

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



**2-hydroxyethylcelulózové gely s novými
polyamidoaminovými dendrimery pro kožní aplikaci
imiquimodu**

Diplomová práce

Michaela Prokopová

V Hradci Králové 2023

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

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

V Hradci Králové

Michaela Prokopová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, vstřícnost a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 1156120, SVV 260 661).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Michaela Prokopová

Název diplomové práce: 2-hydroxyethylcelulóзовé gely s novými polyamidoaminovými dendrimery pro kožní aplikaci imiquimodu

Imiquimod (IMQ) je léčivá látka používaná při léčbě kožních onemocnění (karcinomů). Hydrofobicita IMQ neumožňuje jeho začlenění do hydrofilních gelů, které jsou nejpoužívanějšími gelovými formulacemi pro topickou aplikaci. Dendritické molekuly, které jsou vysoce rozvětvenými polymery, by mohly potenciálně zvýšit rozpustnost IMQ v hydrofilních formulacích pro přípravu koncentrovanějších hydrofilních lékových forem.

Účelem této práce bylo zvýšit koncentraci IMQ v hydrofilních formulacích pomocí dendritických molekul. Nejprve byly připraveny vodné roztoky obsahující IMQ v přítomnosti nebo nepřítomnosti různých generací a koncentrací dendritických molekul. pH roztoků bylo upraveno na 5,5, což odpovídá pH pokožky. Poté byla použita 2-hydroxyethylcelulóza jako gelující látka pro přípravu hydrofilních gelů, jako výhodných formulací pro topickou aplikaci. Vybrané roztoky a gelové formulace byly použity pro permeační experimenty na lidské kůži.

Výsledky této práce dokazují, že přítomnost dendritických molekul může zvýšit rozpustnost IMQ ve vodném prostředí při pH 5,5. Ve srovnání s komerčně dostupnou formulací Aldara jsou gelové formulace obsahující dendrimery schopny dodat 3× nižší množství IMQ do cílové tkáně (*epidermis*), přičemž obsahují 1000× méně účinné látky. Na druhou stranu bylo zjištěno, že gelové formulace obsahující dendrimery dodávají detekovatelná množství IMQ do akceptorové fáze. Do budoucna by bylo vhodné provést další experimenty, aby se zjistilo, zda lze nižší koncentraci dendritických molekul použít v hydrofilních gelech k dodání podobných množství IMQ do *epidermis*. Zároveň by tyto gely neměly doručit účinnou látku do akceptorové fáze, aby se minimalizovaly potenciální vedlejší účinky.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Michaela Prokopová

Title of the thesis: 2-hydroxyethyl cellulose gels with novel polyamidoamine dendrimers for the skin application of Imiquimod

Imiquimod (IMQ) is a medicinal substance used in the therapy of skin diseases (carcinomas). IMQ's hydrophobicity does not allow its incorporation in hydrophilic gels, which are the most used gel formulations for topical application. Dendritic molecules, which are highly branched polymers, could potentially increase the solubility of IMQ in hydrophilic formulations for the preparation of more concentrated hydrophilic dosage forms.

The purpose of this work was to increase the concentration of IMQ in hydrophilic formulations using dendritic molecules. First, aqueous solutions containing IMQ were prepared, in the presence or absence of different generations and concentrations of dendritic molecules. The pH of the solutions was adjusted to 5,5, which corresponds to the pH of the skin. After that, 2-hydroxyethyl cellulose was used as gelling agent to prepare hydrophilic gels as preferable formulations for topical application. Selected solutions and gel formulations, were used for permeation experiments on human skin.

The results of this thesis prove that the presence of dendritic molecules can increase the solubility of IMQ in aqueous medium at pH 5,5. In comparison with the commercially available formulation Aldara, the gel formulations containing dendrimers are able to deliver 3 times less IMQ amount to the target tissue (*epidermis*) while containing 1000 times less active substance. On the other hand, the gel formulations containing dendrimers were found to deliver detectable amounts of IMQ to the acceptor phase after the permeation experiment. Additional experiments are needed to evaluate if lower concentration of dendritic molecules can be used in hydrophilic gels to deliver similar amounts of IMQ in *epidermis*. At the same time, these gels should not deliver the active substance to the acceptor phase, minimizing potential side effects.

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod a cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1. Kůže.....	10
3.1.1. Hypodermis.....	11
3.1.1. Dermis.....	11
3.1.1. Epidermis.....	11
3.1.2. Buňky epidermis.....	13
3.1.3. Funkce kůže.....	14
3.2. Akceleranty kožní permeace.....	14
3.2.1. Charakteristika.....	14
3.3. Dendritické molekuly.....	15
3.3.1. Popis, struktura.....	15
3.3.2. Typy dendrimerů.....	16
3.3.3. Využití dendrimerů.....	17
3.4. Polymery.....	17
3.4.1. Charakterizace.....	17
3.4.2. Přírodní polymery.....	18
3.4.3. 2-Hydroxyethyl celulóza.....	18
3.5. Polymerní gely.....	19
3.5.1. Charakterizace.....	19
3.5.2. Příprava gelů.....	19
3.5.3. Hydrogely.....	19
3.6. Imiquimod.....	20
3.6.1. Charakterizace.....	20
3.6.2. Mechanismus účinku.....	21
3.6.3. Klinické údaje.....	21
3.6.4. Reálná zkušenost.....	22
4. Experimentální část.....	23
4.1. Chemikálie, materiál a přístroje.....	23

4.2.	Příprava hydrofilních gelů s obsahem IMQ a dendritických molekul.....	24
4.2.1.	Příprava vodných roztoků IMQ	24
4.2.2.	Příprava vodných roztoků dendritických molekul	24
4.2.3.	Příprava vodných roztoků IMQ s obsahem dendritických molekul	25
4.2.4.	HPLC stanovení koncentrace IMQ.....	25
4.2.5.	Příprava hydrofilních gelů	26
4.3.	Permeace.....	27
5.	Výsledky a diskuze	32
5.1.	Rozpustnost vzorků IMQ	34
5.2.	První permeace.....	36
5.3.	Druhá permeace	42
6.	Závěr	47
7.	Reference	48

1. Seznam zkratek

CH ₃ COOH	kyselina octová
ACN	acetonitril
Gn	generace dendrimeru <i>n</i>
HCl	chlorovodíková kyselina
2-HEC	2-hydroxyethylcelulosa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMQ	imiquimod
KCl	chlorid draselný
MeOH	methanol
NaCl	chlorid sodný
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	dodecahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
NaOH	hydroxid sodný
PAMAM	poly(amidamin)
PBS	fosfátový pufr
PPI	poly(propylenimin)

2. Úvod a cíl práce

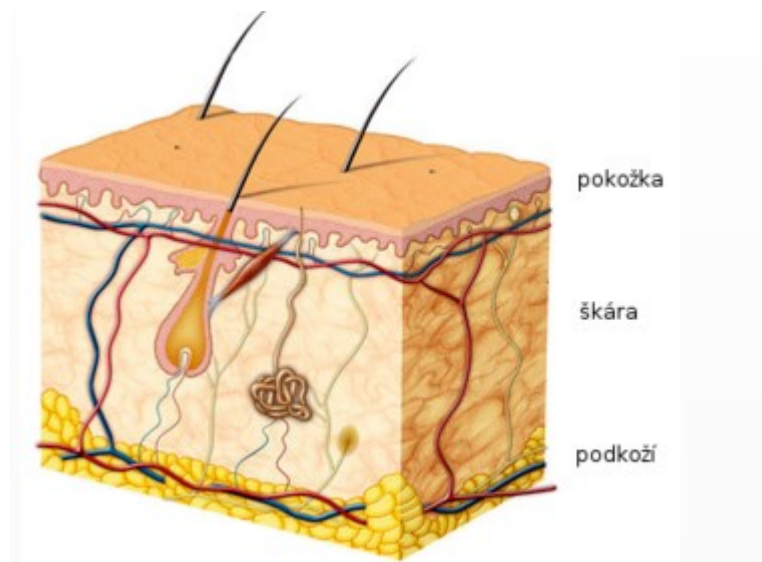
Pro terapii kožních onemocnění je možné využívat hydrofobní látku imiquimod (IMQ), která je špatně zpracovatelná do požadovaných formulací k aplikaci na kůži. Následkem je i špatný přechod do svrchní vrstvy kůže *epidermis*, kde je koncentrace IMQ žádoucí. Jedno z potenciálních řešení tohoto problému je aplikace dendritických molekul.

Cílem této práce je využití dendritických molekul při tvorbě hydrofilních gelů, které se aplikují na kůži v případě kožních onemocnění. Byl zjišťován vliv dendritických molekul na změnu rozpustnosti IMQ v hydrofilních roztocích a gelech. Formulace byly následně testovány pomocí permeačních pokusů na lidské kůži, kdy byla sledována jejich schopnost doručit IMQ do jednotlivých vrstev kůže.

3. Teoretická část

3.1. Kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla. Tvoří asi 15 % tělesné hmotnosti dospělého člověka. Hraje roli v mnoha důležitých životních funkcích, včetně ochrany před chemickými, fyzikálními a biologickými vlivy. Také zabraňuje nadměrné ztrátě vody z těla a podílí se na řízení termoregulace. Kůže spolu se sliznicemi souvisle lemuje povrch těla. (1) Fyzickou bariéru tvoří *stratum corneum*, chemická bariéra se skládá z lipidů, kyselin, hydrolytických enzymů, antimikrobiálních peptidů. Imunologickou bariéru tvoří humorální a buněčné složky imunitního systému jako jsou například makrofágy. (2) Kůže se skládá ze tří základních vrstev, kterými jsou *epidermis*, *dermis* a *hypodermis*, přičemž se všechny výrazně liší svojí anatomí a funkcí. Tloušťka kůže se liší v závislosti na oblasti těla a kategorizuje se na základě tloušťky vrstev *epidermis* a *dermis*. Kůže s největší tloušťkou se nachází na dlaních a chodidlech, protože obsahuje navíc další vrstvu *stratum lucidum*. Horní část zad pokrývá kůže s nejtlustší vrstvou *dermis*, ale *epidermis* postrádá vrstvu *stratum lucidum*, proto z tohoto hlediska se jedná o kůži s menší tloušťkou. (3)



Obrázek 1 – Kůže (4)

3.1.1. Hypodermis

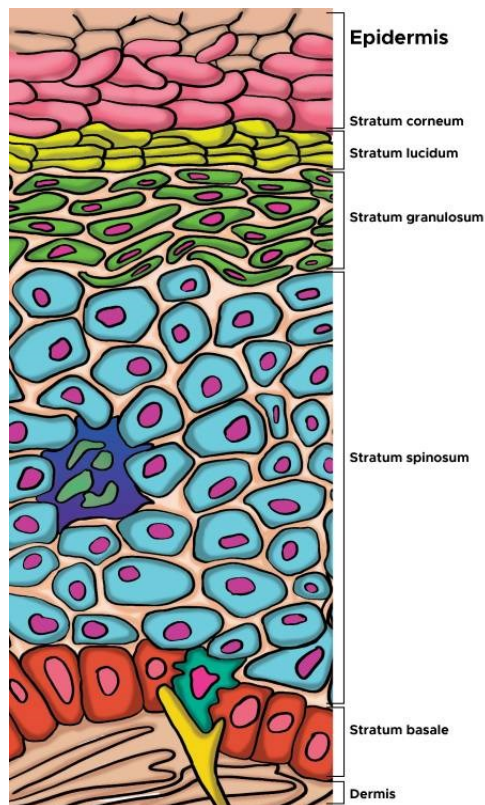
Hypodermis (podkožní fascie) je vrstva hluboko pod *dermis*. Obsahuje tukové lalůčky s dalšími kožními deriváty jako vlasové folikuly, nervové zakončení, cévy. (3) Poskytuje tělu vztlak a funguje jako zásobárna energie. (1)

3.1.1. Dermis

Dermis (škára) je další z vrstev kůže, která je spojena s *epidermis* na úrovni bazální membrány. (3) Z druhé strany je ohraničena podkožním tukem. Tloušťka *dermis* se v různých oblastech výrazně liší. Je to tuhá, pružná vrstva, která chrání tělo před mechanickým poraněním a obsahuje specializované struktury. (5) Je tvořena papilární a retikulární vrstvou. Papilární je horní, tenčí vrstva, která je v kontaktu s *epidermis*. Retikulární vrstva je hlubší, silnější vrstva, obsahuje méně buněk, skládá se z pojivové tkáně (svazků kolagenních vláken). V *dermis* se nachází potní žlázy, vlasy, vlasové folikuly, svaly, senzorické neurony a cévy. (3) Hlavní složkou je kolagen, hlavní strukturální protein pro celé tělo. Součástí jsou i elastická vlákna, které zajišťují elasticitu kůže, ale jen málo odolávají deformaci. (1)

3.1.1. Epidermis

Epidermis (pokožka) je vrstva dlaždicového epitelu, která se převážně skládá ze dvou typů buněk – keratinocytů a dendritických buněk. V pokožce se vyskytují další buněčné útvary jako melanocyty, Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky. Pokožka je stále obnovující se vrstva a dává vzniknout dalším strukturám jako jsou nehty nebo potní žlázy. Bazální buňky procházejí proliferačními cykly, které zajišťují obnovu vnější části *epidermis*. (1) *Epidermis* se tradičně dělí do několika vrstev – *stratum basale* (nejhlubší část *epidermis*), *stratum spinosum* (vrstva dlaždicových buněk), *stratum granulosum* (vrstva granulárních buněk), *stratum lucidum* a *stratum corneum* (nejsvrchnější část *epidermis* – zrohovatělá vrstva). (2)



Obrázek 2 – Ilustrace buněk epidermis (6)

Stratum basale (bazální vrstva, *stratum germinativum*) je nejhlubší vrstvou *epidermis*. Od *dermis* je oddělena bazální membránou (bazální lamina) a k bazální membráně je připojena *hemidesmosomy*. (3) Tato vrstva obvykle obsahuje jednu vrstvu buněk (výjimkou může být hyperproliferativní *epidermis*). Hlavní stavební buňkou této vrstvy je keratinocyt, který může být dělicí se nebo nedělicí. (5) Keratinocyty jsou buňky ve tvaru sloupce a připojují se k bazální membráně svou dlouhou osou kolmo k *dermis*. Tyto bazální buňky nasedají na sebe navzájem prostřednictvím *desmosomálních* spojení. Mají tmavě zbarvená protáhlá jádra. (1) Tuto vrstvu v menší míře tvoří i melanocyty, které tvoří 5 až 10 % buněčné populace. (5)

Stratum spinosum (dlaždicová vrstva) nasedá na vrstvu bazální. Obsahuje 5-10 vrstev buněk. Skládá se z různých buněk, které se odlišují tvarem, strukturou a subcelulárními vlastnostmi. (1) Součástí jsou polyedrické buňky s cytoplazmatickými výběžky, které jsou někdy nazývány „trny“, které se rozprostírají směrem ven a komunikují se sousedními buňkami *desmosomy*. Tato vrstva obsahuje i dendritické buňky. (3) Buňky se pohybují směrem k povrchu. (5) Dalším typem spojení jsou gap junctions, které vytváří pór a umožňují fyziologickou komunikaci prostřednictvím chemických signálů. (1)

Stratum granulosum (granulární vrstva) je vrstva *epidermis*, která obsahuje živé buňky. Jedná se o zploštělé buňky, které obsahují ve své cytoplazmě keratohyalinová granula. (1)

Obsahuje 3-5 vrstev buněk. (3) Vrstva se mění v tloušťce v poměru k tloušťce překrývající zrohovatělé vrstvy. Velmi tenká nebo chybějící granulární vrstva může vést k parakeratóze. (1) Buňky vylučují své lipidové složky do mezibuněčného prostoru, který hraje důležitou roli v bariérové funkci. (5) Granulární vrstva je keratogenní zónou *epidermis*, protože obsahuje ve vysokých koncentracích lysosomální enzymy. Dochází zde k rozpouštění buněčných organel, když buňky granulární vrstvy podléhají náhlému diferenciálnímu procesu na buňky zrohovatělé vrstvy. (1)

Stratum lucidum (zrohovatělá vrstva) je tvořena 2-3 vrstvami buněk, tato vrstva se nachází v oblasti chodidel a dlaní. (3) Tyto buňky se také nazývají přechodné a doba od buněčného dělení do oddělení od rohovité vrstvy je asi 28 dní. (5)

Stratum corneum tvoří 20-30 vrstev buněk. Poskytuje mechanickou ochranu spodní *epidermis* a brání ztrátám vody. Buňky, které se zde nazývají korneocyty, mají zploštělý tvar a jsou mnohostěnného tvaru, během diferenciace ztratila svá jádra, a proto se považuje za buňky odumřelé. (1) Jedná se o nejsvrchnější vrstvu tvořenou keratinem a zrohovatělými šupinami, které jsou tvořeny mrtvými keratinocyty. Zde mrtvé keratinocyty vylučují defensiny, které jsou složkou první imunitní obrany. (3)

3.1.2. Buňky *epidermis*

Keratinocyty jsou buňky, které v *epidermis* převládají, syntetizují keratin a jsou zodpovědné za tvorbu vodní bariéry, syntézu lipidů a regulují vstřebávání vápníku. (3) Keratin je protein obsahující stočené polypeptidové řetězce, které se spojují. Keratinocyty také produkují cytokiny jako odpověď na poranění. (5)

Melanocyty jsou buňky, které primárně produkují melanin, který je zodpovědný za pigment kůže. Je možné je najít mezi buňkami *stratum basale*. UVB záření stimuluje sekreci melaninu a ten chrání před UV zářením. (3)

Merkelovy buňky jsou modifikované *epidermální* buňky oválného tvaru nacházející se ve *stratum basale* v blízkosti bazální membrány. Plní smyslovou funkci jako mechanoreceptory, nejčastěji v konečcích prstů. (3) Jsou připojeny k bazálním keratinocytům. (1)

Langerhansovy buňky jsou obránci první linie kůže. Vychytávají antigeny v kůži a transportují je do lymfatických uzlin. (3) Jsou odvozené od kostní dřeně. (1)

3.1.3. Funkce kůže

Kůže má mnoho funkcí. Jako první je bariérová funkce, kterou poskytuje *epidermis*, po jejím odstranění je *dermis* velice propustná. (5) Slouží jako ochrana proti vodě, mikroorganismům, UV záření, chemickým a mechanickým vlivům. Kůže je první fyzická bariéra, kterou tělo má vůči okolnímu prostředí. (7) Kůže má imunitní funkci, kdy představuje první linii imunitního systému člověka. Neustálé vylučování keratinocytů slouží k blokadě jakéhokoli růstu mikroorganismů na povrchu těla. (5) Imunitní odpověď je zprostředkována na základě Langerhansových buněk. (3) Dále udržuje tělesnou homeostázu regulací teploty a ztrátami vody. (3) Má endokrinní i exokrinní aktivitu. Endokrinní aktivita spočívá v řízení biochemických procesů a řízení syntézy vitamínu D. (7) Syntéza vitamínu D probíhá v keratinocytech. (3) Exokrinní funkce je zprostředkována pomocí potních a mazových žláz. (3) Důležitou funkcí je zprostředkování pocitu bolesti, teploty, doteku, tlaku. (7)

3.2. Akceleranty kožní permeace

3.2.1. Charakteristika

Jak již bylo řečeno, kůže svými vlastnostmi slouží jako bariérová ochrana lidského těla. U zdravé a neporušené kůže je velmi obtížné, aby xenobiotika tuto vrstvu překonala. Ve vrstvě *epidermis*, konkrétně *stratum corneum*, tvoří velké zastoupení kožní lipidy – ceramidy, které jsou mimo jiné zodpovědné za bariérovou funkci kůže. (8) Aby bylo možné podávat léčiva přes kůži nebo do kůže, neboli (trans)dermálně, je tedy potřeba kožní bariéru překonat. K tomu slouží látky známé jako akceleranty kožní permeace.

Akceleranty jsou skupinou farmaceutických pomocných látek, které usnadňují vstup xenobiotik skrz kožní bariéru. Mechanismus účinku akceleraantů není v současné době plně objasněn, nejspíš je založen na nespecifických interakcích se strukturami kůže. Jejich účinkem pravděpodobně dochází k rozrušení organizované struktury lipidů v intercelulárních prostorech kůže, k interakci s keratinem (intracelulární prostory kůže) nebo k optimalizaci hodnoty rozdělovacího koeficientu léčiva mezi léčivým přípravkem a kůží. (9) Mezi nepřímé účinky akceleraantů patří modifikace termodynamické aktivity a rozpustnosti léčiva. (10)

Na akceleranty jsou v dnešní době kladeny vysoké požadavky, především nesmí být dráždivé a toxické, jejich účinek musí být dočasný a po jejich odstranění se musí obnovit bariérové vlastnosti kůže, musí být kompatibilní s léčivem a s ostatními složkami léčivého přípravku. (11) Další ideální vlastnosti akceleraantů jsou specifita (sám akceleraant by neměl mít

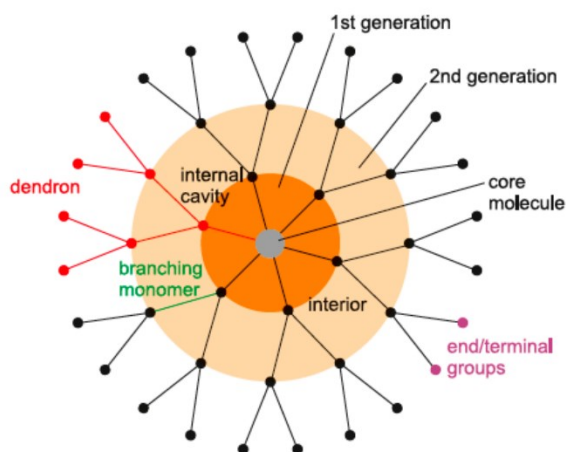
farmakologický efekt), rychlost a předvídatelnost působení, neměl by způsobovat ztráty endogenních látek. (10)

Akceleranty je možné dělit podle původu na přírodní, syntetické nebo polosyntetické. Podle chemických vlastností na rozpouštědla, amfifilní látky (obsahují povrchově aktivní látky) a peptidy. Dále podle obsažených chemických skupin. (10) Nejzákladnější vyskytovanou skupinou je $X-CO-N=$, kde X je $-CH-R$, $-NH_2$, $-NH-$. Molekula by vždy měla obsahovat dlouhý alkylový nebo alkenylový řetězec. (9) Mezi vybrané skupiny akceleraantů patří alkylsulfoxidy, alkoholy, mastné kyseliny a jejich estery, deriváty hydroxykyselin, aminokyseliny a jejich deriváty, laktamy, deriváty močoviny, ketony, deriváty sacharidů a amidy kyselin, které můžeme najít ve strukturách používaných dendritických molekul. (11) Dendritické molekuly byly často využity jako akceleranty kožní permeace. (12)

3.3. Dendritické molekuly

3.3.1. Popis, struktura

Dendrimery, známé jako starburst polymery, kaskádové polymery nebo arboroly, jsou molekuly, které mají kompaktní strukturu a přesně předvídatelnou molekulovou hmotnost. Jsou monodisperzní, polyvalentní, globulární molekuly s vysoce rozvětvenou, trojrozměrnou strukturou. (13) Mají přesně definovanou strukturu, jejich velikost se pohybuje okolo 1-10 nm v závislosti na jejich generaci. Trojrozměrná struktura poskytuje rozdíly ve vlastnostech od lineárních molekul, jako jsou schopnost přizpůsobit velikost a tvar, možnost procházet buněčnými membránami, možnost zapouzdření léčiv a jejich cílená distribuce do tkáně nebo snížení toxicity. Skládají se ze tří hlavních domén: jádro, které je umístěno ve středu, může obsahovat jeden nebo více atomů; větvící se jednotky, které jsou kovalentně spojeny s jádrem a jejich opakování vede ke vzniku soustředných vrstev – počet těchto vrstev vede ke vzniku generací; a terminální skupiny, umístěné na povrchu dendritického skeletu a zodpovědné za jeho vlastnosti. (14) Obecně tedy tyto molekuly vystupují z jádra a postupně se větví. Principiálně existují dvě syntetické cesty: divergentní a konvergentní metoda. Při divergentní metodě se jedna jednotka za druhou postupně připojuje k jádru. Tímto způsobem lze dendrimer vytvářet krok za krokem, dokud sterické efekty nezabrání dalším reakcím koncových skupin. Konvergentní metoda má opačný průběh, kdy je kostra konstruována opačně. (15)

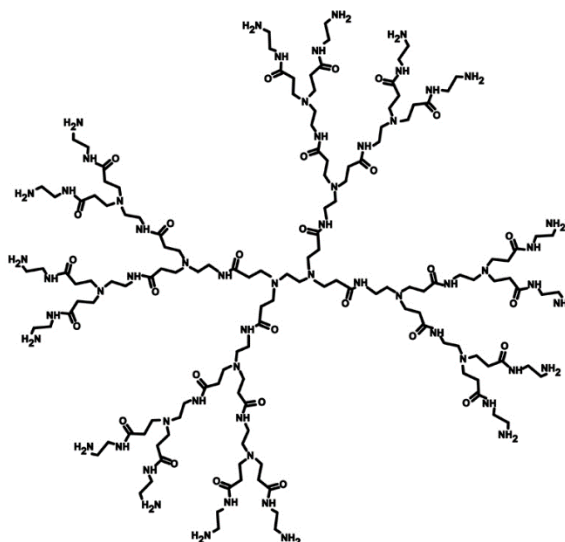


Obrázek 3 – Struktura dendrimeru (16)

Počet vrstev odpovídá generaci, počet vrstev se označuje písmeny Gn, kde n může nabývat hodnoty 0-12. (13)

3.3.2. Typy dendrimerů

Nejčastějšími typy dendrimerů jsou poly(amidamin) (PAMAM) a poly(propylenimin) (PPI) dendrimery. Fosforové (P-dendrimery), karbosilanové (CBS), poly(L-lysin) (PLL), poly(2,2 bis(hydroxymethyl)) dendrimery kyseliny propionové (bis-MPA) a peptidové dendrimery jsou také široce prozkoumány. Všechny tyto skupiny byly v biomedicínské oblasti zkoumány jako nanonosiče léčiv, kontrastní látky pro magnetickou rezonanci, umělé proteiny, nosiče genetického materiálu, syntetická vakcinace. (13) PAMAM dendrimery, farmaceuticky velmi atraktivní, dosahují až desáté generace s různými jádry a terminálními skupinami (převážně $-NH_2$; $-OH$). Mají příznivé vlastnosti jako vysoká rozpustnost ve vodě nebo hlavní řetězec napodobující peptid. PPI dendrimery, známé jako POPAM nebo DAB, obsahují více terciárních aminů na skeletu a primárních v koncové části, jsou poměrně menší než PAMAM dendrimery, mají více hydrofobní skelet. Převládají v biomedicíně díky periferním aminoskupinám. PLL dendrimery, obsahující aminokyselinu lysin, vynikají biokompatibilitou a biologickou rozložitelností, od ostatních se liší asymetrií větvících se částí. To ovlivňuje vlastnosti enkapsulace, protože nemají téměř žádný vnitřní prostor. Karbosilanové dendrimery obsahují ve svých skeletech vazby uhlík-uhlík a uhlík-křemík, které způsobují flexibilní, nepolární a teplotně stabilní vlastnosti. Často obsahují polární skupiny, které zvyšují rozpustnost ve vodě. Jsou klasifikovány jako „anorganické dendrimery“ a vykazují významné rozdíly ve srovnání s „organickými“ jako jsou PAMAM dendrimery. (14)



Obrázek 4 – 2. generace PAMAM dendrimer (17)

3.3.3. Využití dendrimerů

Nejvíce prozkoumaným využitím dendrimerů je jejich schopnost přenášet léčivé látky na požadované místo působení. Tento jev je zprostředkován zapouzdřením nebo navázáním léčiva na molekulu dendrimeru. Dendrimery mohou zlepšovat kinetiku a rozpustnost léčiva, kontrolují uvolňování, zprostředkovávají pohodlnější cesty podání, dosahují cílových míst s obtížným přístupem. Při zapouzdření je léčivo fyzicky zachyceno v dutině dendrimeru. Tyto dutiny jsou hydrofobní, takže mají afinitu k léčivům se špatnou rozpustností ve vodě (např. IMQ). (14) Tyto dendrimery s hydrofobním jádrem jsou využívány jako unimolekulární micely. Konjugáty léčivo-dendrimer by mohly snížit systémové účinky a zvýšit účinnost v cílovém místě. U zapouzdření léčiva mají dendrimery nízké generace nízkou kapacitu plnění dutiny dendrimeru. PEGylované dendrimery mají tuto kapacitu zvýšenou díky aglomeraci PEGylovaného dendrimeru. (18)

3.4. Polymery

3.4.1. Charakterizace

Polymery jsou velké molekuly (makromolekuly), které jsou složeny z opakujících se celků. Tyto podjednotky jsou spojeny kovalentně chemickými vazbami. Dostupné jsou syntetické i přírodní polymery. Přírodní jsou farmaceuticky atraktivnější, protože jsou biologicky odbouratelné a na výjimky i biokompatibilní. (19) Polymery, jejichž základ výroby je z přírodních zdrojů, se nazývají biopolymery. Polymery, které se pojí s biologickými

strukturami těla, se nazývají biokompatibilní polymery. Ty, které se rozkládají na biologicky přijatelné molekuly, se nazývají biodegradovatelné polymery. (20)

3.4.2. Přírodní polymery

Přírodní polymery jsou rozsáhlou skupinou makromolekulárních látek. Nazývají se přírodní, protože se hojně vyskytují v rostlinné i živočišné říši. Složitě je jejich získávání. Extrakce ze zdroje je nákladná a poměrně komplikovaná, jsou vysoce komplexní a variabilní. Jejich výhodou je, že jsou méně toxické než syntetické polymery, jsou biokompatibilní, snadno rozložitelné a nezávadné pro životní prostředí. (21) Materiály na přírodní bázi zahrnují sacharidy (škrob, alginát, chitosan, celulóza) nebo proteiny (sója, kolagen, hedvábí). Jedná se o vysoce organizované struktury. (22) Přírodní polymery se dají klasifikovat podle původu na rostlinný (celulóza) a živočišný (xanthamová guma, chitin). (19)

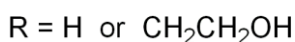
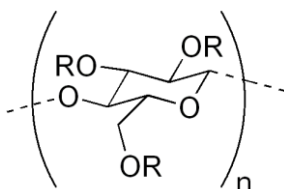
3.4.3. 2-Hydroxyethyl celulóza

Hydroxyethyl celulóza (2-HEC) je neiontový, rozpustný polymer odvozený od celulózy. Ve farmaceutickém prostředí má široké uplatnění jako zahušřovadlo, polymer s řízeným uvolňováním v pevné lékové formě, bioadhezivní činidlo, pojivo nebo potahovací činidlo. (23)

Jádrem tohoto polymeru je celulóza, která je tvořena anhydroglukózovými jednotkami, kdy každá z nich nese tři hydroxylové skupiny. Všechny komerčně dostupné deriváty celulózy se získávají esterifikací nebo etherifikací hydroxylových skupin. Obecně platí, že míra rozpustnosti derivátů celulózy souvisí se stupněm substituce a povahou substitučních skupin. Stupeň polymerace určuje do určité míry i stupeň viskozity.

Výrobní procesy 2-HEC jsou založeny na reakci alkalické celulózy a ethylenoxidem nebo ethylen chlorhydrinem za přítomnosti hydroxidu a vody. Funkce hydroxidu je bobtnat celulózová vlákna a katalyzovat etherifikaci.

2-HEC jako materiál je bílá, vláknitá, pevná látka bez chuti a zápachu. (24)



Obrázek 5 – Struktura 2-HEC (25)

3.5. Polymerní gely

3.5.1. Charakterizace

Polymerní gely se skládají z elastické polymerní sítě a tekutiny, která vyplňuje prostor této sítě. Gely jsou měkké struktury, které jsou schopny podstoupit velké deformace. (26) Přestože mají vlastnosti pevných látek, jako je stálost tvaru, odolnost ve smyku atd., mohou absorbovat rozpouštědlo a bobtnat do rozměrů mnohem větších, než je jejich velikost v suchém stavu. Skutečnost, že gel je pevná látka prostoupená rozpouštědlem, znamená, že je lze považovat za kombinace pevných látek a kapalin a jejich rovnovážný stav je určen souhrou mezi oběma složkami. (27) Podle Českého lékopisu se obecně gely řadí mezi polotuhé přípravky. (28)

Existují různé způsoby klasifikace gelů, jako je přírodní nebo syntetický gel – podle zdroje, hydrogel nebo organogel – podle kapalného média, chemický nebo fyzikální gel – podle zesíťování. Typické přírodní gely lze vyrobit ochlazením vodných roztoků biologických látek jako jsou proteiny nebo polysacharidy (želatina, pektin, agaróza). (26)

3.5.2. Příprava gelů

Struktury typu gelů lze získat chemickými nebo fyzikálními procesy. Chemickou gelaci lze uskutečnit dvěma různými způsoby. První způsob využívá aditivní polymeraci, kdy dochází k adici volných radikálů na dvojnou vazbu například vinylového monomeru. Druhý způsob je založen na kondenzaci polyfunkčních jednotek, kdy reakce vede k rozvětveným řetězcům. Tyto polymerní sítě ve vhodných rozpouštědlech bobtnají, ale nerozpouští se, stupeň bobtnání závisí na stupni zesíťování. Čím nižší je stupeň zesíťování, tím více gel bobtná.

Fyzikální gelace využívá principů, že jakýkoli fyzikální proces, který podporuje spojení mezi určitými body na různých řetězcích, může vést ke vzniku gelu. Vznik vodíkových vazeb vede ke vzniku šroubovicových struktur, při vzniku coulombických vazeb dochází k zesíťování mezi dvěma nebo více polymerními řetězci prostřednictvím iontových interakcí. (26)

3.5.3. Hydrogely

Hydrogely jsou definovány jako trojrozměrné zesíťované hydrofilní polymerní sítě, které jsou schopné nasát až tisícinásobek své suché hmotnosti ve vodě nebo biologických tekutinách. Vzhledem k vysokému obsahu vody a vysoké podobnosti s nativní extracelulární maticí jsou hydrogely vysoce biokompatibilní. (29)

Hydrogely lze klasifikovat podle původu na přírodní a syntetické. Přírodní jsou typicky odvozené od polypeptidů (fibrin, kolagen, želatina) nebo polysacharidů (alginát, kyselina hyaluronová). Jejich hlavní výhodou je, že jsou biokompatibilní a biodegradovatelné. Syntetické hydrogely (PEG, PVA) poskytují vysokou míru manipulativnosti. Je to proto, že molekulové hmotnosti a poměry zesíťování syntetických polymerů lze řídit, aby se vyladily fyzikální vlastnosti (elasticita, poróznost, viskozita). (30) Další způsob klasifikace je založen na povaze vedlejších skupin – mohou být iontové nebo neutrální. (31)

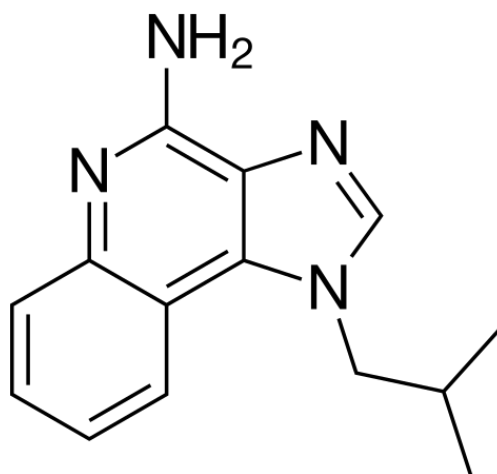
Hydrogely se obvykle připravují spojením malých molekul, jako jsou monomery a oligomery, a reakcí za vytvoření síťové struktury. Několik metod zesíťování je založeno na reakci volných radikálů. Další způsob přípravy využívá přímou reakci lineárního nebo rozvětveného polymeru s difunkčním nebo multifunkčním zesíťovacím činidlem s nízkou molekulovou hmotností. Toto činidlo spojuje dva řetězce s vyšší molekulovou hmotností. Tvorba hydrogelových sítí může být i výsledkem chemicko-fyzikálních reakcí. (32)

Hydrogely mají široké využití v medicínské praxi pro aplikaci léčiv. Hydrogely patří mezi vynikající kandidáty pro řízené uvolňování, adhezivní aplikaci nebo cílenou distribuci. Nejběžnější využití je pro perorální aplikaci (ústa, žaludek, tenké střevo, tlusté střevo), kdy mohou být využity k řízenému uvolňování nebo mohou v určité části přilnout a tím zajistit uvolňování pouze v tomto místě. U rektálního podání mohou hydrogely řešit problém vstřebání léčiva z konvenčních čípků, kdy není zajištěna jejich jednotná poloha v rektu. Hydrogelové čípky mohou opět ke sliznici přilnout a zajistit přesné místo vstřebávání. Při aplikaci léčiv na kůži je výhodou dobrá přilnavost hydrogelu a libovolné přerušení dodávky léčiva jejím odstraněním z pokožky. Navíc díky vysokému obsahu vody mohou hydrogely poskytnout lepší pocit na pokožce ve srovnání s konvenčními mastmi. (31)

3.6. Imiquimod

3.6.1. Charakterizace

IMQ, nukleosidový analog rodiny imidazochinolinů, je modifikátor imunitní reakce a prokázal účinnost proti mnoha nádorovým entitám. (33) Má syntetický vzorec (1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-C]chinolin-4-amin) a molekulový $C_{14}H_{16}N_4$. (obrázek č.6) Poprvé byl schválen FDA v roce 1997 k léčbě vnějších genitálních a perianálních bradavic. (34)



Obrázek 6 – Struktura IMQ (35)

Dnes je topický IMQ 5% krém (Aldara), indikován k léčbě vnějších perigenitálních bradavic, povrchového a aktinických keratóz. Krém se aplikuje dvakrát až pětkrát týdně na různě dlouhou dobu v závislosti na indikaci. Lokální krém byl také hodnocen v několika dalších kožních indikacích. Zdá se, že topický IMQ je dobře snášen, s možností přestávek v léčbě při místních kožních reakcích. Stimuluje vrozené i buňkami stimulované imunitní reakce na viry a nádorové buňky prostřednictvím řady molekulárních dějů. Zatímco většina aktivity se vyskytuje v místě podání, byla také zaznamenána minimální systémová imunomodulace po topickém podání. Systémová absorpce byla minimální po aplikaci 5% IMQ denně po dobu sedmi dnů u zdravých dobrovolníků a po dobu 16 týdnů u pacientů s perigenitálními bradavicemi. Léčivo je v kůži zadržováno delší dobu, to má za následek poločas eliminace jeden den. IMQ a jeho aktivní metabolity jsou vylučovány močí a stolicí. (36)

3.6.2. Mechanismus účinku

Mechanismus účinku probíhá prostřednictvím membránového toll-like receptoru 7 na monocytech a makrofázích a na dendritických buňkách *epidermis* a *dermis*. Při navázání IMQ na tento receptor se aktivují Langerhansovy buňky, které začnou uvolňovat imunomodulační a protizánětlivé cytokiny (interferon α , tumor nekrotizující faktor α , interleukin 1). Langerhansovy buňky zároveň migrují do lymfatických uzlin k prezentaci antigenu. Stimulací vrozené i získané protinádorové imunity dochází k inhibici růstu nádoru, k indukci apoptózy a k destrukci nádoru specializovanými buňkami imunitního systému (*natural killer* buňky) a T-lymfocyty. (37)

3.6.3. Klinické údaje

Frekvence nanášení a délky léčby se liší podle indikace. V případě zevních kondylomat se krém aplikuje třikrát týdně na noc po dobu 16 týdnů. U povrchového *basocelulárního* karcinomu se aplikuje pětkrát do týdne na 8 hodin po dobu 6 týdnů. Použití u pediatrických pacientů se nedoporučuje. Krém se nanáší na omytou a osušenou pokožku v tenké vrstvě a vtírá se do kůže, dokud se zcela nevstřebá. Aplikuje se na noc, během jeho působení není možné se sprchovat. Před i po aplikaci krému je nutné si umýt ruce. Léčenou oblast je potřeba chránit před sluncem. (38)

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří místní kožní reakce, ze systémových reakcí byly hlášeny bolesti hlavy, symptomy podobné chřipce a myalgie. (38)

3.6.4. Reálná zkušenost

V kontrolovaných studiích s použitím 5% krému s IMQ k léčbě perianálních virových bradavic bylo časté podráždění kůže v místě aplikace, ale nebyla pozorována žádná systémová toxicita. U 50leté pacientky s kožními metastatickými lézemi melanomu probíhala lokální léčba dacarbazinem, kdy léze zůstávaly stabilní, ale na levém prsu se objevil nový shluk kožních metastáz. Po přidání terapie IMQ třikrát týdně se velikost nádoru zmenšila a po 12 týdnech již nebyla možná sonografická detekce nádoru. Neléčené kožní metastázy současně progredovaly. Lokální podráždění v místech aplikace IMQ bylo jediným nežádoucím účinkem. (39)

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, materiál a přístroje

Pro experimentální část diplomové práce byla použita ultra čistá voda čištěná systémem milli-Q na katedře biochemických věd (FaF, UK). Syntéza dendritických molekul, které byly v této práci využívány, je popsána v obhájených diplomových pracích. (40) (41) Syntetizována a uplatněna byla 0. generace ($M_w=492,31$ g/mol), 1. generace ($M_w=1210,90$ g/mol) a 2. generace ($M_w=2648,09$ g/mol). Použitý IMQ ($M_w=240,31$ g/mol) byl zakoupen od firmy TCI, Japonsko. Pro úpravu pH vodného roztoku byla použita 36% kyselina chlorovodíková (HCl) ($M_w=36,46$ g/mol) nebo hydroxid sodný (NaOH) ($M_w=40,00$ g/mol) od výrobce Penta, ČR.

Pro přípravu acetátového pufru jako součást mobilní fáze vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byl upotřeben chlorid sodný (NaCl) ($M_w=58,40$ g/mol) zakoupený od firmy Merck, Německo a kyselina octová (CH_3COOH) od výrobce Penta, ČR. Zbytek mobilní fáze tvořil methanol (MeOH) pro HPLC ($M_w=32,04$ g/mol) a acetonitril (ACN) pro HPLC ($M_w=41,05$ g/mol), Merck, Německo. Při vakuové filtraci mobilní fáze byla využita nylonová membrána $0,45 \mu\text{m}$ od výrobce Fisher Scientific, EU. Analýza koncentrace IMQ v jednotlivých fázích proběhla pomocí systému HPLC 1290 Infinity, Agilent, Německo.

Při permeacích byl jako kontrolní vzorek použit léčivý přípravek Aldara od výrobce Meda, Švédsko, jedná se o krém, který obsahuje 5 mg IMQ na 100 mg krému. 2-HEC ($M_w=1300000,00$ g/mol), použitý k přípravě gelů, byl zakoupen od firmy Merck, Německo. Jako akceptorová fáze pro permeace byl využit 10mM izotonický fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4, připravený z dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ($M_w=156,00$ g/mol), dodecahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ($M_w=358,00$ g/mol), NaCl ($M_w=58,40$ g/mol), chloridu draselného (KCl) ($M_w=74,60$ g/mol) pořízeno z PENTA, ČR a gentamicin sulfátu zakoupeno od firmy Merck, Německo. Použité rozpouštědlo na extrakci jednotlivých vrstev kožní bariéry se skládalo z ACN pro HPLC ($M_w=41,05$ g/mol) a amonium acetátu, všechny tyto uvedené suroviny byly zakoupeny od firmy Merck, Německo. Cely, které byly využity při permeacích, jsou ruční výroby, mají objem ~ 7 ml. Poté byly vloženy do vany s vodní lázní temperovanou na 37°C a pro snazší oddělování *epidermis* a *dermis* bylo potřeba krátkodobé působení vyšších teplot, a proto byla využita trouba, oba přístroje od výrobce Memmert, Německo.

Navazování jednotlivých surovin proběhlo pomocí analytických vah Ohaus Pioneer a Ohaus Discovery od výrobce Ohaus, USA. Specifické objemy byly odměřovány pipetou

s nastavitelným objemem Transferpette S, Brand Tech Scientific, USA. Roztoky byly krátkodobě homogenizovány pomocí přístroje Vortex MS 3 Digital, IKA, Německo, pro dlouhodobou homogenizaci byla využívána třepačka LT3, Nedform, ČR. Sonikace prováděna v ultrazvukové lázni K-12 LE, Kraintek, ČR. Pro centrifugaci roztoků byl využit přístroj miniSpin, Eppendorf, Německo s nastaveným časem 5 minut a 3000 otáček za minutu. Při měření pH byl používán přístroj SevenCompact, Mettler Toledo, ČR pro pH malých objemů Hanna model 210, Merck, Německo a magnetická míchačka MR Hei-Standard, Heidolph.

4.2. Příprava hydrofilních gelů s obsahem IMQ a dendritických molekul

4.2.1. Příprava vodných roztoků IMQ

Postupně byly provedeny dva pokusy. Pro každý byly připraveny dvě skupiny vodných roztoků IMQ za účelem stanovení koncentrace IMQ v roztoku pomocí metody HPLC. V obou případech první skupina vzorků (A) byla připravena přidáním 1 mg IMQ do 1 ml vodného roztoku o pH 5,5, který vzniknul upravením ultra čisté vody pro HPLC pomocí 36% HCl. Voda s upraveným pH na 5,5 byla připravena v nadbytku a skladována při laboratorní teplotě pro budoucí použití. pH 5,5 bylo použito z důvodu, že odpovídá fyziologickému pH povrchu kůže, a proto by mělo být pro naše formulace ideální. Druhá skupina vzorků (B) byla připravena stejným postupem, kdy 1 mg IMQ byl přidán do 1 ml ultra čisté vody o pH 7. Tento roztok vzniknul upravením ultračisté vody pomocí NaOH, byl připraven v nadbytku a uchován pro další použití. Pro druhou skupinu vzorků bylo zvoleno pH 7, aby bylo zjištěno, jaká je rozpustnost IMQ v neutrálním pH. Výsledné vodné roztoky IMQ byly připevněny na třepačku a ponechány 24 hodin homogenizovat, aby došlo ke vzniku nasycených roztoků IMQ ve vodě.

Všechny roztoky byly následně podrobeny metodě HPLC (viz dále). Vodné roztoky s obsahem IMQ a hodnotou pH 5,5 byly dále použity k tvorbě gelu a využity při permeacích.

4.2.2. Příprava vodných roztoků dendritických molekul

Při přípravě vodných roztoků dendritických molekul bylo vytvořeno několik skupin vzorků. Pro první pokus byly vytvořeny vzorky s obsahem pouze 2. generace dendritických molekul s koncentrací 2,5mM. Pro druhý pokus byla připravena první skupina 0. generace s koncentrací 10mM, označená G0-10, druhá skupina 0. generace 5mM, označená G0-5, třetí skupina 1. generace 5mM, označená G1-5, čtvrtá skupina 1. generace 2,5mM, označená G1-2,5, pátá skupina 2. generace 2,5mM, označená G2-2,5 a šestá skupina 2. generace 1,25mM, označená G2-1,25. Bylo vypočteno potřebné množství vodného roztoku dendritických molekul

na základě potřebného objemu k HPLC, tvorbě gelu a minimálního odpadu. Poté byla vypočtena i teoretická navážka dendrimerů, pomocí hmotnosti, molární hmotnosti a objemu, pro přípravu těchto vodných roztoků dendritických molekul. Do vialek bylo naváženo potřebné množství dendritických molekul, podle reálné navážky byl k navážkám přidán reálný objem vodného roztoku o pH 5,5.

Ve všech případech výsledné pH vodných roztoků dendritických molekul odpovídalo hodnotě okolo 2. Požadavkem bylo, aby výsledné roztoky měly hodnotu pH 5,5, aby bylo nejbližší fyziologickému pH kůže. Z toho důvodu bylo pH roztoků upravováno pomocí velmi koncentrovaných roztoků NaOH v nejmenším možném množství, aby nedošlo ke změně výsledné koncentrace z důvodu velkého zásahu do objemu.

Vzniklé roztoky dendritických molekul byly použity k tvorbě roztoků IMQ s obsahem dendritických molekul (viz dále).

4.2.3. Příprava vodných roztoků IMQ s obsahem dendritických molekul

Do označených vialek byl navážen 1 mg IMQ. Pro první pokus byla skupina vzorků 2. generace s koncentrací 2,5mM označená G2-2,5₁₋₄. Pro druhý pokus první skupina 0. generace s koncentrací 10mM označená G0-10₁₋₅, druhá skupina 0. generace 5mM, označená G0-5₁₋₅, třetí skupina 1. generace 5mM, označená G1-5₁₋₅, čtvrtá skupina 1. generace 2,5mM, označená G1-2,5₁₋₅, pátá skupina 2. generace 2,5mM, označená G2-2,5₁₋₅ a šestá skupina 2. generace 1,25mM, označená G2-1,25₁₋₅. Potřebné množství IMQ pro tvorbu těchto roztoků bylo vyvozeno z výsledků HPLC analýzy vzorků IMQ ve vodném roztoku, který neobsahoval dendritické molekuly. Potřebné množství IMQ s přítomností dendritických molekul roste. Ke každé navážce ve skupinách vzorků bylo přidáno potřebné množství příslušného roztoku dendrimerů. Takový objem byl zvolen na základě potřebného objemu k HPLC, potřebného objemu pro přípravu gelu a zároveň minimálního odpadu. Všechny připravené vzorky byly upevněny ve stojanu a připevněny na třepačku, kde byly 24 hodin homogenizovány do vzniku nasycených roztoků.

Vzniklé roztoky byly podrobeny metodě HPLC a následně z nich byly připraveny gely, dále využité při permeacích (viz dále).

4.2.4. HPLC stanovení koncentrace IMQ

HPLC je metoda, která byla využita pro zjištění koncentrace IMQ v připravených vzorcích. Pro přípravu mobilní fáze pro HPLC byl nejprve připraven acetátový pufr,

a to rozpuštěním 9,04g CH₃COOH a 8,77g NaCl v 1500 ml vody a úpravou pH na hodnotu 4 pomocí NaOH. Výsledný acetátový pufr byl zfiltrován pomocí vakua přes nylonovou membránu. Finální složení mobilní fáze bylo: acetátový pufr, MeOH a ACN v poměru 1080:370:550, a do měření byla uchovávána v lednici.

Příprava vzorků pro HPLC probíhala po 24h homogenizaci. Vzorky byly podrobeny centrifugaci a následné filtraci přes vatu. Při filtraci bylo využito maximální možné množství bez odebrání sedimentu. U všech vzorků bylo zkontrolováno pH. Dále bylo nutné zředit každý vzorek 10× a následně 100×. Pro ředění 10× bylo odebráno 100 μl původního vzorku a naředěno 900 μl vody o pH 5,5. 100× zředěný vzorek vzniknul odebráním 10 μl 10× ředěného vzorku a přidáním 900 μl zásobního roztoku. Po každém ředění bylo nutné vzorek krátkodobě homogenizovat. Vzorky bylo potřeba ředit z důvodu nastavené metody pro HPLC, která je kalibrována pro koncentrace 20-5000 ng/ml.

Pro metodu HPLC byla používána připravená mobilní fáze acetátový pufr (100 mM, pH=4)/MeOH/ACN v poměru 1080:370:550. Analýza proběhla na koloně HS Discovery C-18 150 mm × 4,6 mm (5 μm částice s porozitou 100 Å) při teplotě kolony 25 °C. Podmínky byly nastavené na injektovaný objem 1 ul, průtok 1 ml/min, doba analýzy 5 minut. IMQ byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru ($\lambda_{exc} = 240$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm) a jeho retenční čas byl 3,1 minuty. Tlak byl okolo hodnoty 120 barů. Výsledné hodnoty byly uvedené v jednotkách ng/ml.

Prvně byly HPLC podrobeny vzorky, které neobsahovaly dendritické molekuly, aby byla zjištěna hodnota koncentrace IMQ pouze ve vodném prostředí, bez specifického pH a bylo možné predikovat potřebné množství IMQ pro roztoky s obsahem dendritických molekul. Následně byly HPLC podrobeny všechny vzorky s různými generacemi i koncentracemi dendritických molekul a IMQ.

4.2.5. Příprava hydrofilních gelů

Do vody ve vialce byla postupně přidávána navážka polymeru. Po přidání kompletního množství polymeru bylo vloženo do roztoku magnetické míchadlo, roztok upevněn na magnetickou míchačku, kde vzorky byly homogenizován. Do tvorby čirého a viskózního gelu byla potřeba minimálně hodina času. Takto byl připraven gel s obsahem 2-HEC v koncentraci 1 %.

Při tvorbě gelů pro permeace polymer bobtnal v roztoku pH 5,5 s obsahem dendritických molekul různých generací a koncentrací a s obsahem IMQ. Pro první pokus byly

smísены připravené roztoky IMQ s obsahem druhé generace dendritických molekul o koncentraci 2,5mM s průměrnou koncentrací IMQ 0,04 mg/ml a pH 5,57. Pro druhý pokus byl z každé skupiny vzorků vybrán jeden podle průměrné hodnoty koncentrace IMQ, jak je uvedeno v tabulce č. 1.

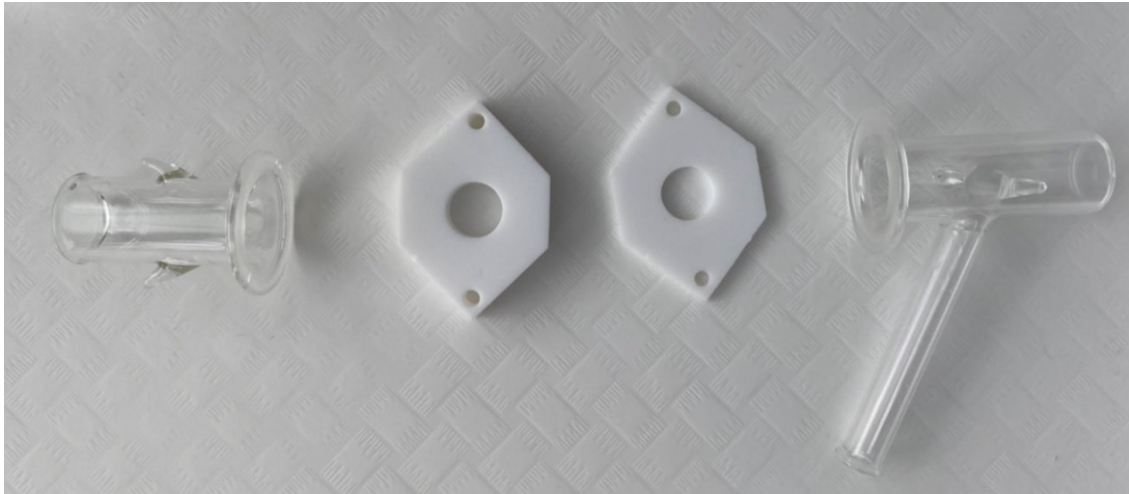
Tabulka 1 – Naměřené hodnoty ve vybraných roztocích pro přípravu gelu s obsahem dendrimerů pro druhý pokus

Generace	Koncentrace dendrimer (mM)	Koncentrace IMQ (mg/ml)	Hodnota pH
0	5	0,04	5,84
0	10	0,03	5,53
1	2,5	0,03	5,44
1	5	0,02	5,45
2	1,25	0,03	5,66
2	2,5	0,04	5,55

Pro oba pokusy byl jeden vzorek ponechán bobtnat ve vodném roztoku IMQ o pH 5,5 bez přítomnosti dendritických molekul. Tento roztok vzniknul smísením již připravených vzorků bez dendrimerů.

4.3. Permeace

Nejdůležitější součástí pro permeace byly skleněné cely, do kterých se upevnila lidská kůže (obrázek č. 7).



Obrázek 7 – Součásti cely

Vrchní skleněná, spodní skleněná část a dvě různě vysoké teflonové destičky s otvorem 1 cm^2 byly natřeny silikonem. Do spodní skleněné části o objemu $\sim 7 \text{ ml}$ bylo vloženo magnetické míchadlo. Mezi teflonové destičky byla vložena lidská kůže, která předem byla nařezána na malé čtverce, které plochou odpovídaly ploše teflonové destičky. Použité kůže byly darovány ženami, které podstoupily abdominoplastiku v chirurgickém centru Sanus, Hradec Králové. Po operaci byl z kůže odstraněn podkožní tuk a kůže byla až do použití uchovávána při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. V čase potřeby byla volně rozmrazena a použita na permeaci. Celý proces probíhal po souhlasu Etické komise (No. 5/4/2018) a podle principů Helsinské deklarace. Všechny části cel byly postupně sestrojeny a upevněny pomocí dřívěk a gumiček (viz obrázek č. 8).



Obrázek 8 – Sestrojená skleněná cela

Akceptorová fáze byla tvořena 10mM izotonickým PBS s hodnotou pH 7,4, který byl připraven postupným navážením a rozpuštěním 0,31g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,87g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8,00g NaCl, 0,20g KCl a 0,05g gentamicinu v 1000 ml ultra čisté vody.

Po sestrojení byl do spodní skleněné části pomocí stříkačky přidán 10mM izotonický PBS s hodnotou pH 7,4 až po okraj a byly odstraněny vzduchové bubliny. Zbylé množství 10mM izotonického PBS ze stříkačky bylo převedeno do odměrného válce, tímto způsobem byl zjištěn aplikovaný objem 10 mM izotonického PBS do cely. Takto byly připraveny všechny cely, které byly vloženy do stojanu ve vaně s vodní lázní (obrázek č. 9), vytemperovanou na teplotu 32 °C, která odpovídá fyziologické teplotě kůže. Teplota se předem nechala ustálit 24 hodin.



Obrázek 9 – Cely ve vodní lázni

Druhý den byly překontrolovány všechny cely, znovu odstraněny vzniklé vzduchové bubliny a doplněna odpařená akceptorová fáze. Byla doplněna odpařená voda z vodní lázně, aby měla dostatečnou hladinu. Do každé cely bylo aplikováno 50 μl vzorků, každý vzorek byl aplikován při prvním pokusu 4 \times (tabulka č. 2). Při druhém pokusu byl každý vzorek s obsahem IMQ a dendrimer aplikován 5 \times , léčivý přípravek Aldara 7 \times , jak je znázorněno v tabulce č. 3.

Tabulka 2 – Množství vzorků aplikovaných na kůži při prvním pokusu

Číslo cely	Vzorek	Množství
1.-4.	Roztok pH 7	50 µl
5.-8.	Roztok pH 5,5	50 µl
9.-12.	Roztok pH 5,5 + G2 2,5mM	50 µl
13.-16.	Gel pH 5,5 + G2 2,5mM	50 µl
17.-20.	Aldara	25 mg

Tabulka 3 – Množství vzorků aplikovaných na kůži při druhém pokusu

Číslo cely	Vzorek	Množství
1.-5.	Gel pH 5,5	50 µl
6.-10.	Gel pH 5,5 + G0 5mM	50 µl
11.-15.	Gel pH 5,5 + G0 10mM	50 µl
16.-20.	Gel pH 5,5 + G1 2,5mM	50 µl
21.-25.	Gel pH 5,5 + G1 5mM	50 µl
26.-30.	Gel pH 5,5 + G2 1,25mM	50 µl
31.-35.	Gel pH 5,5 + G2 2,5mM	50 µl
36.-42.	Aldara	25 mg

Kontrolním vzorkem byl léčivý přípravek Aldara. Aplikace Aldary do jednotlivých cel byla náročná z důvodu její lékové formy. Prvně tedy byla zvážena prázdná plastová špička, poté do špičky nabrán léčivý přípravek v nadbytku, špička byla zvážena, krém aplikován na kůži a špička opět zvážena. Odečítáním bylo zjišťováno, jaká hmotnost krému již byla aplikována a postupně se aplikovalo přibližně 25 mg léčivého přípravku do každé cely. Toto množství mělo podobný obsah IMQ jako připravené vzorky. Po aplikaci byly vzorky ponechány v celách ve vytemperované vodní lázni 8 hodin.

Po 8 hodinách od aplikace byly z každé cely formulace odstraněny pomocí vatové tyčinky a destilované vody. Nejprve bylo aplikováno 500 µl destilované vody, která byla postupně odstraňována spolu s aplikovanou formulací pomocí vatové tyčinky, podruhé bylo aplikováno 300 µl destilované vody a kůže vatovou tyčinkou dočištěna. Při čištění byla jasně zřetelná oddělená vrstva zaschlého gelu, která se přichytila na vatovou tyčinku. Po odstranění formulací byly sestrojené cely ponechány do druhého dne ve vytemperované vodní lázni.

Bylo připraveno potřebné množství vialek, byly připraveny zvlášť pro *epidermis*, *dermis*, zbytek kůže bez aplikované formulace a pro 10mM izotonický PBS. Pro filtraci extrakčního činidla byly připraveny plastové špičky pro poloautomatickou pipetu naplněné vatou. Pro extrakci bylo potřeba extrakčního činidla, které bylo připraveno smísením ACN a acetátu amonného (5 mM, pH 2,7) v poměru 98:2.

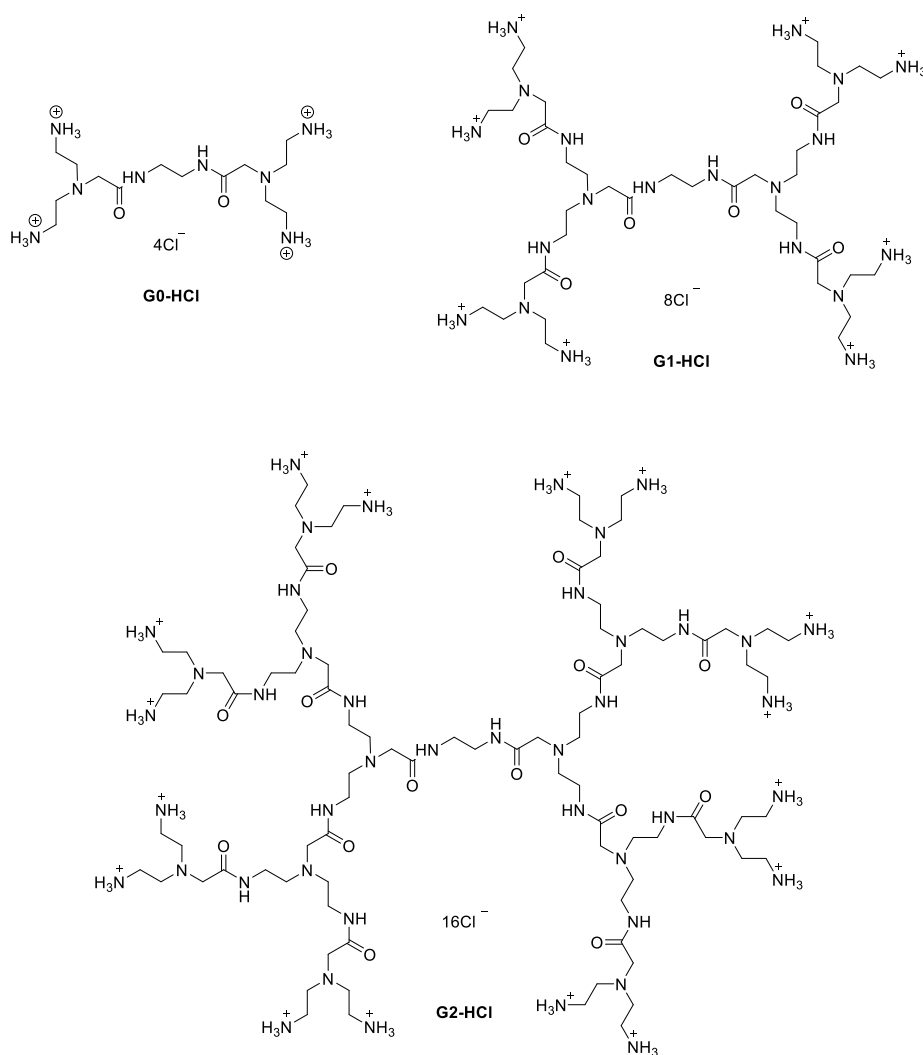
Třetí den byly rozebrány všechny cely. Část kůže, na které byla aplikovaná formulace, byla oddělena od zbytku. Následně použitím pinzet byla oddělována *epidermis* a *dermis*, pro podporu oddělení byla využito zahřátí navlhčené kůže na 80 °C po dobu jedné minuty. Oddělené vrstvy byly zvlášť vloženy do připravených vialek a zváženy. Na zbytku kůže, na který nebyla aplikovaná formulace, nebyly jednotlivé vrstvy oddělovány a celý kus byl vložen do připravené vialky a zvážen. Do každé vialky bylo přidáno předem připravené extrakční činidlo. K *epidermis* 1 ml, k *dermis* 2 ml a ke zbytku kůže 3 ml extrakčního činidla. Všechny vialky byly připevněny k třepačce a ponechány 24 hodin intenzivně protřepávat a extrahovat. Mezi tím byly všechny vzorky akceptorové fáze přeneseny do připravených vialek a poté pomocí poloautomatické pipety zfiltrovány přes plastovou špičku naplněnou vatou do připravené vialky pro HPLC. Všechny vzorky byly podrobeny HPLC.

Čtvrtý den, po 24hodinové extrakci *epidermis*, *dermis* a zbytku kůže, byl každý extrakt zfiltrován pomocí poloautomatické pipety a plastové špičky naplněné vatou do vialky pro HPLC. Všechny vzorky pak byly podrobeny HPLC analýze.

5. Výsledky a diskuze

Využití schopnosti dendritických molekul při zvyšování rozpustnosti hydrofobních léčiv a následné zvýšení jejich biodostupnosti bylo popsáno již v několika publikovaných článcích. (42) (43) (44) IMQ je hydrofobní léčivá látka, která se prokázala jako účinná proti nádorovým lézím a je využívána v klinické praxi. (33)

Cílem této práce je zvyšování rozpustnosti hydrofobní léčivé látky IMQ ve vodném roztoku za využití dendritických molekul. Zvýšení rozpustnosti zprostředkované dendritickou molekulou je závislé hlavně na faktorech jako generace a koncentrace dendrimeru nebo pH roztoku. (44) Struktury dendrimerů, které byly použity v této diplomové práci, jsou na obrázku 10. Následovala formulace tohoto roztoku do hydrofilního gelu pro zlepšení jeho aplikovatelnosti na kůži.



Obrázek 10: Struktury dendrimerů

První část této práce spočívala v přípravě vodných roztoků léčivé látky. Příprava nasycených vodných roztoků IMQ bez dendritických molekul i IMQ s dendritickými molekulami probíhala prostým rozpouštěním za laboratorní teploty s dodáním mechanické energie. Tento postup rozpouštění byl dostačující k přípravě nasycené roztoku IMQ. pH vytvořených roztoků odpovídalo pH lidské kůže (pH 5,5) z důvodu, aby všechny faktory, které by mohly negativně ovlivňovat vlastnosti lidské kůže, byly potlačeny. (45) Dalším krokem byla tvorba gelů, které jsou jako lékové formy více vhodné pro aplikaci na kůži pro svoji vyšší viskozitu než roztoky. Na základě publikovaných článků byla jako základní polymer vybrána 2-HEC, která vytváří gely s hladkou a homogenní strukturou s výhodnými reologickými a mechanickými vlastnostmi. (46) (47) Posledním krokem experimentální části byly permeační pokusy na lidské kůži, kdy bylo následně zjišťováno množství IMQ vstřebané do jednotlivých vrstev kůže a vnitřního prostředí. Připravené gelové formulace byly aplikovány na lidskou kůži po dobu 8 hodin, doba aplikace byla stanovena na základě aplikace léčivého přípravku Aldara, který má být aplikován po dobu 8 hodin. (38) Bylo aplikováno 50 μ l připravené formulace, protože po předchozí zkušební aplikaci bylo zjištěno, že takové množství je dostačující k pokrytí celé plochy zkoušené kůže. Po odstranění gelu následovala separace jednotlivých vrstev kůže, pro lepší separaci byla kůže vystavena vyšším teplotám, pomocí kterých bylo možné lepší oddělení *epidermis* a *dermis* a následně byla provedena jejich extrakce.

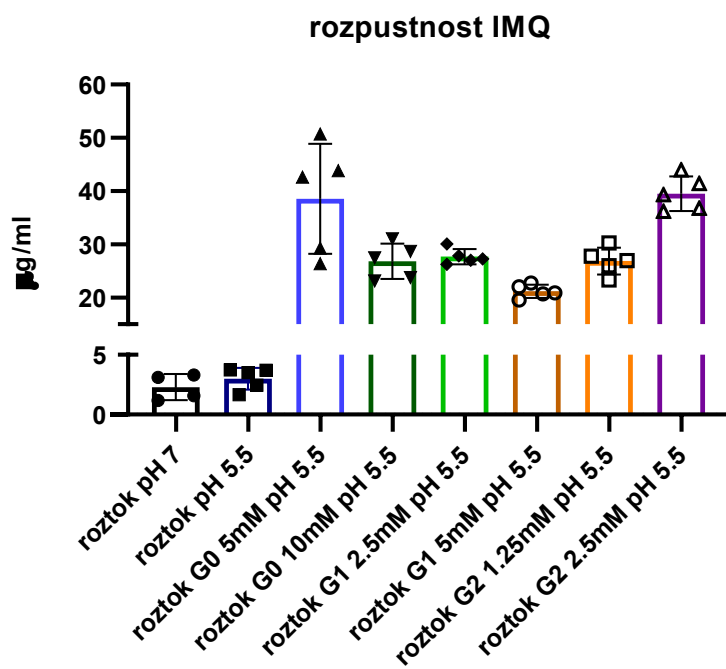
5.1. Rozpustnost vzorků IMQ

Tabulka číslo 4 znázorňuje průměrné hodnoty naměřených hodnot rozpustnosti vodných roztoků IMQ a vodných roztoků IMQ s různými generacemi a koncentracemi dendritických molekul, v tabulce jsou uvedeny i směrodatné odchylky naměřených hodnot. Průměrné hodnoty byly vyhodnocovány vždy z pěti měření ve skupině vzorků.

Tabulka 4 - Průměrné hodnoty naměřených hodnot rozpustností jednotlivých vzorků IMQ

Vzorek	Rozpustnost [$\mu\text{g/ml}$]	SD
Roztok pH 7	2,30	$\pm 1,08$
Roztok pH 5,5	3,01	$\pm 0,91$
Roztok pH 5,5 G0 5mM	38,58	$\pm 10,32$
Roztok pH 5,5 G0 10mM	26,82	$\pm 3,33$
Roztok pH 5,5 G1 2,5mM	27,69	$\pm 1,45$
Roztok pH 5,5 G1 5mM	21,18	$\pm 1,24$
Roztok pH 5,5 G2 1,25mM	26,86	$\pm 2,53$
Roztok pH 5,5 G2 2,5mM	39,54	$\pm 3,25$

Jak je shrnuto v tabulce 4, tak je zřetelné i v grafickém znázornění na obrázku 11, není významný rozdíl v rozpustnosti IMQ mezi roztoky o hodnotě pH 5,5 a pH 7 bez přítomnosti dendritických molekul. Předchozí studie ukázala, že rozpustnost IMQ je vyšší při nižším pH, ale tento jev byl více patrný při hodnotách pH nižších než 5. (48) Naopak přítomnost dendritických molekul ve vodném roztoku IMQ jeho rozpustnost významně zvyšuje (přibližně 10 \times vyšší rozpustnost). Mezi rozpustnostmi IMQ v roztocích bez přítomnosti dendritických molekul a v roztocích s jejich přítomností je statisticky významný rozdíl (není ukázáno v grafu). Vodné roztoky obsahující dendrimery prokázaly 10 \times vyšší rozpustnost IMQ, což dokazuje, že nižší pH není jediný důvod zvýšené rozpustnosti. Na druhou stranu, nebyla pozorována žádná závislost na generaci nebo koncentraci dendrimerů.



Obrázek 11 – Rozpustnost IMQ

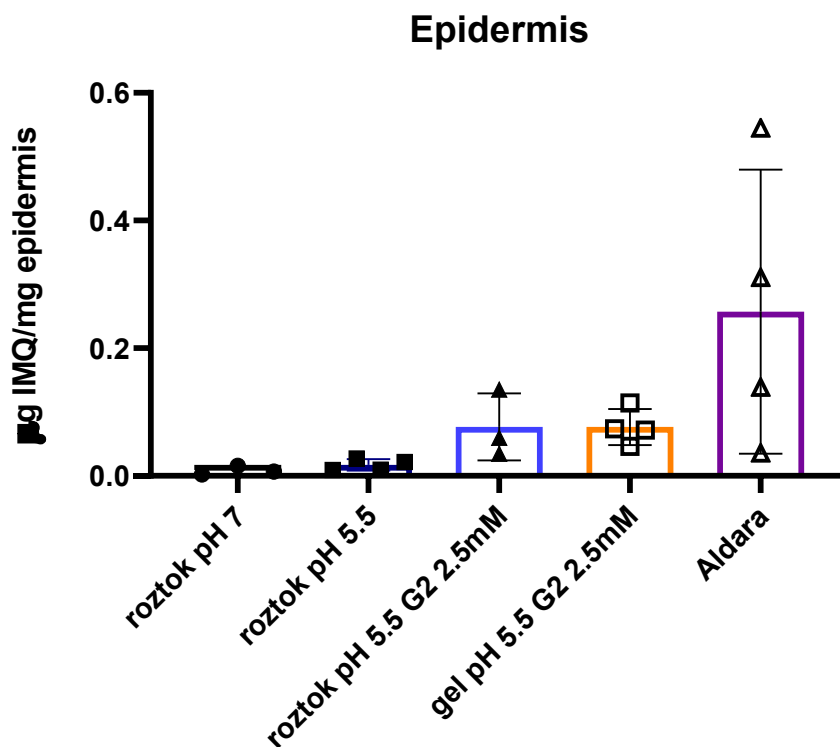
5.2. První permeace

V tabulce 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty z jednotlivých měření vstřebaného IMQ do *epidermis* a jejich směrodatné odchylky. Průměrné hodnoty jsou vypočítány vždy z minimálně 3 různých měření ve skupině vzorků.

Tabulka 5 - Průměrné hodnoty naměřeného množství vstřebaného IMQ v *epidermis*

Vzorek	Průměrné množství vstřebaného IMQ [ng IMQ/mg <i>epidermis</i>]	SD
Roztok pH 7	8,33	±6,95
Roztok pH 5,5	17,13	±8,93
Roztok pH 5,5 G2 2,5mM	76,73	±42,81
Gel pH 5,5 G2 2,5mM	76,57	±28,14
Aldara	257,42	±222,53

Jak je znázorněno na obrázku 12, ze vzorků s obsahem dendritických molekul se do *epidermis* vstřebalo 5-9× vyšší množství IMQ než ze vzorků, které dendritické molekuly neobsahovaly. Avšak není významný rozdíl v množství vstřebané léčivé látky z roztoku a z gelu. Množství vstřebaného IMQ z připravených vzorků s dendrimery je asi 3× nižší než množství IMQ vstřebaného z kontrolního vzorku (léčivý přípravek Aldara).



Obrázek 12 - Grafické znázornění množství vstřebaného IMQ do epidermis

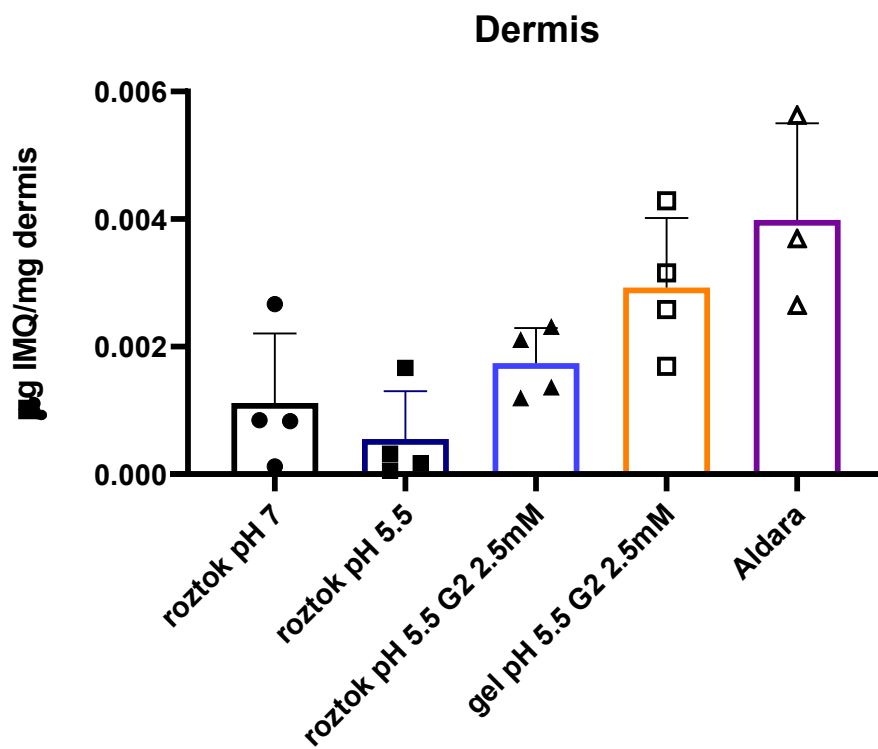
I když je množství vstřebané léčivé látky 3× nižší u připravených vzorků než u kontroly, je potřeba dodat, že aplikované množství IMQ ve formulacích obsahujících dendrimery je cíleně nižší než u léčivého přípravku Aldara. Například, když bylo aplikováno 50 µl gelu o pH 5,5 s obsahem G2 dendritických molekul v koncentraci 2,5mM, množství IMQ je 1,34 µg (koncentrace IMQ je 26,8 µg/ml). Na druhou stranu při aplikaci 25 mg přípravku Aldara, je množství IMQ 1,25 mg (koncentrace IMQ je 5mg/100mg). Tento rozdíl v aplikovaném množství IMQ je téměř 1000× nižší. Proto z tohoto grafického znázornění můžeme vyvodit, že dendritické molekuly pozitivně ovlivňují vstřebávání hydrofobní léčivé látky IMQ bez závislosti na aplikační formulaci. Z hlediska aplikace na kůži je však více vhodný viskóznější gel.

V tabulce 6 jsou uvedeny průměrné hodnoty z jednotlivých měření vstřebaného IMQ do *dermis*. Průměrné hodnoty jsou vypočítány vždy z minimálně 3 různých měření ve skupině vzorků.

Tabulka 6 - Průměrné hodnoty naměřeného množství vstřebaného IMQ v *dermis*

Vzorek	Průměrné množství vstřebaného IMQ [ng IMQ/mg <i>dermis</i>]	SD
Roztok pH 7	1,12	±1,09
Roztok pH 5,5	0,55	±0,75
Roztok pH 5,5 G2 2,5mM	1,74	±0,55
Gel pH 5.5 G2 2,5mM	2,93	±1,09
Aldara	3,99	±1,51

Průměrné množství vstřebaného IMQ v *dermis* je v porovnání s *epidermis* nižší. Mezi jednotlivými formulacemi nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (obrázek 13). Protože je cílem dosáhnout pouze lokálního působení léčiva v *epidermis*, bylo by ideální dosáhnout nulového vstřebání léčivé látky do *dermis* i akceptorové fáze. Nejvyšších hodnot zde dosáhl kontrolní vzorek Aldara, v *dermis* jsou hodnoty připravených formulací v porovnání s kontrolou nižší, ale v akceptorové fázi vyšší, což není žádoucí.



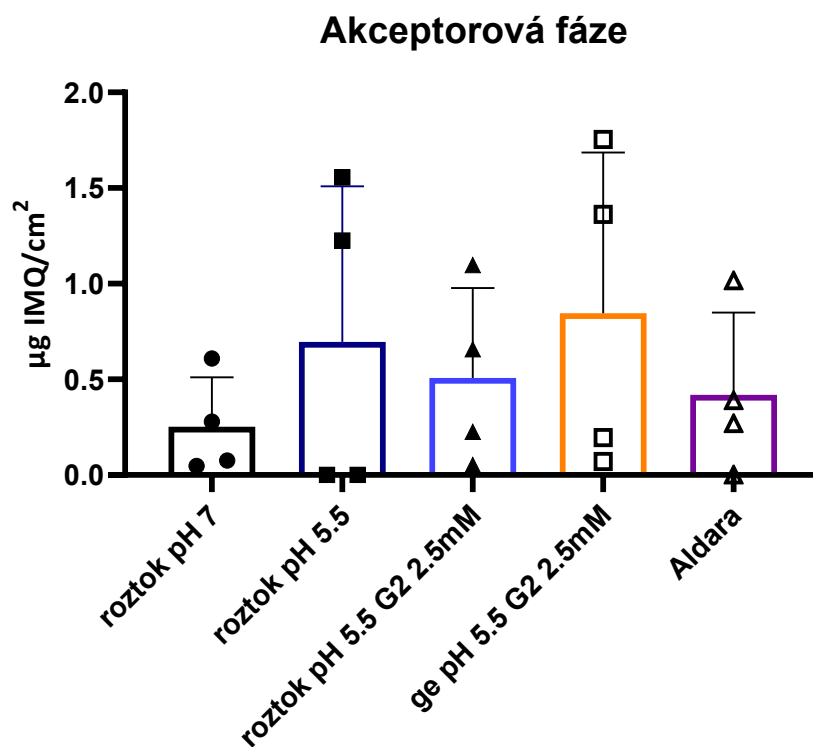
Obrázek 13 - Grafické znázornění množství vstřebaného IMQ do dermis

V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty z jednotlivých měření detekovaného IMQ v akceptorové fázi. Průměrné hodnoty jsou vypočítány vždy z minimálně 3 různých měření ve skupině vzorků.

Tabulka 7 - Průměrné hodnoty naměřeného množství detekovaného IMQ v akceptorové fázi

Vzorek	Průměrné množství detekovaného IMQ [ng/cm ²]	SD
Roztok pH 7	252,94	±258,340
Roztok pH 5,5	695,25	±814,06
Roztok pH 5,5 G2 2,5mM	508,18	±468,55
Gel pH 5,5 G2 2,5mM	846,11	±839,35
Aldara	418,58	±430,41

Jako v případě *dermis*, nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi detekovaným množstvím IMQ v akceptorové fázi po aplikaci jednotlivých formulací. Kvůli přítomnosti IMQ v akceptorové fázi lze říct, že všechny formulace doručují léčivo do systémového oběhu, což je v případě IMQ nežádoucí. Systémová cirkulace IMQ po topické aplikaci patří mezi hlavní nevýhody topické formulace Aldara a je zodpovědná za její nežádoucí vedlejší účinky.



Obrázek 14 - Grafické znázornění množství vstřebaného IMQ do akceptorové fáze

V *dermis* i akceptorové fázi je určitý trend více vstřebaného IMQ z gelové formulace (obrázek 13, 14), což může být vysvětleno nedokonalým odstraněním formulace po 8 hodinách aplikace. Gel může být z tak malé části kůže s omezeným přístupem hůře odstranitelný kvůli své viskózní struktuře.

Po první permeaci bylo rozhodnuto pokračovat další permeací s gely s různými generacemi a koncentracemi dendritických molekul, aby bylo možné zjistit, jestli má generace a koncentrace dendritických molekul vliv na vstřebávání IMQ.

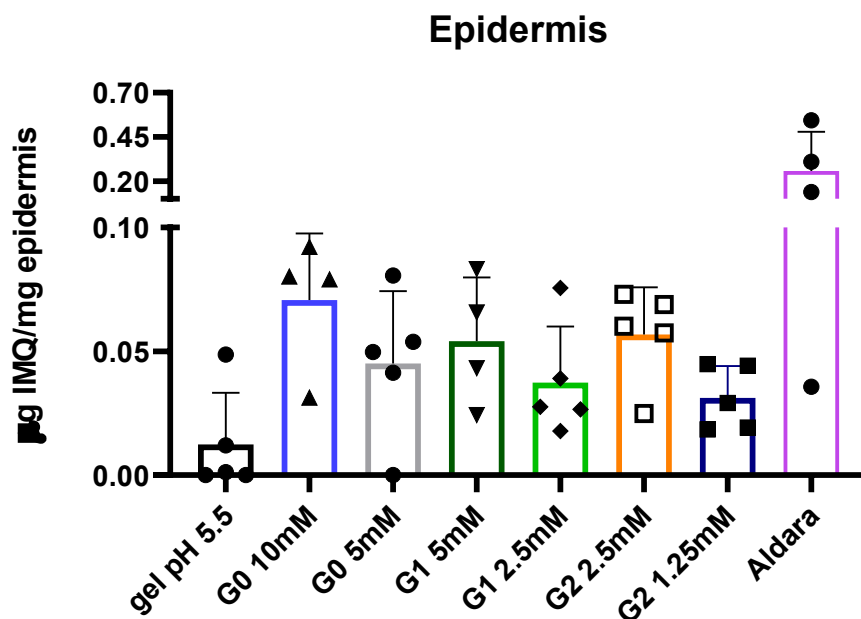
5.3. Druhá permeace

Při druhé permeaci byly na základě výsledků z první permeace použity pouze gelové formulace. Jeden gel pouze s obsahem IMQ a zbylých 7 formulací s obsahem IMQ a různých generací a koncentrací dendritických molekul. V tabulce 8 je znázorněno množství vstřebaného IMQ do *epidermis*, včetně jejich směrodatných odchylek. Je zde možné porovnat hodnoty vstřebaného IMQ mezi jednotlivými zhotovenými formulacemi a porovnat tak možný vliv měnící se generace a koncentrace dendritických molekul na prostup IMQ do jednotlivých vrstev. Uvedené hodnoty jsou výsledkem minimálně 4 různých měření.

Tabulka 8 - Průměrné hodnoty naměřeného množství vstřebaného IMQ v *epidermis*

Vzorek	Průměrné množství vstřebaného IMQ [ng IMQ/mg <i>epidermis</i>]	SD
Gel pH 5,5	12,39	±20,93
Gel pH 5,5 G0 10mM	70,73	±26,92
Gel pH 5,5 G0 5mM	45,10	±29,18
Gel pH 5,5 G1 5mM	54,08	±25,77
Gel pH 5,5 G1 2,5mM	37,35	±22,69
Gel pH 5,5 G2 2,5mM	56,86	±18,97
Gel pH 5,5 G2 1,25mM	31,21	±12,89
Aldara	205,93	±224,48

Jak je možné vidět na obrázku 15, největší vstřebažené množství IMQ je znovu z léčivého přípravku Aldara. Avšak jak již bylo zmíněno dříve, Aldara má vyšší koncentraci léčivé látky IMQ než připravené gelové formulace. Množství vstřebaného IMQ je ve všech případech minimálně 2,5× vyšší oproti připraveným gelům, ale koncentrace IMQ v přípravku Aldara je více než 1000× vyšší. U vzorku, který se shoduje v obou permeacích (gel pH 5,5 G2 2,5mM) jsou výsledky podobné.



Obrázek 15 - Grafické znázornění množství vstřebaného IMQ do epidermis

Protože ze všech zhotovených přípravků s obsahem dendritických molekul se vstřebalo výrazně vyšší množství IMQ, lze vyvodit, že dendritické molekuly mají vliv na vstřebávání této léčivé látky. Jako u první permeace existuje i zde určitý trend závislosti zvyšujícího se množství vstřebaného IMQ na rostoucí koncentraci dendritických molekul v té samé generaci. V porovnání s kontrolním vzorkem Aldara je množství vstřebaného IMQ v *epidermis* z připravených vzorků minimálně 4× nižší. Tato skutečnost může být ovlivněna nedokonalým odstraněním léčivého přípravku Aldara, jedná se o krém, proto zde není tak jednoduché odstranění jako u gelu, kde je možné při odstraňování sloupnout celou vrstvu gelu najednou.

V tabulkách 9 a 10 je znázorněno množství vstřebaného IMQ do *dermis* a detekovaného v akceptorové fázi, včetně jejich směrodatných odchylek. Uvedené hodnoty jsou výsledkem minimálně 4 různých měření.

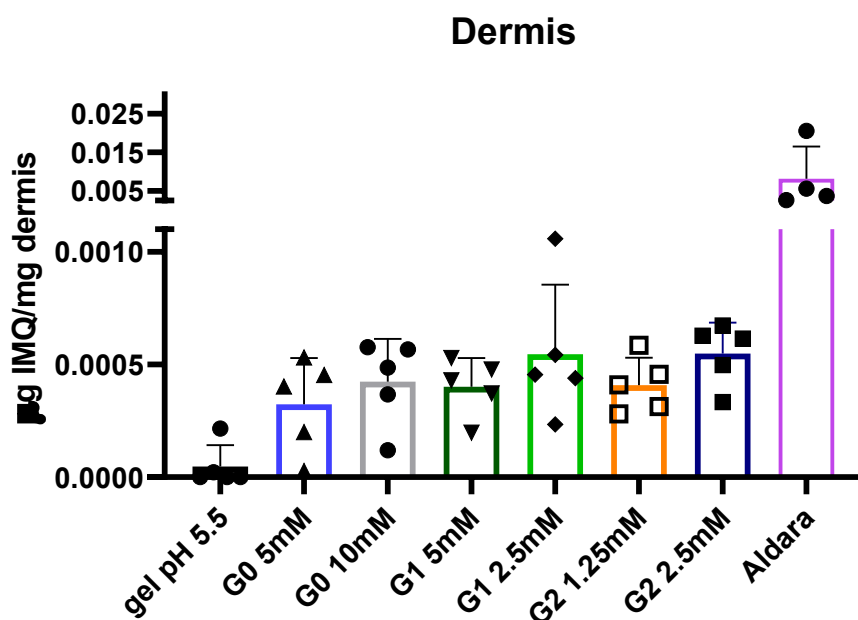
Tabulka 9 - Průměrné hodnoty naměřeného množství vstřebaného IMQ v *dermis*

Vzorek	Průměrné množství vstřebaného IMQ [ng IMQ/mg <i>dermis</i>]	SD
Gel pH 5,5	0,08	±0,14
Gel pH 5,5 G0 10mM	0,42	±0,19
Gel pH 5,5 G0 5mM	0,32	±0,21
Gel pH 5,5 G1 5mM	0,40	±0,13
Gel pH 5,5 G1 2,5mM	0,55	±0,31
Gel pH 5,5 G2 2,5mM	0,55	±0,14
Gel pH 5,5 G2 1,25mM	0,41	±0,12
Aldara	8,13	±7,25

Tabulka 10 - Průměrné hodnoty naměřeného množství detekovaného IMQ v akceptorové fázi

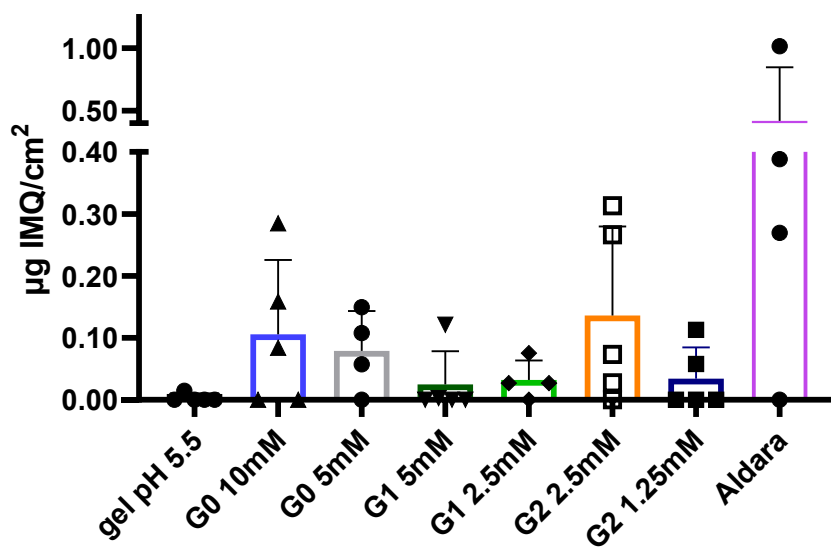
Vzorek	Průměrné množství detekovaného IMQ [ng/cm ²]	SD
Gel pH 5,5	2,95	±6,61
Gel pH 5,5 G0 10mM	105,56	±120,18
Gel pH 5,5 G0 5mM	78,77	±64,67
Gel pH 5,5 G1 5mM	24,79	±53,80
Gel pH 5,5 G1 2,5mM	32,31	±27,24
Gel pH 5,5 G2 2,5mM	136,19	±143,84
Gel pH 5,5 G2 1.25mM	34,16	±50,70
Aldara	418,58	±430,40

Jak již bylo řečeno, množství vstřebané látky do další vrstvy kůže a následně akceptorové fáze by mělo být ideálně nulové, protože místem účinnu IMQ je *epidermis*. Avšak na obrázcích 16 a 17 je vidět, že i z léčivého přípravku Aldara se léčivá látka do těchto vrstev vstřebává. V kožní vrstvě *dermis* je rozdíl mezi kontrolním vzorkem Aldara a zhotovenými přípravky větší, než bylo v *epidermis*. V akceptorové fázi je tento poměr menší, to může být vysvětleno nedokonalým odstraněním formulace z kůže po 8 hodinách aplikace jako tomu může být v případě u *epidermis* i *dermis*. Ve všech těchto částech existuje určitý trend závislosti vstřebávání na rostoucí koncentraci dendritických molekul v rámci jednotlivých generací.



Obrázek 16 - Grafické znázornění množství vstřebaného IMQ do dermis

Akceptorová fáze



Obrázek 17 - Grafické znázornění množství detekovaného IMQ v akceptorové fázi

6. Závěr

V této diplomové práci byly použity nové dendritické molekuly nulté, první a druhé generace jako enhancery rozpustnosti IMQ ve vodném roztoku při pH 5,5. Připravené roztoky byly později použity pro přípravu hydrofilních gelů přidáním 2-HEC. Gelové formulace obsahující dendritické molekuly byly testovány pro jejich schopnost dodávat účinnou látku do různých vrstev lidské kůže.

Výsledky této práce prokázaly, že přítomnost dendrimerů zvyšuje rozpustnost IMQ ve vodných roztocích o pH 5,5 bez závislosti na použité generaci nebo koncentraci. Přídavek 2-HEC v těchto vodných roztocích na konečnou koncentraci 1 % poskytuje čiré gely. Hydrofilní gely jsou schopny dodat do *epidermis* přibližně 3× menší množství IMQ než komerčně dostupná formulace, přičemž obsahují 1000× menší množství aktivní látky. Na druhou stranu, po permeačním experimentu bylo detekováno značné množství aktivní látky v *dermis* a akceptorové fázi.

Závěrem lze říci, že hydrofilní gely 1 % 2-HEC obsahující nové dendritické molekuly při pH 5,5 mohou být potenciálními kandidáty pro topickou aplikaci IMQ. Je třeba provést další experimenty, aby se zabránilo nebo snížilo množství účinné látky, které dosáhne *dermis* a akceptorové fáze.

7. Reference

1. **Kolarsick, Paul AJ BS, Kolarsick, Maria Ann MSN, ARHP-C a Goodwin, Carolyn APRN-BC, FNP.** Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the dermatology nurses association*. 07 2011, Sv. 3, 4, stránky 203-213.
2. **Ehrhardt Proksch, Johanna M. Brandner, Jens-Michael Jensen.** The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*. 28. 11 2008, Sv. 17, 12, stránky 1063-1072.
3. **Yousef H, Alhadj M, Sharma S.** *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. [StatPearls (Internet)] Treasure Island : StatPearls Publishing, 21. 11 2021.
4. **Hojení-ran.cz.** *Anatomie lidské kůže*.
5. **Matt Venus, Jacqueline Waterman, Ian McNab.** Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2010, Sv. 28, 10, stránky 469-472.
6. **contributors, Wikimedia Commons.** *File:Skin.png*. Wikimedia Commons, the free media repository, místo neznámé : 2022.
7. **Lopez-Ojeda, Wilfredo, a další.** *Anatomy, Skin (Integument)*. [StatPearls [Internet]] místo neznámé : StatPearls Publishing, 21. 10 2021.
8. **Yukiko Mizutani, Susumu Mitsutake, Kiyomi Tsuji, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi.** Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. June 2009, Sv. 91, 6, stránky 784-790.
9. **Alexandr Hrabálek, Pavel Doležal, Zdenka Šklubalová, Oldřich Farsa, Aleš Krebs.** Akceleranty transdermální aplikace. *Chemické listy*. 1999, 93, stránky 107-119.
10. **Andrej Kováčik, Monika Kopečná, Kateřina Vávrová.** Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 17, 2020, Sv. 2, stránky 145-155.
11. **doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc., PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.** Lze překonat kožní bariéru? . *Praktické lékárenství*. 2005, Sv. 1, 1, stránky 8-11.
12. **Rahul S. Kalhapure, Krishnacharya G. Akamanchi.** Oleodendrimers: A novel class of multicephalous heterolipids as chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 15. September 2013, Sv. 454, 1, stránky 158-166.
13. **Anna Janaszewska, Joanna Lazniewska, Przemysław Trzepiński, Monika Marcinkowska, Barbara Klajnert-Maculewicz.** Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules*. *Biomolecules*. 01. 08 2019, Sv. 9, 8.
14. **Miguel Ángel Ortega, Alberto Guzmán Merinn, Oscar Fraile-Martínez, Judith Recio-Ruiz, Leonel Pekarek, Luis G. Guijarro, Natalio García-Honduvilla, Melchor Álvarez-Mon, Julia Buján, Sandra García-G.** Dendrimers and Dendritic Materials: From Laboratory to Medical Practice in Infectious Diseases. *Pharmaceutics*. 14. 07 2020, Sv. 12, 9.
15. **Marco Fischer, Fritz Vögtle.** Dendrimers: From Design to Application—A Progress Report. *Angewandte Chemie*. 26. 03 1999, Sv. 38, 7, stránky 884-905.
16. **Anna Janaszewska, Joanna Lazniewska, Przemysław Trzepiński, Monika Marcinkowska, Barbara Klajnert-Maculewicz.** *Structure of a dendrimer*. Lodz : 2019.
17. **Dendritech, Inc.** *Generatin 2 PAMAM denrimer*. Michigan : 2017.

18. **Juan Wang, Boxuan Li, Li Qiu, Xin Qiao, Hu Yang.** Dendrimer-based drug delivery systems: history, challenges, and latest developments. *Journal of Biological Engineering*. 25. 07 2022, Sv. 16, 18.
19. **Vishakha (Gajre)Kulkarni, Kishor Butte.** Natural Polymers- A comprehensive Review. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences*. 12 2012.
20. **Anand B. Balaji, Harshini Pakalapat, Mohammad Khalid.** *Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers*. Duxford : Woodhead Publishing, 2018. Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites.
21. **Majtyka, Ondřej.** *Přírodní polymery*. [Bakalářská práce] Pardubice : Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2021.
22. **Maddela Swethaa, Kolli Sahithi, Ambigapathi Moorthi, Narasimhan Srinivasanb.** Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*. 07 2010, Sv. 47, 1, stránky 1-4.
23. **Jia-Hwa Guo, G.W. Skinner, W.W. Harcum and P.E. Barnum.** Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 08. 11 1998, Sv. 1, 6, stránky 254-261.
24. **W. E. GLOOR, B. II. MAHLMAN, AND R. D. ULLRICH.** Hydroxyethylcellulose and its use. *American Chemical Society*. 1. 10 1950, Sv. 42, 10, stránky 2150–2153.
25. **contributors, Wikimedia Commons.** *File:Hydroxyethyl cellulose.png*. Wikimedia Commons, the free media repository., místo neznámé : 2008.
26. **Yoshihito Osada, Jian-Ping Gong.** Soft and Wet Materials: Polymer Gel. *Advanced Materials*. 08 1998, Sv. 44, 1, stránky 827-837.
27. **Sergei Panyukov, Yitzhak Rabin.** Statistical physics of polymer gels. *Physics Reports*. 05 1996, Sv. 269, 1-2, stránky 1-131.
28. **ČR, Ministerstvo zdravotnictví.** *Český lékopis 2009 – Doplněk 2013*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2013. str. 891.
29. **Eneko Larrañeta, Sarah Stewart, Michael Ervine, Rehan Al-Kasasbeh, Ryan F. Donnelly.** Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications. *Journal of functionals biomaterials*. 1, 24. 01 2018, Sv. 9, 13.
30. **Abhirup Mandal, John R. Clegg, Aaron C. Anselmo, Samir Mitragotri.** Hydrogels in the clinic. *Bioengineering and translation medicine*. 10158, 26. 03 2020, Sv. 5, 2.
31. **N.A.Peppasa, P.Buresa, W.Leobandunga, H.Ichikawa.** Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 03. 07 2000, Sv. 50, 1, stránky 27-46.
32. **Nicholas A.Peppas, Allan S.Hoffman.** Hydrogels. *Biomaterials Science (Fourth Edition)*. 29. 05 2020, Sv. 4, stránky 153-166.
33. **M.P Schön, M Schön.** Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*. 07. 12 2007, Sv. 157, s2, stránky 8-13.
34. **Edith Hanna MD, Rami Abadi MD, Ossama Abbas MD.** Imiquimod in dermatology: an overview. *British Journal of Dermatology*. 08. 07 2016, Sv. 55, 8, stránky 831-844.

35. **contributors, Wikimedia Commons.** *File:Imiquimod.svg.* Wikimedia Commons, místo neznámé : 2020.
36. **Antona J. Wagstaff, Caroline M. Perry.** Topical Imiquimod. *Drugs.* 17. 09 2012, Sv. 67, 15, stránky 2187–2210.
37. **MUDr. Zuzana Rozehnalová, MUDr. Jana Hercogová, CSc.** Možnosti využití imiquimodu v dermatologii. *Remedia.* 05 2008, 3.
38. **SÚKL, STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV.** Aldara 5% crm 24X250MG. *Státní ústav pro kontrolu léčiv.* [Online] [Citace: 13. 11 2022.] <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0026353&tab=texts>.
39. **Alexander Steinmann, MD, Jens Oliver Funk, MD, Gerold Schuler, MD, Peter von den Driesch, MD.** Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanomametastasis. *Journal of the American Academi of Dermatology.* 01. 09 2000, Sv. 43, 3, stránky 555-556.
40. **Chladová, P.** *Vliv koncentrace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu.* [Diplomová práce] Hradec Králové : Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie, Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D, 2020.
41. **Houšková, D.** *Vliv generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu.* [Diplomová práce] Hradec Králové : Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie, Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D, 2020.
42. **Narendra K Jain, Umesh Gupta.** Application of dendrimer–drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2008, Sv. 4, 8, stránky 1035-1052.
43. **Bapi Gorain, Manisha Pandey, Hira Choudhury, Gaurav K. Jain, Prashant Kesharwani.** *Dendrimer-Based Nanotherapeutics.* London : Academic Press, 2021. stránky 273-283. 978-0-12-821250-9.
44. **Umesh Gupta, Hrushikesh Bharat Agashe, Abhay Asthana, and N. K. Jain.** Dendrimers: Novel Polymeric Nanoarchitectures for Solubility Enhancement. 2006, Sv. 7, 3, stránky 649-658.
45. **PharmDr. Julie Strážnická, PharmDr. Hana Havlová.** *Kosmetologie e-book.* Hradec Králové : Vyšší odborná škola zdravotní a Střední zdravotnická škola, Hradec Králové, 2016. 978-80-88058-83-0.
46. **Hoang Nhan Ho, Hoang Hao Le, Thien Giap Le, Thi Hong Anh Duong, Viet Quynh Tram Ngo, Cong Thuan Dang, Van Minh Nguyen, Tuan Hiep Tran, Chien Ngoc Nguyen.** Formulation and characterization of hydroxyethyl cellulose-based gel containing metronidazole-loaded solid lipid nanoparticles for buccal mucosal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022, Sv. 194, stránky 1010-1018.
47. **H. Hoffmann, U. Kästner, R. Dönges, R. Ehrler.** Gels from modified hydroxyethyl cellulose and ionic surfactants. *Polymers Gels and Networks.* 1996, Sv. 4, 5-6, stránky 375-531.
48. **JL Chollet, MJ Jozwiakowski, KR Phares, MJ Reiter, PJ Roddy, HJ Schultz, QV Ta, MA Tomai.** Development of a Topically Active Imiquimod Formulation. *Pharmaceutical Development and Technology.* 1999, Sv. 4, 1, stránky 35-43.

