIBAYASHI a Yasunori MORIMOTO. In vitro permeation of several model drugs across rabbit nasal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1994, **103**(1), 27–36. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(94)90200-3
207. SCHMIDT, M. Christiane, Hagen PETER, Steffen R. LANG, Gunter DITZINGER a Hans P. MERKLE. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1998, **29**(1–2), 51–79. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(97)00061-6
208. WERNER, Ute a Thomas KISSEL. Development of a Human Nasal Epithelial Cell Culture Model and Its Suitability for Transport and Metabolism Studies Under in Vitro Conditions. *Pharmaceutical Research* [online]. 1995, **12**(4), 565–571. ISSN 1573-904X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016210231121
209. HOSOYA, Kenichi, Hiroyuki KUBO, Hideshi NATSUME, Kenji SUGIBAYASHI a Yasunori MORIMOTO. Evaluation of Enhancers to Increase Nasal Absorption Using Ussing Chamber Technique. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [online]. 1994, **17**(2), 316–322. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.17.316
210. YAMAMOTO, Akira, Tomoya ISEKI, Michiko OCHI-SUGIYAMA, Naoki OKADA, Takuya FUJITA a Shozo MURANISHI. Absorption of water-soluble compounds with different molecular weights and [Asu1.7]-eel calcitonin from various mucosal administration sites. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, **76**(3), 363–374. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(01)00454-0
211. FANALI, Gabriella, Alessandra DI MASI, Viviana TREZZA, Maria MARINO, Mauro FASANO a Paolo ASCENZI. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2012, **33**(3), 209–290. ISSN 18729452. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2011.12.002
212. PETERS, Theodore Jr. *All About Albumin* [online]. B.m.: Academic Press, 1995. ISBN 9780125521109. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4
213. DIAMANDOPOULOS, Athanasios, Pavlos GOUDAS a Dimitrios OREOPOULOS. Thirty-six Hippocratic aphorisms of nephrologic interest. *American Journal of Kidney Diseases* [online]. 2009, **54**(1), 143–153. ISSN 0272-6386. Dostupné z: doi:10.1053/j.ajkd.2009.01.275

214. KRATZ, Felix a Bakheet ELSADEK. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 429–445. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.028
215. WIKISKRIPTA. Plazmatické bílkoviny. *WikiSkripta* [online]. 2019 [vid. 2019-07-26]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Plazmatick?\\_b?lkoviny](https://www.wikiskripta.eu/w/Plazmatick?_b?lkoviny)
216. PRINSEN, Berthil H.C.M.T. a Monique G.M. DE SAIN-VAN DER VELDEN. Albumin turnover: Experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2004, **347**(1–2), 1–14. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cccn.2004.04.005
217. MELOUN, B., L. MORÁVEK a V. KOSTKA. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Letters* [online]. 1975, **58**(1–2), 134–137. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(75)80242-0
218. BEHRENS, P. Q., A. M. SPIEKERMAN a J. R. BROWN. Structure of human serum albumin. In: *Federation proceedings*. Bethesda: Federation Amer Soc Exp Biol 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3998, 1975, s. 591.
219. BROWN, J R. Structure of bovine serum albumin. In: *Federation proceedings*. CONF. Bethesda: Federation Amer Soc Exp Biol 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3998, 1975, s. 591.
220. EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY - EUROPEAN BIONFORMATICS INSTITUTE HINXTON UK. Serum albumin. *PDBe-KB Protein Pages* [online]. 2019 [vid. 2019-07-26]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb/proteins/P02768>
221. DRUGBANK. Serum albumin. *DrugBank* [online]. 2019 [vid. 2019-07-26]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/polypeptides/P02768>
222. MINGHETTI, P. P., D. E. RUFFNER, W. J. KUANG, O. E. DENNISON, J. W. HAWKINS, W. G. BEATTIE a A. DUGAICZYK. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *Journal of Biological Chemistry*. 1986, **261**(15), 6747–6757. ISSN 00219258.
223. CARACENI, Paolo, Marco DOMENICALI, Alessandra TOVOLI, Lucia NAPOLI, Carmen Serena RICCI, Manuel TUFONI a Mauro BERNARDI. Clinical indications for the albumin use: Still a controversial issue. *European Journal of Internal Medicine* [online]. 2013, **24**(8), 721–728. ISSN 09536205. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejim.2013.05.015
224. COHN, Edwin J, Laurence E STRONG, Wj HUGHES, D J MULFORD, J N ASHWORTH, M ea MELIN a H L TAYLOR. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids1a, b, c, d. *Journal of the American Chemical Society*. 1946, **68**(3), 459–475. ISSN 0002-7863.
225. KRATZ, Felix. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008, **132**(3), 171–183. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.05.010
226. KRAGH-HANSEN, Ulrich. Human Serum Albumin: A Multifunctional Protein. In: Masaki OTAGIRI a Victor Tuan GIAM CHUANG, ed. *Albumin in medicine: Pathological and clinical applications* [online]. Singapore: Springer, 2016, s. 1–24. ISBN 978-981-10-2115-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2116-9



227. LAWN, Richard M, John ADELMAN, Susan C BOCK, Arthur E FRANKE, Catherine M HOUCK, Richard NAJARIAN, Peter H SEEBURG a Karen L WION. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* [online]. 1981, **9**(22), 6103–6114. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/9.22.6103
228. SAUNDERS, Charles W, B J SCHMIDT, R L MALLONEE a M S GUYER. Secretion of human serum albumin from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* [online]. 1987, **169**(7), 2917–2925. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.169.7.2917-2925.1987
229. HODGKINS, M.A., P.E. SUDBERY, S. KERRY-WILLIAMS a A. GOODEY. Secretion of human serum albumin from *Hansenula polymorpha*. *Yeast* [online]. 1990, **6S**, 435. Dostupné z: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10005401792/en/>
230. FLEER, R, P YEH, N AMELLAL, I MAURY, A FOURNIER, F BACCHETTA, P BADUEL, G JUNG, H L'HÔTE, J BECQUART, H. FUKUHARA a J. F. MAYAUX. Stable Multicopy Vectors for High-Level Secretion of Recombinant Human Serum Albumin by *Kluyveromyces* Yeasts. *Nature Biotechnology* [online]. 1991, **9**(10), 968–975. ISSN 0733-222X. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1091-968
231. CLARE, Jeffrey J, Michael A ROMANES, Frederick B RAYMENT, James E ROWEDDER, Marjorie A SMITH, Michael M PAYNE, Koti SREEKRISHNA a Cora A HENWOOD. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* [online]. 1991, **105**(2), 205–212. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(91)90152-2
232. KOBAYASHI, Kaoru. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals* [online]. 2006, **34**(1), 55–59. ISSN 10451056. Dostupné z: doi:10.1016/j.biologicals.2005.08.021
233. SLEEP, D, G.P. BELFIELD, D.J. BALLANCE, J STEVEN, S JONES, L.R. EVANS, P.D. MOIR a A.R. GOODEY. *Saccharomyces Cerevisiae* Strains that Overexpress Heterologous Proteins. *Nature Biotechnology* [online]. 1991, **9**(2), 183–187. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0291-183
234. FARRAN, Inma, José J. SÁNCHEZ-SERRANO, Juan F. MEDINA, Jesús PRIETO a Angel M. MINGO-CASTEL. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic research* [online]. 2002, **11**(4), 337–346. ISSN 0962-8819. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016356510770
235. FERNÁNDEZ-SAN MILLÁN, Alicia, Angel MINGO-CASTEL, Michael MILLER a Henry DANIELL. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal* [online]. 2003, **1**(2), 71–79. Dostupné z: doi:10.1046/j.1467-7652.2003.00008.x
236. HUANG, Li-Fen Fen, Yu-Kuo Kuo LIU, Chung-An An LU, Shie-Liang Liang HSIEH a Su-May May YU. Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture. *Transgenic research* [online]. 2005, **14**(5), 569–581. ISSN 0962-8819. Dostupné z: doi:10.1007/s11248-004-6481-5
237. HE, Y., T. NING, T. XIE, Q. QIU, L. ZHANG, Y. SUN, D. JIANG, K. FU, F. YIN, W. ZHANG, L. SHEN, H. WANG, J. LI, Q. LIN, Y. SUN, H. LI, Y. ZHU a D. YANG. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, **108**(47), 19078–19083. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1109736108

238. SIJMONS, Peter C, Ben M M DEKKER, Barbara SCHRAMMEIJER, Theo C VERWOERD, Peter J. M. VAN DEN ELZEN a André HOEKEMA. Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants. *Nature Biotechnology* [online]. 1990, **8**(3), 217–221. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0390-217
239. BARASH, Itamar, Alexander FAERMAN, Ariela BARUCH, Margaret NATHAN, David R HURWITZ a Moshe SHANI. Synthesis and secretion of human serum albumin by mammary gland explants of virgin and lactating transgenic mice. *Transgenic Research* [online]. 1993, **2**(5), 266–276. ISSN 0962-8819. Dostupné z: doi:10.1007/BF01968839
240. BERN, Malin, Kine Marita Knudsen SAND, Jeannette NILSEN, Inger SANDLIE a Jan Terje ANDERSEN. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **211**, 144–162. ISSN 18734995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.006
241. GHUMAN, Jamie, Patricia A. ZUNSZAIN, Isabelle PETITPAS, Ananyo A. BHATTACHARYA, Masaki OTAGIRI a Stephen CURRY. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2005, **353**(1), 38–52. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075
242. PARODI, Alessandro, Jiaying MIAO, Surinder M. SOOND, Magdalena RUDZIŃSKA a Andrey A. ZAMYATNIN. Albumin Nanovectors in Cancer Therapy and Imaging. *Biomolecules* [online]. 2019, **9**(6), 218. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9060218
243. SJÖHOLM, Ingvar, B.O. EKMAN, Anita KOBER, Ingrid LJUNGSTEDT-PÅHLMAN, Birgitta SEIVING a Torgny SJÖDIN. Binding of Drugs to Human Serum Albumin: XI. The Specificity of Three Binding Sites as Studied with Albumin Immobilized in Microparticles. *Molecular Pharmacology* [online]. 1979, **16**(3), 767 LP-777. Dostupné z: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/16/3/767.abstract>
244. LARSEN, Maja Thim, Matthias KUHLMANN, Michael Lykke HVAM a Kenneth A. HOWARD. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies* [online]. 2016, **4**(1), 3. ISSN 2052-8426. Dostupné z: doi:10.1186/s40591-016-0048-8
245. ELZOGHBY, Ahmed O., Wael M. SAMY a Nazik A. ELGINDY. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **157**(2), 168–182. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.031
246. LANGER, K., S. BALTHASAR, V. VOGEL, N. DINAUER, H. VON BRIESEN a D. SCHUBERT. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2003, **257**(1–2), 169–180. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(03)00134-0
247. WEBER, C., J. KREUTER a K. LANGER. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2000, **196**(2), 197–200. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(99)00420-2
248. LANGER, K., M. G. ANHORN, I. STEINHAUSER, S. DREIS, D. CELEBI, N. SCHRICKEL, S. FAUST a V. VOGEL. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, **347**(1–2), 109–117. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.028

249. PATIL, Gayathri V. Biopolymer albumin for diagnosis and in drug delivery. *Drug Development Research* [online]. 2003, **58**(3), 219–247. ISSN 02724391. Dostupné z: doi:10.1002/ddr.10157
250. SUNDAR, Sushmitha, Joydip KUNDU a Subhas C KUNDU. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2010, **11**(1), 14104. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/11/1/014104
251. PINTO REIS, Catarina, Ronald J. NEUFELD, António J. RIBEIRO a Francisco VEIGA. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2006, **2**(1), 8–21. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
252. YU, Shaoyong, Ping YAO, Ming JIANG a Guangzhao ZHANG. Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins. *Biopolymers* [online]. 2006, **83**(2), 148–158. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.20539
253. QI, Jianing, Ping YAO, Fen HE, Chuiliang YU a Chong HUANG. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core—Doxorubicin loading and delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, **393**(1–2), 177–185. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.063
254. BOYE, Joyce I, Inteaz ALLI a Ashraf A ISMAIL. Interactions Involved in the Gelation of Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1996, **44**(4), 996–1004. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf950529t
255. ARPAGAUS, Cordin. Nano spray drying of pharmaceuticals. In: *Proceedings of 21th International Drying Symposium* [online]. Valencia: Universitat Politècnica València, 2018, s. 64–68. ISBN 9788490486887. Dostupné z: doi:10.4995/IDS2018.2018.7356
256. SCHAFROTH, Nina, Cordin ARPAGAUS, Umesh Y. JADHAV, Sushil MAKNE a Dennis DOUROUMIS. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2012, **90**(1), 8–15. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.038
257. LEE, Sie Huey, Desmond HENG, Wai Kiong NG, Hak-Kim CHAN a Reginald B.H. TAN. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, **403**(1–2), 192–200. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.012
258. XU, Rongzuo, Michael FISHER a R. L. JULIANO. Targeted Albumin-Based Nanoparticles for Delivery of Amphipathic Drugs. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2011, **22**(5), 870–878. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc1002295
259. GONG, Jian, Meirong HUO, Jianping ZHOU, Yong ZHANG, Xiaoling PENG, Di YU, Hui ZHANG a Jing LI. Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, **376**(1–2), 161–168. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.033
260. CORTES, Javier a Cristina SAURA. Nanoparticle albumin-bound (nab<sup>TM</sup>)-paclitaxel: improving efficacy and tolerability by targeted drug delivery in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer, Supplement* [online]. 2010, **8**(1), 1–10. ISSN 13596349. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6349(10)70002-1

261. DESAI, Neil. Nanoparticle albumin bound (nab) technology: targeting tumors through the endothelial gp60 receptor and SPARC. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2007, **3**(4), 339. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2007.10.021
262. IBRAHIM, Nuhad K., Richard L. THERIAULT, Edgardo RIVERA, Gabriel N. HORTOBAGYI, Sewa LEGHA, Sigrid E. RING, Agop BEDIKIAN, Julie A. ELLERHORST, Bitá ESMAELI, Neil DESAI a Patrick SOON-SHIONG. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical Cancer Research*. 2002, **8**(5), 1038–1044. ISSN 1078-0432.
263. DAMASCELLI, Bruno, Giulio CANTÚ, Franco MATTAVELLI, Paolo TAMPLENIZZA, Paolo BIDOLI, Ermanno LEO, Franco DOSIO, Anna M. CERROTTA, Giuseppe DI TOLLA, Laura F. FRIGERIO, Francesco GARBAGNATI, Rodolfo LANOCITA, Alfonso MARCHIANÓ, Gianluigi PATELLI, Carlo SPREAFICO, Vladimira TICHÁ, Valentina VESPRO a Franco ZUNINO. Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007). *Cancer* [online]. 2001, **92**(10), 2592–2602. ISSN 0008-543X. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0142(20011115)92:10<2592::AID-CNCR1612>3.0.CO;2-4
264. DESAI, Neil, Vuong TRIEU, Zhiwen YAO, Leslie LOUIE, Sherry CI, Andrew YANG, Chunlin TAO, Tapas DE, Bridget BEALS, Donald DYKES, Patricia NOKER, Rosie YAO, Elizabeth LABAO, Michael HAWKINS a Patrick SOON-SHIONG. Increased Antitumor Activity, Intratumor Paclitaxel Concentrations, and Endothelial Cell Transport of Cremophor-Free, Albumin-Bound Paclitaxel, ABI-007, Compared with Cremophor-Based Paclitaxel. *Clinical Cancer Research* [online]. 2006, **12**(4), 1317–1324. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1634
265. HAWKINS, Michael J., Patrick SOON-SHIONG a Neil DESAI. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(8), 876–885. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.08.044
266. KIM, Tae Hyung, Hai Hua JIANG, Yu Seok YOUN, Chan Woong PARK, Kyung Kook TAK, Seulki LEE, Hyungjun KIM, Sangyong JON, Xiaoyuan CHEN a Kang Choon LEE. Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, **403**(1–2), 285–291. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.041
267. OTAGIRI, Masaki a Victor Tuan GIAM CHUANG. *Albumin in Medicine* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2016. ISBN 978-981-10-2115-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2116-9
268. KRATZ, Felix. A clinical update of using albumin as a drug vehicle — A commentary. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **190**, 331–336. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.013
269. DAUM, S, J P MAGNUSSON, L PES, J. GARCIA FERNANDEZ, S CHERCHEJA, F MEDDA, F I NOLLMANN, S. D. KOESTER, P. PEREZ GALAN, A. WARNECKE, K. ABU AJAJ a Felix KRATZ. Development of a Novel Imaging Agent for Determining Albumin Uptake in Solid Tumors. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. 2019, **53**(3), 189–198. ISSN 1869-3474. Dostupné z: doi:10.1007/s13139-019-00587-w

270. CYTRX. Corporate Overview, July 2019. In: [online]. B.m. 2019. Dostupné z: <http://www.cytrx.com/wp-content/uploads/2019/07/New-CYTR-Corp-Overview-July-2019-Non-Conf.pdf>
271. YOUSEFPOUR, Parisa, Lucie AHN, Joel TEWKSBURY, Soumen SAHA, Simone A. COSTA, Joseph J. BELLUCCI, Xinghai LI a Ashutosh CHILKOTI. Conjugate of Doxorubicin to Albumin-Binding Peptide Outperforms Aldoxorubicin. *Small* [online]. 2019, **15**(12), 1804452. ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201804452
272. PUBCHEM. *Caffeine - Solubility* [online]. 2019 [vid. 2019-07-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine#section=Solubility>
273. EICHMAN, Jonathan D. a Joseph R. ROBINSON. Mechanistic studies on effervescent-induced permeability enhancement. *Pharmaceutical research* [online]. 1998, **15**(6), 925–930. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1011936901638
274. LIANG, Earvin, Kelli CHESSIC a Mehran YAZDANIAN. Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2000, **89**(3), 336–345. ISSN 0022-3549.
275. NICOLAZZO, Joseph A, Barry L REED a Barrie C FINNIN. Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004, **93**(2), 431–440. ISSN 0022-3549.
276. PATIL, Anand, VARUN RAHEJA a ANAGHA DAMRE. Simultaneous analysis of intestinal permeability markers, caffeine, paracetamol and sulfasalazine by reverse phase liquid chromatography: a tool for the standardization of rat everted gut sac model. *Asian J Pharm Clin Res*. 2010, **3**(October), 204–207.
277. ROWE, Raymond C, Paul J SHESKEY a Marian E QUINN. *Handbook of pharmaceutical excipients, Sixth edition* [online]. 6th vyd. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2009. ISBN 978 0 85369 792 3. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(01)00243-7
278. YANG, Enlong, Xiaohong QIN a Shanyuan WANG. Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. *Materials Letters* [online]. 2008, **62**(20), 3555–3557. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2008.03.049
279. DING, Bin, Hak-yong KIM, Se-chul LEE, Douk-Rae LEE a Kyung-Ju CHOI. Preparation and characterization of nanoscaled poly(vinyl alcohol) fibers via electrospinning. *Fibers and Polymers* [online]. 2002, **3**(2), 73–79. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/BF02875403
280. GOSWAMI, Tarun, Amit KOKATE, Bhaskara R. JASTI a Xiaoling LI. In silico model of drug permeability across sublingual mucosa. *Archives of Oral Biology* [online]. 2013, **58**(5), 545–551. ISSN 00039969. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2012.09.020
281. SANTOS, Sonia F., Dino ZANETTE, Hannes FISCHER a Rosangela ITRI. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2003, **262**(2), 400–408. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9797(03)00109-7

## 12. SEZNAM PRACÍ

### Publikace:

1. **BERKA, Pavel**, Denisa STRÁNSKÁ, Vladimír SEMECKÝ, Karel BERKA, Pavel Doležal. Testing the limits of in vitro sublingual macromolecular drug delivery: dextrans and albumin with nanofiber mats. *BioRxiv* 690990; **2019**  
doi: 10.1101/690990
2. STRÁNSKÁ, Denisa, **Pavel BERKA** a Pavel DOLEŽAL. Validace výroby jednodávkových medikovaných nanovlákných přípravků produkovaných elektrospinningem. *Chemické listy*. **2019**, roč. 113, s. 337–342. (IF: **0.311**)
3. VRBATA, Petr, **Pavel BERKA**, Denisa STRÁNSKÁ, Pavel DOLEŽAL a Milan LÁZNÍČEK. Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **2014**, roč. 473, č. 1–2, s. 407–413 [vid. 10. září 2014]. ISSN 03785173.  
doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.017 (IF: **4.213**)
4. VRBATA, Petr, **Pavel BERKA**, Denisa STRÁNSKÁ, Pavel DOLEŽAL, Marie MUSILOVÁ a Lucie ČIŽINSKÁ. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **2013**, roč. 457, č. 1, s. 168–176 [vid. 15. říjen 2014]. ISSN 03785173.  
doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.085 (IF: **4.213**)
5. ŠKOLOVÁ, Barbora, Barbora JANUŠOVÁ, Jarmila ZBYTOVSKÁ, Gert GOORIS, Joke BOUWSTRA, Petr SLEPIČKA, **Pavel BERKA**, Jaroslav ROH, Karel PALÁT, Alexandr HRABÁLEK a Kateřina VÁVROVÁ. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* [online]. **2013**, roč. 29, č. 50, s. 15624–15633. ISSN 0743-7463. doi:10.1021/la4037474 (IF: **3.683**)
6. KOPECKY, Kamil, Veronika NOVAKOVA, Miroslav MILETIN, Lucie PLISTILOVA, **Pavel BERKA** a Petr ZIMCIK. Synthesis and properties of azaphthalocyanines with 1,2,3,4-tetrahydropyrazino[2,3-b]pyrazine moiety. *Macroheterocycles* [online]. **2011**, roč. 4, č. 3, s. 171–176. ISSN 19989539.  
doi:10.6060/mhc2011.3.05 (IF: **1.086**)
7. ZIMCIK, Petr, Miroslav MILETIN, Kamil KOPECKY, Zbynek MUSIL, **Pavel BERKA**, Veronika HORAKOVA, Helena KUCEROVA, Jarmila ZBYTOVSKA a Daniel BRAULT. Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *Photochemistry and Photobiology* [online]. **2007**, roč. 83, č. 6, s. 1497–1504. ISSN 00318655.  
doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00193.x (IF: **2.214**)
8. HOLAS, Tomáš, Jarmila ZBYTOVSKÁ, Kateřina VÁVROVÁ, **Pavel BERKA**, Michaela MÁDLOVÁ, Jana KLIMENTOVÁ a Alexandr HRABÁLEK. Thermotropic phase behavior of long-chain alkylammonium-alkylcarbamates. *Thermochimica Acta* [online]. **2006**, roč. 441, č. 2, s. 116–123. ISSN 00406031.  
doi:10.1016/j.tca.2005.12.012 (IF **2.251**)

### Skripta:

1. ŘEHULA, Milan, **Pavel BERKA**, Milan DITTRICH, Jitka MUŽÍKOVÁ a Eva ŠNEJDROVÁ. *Návody k speciálním praktickým cvičením z farmaceutické technologie*. Praha: Karolinum, **2014**. ISBN 978-80-2462-692-5.
2. ŘEHULA, Milan, **Pavel BERKA**, Milan DITTRICH, Jitka MUŽÍKOVÁ, Pavel ONDREJČEK, Petra SVAČINOVÁ, Zdeňka ŠKLUBALOVÁ a Eva ŠNEJDROVÁ. *Návody k základním praktickým cvičením z farmaceutické technologie*. Praha: Karolinum, **2013**. ISBN 978-80-2462-378-8.

### Patenty:

1. STRÁNSKÁ, Denisa, Jana SVOBODOVA, **Pavel BERKA** a Pavel DOLEŽAL. OROMUCOSAL NANOFIBER CARRIERS FOR THERAPEUTIC TREATMENT. WO 2017/130141 A1. **2017**.
2. STRÁNSKÁ, Denisa, Pavel DOLEŽAL, **Pavel BERKA**, Petr VRBATA, Jan HONEGR a Marie MUSILOVÁ. ELECTROSPUN NANOFIBERS COMPRISING PHARMACEUTICALLY ACTIVE AGENTS. WO 2014/131376 A1. **2014**.
3. STRÁNSKÁ, Denisa, Adéla KLABANOVÁ, Pavel DOLEŽAL, Petr VRBATA, **Pavel BERKA** a Marie MUSILOVÁ. A CARRIER FOR OROMUCOSAL, ESPECIALLY SUBLINGUAL ADMINISTRATION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES. WO 2012/097763 A2. **2012**.

### Přednášky / postery v konferenčních sbornících:

1. **BERKA, Pavel**, Petr VRBATA, Pavlína DVOŘÁKOVÁ, Martina SPURNÁ a Pavel DOLEŽAL. Průnik nanočástic značených chromeonem 470 přes sublinguální membránu *in vitro*. In: *Česká a slovenská farmacie*. **2014**, s. 99–103.
2. **BERKA, Pavel**, Petr VRBATA, Lenka HOREJŠOVÁ, Michaela ŠAŠUROVÁ a Pavel DOLEŽAL. Investigation of influence of method of fixing of porcine sublingual membranes on the permeation of nanoparticles *in vitro*. In: *4. Postgraduální 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové*. **2014**, s. 126.
3. **BERKA, Pavel**, Petr VRBATA, Martina SPURNÁ, Pavlína DVOŘÁKOVÁ, Lenka HOREJŠOVÁ, Michaela ŠAŠUROVÁ, Lucie KRUPAUEROVÁ, Lenka TURNEROVÁ a Pavel DOLEŽAL. Permeation of Dextrans and Nanoparticles Through Porcine Sublingual Membrane *In Vitro*. In: *NanoCon - 5th International Conference, Brno*. **2013**, s. 638.
4. **BERKA, Pavel**, Petr VRBATA, Pavlína DVOŘÁKOVÁ, Martina SPURNÁ a Pavel DOLEŽAL. Sublingual Permeation of Chromeon 470 Marked Nanoparticles *In Vitro*. In: *3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, Pisa, Italy*. **2013**, s. 142.
5. VRBATA, Petr, Denisa STRÁNSKÁ, **Pavel BERKA**, Pavel DOLEŽAL a Marie MUSILOVÁ. Nanofibrous Membranes for Sublingual Administration of Sumatriptan. In: *3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, Pisa, Italy*. **2013**, s. 142.
6. **BERKA, Pavel**, Petr VRBATA, Pavlína DVOŘÁKOVÁ, Martina SPURNÁ a Pavel DOLEŽAL. Investigation of permeation of nanoparticles through sublingual membranes *in vitro*. In: *3. Postgraduální 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové*. **2013**, s. 1–14.
7. **BERKA, Pavel**. Solubility and permeability of cyclosporin A in simulated intestinal fluids (oral presentation). In: *Galenos - 2nd Thematic workshop, Cardiff, UK*. 2005.

8. **BERKA, Pavel.** In-vitro studies into the oral absorption of ciclosporin A (oral presentation). In: *Galenos – Towards a European PhD in Advanced Drug Delivery - 1st Thematic Workshop and Training Course, Ljubljana, Slovenia.* 2005.
9. **BERKA, Pavel,** Luke ARNOT, Nilesh PATEL, Paul ROYALL a Ben FORBES. Interactions of drugs with oral lipid formulations and simulated intestinal fluid solutions. In: *Biopharmaceutics Considerations for Oral CR/MR Formulations - Academy of Pharmaceutical Sciences Conference. London, UK.* 2005.
10. **BERKA, Pavel,** Michal LARISCH a Pavel DOLEŽAL. Formulační faktory a vlastnosti retardet. In: *31. Technologické dni; 15.-17.10., 2003; Piešťany, SK.* B.m.: FaF UK, Bratislava, 2003, s. 14–14.
11. LARISCH, Michal, **Pavel BERKA** a Pavel DOLEŽAL. Studium vlivu formulačních faktorů na vlastnosti retardet. In: *31. Technologické dni; 15.-17.10., 2003; Piešťany, SK.* B.m.: FaF UK, Bratislava, 2003, s. 41–41.
12. **BERKA, Pavel,** Michal LARISCH a Pavel DOLEŽAL. Study of hydrophilic matrix tablets for prolonged release of hydrophilic drug. In: *Farmaceutski Vestnik* 2003, 54 (Special Issue), 441–442. ISSN 0014-8229.



## 13. PŘÍLOHY

- Příloha 1: **BERKA, Pavel**, Denisa STRÁNSKÁ, Vladimír SEMECKÝ, Karel BERKA, Pavel Doležal. Testing the limits of in vitro sublingual macromolecular drug delivery: dextrans and albumin with nanofiber mats. *BioRxiv* 690990; **2019**  
doi: 10.1101/690990
- Příloha 2: STRÁNSKÁ, Denisa, **Pavel BERKA** a Pavel DOLEŽAL. Validace výroby jednodávkových medikovaných nanovlákných přípravků produkovaných elektrospinningem. *Chemické listy*. **2019**, roč. 113, s. 337–342. (**IF: 0.311**)
- Příloha 3: VRBATA, Petr, **Pavel BERKA**, Denisa STRÁNSKÁ, Pavel DOLEŽAL a Milan LÁZNÍČEK. Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **2014**, roč. 473, č. 1–2, s. 407–413 [vid. 10. září 2014]. ISSN 03785173. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.017 (**IF: 4.213**)
- Příloha 4: VRBATA, Petr, **Pavel BERKA**, Denisa STRÁNSKÁ, Pavel DOLEŽAL, Marie MUSILOVÁ a Lucie ČIŽINSKÁ. Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **2013**, roč. 457, č. 1, s. 168–176 [vid. 15. říjen 2014]. ISSN 03785173. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.085 (**IF: 4.213**)