

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Vliv PAMAM dendrimerů na rozpustnost a kožní
permeaci kyseliny flufenamové

Diplomová práce

Lenka Novotná

V Hradci Králové 2024

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

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

V Hradci Králové

Lenka Novotná

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. za příjemné vedení a trpělivost v průběhu experimentální části. Chtěla bych také poděkovat za odborné rady a konzultace v rámci zpracování této práce, a především za rozšíření mého povědomí o dané problematice.

Děkuji také za finanční podporu Karlově Univerzitě (SVV 260 661).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Lenka Novotná

Název diplomové práce: Vliv PAMAM dendrimerů na rozpustnost a kožní permeaci kyseliny flufenamové

Kyselinu flufenamovou (FFA) patří do skupiny nesteroidních antiflogistik. Léčiva ze skupiny nesteroidních antiflogistik jsou nejhojněji užívané léky na celém světě. Škála použití je velmi rozsáhlá. Účinek léčiv je protizánětlivý, proti bolesti a teplotě. Problém jejich použití, zejména perorálně, tkví ve velkém množství nežádoucích účinků. Pro snížení výskytu nežádoucích účinků lze FFA podávat v lokální formě.

Přestup látek přes kožní bariéru je obtížný. Látky musí splňovat určitá kritéria, aby molekuly byly schopné penetrovat přes hydrofilní a zároveň hydrofóbní část lamelární lipidové multivrstvy obsažené v části *epidermis*. Pro zlepšení rozpustnosti FFA ve vodě bylo využito výhodných vlastností poly(amidoaminových) (PAMAM) dendrimerů.

PAMAM dendrimery jsou sférické makromolekuly s velmi dobře organizovanou strukturou. Fungují i jako akceleranty kožní permeace neboli kožní enhancery. Skupina těchto pomocných látek přechodně snižuje propustnost kožní bariéry a usnadňuje transdermální podání léčiv. Mezi další výhodné vlastnosti patří výborná rozpustnost ve vodě a velká vazebná schopnost molekul.

V této práci se ukázalo, že PAMAM dendrimery zvyšují rozpustnost FFA ve vodném prostředí způsobem závislým na koncentraci a generaci. Dále byly připraveny vodné přípravky obsahující PAMAM dendrimery pro topickou aplikaci FFA.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Lenka Novotná

Title of the thesis:

Flufenamic acid (FFA) belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Medicines from the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs are the most widely used drugs worldwide. The range of uses is very extensive. The effect of the drugs is anti-inflammatory, they also serve against pain and fever. The problem with their use, especially orally, lies in the large number of side effects. To reduce the incidence of adverse effects, FFA can be administered topically.

The transfer of substances through the skin barrier is demanding. The substances must meet certain criteria so that the molecules are able to penetrate through the hydrophilic and at the same time hydrophobic part of the lamellar lipid multilayer contained in the epidermis. To improve the solubility of FFA in water, we used the advantageous properties of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers.

PAMAM dendrimers are spherical macromolecules with a very well-organized structure. They work well as skin permeation accelerators or skin enhancers. A group of these excipients temporarily reduces the skin barrier and facilitates the transdermal administration of drugs. Other advantageous properties include excellent water solubility and high binding capacity.

In this work, PAMAM dendrimers were shown to increase the solubility of FFA in aqueous media in a concentration- and generation-dependent manner. Furthermore, aqueous preparations containing PAMAM dendrimers were prepared for topical application of FFA.

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam zkratk.....	8
1. Úvod a cíl práce	9
2. Teoretická část	10
2.1. Kůže	10
2.2. Epidermis	11
2.3. Dermis.....	14
2.4. Hypodermis.....	15
2.5. Funkce kůže	15
2.6. Přestup látek přes kůži.....	16
2.7. Akceleranty kožní permeace.....	19
2.7.1. Charakteristika	19
2.7.2. Dendritické molekuly	21
2.7.2.1. Popis, struktura	21
2.7.2.2. Syntéza dendrimerů.....	23
2.7.2.3. Potencionální využití dendrimerů ve farmacii a medicíně.....	24
2.7.2.4. PAMAM dendrimery	25
2.8. Kyselina flufenamová.....	27
3. Experimentální část	31
3.1. Chemikálie, materiál a přístroje.....	31
3.2. Příprava roztoků s obsahem flufenamové kyseliny a dendritických molekul	32
3.2.1. Příprava nasycených vodných roztoků s flufenamovou kyselinou	32
3.2.2. Příprava vodných roztoků PAMAM dendrimerů	32
3.2.3. Příprava nasycených vodných roztoků flufenamové kyseliny s PAMAM dendrimery	33
3.2.4. HPLC stanovení koncentrace flufenamové kyseliny bez a s PAMAM dendrimery	33
3.3. Permeace	34
4. Výsledky a diskuse	37
4.1. Rozpustnost	37
4.2. Kožní permeace	39
4.2.1. Množství FFA v kůži.....	39
4.2.2. Množství FFA v akceptorové fázi	41

5. Závěr.....	43
6. Citace	44

Seznam zkratek

API	<i>Active pharmaceutical ingredient</i> – aktivní farmaceutická látka
COX	Cyklooxygenáza
FFA	<i>Flufenamic acid</i> – Kyselina flufenamová
G2	Druhá generace
G4	Čtvrtá generace
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CH ₃ COOH	Kyselina octová
MeOH	Methanol
Mw	<i>Molecular weight</i> – Molekulová hmotnost
NSAIDs	<i>Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs</i>
NÚ	Nežádoucí účinek
PAMAM	Poly(amidoaminové)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> – Fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PPI	Poly (propyleniminové)
SC	<i>Stratum corneum</i>

1. Úvod a cíl práce

Trans(dermální) podání léčiv je aplikace léčivé látky na kůži s doručením léčiva do jednotlivých vrstev kůže či dosažením systémového účinku. Aplikace je výhodná zejména díky redukcí nežádoucích účinků plynoucích z podání perorálního. Kůže je složena z několika vrstev-*epidermis*, *dermis* a *hypodermis*. *Epidermis* jako nejsvrchnější část lidské kůže je nepropustná pro exogenní látky a zajišťuje účinnou ochrannou bariéru lidského těla. Přestup jednotlivých xenobiotik přes *epidermis* je limitován vlastnostmi kůže. Pro snadnější průnik exogenních látek je velkou výzvou nalézt pomocné látky, které by přestup jednotlivých xenobiotik usnadnily a zároveň ireverzibilně nepoškodily kožní bariéru.

Poly(amidoaminové) (PAMAM) dendrimery jsou velkou skupinou pomocných látek, které jsou řazeny mezi kožní enhancery. Mají výhodné vlastnosti, zejména díky své dobré rozpustnosti ve vodě zvyšují rozpustnost málo rozpustných xenobiotik. Dále usnadňují průnik podaných látek přes kůži, jelikož molekuly fungují jako kožní enhancery.

Cílem této práce, bylo zajistit zvýšenou rozpustnost ve vodě špatně rozpustné kyseliny flufenamové (FFA) pomocí PAMAM dendrimerů a usnadnit trans(dermální) přestup FFA přes kůži a dosáhnout tak zejména protizánětlivého a analgetického účinku.

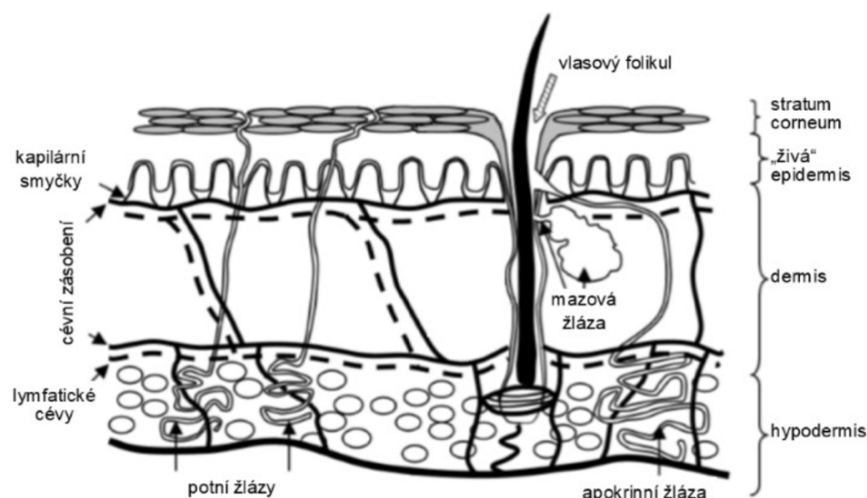
2. Teoretická část

2.1. Kůže

Kůže neboli *cutis*, je největším orgánem lidského těla. Kůže dospělého člověka dosahuje velikosti až 2 m² (průměrně 1,6-1,8 m²). Zaujímá asi jednu desetinu lidské hmotnosti. Kůže pokrývá povrch těla a díky tomu zajišťuje účinnou ochranu před fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými škodlivinami z okolí. Průměrná hmotnost kůže se pohybuje okolo 3 kg, avšak může dosahovat hmotnosti až 20 kg, pokud se jedná o kůži s vysokým obsahem tuku. Díky uspořádání potních žláz, krevního řečiště a vlastností špatného vodiče tepla hraje kůže nezastupitelnou úlohu v termoregulaci lidského organismu. Lidská kůže má v různých částech těla různou tloušťku. Rozmezí tloušťky činí od 0,5 mm do 4 mm. Nejtenčí kůži lze lokalizovat na očních víčkách, ta nejsilnější se nachází v oblasti zad. [1–3]

Barva kůže závisí na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří tloušťka kůže, celkové množství pigmentu a míra prokrvení. Pigment neboli melanin, je uložen ve formě zrníček ve specializovaných buňkách melanocytech. Melanin vzniká z tyrosinu pomocí enzymu tyrosinasy. Melanocyty se nacházejí v bazální části vrstvy epidermis. Díky tomuto pigmentu mívá kůže nažloutlou až hnědou barvu. Množství pigmentu se během života mění. Nejméně pigmentů mají novorozenci. Míra pigmentu se například v průběhu těhotenství zvyšuje. Při vystavení lidského těla slunci dochází ke zvyšování produkce pigmentu, který chrání hlubší vrstvy kůže před působením škodlivého slunečního záření. [2]

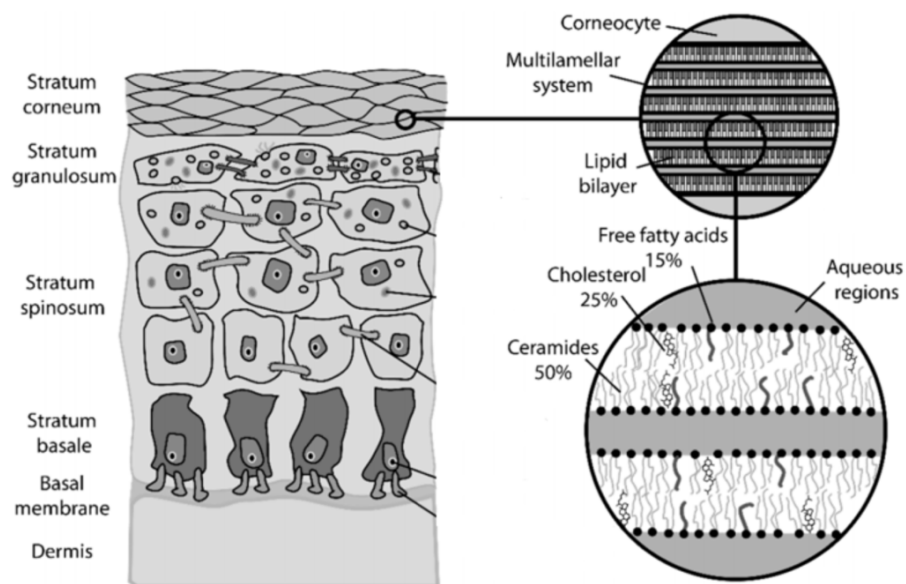
Kůže je složena ze tří vrstev. Těmi jsou *epidermis*, *dermis* a *hypodermis* (Obr.1). [1, 4, 5]



Obr 1: Stavba lidské kůže [6] (převzato a upraveno)

2.2. Epidermis

Epidermis neboli pokožka, je nejtenčí vrstva, která se nachází bezprostředně na povrchu kůže. Průměrná tloušťka je 0,1 mm. Nejtenčí část lze najít na očních víčkách (0,04 mm) a nejtlustší na dlaních (1,6 mm). Skládá se z vrstevnatého dlaždicovitého epitelu, který je v povrchových částech zrohovatělý. V *epidermis* se nachází dva druhy buněk, a těmi jsou buňky dendritické (Merkelovy, Langerhansovy buňky a melanocyty) a keratinocyty. [1, 2, 5] Mezi deriváty *epidermis* jsou řazeny chlupy, nehty a kožní žlázy. Pokožka se skládá z několika vrstev v závislosti na stádiu keratinizace neboli rohovatění a barvení. Nejspodnější vrstvou je *stratum basale*, následuje *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (Obr.2). Obnova celé *epidermis* trvá 26 dnů – prvních 13 dnů se buňky posouvají ze *stratum basale* do *stratum corneum* (SC), následně trvá 13 dnů odloučení buněk z povrchu *epidermis*. Vrstva je avaskulární a výživu získává přes spodnější vrstvu *dermis*. [1, 4, 5]



Obr 2: Obrázek vlevo znázorňuje jednotlivé vrstvy epidermis. Pravý horní obrázek znázorňuje multilamelní uspořádání lipidů v mezibuněčných prostorech ve vrstvě SC. Pravý spodní obrázek znázorňuje složení multilamelní vrstvy [7]

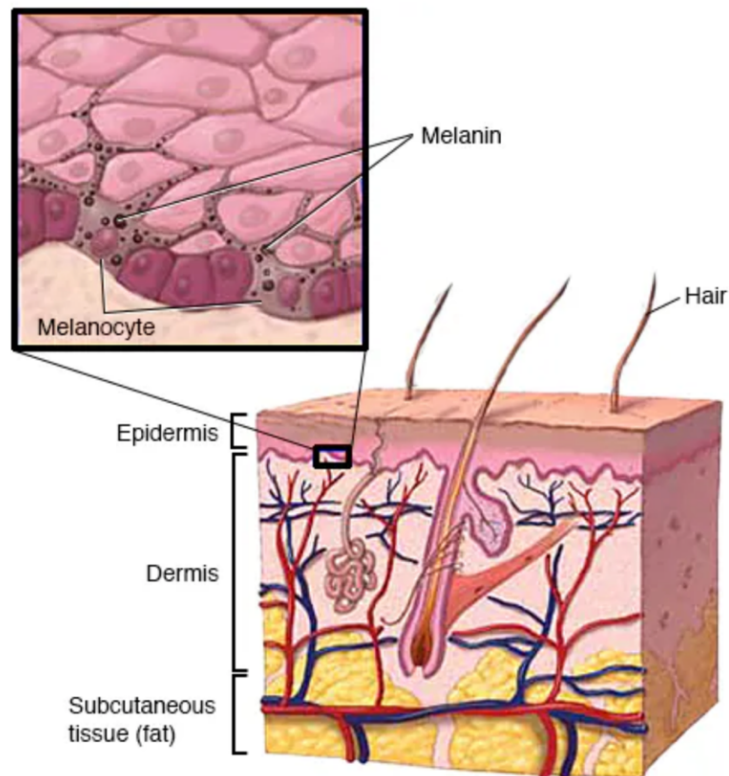
- *Stratum basale* je tvořeno cylindrickými buňkami, které jsou spojeny pomocí *hemidesmosomů* s okolními buňkami a také s bazální membránou. V cylindrických buňkách dochází zejména k syntéze keratinů 5. a 14. typu. Z této vrstvy dochází k vývoji ostatních keratinocytů vrchnějších vrstev. [1, 2, 5]

- *Stratum spinosum* je tvořeno několika řadami (2-5) buněk ostnitého tvaru. V této vrstvě se nacházejí keratiny 1 a 10. V horní části lze nalézt lamelární granula, která uvolňují svůj obsah do mezibuněčného prostoru. Hlavní součástí granul jsou volné steroly, polární lipidy a hydrolytické enzymy. Díky tomu dochází k reorganizaci do lamel a zajišťují účinnou permeabilní bariéru. [1, 2]
- *Stratum granulosum* je vrstva *epidermis*, kde začíná keratinizace. Buňky jsou obsaženy v 1-3 vrstvách a obsahují zrna s keratohyalinem, který je prekurzorem keratinu. Buňky postupně postupují k povrchu, kde dochází k diferenciaci a následné buněčné smrti, kdy dochází ke ztrátě jádra. Buňky, u kterých došlo ke ztrátě jádra, jsou součástí další vrstvy *stratum lucidum*. [1, 2]
- *Stratum lucidum* tenká vrstva, která je viditelná elektronovým mikroskopem. Optickým mikroskopem ji lze pozorovat jen na ploskách a dlaních. [1] Buňky v této vrstvě nemají jádro a přecházejí přesnou hranicí do poslední nejsvrchnější vrstvy. [2]
- *Stratum corneum* (SC) nejsvrchnější vrstva *epidermis*, která obsahuje již plně zrohovatělé bezjaderné keratinocyty. Tyto buňky jsou známé jako *korneocyty* neboli rohové buňky a tvoří 90% vrstvy. [1, 2, 4, 5, 8] Korneocyty jsou shromážděny v 15-25 vrstvách, které na některých místech jako jsou chodidla, mohou dosahovat až 100 vrstev. SC je zodpovědná za ochranu lidského organismu před infekcí, dehydratací, chemickým či fyzikálním působením okolí. [1, 2, 4, 5, 9]

Jak již bylo výše řečeno, *epidermis* obsahuje dva typy buněk. Mezi jednotlivé typy buněk řadíme keratinocyty, dále melanocyty a buňky Langerhansovy či Merkelovy. [1, 2]

Melanocyty jsou buňky produkující pigment melanin. Pochází z neurální lišty a jsou nakumulovány v bazální vrstvě *epidermis*. Zde zastupují zhruba 4% veškeré buněčné populace. Každý melanocyt má dendritické výběžky, díky kterým předává melanin do okolních buněk. Jednotlivý melanocyt obsahuje endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Zde vznikají submikroskopická tělíska *melanosomy*, ve kterých dochází k tvorbě pigmentu melaninu. Takto vzniklé *melanosomy* postupují do vrchnějších vrstev *epidermis* pomocí dendritických výběžků, zvětšují se, dozrávají a hromadí melanin. Následně zbarvený melanin opustí dendritické zakončení a přechází do sousedních keratinocytů (Obr.3). Nejvíce melanocytů lze nalézt na

částech těla, která jsou pod častým působením slunečního záření. Barva lidské kůže je závislá na velikosti, počtu a rychlosti rozpadu *melanosomů* nikoliv na počtu melanocytů. [1, 2, 5]



Obr 3 Lokalizace a struktura melanocytu[10]

Langerhansovy buňky lze nalézt ve vrstvě *stratum spinosum*. Buňky mají původ z kostní dřeně a funkcí jsou si rovny s makrofágy. Hlavní funkcí těchto buněk je detekce antigenu a následné zpracování pomocí lymfocytů. Buňky činí 4-5 % veškeré buněčné populace *epidermis*. Langerhansovy buňky jsou spojovány s alergickými reakcemi na kůži a jsou velmi citlivé na světlo. [1, 2, 5]

Merkelovy buňky zajišťují mechanickou ochranu kůže. Lze je nalézt na bazální vrstvě *epidermis*. Buňky činí 4-6 % buněk bazální vrstvy *epidermis*. Buňky patří do nervového systému a slouží jako mechanoreceptory. Často bývají u savců vázány na hmatové chlupy. [1, 2, 5]

Keratinocyty jsou buňky, která obsahují výrazný cytoskelet, který je tvořen pomocí keratinových tonofilament. Tato keratinová tonofilamenta jsou prekurzorem keratinu a v buňce je možné je nalézt ve formě svazků, které jsou ukotveny do *desmosomů*. Pomocí *desmosomů*

jsou keratinocyty pevně svázané a díky průběžné degradaci *desmosomů* dochází k posouvání keratinocytů do vrchnější části kůže. [2]

Epidermis jako nejsvrchnější vrstva kůže zajišťuje zevní ochranu organismu. Díky svým unikátním vlastnostem je tato vrstva účinnou chemickou, mechanickou a antimikrobiální bariérou. [3, 4, 11]

2.3. Dermis

Dermis, corium neboli škára je střední vrstva kůže, která je lokalizována mezi *epidermis* a *hypodermis*. Škára je složena zejména z nebuněčné pojivové tkáně, která je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, základní hmotou a buňkami (fibrocyty, dermální dendrocyty, histiocyty, Langerhansovy buňky a vzácně lymfocyty). [1, 2, 11] *Dermis* je vrstvou kůže ve které se nacházejí cévy, hladké svaly a nervová zakončení. Tloušťka *dermis* se nachází v rozmezí 0,6-3 mm a je zhruba 15- 40krát silnější než vrstva *epidermis*. Vrstvu lze rozdělit na dvě základní části – *pars reticularis* a *pars papilaris*. [1, 4]

Pars papilaris je tenká vrstva, která se nachází přímo pod *epidermis*. Skládá se z tenkých neuspořádaných kolagenních vláken, elastických fibril, fibrocytů, základní hmoty a bohatého množství kapilár, díky kterým dochází k výživě *epidermis*. [1, 2, 4, 5]

Pars reticularis silná vrstva, která je lokalizována pod částí *pars papilaris* a je složena ze silných uspořádaných svazků kolagenu a elastických fibril. Tato vrstva obsahuje méně fibrocytů, cév i základní hmoty. *Pars reticularis* sahá až do vrstev podkožního tuku, díky čemuž lze najít v této vrstvě přítomnost adipocytů. Vrstva se podílí zejména na regulaci krevního tlaku, teploty, a především díky vysokému obsahu kolagenních a elastických vláken zajišťuje mechanickou pružnost a elasticitu kůže. [1, 2, 4, 5]

Základní hmota se skládá z vody, elektrolytů, proteinů plazmy a mukopolysacharidů. Mukopolysacharid je tvořen ve fibrocytech a je kovalentně vázán k polypeptidu. Hlavními mukopolysacharidy obsažené v *dermis* jsou kyselina hyaluronová, dermatansulfát, v menším množství chondroitin-6-sulfát, heparansulfát a heparin. Tyto substance mají schopnost zadržovat až tisíckrát více vody, než je jejich objem. [1]

Hlavní funkcí této vrstvy kůže je zajištění zejména mechanické odolnosti kůže především díky vysokému obsahu kolagenních a elastických vláken. [3] Důležitou roli hrají buňky jménem fibrocyty. Tyto buňky jsou odpovědné za syntézu a degradaci proteinů pojivové tkáně. Jsou součástí imunologické funkce kůže, kde interagují s buňkami *epidermis* a *dermis* a

mají schopnost uvolňovat prozánětlivé cytokiny. Díky vysokému obsahu kolagenních a elastických vláken tato vrstva zajišťuje mechanickou odolnost a pružnost kůže. [1, 2, 11]

2.4. Hypodermis

Hypodermis, neboli podkoží, je nejspodnější vrstva kůže. Nachází se pod vrstvou *dermis*. Tato vrstva je složena zejména z *fibrocytů* a *adipocytů*. *Adipocyty* jsou buňky, které mají schopnost syntetizovat tuk v cytoplazmě. Jsou důležité z hlediska tepelně-izolačního, slouží jako rezervoár energie a zvyšují mechanickou odolnost kůže. [1, 4, 5, 11] Díky této vrstvě je kůže pomocí vaziva upevněna ke kostem nebo svalům. [5, 11]

2.5. Funkce kůže

Kůže zastává pro lidský organismus řadu důležitých funkcí zajišťujících především ochranu vnitřního prostředí organismu. [3] Jednou z nich je ochrana organismu před škodlivými vlivy zevního prostředí. Jedná se zejména o ochranu mechanickou, chemickou, ochranu před různými druhy záření či mikroorganismy. Ochrannou funkci lze rozdělit na fyzikální, chemickou a biologickou. [2, 4, 5]

Fyzikální bariéra zajišťuje mechanickou ochranu především díky desmosomům, keratinocytům, hydratované rohové vrstvě a také podkožní tukové tkáni. Za fyzikální ochranu kůže lze považovat také přirozenou fotoprotekci před ultrafialovým (angl. *ultraviolet*; UV) zářením. Tato ochrana je zajištěna zejména díky přítomnosti a distribuci melaninu v keratinocytech. [11]

Chemická bariéra je zajištěna díky nízké propustnosti kůže pro vodu a také pro látky rozpuštěné ve vodě. Látky, které jsou rozpustné v tucích, pronikají kůží lépe. Mazové žlázy tvoří kožní maz, který zvyšuje nepropustnost kůže. [4, 11]

Biologická ochrana lidského těla je tvořena na dvou úrovních. První úroveň zajišťuje přítomnost potu a kožního mazu z důvodu obsahu antibakteriálních látek. Povrch kůže má kyselé pH (5,4-5,9) a minimální vlhkost, díky čemuž je také zajištěna biologická ochrana kůže vůči patogenům. [3, 4] Druhá úroveň je tvořena buňkami imunitního systému v hlubších vrstvách kůže (např. Langerhansovy buňky). [3, 11]

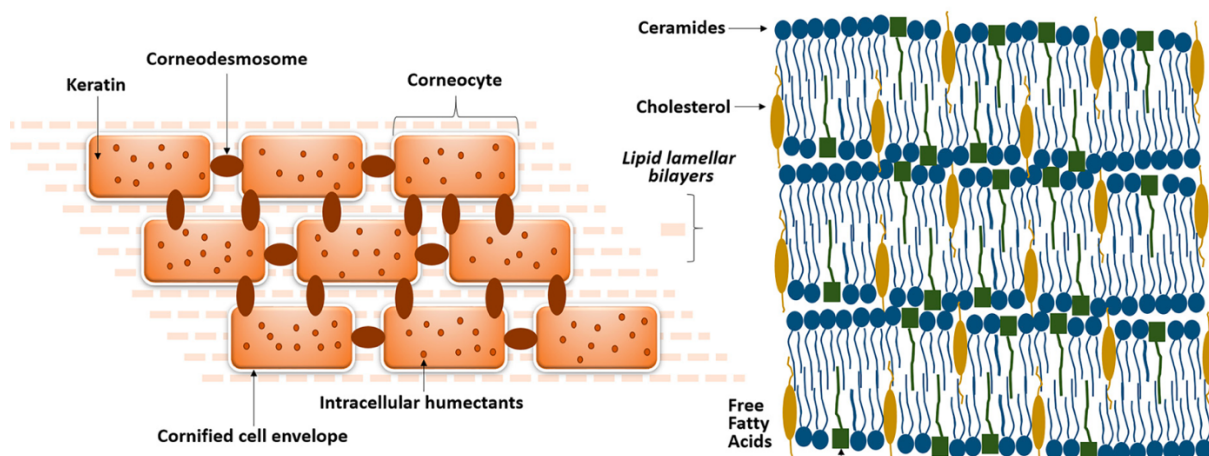
Mezi další funkce kůže je řazena termoregulace. Termoregulaci zajišťují změny průtoku krve cévami, pocení a odpařování vody. Metabolická funkce kůže spočívá v přeměně provitaminu na vitamin D působením UV záření. Díky vysokému množství bílkovin v kůži dochází k přeměně bílkovin na aminokyseliny v případě nedostatku či zvýšené spotřebě těchto

látek. Senzorická funkce je zprostředkována pomocí receptorů doteku, tlaku, vibrací, teploty a hrozícího nebezpečí. Díky nim lidský organismus získává informace o zevním a vnitřním prostředí. [3, 11]

2.6. Přestup látek přes kůži

Jak již bylo dříve řečeno, kůže svým složením představuje účinnou ochranu pro lidský organismus před působením látek z vnějšího prostředí. Aplikace xenobiotika skrz neporušenou kůži kvůli dosažení trans(dermální) aplikace léčiva je velmi obtížná, ale není nemožná. [7, 9, 12] Nejsvrchnější vrstva *epidermis* SC je zodpovědná za zajištění účinné bariéry pro absorpci chemických a biologických toxinů. Pro usnadnění přestupu xenobiotika přes SC bylo nejdříve nutné popsat chemické složení vrstvy SC. [4, 9, 12–15]

SC je složena 75-80 % proteinů, 5-15 % lipidů a zbytek je tvořen organickými sloučeninami, vodou a přirozeně zvlhčujícími látkami. [9, 13, 16] Intercelulární prostor SC je složen z multilamelární lipidové matrice a minimálního množství vody. Lamely jsou svými hydrofilními částmi uspořádány vně a hydrofobní části dovnitř. Intercelulární lamelární vrstva je tvořena především z 50 % ceramidů, 25 % cholesterolu, 15 % volných mastných kyselin a zbytek je tvořen estery cholesterolu. [9, 13, 16–18] Uspořádání SC popisuje několik modelů. Nejstarší z nich SC přirovnává k modelu cihel a malty, kdy korneocyty představují roli cihel, které jsou upevněné pomocí lipidové matrix-malty. Díky této vysoce organizované struktuře SC tvoří vysoce účinnou bariéru lidského organismu (Obr. 4) [9, 13, 14, 16, 19, 20]



Obr 4 Na obrázku vlevo se nachází popis organizované struktury SC, na obrázku vpravo je zobrazeno intercelulární uspořádání a chemické složení lipidové multivrstvy [15]

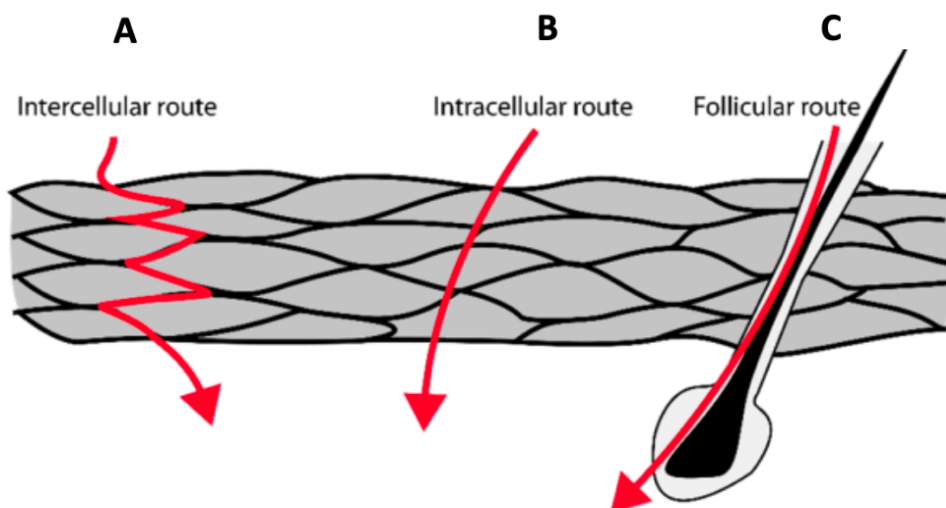
Trans(dermální) aplikace je jedna z možných způsobů aplikace léčiva. Je nutné rozlišovat podání transdermální, kdy dochází k průniku léčiva do krve přes kůži s

cílem systémového účinku léčiv. Tento způsob aplikace je označován jako permeace. [12] Druhou možností je dermální způsob aplikace, kdy léčivo podané na kůži proniká do jednotlivých vrstev kůže a nedochází k systémovému účinku. V literatuře je druhý způsob aplikace označován jako penetrace. [9, 12, 21]

Hlavní výhoda trans(dermální) aplikace je založena na eliminaci *first-pass* efektu játry. Tím je dosaženo snížené metabolizace podaného léčiva. Dalšími výhodami jsou snížení dráždivosti gastrointestinálního traktu, zamezení proměnlivé absorpci xenobiotika vlivem gastrointestinální náplně a rychlosti. U transdermální aplikace je výhodné, že pokud dojde u pacienta k vedlejším či neočekávaným účinkům podaného léčiva, lze jednoduše ukončit podání léčiva do organismu. Mezi komplikace perorálního podání může být vlastní nutnost polykání, která u některých skupin pacientů může být velmi problematická. Oproti parenterální aplikaci je transdermální aplikace xenobiotika bezbolestná, není náročná na vybavení a lze ji aplikovat bez odborného dohledu. [9, 12, 21–23] Hlavní mechanismus přestupu léčiv přes kůži je zprostředkován především difúzí, která je popsána prvním Fickovým zákonem. [24]

Obecně mohou volnou difúzí prostupovat léčiva, která jsou lipofilní a s malou molekulou (<400 Da). [14, 21] Způsob podání je závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva a je nutná správná léková forma. [21] Vzhledem k tomu, že všechny lidské tkáně a tělní tekutiny obsahují vysoký obsah vody (50-70 %), je pro systémový účinek důležité, aby léčiva byla přijatelně rozpustná ve vodě. [14, 25] Pro přestup léčiv přes membrány je nutná také vhodná lipofilita léčiv. Tyto fyzikálně-chemické vlastnosti je nutné chápat ve vzájemném vztahu a jsou popsány rozdělovacím koeficientem. Rozdělovací koeficient vyjadřuje poměr celkové koncentrace látky rozpuštěné v lipidech k celkové koncentraci látky rozpuštěné ve vodné fázi. Výsledek rozdělovacího koeficientu popisuje pohyb léčiva v organismu. Pokud léčivá látka je charakterizována nízkým rozdělovacím koeficientem, léčivo je dobře rozpustné ve vodě, avšak prostup biologickými membránami je velmi špatný. [15, 25]

Pro přestup látek odolnou vrstvou SC je možné využít potencionálně několik míst možného průniku xenobiotika. Uplatňují se zejména tři hlavní cesty přestupu látek (Obr.5). [22, 26, 27]



Obr 5 Možné způsoby přestupu látek přes vrstvu SC [7]

- Intercelulární cesta je první z možností, jak léčiva mohou přestoupit pře SC do lidského systému (Obr.5A). Léčivé látky se do organismu dostávají přes lamelární lipidovou multivrstvu. Tato cesta se stala hojně využívanou, a to především díky poznání chemického složení. Díky poznání chemického složení byly připraveny chemické substance, které cíleně působí na lamelární lipidovou multivrstvu a umožní či v některých případech mohou i urychlit přestup léčiva přes kůži. Takové pomocné látky jsou nazývány jako akceleranty kožní permeace, kterým bude věnována další kapitole. [7, 9, 14, 15, 18, 22]
- Druhou možnou alternativou je cesta přestupu léčiv přes kůži označována jako transcelulární nebo také intracelulární průnik, kdy dochází k průniku molekul přes korneocyty (Obr.5B). Tato cesta je založena na zvýšení množství vody ve vrstvě SC především díky korneocytům, které obsahují aminokyseliny s funkčními skupinami ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$) schopné vázat vodu. Dochází tedy k nabobtnání korneocytů a zvýšení množství vody ovlivňuje prostupnost kožní bariéry. [7, 9, 14, 15, 18, 22]
- Další alternativa přestupu xenobiotik přes SC je pomocí potních či mazových žláz a transfolikulární přestup (Obr.5C). Jednotlivé cesty jsou velmi problematické z hlediska použití. Pro využití přestupu potní žlázou je nutné, aby léčiva byla hydrofilní. Využití je limitováno minimálním množstvím léčiv, která splňují tuto podmínku. Průnik mazovou žlázou je podmíněn dostatečnou

lipofilitou. Problém tkví ve snadné kumulaci xenobiotik v mazové žláze. [7, 9, 14, 15, 18]

2.7. Akceleranty kožní permeace

2.7.1. Charakteristika

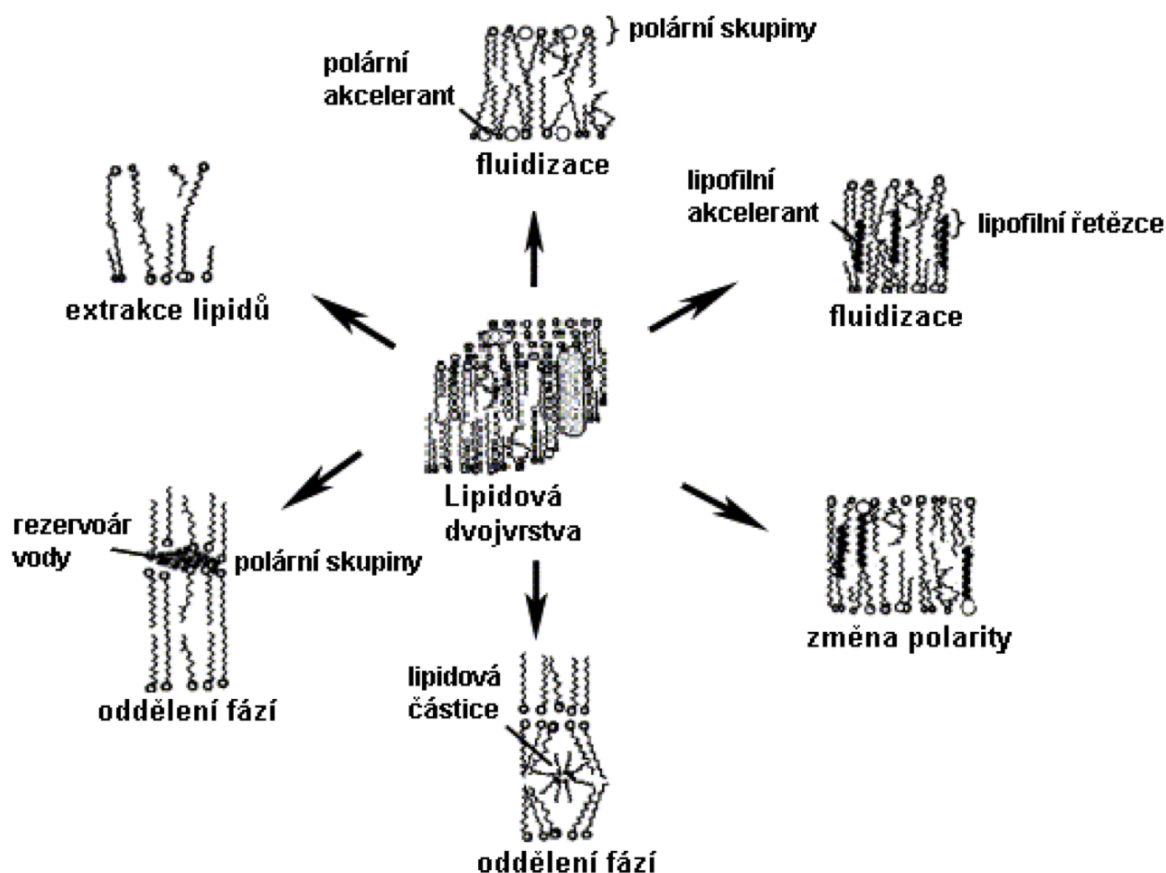
Akceleranty kožní permeace jsou skupinou farmaceutických pomocných látek, které mají schopnost reverzibilně snížit bariérovou funkci kůže a usnadnit (trans)dermální přestup léčivé látky. [9, 12, 13, 18, 28] Je známé, že pro použití látek jako permeačních akceleraantů panují přísná kritéria. Ideální akceleraant by měl splňovat tato kritéria. [4, 9, 12, 13, 18, 28]

- netoxický, nedráždivý a nealergizující
- nesmí mít vlastní farmakologickou aktivitu
- rychlý nástup účinku
- jednosměrný přestup látek – endogenní látky neopouští kůži
- kompatibilní s léčivými a pomocnými látkami
- rychlá obnova kůže po odstranění přípravku
- kosmeticky přijatelný

Není tedy překvapujícím jevem, že v současné době neexistuje ideální akceleraant. Při praktickém používání akceleraantů je volen kompromis mezi terapeutickým přínosem dané substance a rizikem nežádoucích účinků. [12, 18, 28] Při volbě vhodného akceleraantu je nutné dbát na fyzikální a chemické vlastnosti používaného léčiva. [22]

Přesné mechanismy účinku akceleraantů nejsou zcela objasněny. Jedná se chemicky o velmi různorodou skupinu látek, která obsahuje strukturální podobnost. Velmi často se v molekule akceleraantu objevují shodné funkční skupiny. Zpravidla je možné nalézt fragment $X-CO-N=$, kde X je CH_2 nebo NH_2 a také by měla molekula akceleraantu obsahovat dlouhý (C8-C20) alkylový nebo alkylenový řetězec, který může být rozvětvený či nerozvětvený. [12] Přítomnost těchto funkčních skupin fyziologicky lze nalézt v kožní bariéře. Mechanismus účinku je založen především na nespecifických interakcích se strukturami SC (Obr.6.). Předpokládá se, že mechanismus účinku je založen na jedné ze tří možných cest, nebo se může jednat o jejich vzájemnou kombinaci. [12–14, 18]

U prvního z předpokládaného mechanismu účinku akceleraantů dochází k dezintegraci intercelulárních lipidů v lamelární vrstvě především ve vrchní části SC. Druhým mechanismem účinku je myšlená zejména interakce akceleraantů s intracelulárními proteiny kůže. U třetího ze základních mechanismů účinku akceleraantů dochází ke změně rozdělovacího koeficientu mezi léčivým přípravkem a kůží. [12, 13, 18, 22]



Obr 6 Mechanismus účinku akceleraantů transdermální aplikace intercelulární cestou [18]

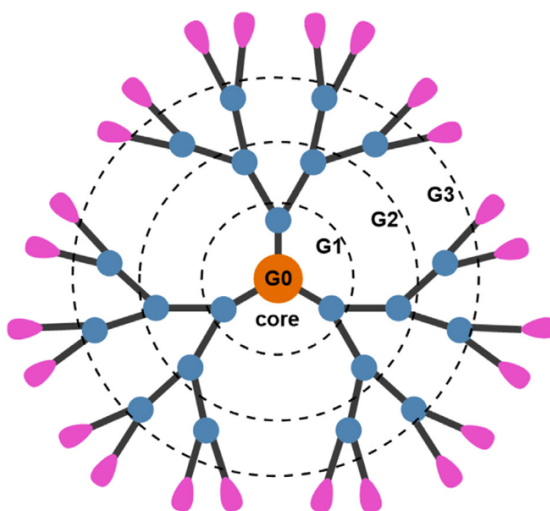
Jak již bylo dříve zmíněno, akceleraanty kožní permeace jsou velkou a různorodou skupinou chemických látek. Jako jednotlivé příklady lze uvést vodu, deriváty sulfoxidu (decylmethylsulfoxid), alkohol (ethanol), ureu a terpenoidy. První specificky vytvořenou molekulou byl azon. [28] V dnešní době se vědci pokouší najít molekuly, které by lépe splňovaly přísná kritéria. Jedná se především o upravená analoga již známých látek například analoga azonu či analoga ceramidů, která jsou hojně zastoupená v intercelulárním prostoru SC. [17, 22] Mezi velmi výhodné akceleraanty jsou v současné době řazeny dendritické molekuly, kterým bude věnována následující kapitola. [29]

2.7.2. Dendritické molekuly

2.7.2.1. Popis, struktura

Dendrimery jsou třída unikátních syntetických polymerů, které jsou charakterizované svou jedinečnou symetrickou strukturou. [29] Především díky symetrické struktuře tvoří dendrimery monodisperzní makromolekuly s trojrozměrnou globulární strukturou s velikostí v průměru 1–20 nm. [30] Dendrimery jsou složeny z větvících, opakujících se jednotek (monomerů), které vycházejí z ohniska molekuly (jádro). [31] Struktura dendrimerů je přirovnávána ke stromu a větvím, odkud je odvozen jejich název (skládá se ze dvou řeckých slov „*dendron*“, které znamená strom a „*mer*“, které v překladu znamená část). [31] První práce, která zmiňovala dendritické molekuly byla publikovaná vědeckou skupinou vedenou panem Vögtem v roce 1978. V 80. letech 20. století byla dendritickým molekulám věnovaná velká pozornost a objevení těchto molekul bylo potvrzeno mnoha vědeckými skupinami. [29]

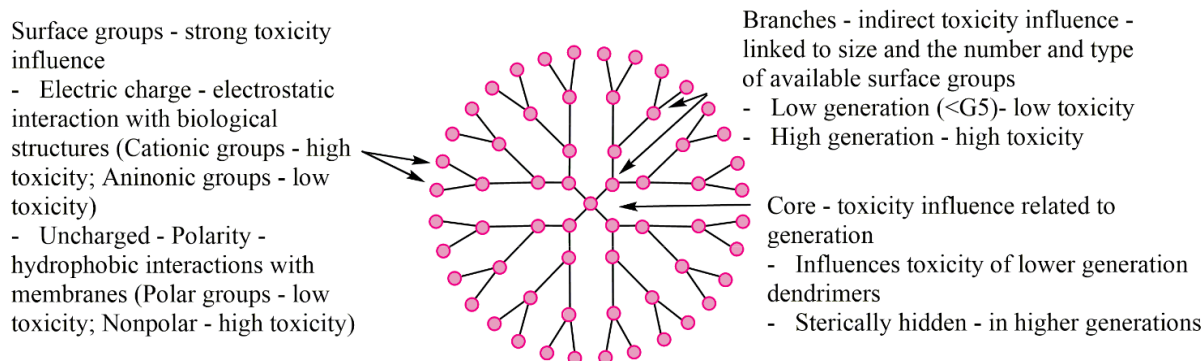
Dendrimery se skládají ze tří hlavních částí (Obr. 7). Obsahují iniciační jádro, větvící se jednotky a funkční skupiny lokalizované na povrchu dendrimerů. [32] Jádro dendrimerů bývá tvořeno jedním atomem (dusík, fosfor, uhlík) nebo může být tvořeno i atomovou skupinou se dvěma shodnými chemickými funkcemi. [29, 33] Z jádra vycházejí větvící se monomery, které se mohou následně dělit a zajišťují velmi organizovanou strukturu charakteristickou pro dendrimery. [33] Jednotlivé generace dendrimerů jsou označovány jako G0 – G12. Číslo označuje počet větvících vrstev (Obr.7). [30]



Obr 7 Obecná struktura dendrimerů s ukázkou jednotlivých generací [34]

Vlastnosti dendrimerů jsou ve srovnání s konvenčně využívanými povrchově aktivními látkami výhodnější. Jako hlavní výhodu využívání dendrimerů v porovnání s povrchově aktivními látkami, patří vysoká schopnost molekul penetrovat skrz biologické membrány. Mezi další výhody dendrimeru je řazena vysoká vazebná kapacita, zvýšená biologická dostupnost podaných léčiv a díky molekulám lze také dosáhnout cílené distribuce léčiv do specifických tkání a snížit toxicitu podaných léčiv. [29, 35] Jsou hojně využívány jako přenašečové systémy pro léky a geny. Rozsáhlé studie ukázaly, že některé dendrimery mohou mít vlastní farmakologickou aktivitu. Jedná se zejména o antibakteriální, antimykotickou a cytotoxickou aktivitu. [36]

Pro zavedení nové molekuly pro terapeutické a diagnostické užívání u lidí je nutné dokonale zdokumentovat veškeré vlastnosti dané substance. Jedná se především o popis fyzikálně-chemických vlastností, farmakologického a toxikologického profilu dané substance. [29] Bylo zjištěno, že charakter povrchu jednotlivých dendrimerů ovlivňuje výslednou farmakokinetiku, specifitu vůči cíli a především toxicitu. [34] Toxicita je zvýšená především u dendrimerů s kladným nábojem nebo s amino- skupinou na povrchu. [34, 37] Po podrobném prostudování struktury byly definovány charakterické znaky toxicity pro molekuly dendrimerů (Obr.8.). [29]



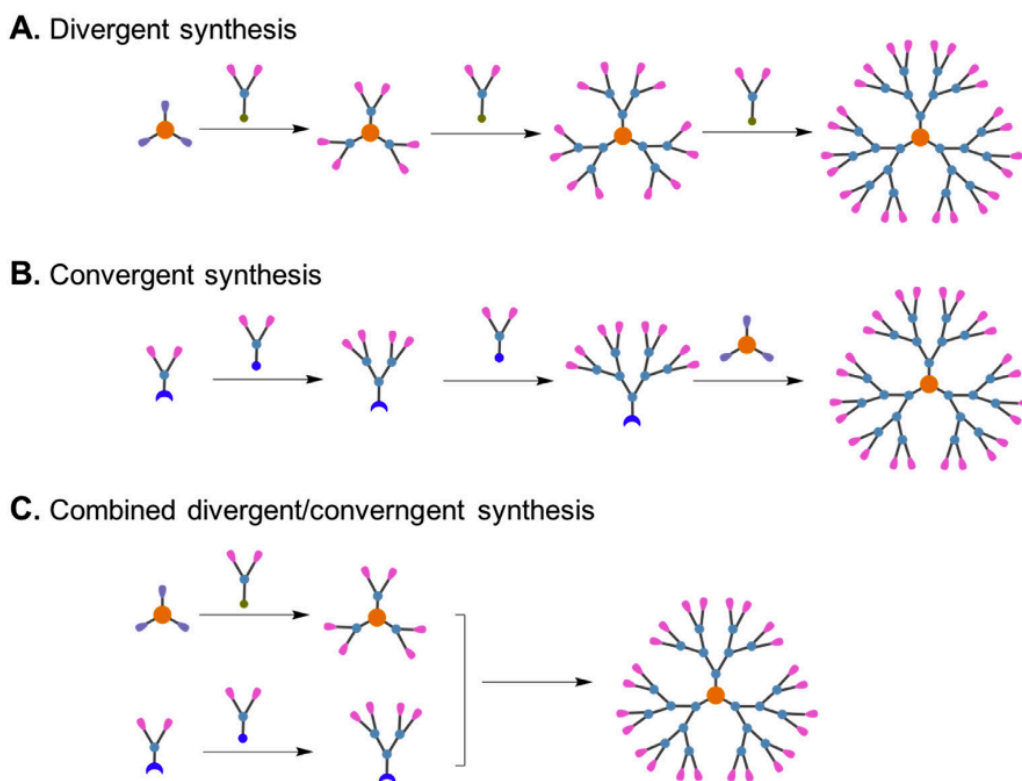
Obr 8 Charakteristické znaky pro toxicitu dendrimerů [29]

Jak bylo již zmíněno, dendrimery jsou velmi kvalitními akceleranty kožní permeace. Hlavních mechanismů, kterými dendrimery interagují s aktivní farmaceutickou látkou (API) a usnadňují transdermální přestup, je více. Inkluze API do dutiny dendrimerů je jedním z mechanismů interakce. Druhou možností bývá spojení API s funkčními skupinami na

povrchu dendrimerů a poslední možností může být jednak inkluze API do dutiny a také spojení s funkčními skupinami na povrchu. [29, 36]

2.7.2.2. Syntéza dendrimerů

Dendrimery představují vysoce organizovanou strukturu, pro jejichž vznik je důležitá postupně řízená syntéza. [38] Rozdíl mezi konvenčně používanými polymery a dendrimery tkví ve tvorbě monodisperzní soustavy a možnosti postupné syntézy. [29, 34] Pro syntézu dendrimerů jsou používány zejména dva odlišné způsoby tvorby molekul - **konvergentní** a **divergentní** syntéza a jejich kombinace (Obr.9). Divergentní syntéza byla poprvé popsána v roce 1983 vědcem Tomalia a spol. [29, 36] Konvergentní metoda byla popsána v pozdější době v roce 1990 vědci Hawker a Frechet. [29, 36]



Obr 9 Hlavní metody syntézy dendrimerů A) divergentní B) konvergentní C) kombinace divergentní a konvergentní metody [31]

Divergentní metoda je založena na postupné syntéze dendrimerů od jádra k periférii, kdy dle specifické generace jsou prodlužovány větve jednotlivých monomerů. [15, 20] Divergentní metoda je hojně využívána při produkci velkého množství dendrimerů. Především díky divergentní syntéze lze zajistit vznik dendrimerů vyšších generací. Problémem této

metody bývá vznik strukturálních defektů díky vedlejším reakcím či neúplná reakce koncových skupin. Vzniklé molekuly dendrimerů lze velmi obtížně oddělit od molekul se strukturálními defekty díky podobnému chemickému složení a fyzikálním vlastnostem. [31] Problém lze částečně zredukovat díky nadměrnému použití činidel. [40] Nejčastěji používané poly(amidoaminové) (PAMAM) a poly(propylen iminové) (PPI) dendrimery vznikají právě pomocí divergentní metody. [34]

Konvergentní metoda začíná na periférii, kde vznikají malé molekuly, které se po dosažení určité velikosti napojí na iniciační jádro dendrimerů. [34, 39] Metoda byla vytvořena především kvůli nevýhodám divergentní metody. Jako výhody lze uvést především snadné čištění výsledných molekul dendrimerů díky rozdílné velikosti, struktuře a fyzikálním vlastnostem. Jako další výhody metody lze zmínit redukci či úplnou eliminaci vzniku strukturálních defektů ve finální molekule především díky lepší kontrole syntézy. [31] Pomocí konvergentní metody nelze připravit dendrimery vyšších generací, což je limitací použití této metody. [34, 40]

Některé publikace zmiňují možnost syntézy dendrimerů pomocí kombinace dvou zmíněných metod. Metoda je založena na tvorbě jednotlivých stavebních bloků pomocí divergentního přístupu. Následně jsou pomocí konvergentní metody připojeny koncové části jednotlivých dendrimerů. Mezi hlavní výhody této metody lze zmínit především: efektivnější příprava, snížení reakčních kroků, lze dosáhnout strukturální diverzity. [31, 34]

2.7.2.3. Potencionální využití dendrimerů ve farmacii a medicíně

Molekuly mají velmi široké uplatnění v medicíně a ve farmacii. Pro využití těchto látek ve zdravotnictví je zapotřebí splnit předem stanovená kritéria. Dendrimery by měly být co nejméně toxické pro lidský organismus, neměly by být imunogenní a měly by být schopné dobře prostupovat biologickými bariérami a dosahovat specifického cíle. [29, 40] Látky mají také schopnost zvýšit rozpustnost API a tím zvyšují absorpci a biodostupnost jednotlivých léčiv. [41]

Vysoký potenciál použití mají dendrimery v antineoplastické terapii. Problémem klasické chemoterapie v současné době tkví v nespecifickém působení cytostatik pouze na nádorové buňky. Použití dendrimerů v tomto odvětví medicíny výrazně redukuje nežádoucí účinky klasické chemoterapie. Současně zvyšuje koncentrace cytostatika v postižené tkáni především díky cílenému protinádorovému působení na specifické molekuly lokalizované na

povrchu nádorové tkáně. [29, 34, 42] Využití dendrimerů v terapii onkologických onemocnění má v budoucnu velký potenciál. [30, 43–45]

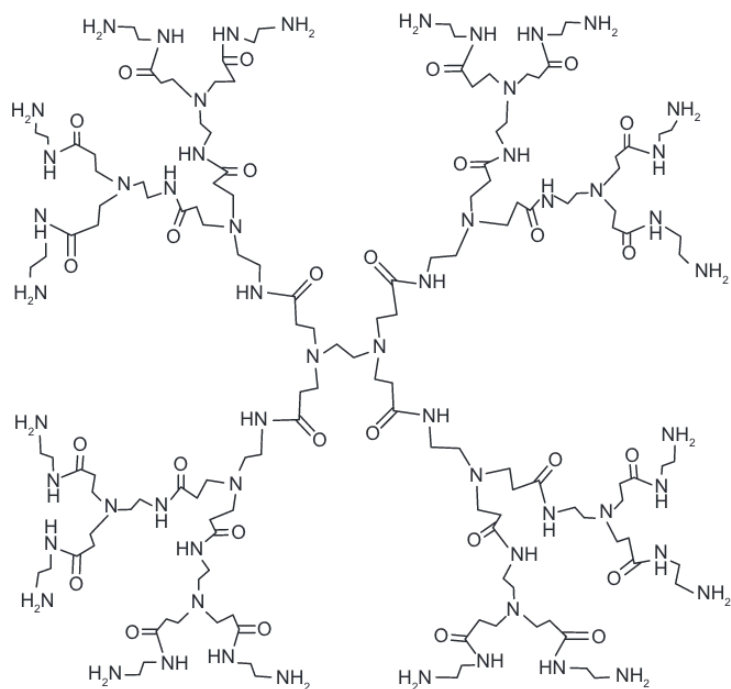
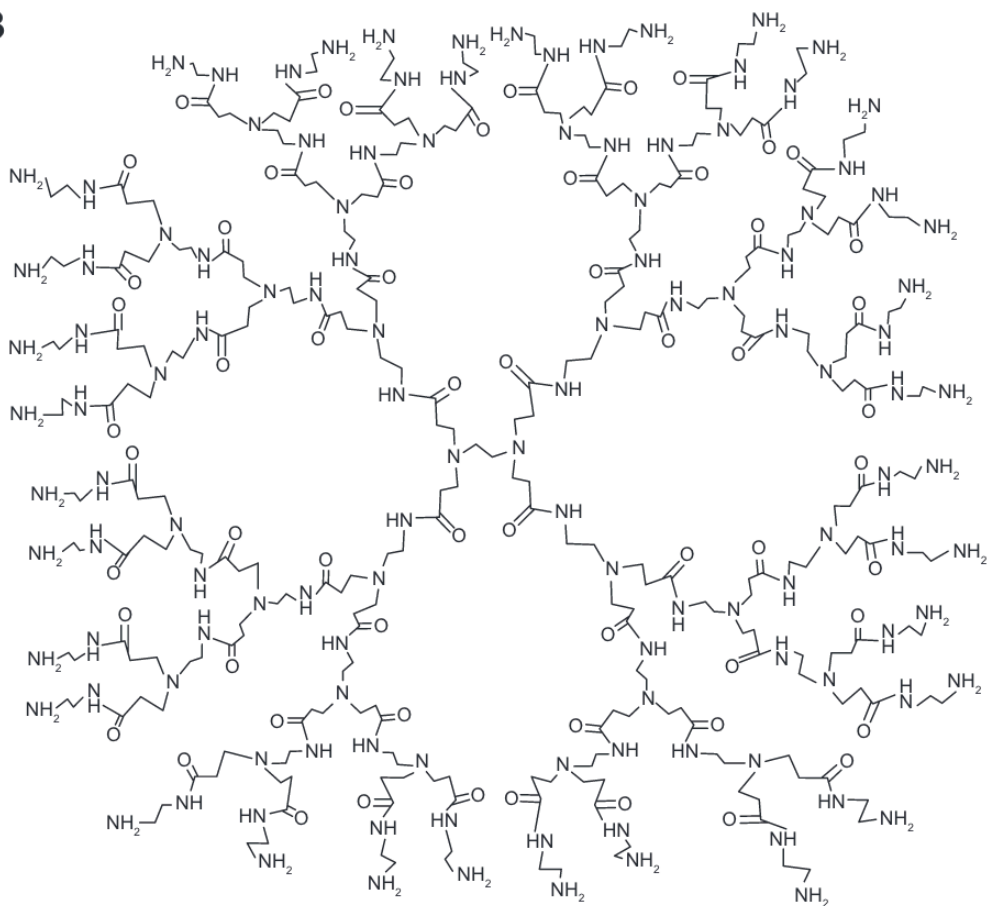
Další možností využití dendrimerů lze nalézt u protizánětlivé terapie. Nesteroidní antiflogistika (NSAIDs) jsou skupina nejvíce užívaných léků na světě. [46] Limitace použití je dána zvýšenou toxicitou asociovanou s nežádoucími účinky NSAIDs a špatnou rozpustností látek, která způsobuje nízkou biodostupnost. [29, 47] Z důvodu redukce toxicity této skupiny léčiv lze uplatnit transdermální aplikaci za použití dendrimerů. [29, 46]

Dendrimery jsou v rámci výzkumu použité u mnoha lékařských specializací. V publikacích lze najít použití u neurodegenerativních onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění, antibakteriální terapie, antivirové terapie. [29, 48, 49] Použití dendrimerů má slibný potenciál použití jako kontrastní látka v diagnostických metodách, především u magnetické rezonance a rentgenu. [34, 40]

2.7.2.4. PAMAM dendrimery

PAMAM dendrimery se řadí mezi nejrozsáhleji studované dendrimery, především díky variabilitě potenciačního užití. [31, 37] Molekuly mohou díky vysoké vazebné schopnosti zlepšovat biologickou dostupnost podaných léčivých substancí a zlepšit rozpustnost a stabilitu ve vodě špatně rozpustných léčiv. [40, 50] Třída těchto dendrimerů byla poprvé zmíněna již v roce 1985, kdy prof. Dr. Donald A. Tomalia, popsal charakter molekul a popsal divergentní syntézu dendrimerů generací 1-7. [31, 32]

Iničiační jádro PAMAM dendrimerů je tvořeno zejména ethylendiaminem (EDA) (Obr. 10), amoniakem (NH_3) nebo cystaminem. [37, 49] Větve jednotlivých dendrimerů jsou tvořeny postupným navázáním N-(2-aminoethyl)akrylamidem pomocí dvoustupňového procesu. V prvním stupni probíhá adice methylakrylátu k jádrové aminoskupině. Následně ve druhém kroku dochází k amidaci výsledných esterů ethylendiaminem. S každou další generací se velikost dendrimerů rozrůstá o 1 nm. Molekulová hmotnost se s rostoucí generací zdvojnásobuje. Koncové aminové skupiny mohou být upravené nejčastěji pomocí hydroxylové (-OH) skupiny, karboxylové (-COOH) skupiny, konjugované s uhlovodíkovými řetězci nebo pegylované. [37, 49]

A**B**

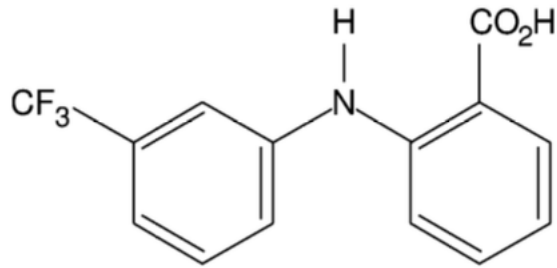
Obr 10 Chemická struktura PAMAM dendrimerů A) G2 B) G3 [50]

PAMAM dendrimery mají sférickou, velmi rozvětvenou a vysoce organizovanou strukturu, která má značnou kapacitu a schopnost sloužit jako přenašeč pro jiné substance. Molekula může být inkorporována do dutiny dendrimeru, nebo ji lze navázat na funkční skupiny lokalizované na povrchu. Na povrchu dendrimeru je lokalizován náboj molekuly. Kationické a neutrální PAMAM dendrimery, které mají na povrchu lokalizovanou zejména aminovou (-NH₂) nebo hydroxylovou (-OH) skupinu, jsou dostupné jako celé generace (G0-G10). Anionické molekuly, které na povrchu mají karboxylovou (-COOH) skupinu, jsou dostupné ve formě polovičních generací (G1,5 - G9,5). [49, 50] Velikost PAMAM dendrimerů dosahuje hodnot od 1 nm do 14 nm v závislosti na jednotlivých generacích. [37] Vazebná schopnost PAMAM dendrimerů je lepší u nižších generací (typicky do G4) ve srovnání s generacemi vyššími než G6, především díky otevřené struktuře molekul. [49]

Použití PAMAM dendrimerů pro své výhodné vlastnosti je značně limitovaná toxicitou. Bylo zjištěno, že toxicita PAMAM dendrimerů je přímo úměrná koncentraci a generaci použitého dendrimeru díky aminoskupinám lokalizovaných na povrchu. Toxicita jednotlivých PAMAM dendrimerů se odvíjí také dle náboje. Zvýšenou toxicitu lze nalézt u molekul s kladným nábojem. Pro redukci lze zneutralizovat náboj na neutrální či až anionický a také upravit funkční skupiny na povrchu. [29]

2.8. Kyselina flufenamová

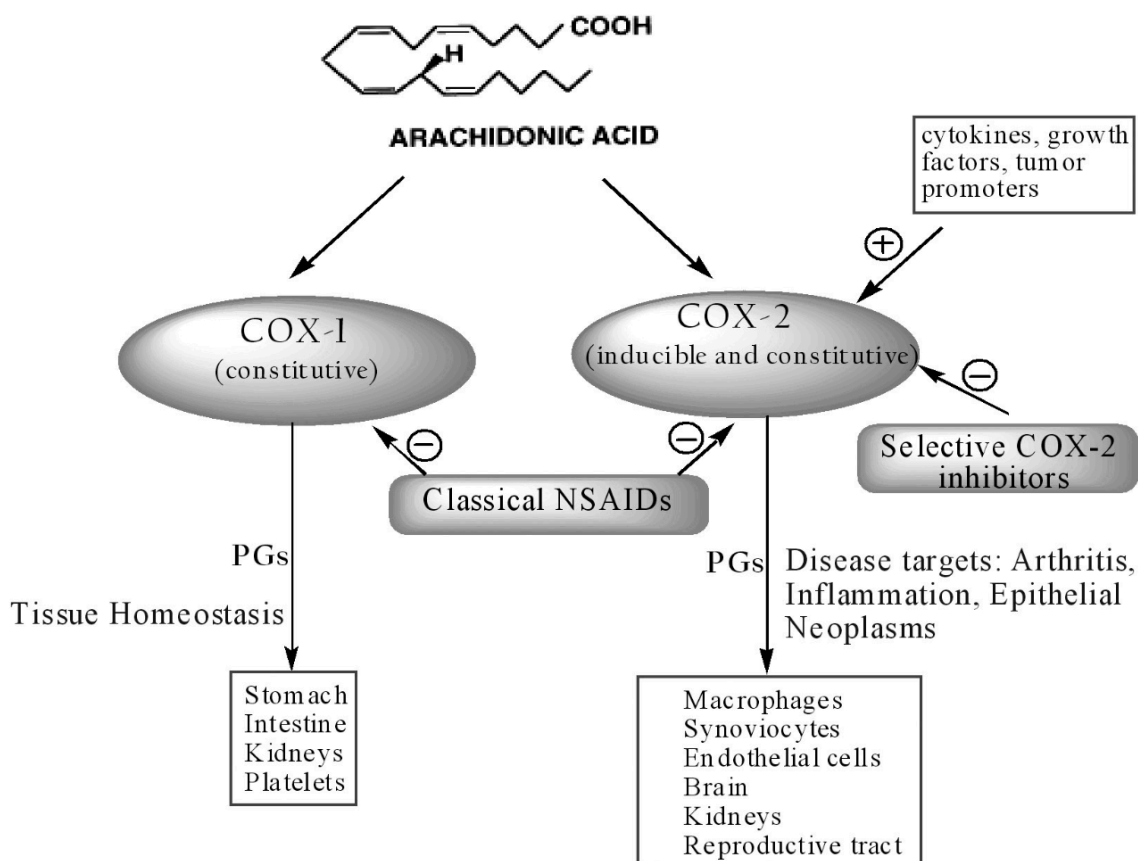
Kyselinu flufenamovou (FFA) (angl. *Flufenamic acid*) (obr. 11) patří do skupiny léčivých látek označované jako NSAIDs. Od roku 1960 jsou již známé její účinky. [51] Tato skupina léčiv mívá v různých publikacích různá označení. Ekvivalentními označeními této kategorie léčiv jsou i nesteroidní antirevmatika a neopiodní analgetika. [52] Z chemického pohledu je FFA řazena mezi N-substituované deriváty anthranilové kyseliny. [53] Pro protizánětlivý účinek je požadována substituce fenylem na aminoskupině v anthranilové kyselině. Vzniklé molekuly někdy jsou označovány jako deriváty N-fenylanthranilové kyseliny – tzv. fenamáty, které mají výborný protizánětlivý, analgetický a antipyretický účinek. Použití léčiv z této kategorie je limitováno přítomností orgánové toxicity a vyšší přítomností nežádoucích účinků. [52, 53] Lokální podání částečně redukuje výskyt systémových nežádoucích účinků a také minimalizuje vznik potenciálních lékových interakcí s jiným léčivem či s potravou. [47, 54, 55]



Obr 11 Chemická struktura FFA [56]

NSAIDs patří díky rozsáhlému účinku mezi nejoblíbenější léčiva na světě. První látka, která vykazovala tyto účinky, byla izolovaná z vrbové kůry již v roce 1830, která byla později upravena vědcem Felixem Hoffmanem a v roce 1897 byla poprvé použita jako kyselina acetylsalicylová neboli Aspirin. [54]

Mechanismus účinku je založen na reverzibilní inhibici enzymu cyklooxygenázy (COX). V lidském těle se nachází dvě izoformy toho enzymu – COX 1 a COX 2 (Obr.12.). [54] COX 1 je označována jako konstitutivní, která je vždy v lidském těle přítomná a aktivní. Ovlivňuje fyziologické funkce a její inhibicí dochází k vyvolání zejména nežádoucí účinky podaných léčiv např. porucha žaludeční sliznice a funkce ledvin. COX 2 je označována jako indukovatelná, která se produkuje zejména při rozvoji zánětu a působí i vasodilatačně. [23, 52, 54] Působením COX vznikají z kyseliny arachidonové endogenní látky zvané *ikosanoidy*, někdy označované jako *eikosanoidy*. *Eikosanoidy* se dále v lidském organismu přeměňují na prostacyklin, prostaglandin a tromboxan. Takto vzniklé molekuly jsou označovány jako hlavní mediátory zánětu a užívání NSAIDs reverzibilně blokuje vznik zmíněných mediátorů. [52]



Obr 12 Mechanismus účinku nesteroidních antiflogistik na přeměnu kyseliny arachidonové[57]

NSAIDs jsou děleny dle chemické struktury, dle délky působení nebo dle působení na jednotlivé izomery COX. Dle specifity účinku NSAIDs jsou rozlišeny na neselektivní, preferenční a selektivní ke COX 2. Vývoj selektivně působících NSAIDs měl potenciálně redukovat nežádoucí účinky plynoucí z inhibice konstitutivní COX. Avšak časem se ukázalo, že sice známé NÚ plynoucí z inhibice COX 1 redukuje, naproti tomu u pacientů došlo k výraznému zvýšení rizika aterotrombotických vaskulárních příhod. [52, 54]

FFA je látka, která je velmi málo rozpustná ve vodě (9,09 mg/l) a má rozdělovací koeficient $\log P = 5,25$. [53] Tyto vlastnosti vedly k vývoji speciálních formulací, které zlepšují topické či systémové podání. [53] Pro léčivé látky ve skupině NSAIDs je charakteristická jejich špatná rozpustnost ve vodě a nízká biologická dostupnost. [54]

Navzdory nižší účinnosti než ostatní NSAIDs, jsou lokální přípravky s FFA používané zejména proti bolesti a zánětu spojeným s muskuloskeletálními poruchami, kloubními

problémy, poruchami měkkých tkání a také jako součást antirevmatická terapie. [51, 58] Perorální podání bylo zastaveno kvůli interindividuální variabilitě v absorpci FFA. S přípravky obsahující FFA se lze setkat pouze ve formě topických přípravků. [51, 59]

V České republice nyní není žádný registrovaný přípravek s obsahem FFA. V zahraničí je registrován přípravek nesoucí název „Mobilisin“. Jedná se o kombinaci FFA s hydroxyethylsalicylátem a benzylnicotinátem určené pro lokální aplikaci. [60] Na českém trhu se lze setkat s několika registrovanými přípravky s etofenamátem. Jedná se o proléčivo FFA, které vzniká esterifikací karboxylové skupiny. [52, 55]

V předešlém výzkumu, který se zaměřoval na permeační pokusy s formulacemi obsahujícími FFA, byly testovány emulze [61], mikroemulze [62–64], suspenze polymerů [65] a nanočástice [59, 66]. Doposud však nebylo popsáno použití PAMAM dendrimerů pro zvýšení rozpustnosti a kožní aplikaci FFA.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie, materiál a přístroje

Pro experimentální část diplomové práce byly použity dvě generace PAMAM dendrimerů s aminoskupinami na jejich periferii. Konkrétněji byly použity 20 w% roztok dendrimera G2 v methanolu ($M_w=3256$ g/mol, hustota=0,86 g/ml, CAS Number: 93376-66-0) a 10 w% roztok dendrimera G4 v methanolu ($M_w=14215$ g/mol, hustota=0,818 g/ml, CAS Number 163442-67-9) zakoupené od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Dále byla použita FFA ($M_w=281,23$ g/mol, CAS Number 530-78-9) od stejné firmy.

Pro navažování jednotlivých surovin byla používána analytická váha Ohaus Pioneer (Ohaus, USA). Pro odebrání specifických objemů byly používány automatické mikropipety VWR (Randor, PA, USA). Ke zrychlení krátkodobé homogenizace vzorků byla použita třepačka MS2 (IKA, Německo). Pro dlouhodobou homogenizaci byla využita třepačka LT3 (Nedform, ČR). V případě potřeby byly vzorky i centrifugovány pomocí centrifugátoru MPW-260R (MPW MED. Instruments, Polsko) a nastavené hodnoty byly: 15 000 otáček za minutu, 21 °C, 10 minut. Pro odpaření methanolu z roztoku dendrimerů byl použit plynný dusík. Pro dosušení vzorků byl použit exikátor obsahující oxid fosforečný připojený s membránovou vakuovou pumpou KNF Laboport (Freiburg im Breisgau, Německo).

Analýza FFA byla provedena pomocí HPLC 1200 Infinity series (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Vždy bylo nutné dbát na použití správných vialek (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA), jelikož musí být kompatibilní s přístrojem HPLC. Pro analýzu byla použita kolona LiChroCART 250-4 naplněná LiChrospher 100 RP-18 částicemi o velikosti 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo). Používaná mobilní fáze byla složena z methanolu (HPLC kvalita, Merck, Darmstadt, Německo), vody (ultračistá voda, čištěná pomocí systému milli-Q RG (Millipore, Burlington, MA, USA)) a kyseliny octové (Penta, Hostivař, ČR).

Pro permeaci bylo nutné připravit akceptorovou fázi. Jako akceptorová fáze byl použit 10 mM izotonický fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4. Pufr byl připravený z následujících solí: dihydrát dihydrogenfosforečnan sodný ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ($M_w= 156,00$ g/mol), dodekahydrát hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ($M_w= 358,00$ g/mol), chlorid sodný (NaCl) ($M_w= 58,40$ g/mol) a chlorid draselný (KCl) ($M_w= 74,60$ g/mol) vše pořízeno z Penta (Hostivař, ČR) a obsahoval gentamicin sulfát, který byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Všechny soli byly rozpuštěny v ultračisté vodě čištěné pomocí systému milli-Q RG

(Millipore, Burlington, MA, USA). Franzovy difúzní cely jsou ruční výroba a průměrný objem je 7 ml. Do každé Franzovy cely bylo vloženo magnetické míchadlo. Permeace byla prováděna ve vodní lázni WNB 29 (Memmert, Schwabach, Německo) s teplotou nastavenou na 32 C°.

3.2. Příprava roztoků s obsahem flufenamové kyseliny a dendritických molekul

3.2.1. Příprava nasycených vodných roztoků s flufenamovou kyselinou

Při přípravě vodných roztoků FFA byla navážena známá hmotnost (přibližně 1,5 mg) FFA, která byla vložena do předem připravených vialek označených W₍₁₋₅₎. Následně bylo přidáno do každé vialky 500 μ l ultračisté vody. Takto připravené systémy byly promíchané na míchačce a vloženy do třepačky na 24hodinovou homogenizaci. Následně byla provedena centrifugace. Do předem připravených vialek s insertem bylo opatrně odebráno 250 μ l nasycených vodných roztoků s FFA, které byly následně vloženy do HPLC.

3.2.2. Příprava vodných roztoků PAMAM dendrimerů

Při přípravě vodných roztoků dendritických molekul bylo vytvořeno několik skupin vzorků. V první části experimentální práce byly připraveny vzorky PAMAM dendrimerů G2 s koncentrací 0,5 mM, 1 mM a 2 mM označené jako G2-X (kde X je připravená koncentrace). Každá koncentrace byla zastoupena pěti vzorky. Dále byl připraven stejný počet vzorků PAMAM dendrimerů G4 s koncentrací 0,5 mM, 1 mM a 2 mM označeny jako G4-X (kde X je připravená koncentrace). Dohromady tedy bylo 30 vzorků.

Používané dendrimery byly rozpuštěné v methanolu. Proto bylo nutné vypočítat, kolik mikrolitrů bude nutno odebrat pro přípravu předem stanovené koncentrace roztoku dendrimeru. PAMAM dendrimeru G2 bylo odebráno 189,3 μ l pomocí automatické mikropipety, který byl vložena do předem zvážené vialky o objemu 8 ml. PAMAM dendrimeru G4 bylo odebráno 1748,5 μ l, který byl také vložena do předem zvážené 8 ml vialky. Po odebrání stanoveného množství bylo nutné odstranit přebytečný methanol a získat suché dendrimery. Odpařování bylo provedeno pomocí dusíku na katedře organické a biorganické chemie. Po odpaření byly vzorky vloženy do vakuového exikátoru do druhého dne. Druhý den byly vialky vyndány z exikátoru za přítomnosti oxidu fosforečného, kde byla přes noc odstraněna zbylá rozpouštědla. Vialky se po vyndání znovu zvažily a porovnála se reálná hmotnost s teoretickou.

Do vialky k suchým dendrimerům G2 a G4 bylo přidáno 5 ml ultračisté vody. Pro urychlení homogenizace byla použita třepačka. Vzniklé roztoky dendrimerů měly koncentraci

2 mM a byly označeny jako G2-2 a G4-2. Bylo nutné provést ředění, kvůli vzniku roztoků dendrimery o koncentraci 1 mM a 0,5 mM. Pro vznik G2 dendrimery o koncentraci 1 mM bylo použito 1,5 ml dendrimery G2-2 a přidáno 1,5 ml ultračisté vody. To samé bylo provedeno i s G4-2. Vzniklé roztoky byly označeny jako G2-1 a G4-1. Následně bylo provedeno další ředění, díky němuž vznikly 0,5 mM roztoky. Pro vznik G2 dendrimery o koncentraci 0,5 mM bylo použito 0,75 ml G2-2 a přidáno 2,25 ml ultračisté vody. Pro homogenizaci vzniklých roztoků byla opět použita míchačka. To samé bylo provedeno i s G4-2. Vzniklé roztoky byly označeny jako G2-0,5 a G4-0,5. Takto připravené roztoky dendrimery o specifické koncentraci byly použity k další přípravě vzorků. Vialky byly označeny dle používaného dendrimery a dané koncentrace.

3.2.3. Příprava nasycených vodných roztoků flufenamové kyseliny s PAMAM dendrimery

Pro přípravu nasycených roztoků FFA s PAMAM dendrimery bylo nutné připravit si požadovaný počet vialek a popsat je dle použité koncentrace a generace dendrimery. Vialky byly označeny G2-0,5_(1.-5.), G2-1_(1.-5.) a G2-2_(1.-5.). Stejně byly označeny vialky i pro G4. Do každé vialky byla navážena známá hmotnost (průměrně 3,5 mg) FFA a přidáno 500 µl připraveného roztoku dendrimery podle generace a koncentrace. Vzniklé vialky byly vloženy do třepačky na 24 hodin. Po 24 hodinách byly vzniklé suspenze vloženy do centrifugy a byla provedena centrifugace. Bylo nutné připravit další vialky, které byly označeny již známým postupem. Museli jsem dbát na to, aby vialky byly kompatibilní s HPLC. Do každé vialky byl vložen insert a následně bylo do každé vialky odebráno 250 µl připraveného vzorku. Vzniklé roztoky byly podrobeny metodě HPLC a následně byly použity na permeaci.

3.2.4. HPLC stanovení koncentrace flufenamové kyseliny bez a s PAMAM dendrimery

Pro stanovení touto metodou bylo nutné připravit mobilní fáze. Použitá mobilní fáze byla složena z MeOH, H₂O a CH₃COOH v poměru 80:20:0,5. Pro přípravu bylo použito 1600 ml MeOH, 400 ml milli-Q vody a 10 ml CH₃COOH. Podmínky HPLC metody byly nastaveny: teplota 25 °C, injektovaný objem 50 µl, průtok 1,35 ml/min, doba analýzy 8 minut. FFA byla detekována při vlnové délce 275 nm a její retenční čas byl 5,9 minut. Tlak byl okolo 230 barů.

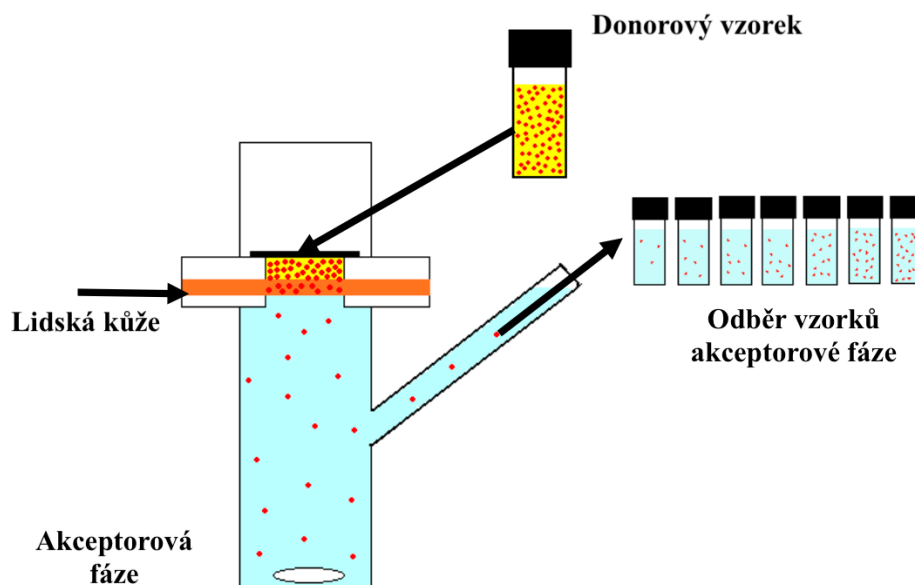
Příprava vzorků pro HPLC analýzu byla popsána v předchozích kapitolách. Před provedením vlastní analýzy vzorků bylo nutné zkontrolovat, zda naše připravené koncentrace jsou měřitelné nastavenou metodou HPLC. Metoda byla kalibrována pro koncentrace

0,05-60 $\mu\text{l/ml}$. Jeden vzorek prezentující odpovídající označení byl vyzkoušen a pokud byla koncentrace vzorků mimo dané koncentrační rozmezí, bylo provedeno ředění. Nejdříve se vzorek ředil 10 \times a pokud i to nestačilo, bylo provedeno ředění 100 \times nebo 1000 \times .

Před vlastní analýzou připravených vzorků byla ověřena nastavená metoda HPLC. Pro ověření nastavených parametrů byla provedena kalibrační křivka. Pro kalibrační křivku bylo připraveno několik roztoků FFA o známé koncentraci. Jako rozpouštědlo byl použit MeOH o HPLC kvalitě. Následně byly zhodnoceny nastavené parametry vybrané metody. Poté byly vzorky vloženy do HPLC a byla provedena vlastní analýza.

3.3. Permeace

Permeace tvořila druhou část experimentální práce. Nejdůležitější součástí permeace byly skleněné Franzovy cely, do kterých byla upevněna lidská kůže. Každá cely byla složena z vrchní skleněné části a spodní skleněné části (Obr.13.). Mezi skleněnými částmi se nacházely dvě teflonové destičky, které byly různě tlusté a obsahovaly otvor o velikosti 1 cm^2 . Každá část cely byla před permeací promazána silikonem pomocí vatičky. Do spodní skleněné části o průměrném objemu 7 ml bylo vloženo magnetické míchadlo.



Obr 13 Schéma Franzovy difúzní cely [18]

Kůže, která byla vložena mezi teflonové části, byla darována dárci, kteří podstoupili abdominoplastiku v chirurgickém centru Sanus, Hradec Králové. Po operaci byly kůže vyzvednuty a byl odstraněn přebytečný tuk. Následně byla kůže vložena do mrazáku, kde byla uchována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr.14). V čase potřeby byla kůže volně rozmrazena a byly

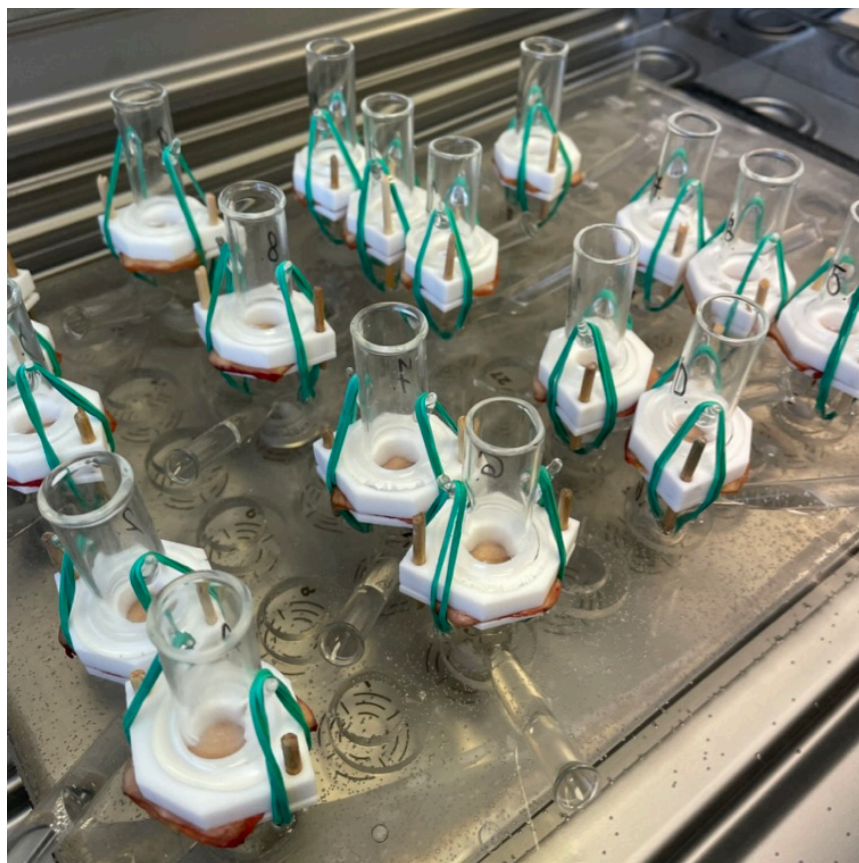
vyříznuty čtverce, které velikostí odpovídaly velikosti teflonové destičky. Celý proces probíhal po souhlasu Etické komise (No. 5/4/2018) a podle principů Helsinské deklarace. Všechny části cel s kůží mezi teflonovými destičkami byly postupně sestaveny ve správném pořadí a byly zpevněny pomocí gumiček a špejlí.



Obr 14 Kůže zbavena tuku a následně použitá pro naši permeaci

Akceptorovou fází představoval 10 mM izotonický roztok PBS s pH 7,4, který představoval pH krve a byl připraven postupným navážením a rozpuštěním 0,31 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 g NaCl, 0,20 g KCl a 0,05 g gentamycinu v 1000 ml milli-Q vodě. Následně byla akceptorová fáze po sestrojení cel aplikována do spodní části Franzových cel pomocí stříkačky s jehlou. Přebytek PBS byl vložen do odměrného válce, kde byl zjištěn reálný objem každé cely. Takto připravené cely byly vloženy do stojanu ve vodní lázni. Lázeň byla vytemperována na teplotu 32 °C, která odpovídá fyziologické teplotě povrchu kůže a byla zapnutá magnetická míchačka.

Pro permeaci byly používány roztoky PAMAM dendrimerů G2 o koncentraci 0,5 mM označené jako G2-0,5 a PAMAM dendrimerů G4 o koncentraci 0,5 mM označené jako G4-0,5, ve kterých byla rozpuštěna FFA. Další skupina vzorků byla složena z FFA a milli-Q vody, které byly označeny jako W (bez dendrimerů). Příprava roztoků byla popsána v kapitole 4.2. Každý typ vzorků byl aplikován 6×, dohromady bylo tedy pro permeaci připraveno 18 cel. Vzniklé roztoky byly aplikovány přes horní díl Franzovy cely pomocí automatické mikropipety. Objem, který byl aplikován na kůži, byl 100 μl . Před spuštěním permeace byl do Franzových cel doplněn objem akceptorové fáze do konce hrdla (Obr.15).



Obr 15 Franzovy cely vložené do vodní lázně při průběhu permeace

Po 24 hodinách permeace byla každá Franzova cela rozebrána. Z každé cely bylo odebráno 300 μl akceptorové fáze, která byla zfiltrována přes vatou do předem připravené a označené vialky s insertem. Kůže, která se nacházela mezi teflonovými destičkami byla opláchnuta milli-Q vodou, osušena vatou a položena na ták dle pořadí cel. Následně byla vytlučena kolečka kůže o velikosti 1 cm^2 , na která byly aplikovány roztoky. Takto připravená kolečka kůže byla vložena do vialek, které byly předem zváženy a po vložení byly opětovně zváženy. Do každé vialky bylo odměřeno 1 ml předem připravené mobilní fáze. Vialky s kůží byly vloženy do třepačky na 12 hodin při laboratorní teplotě. Druhý den bylo z každého roztoku s kůží po centrifugaci odebráno 500 μl rozpouštědla pomocí automatické mikropipety a zfiltrováno přes vatou do vialek. Vialky byly vloženy opět do centrifugy, aby došlo k sedimentaci zbylých částí kůže. Po provedení centrifugace bylo z vialek opatrně odebráno 300 μl a zfiltrováno opět přes špičku naplněnou vatou do vialek s insertem.

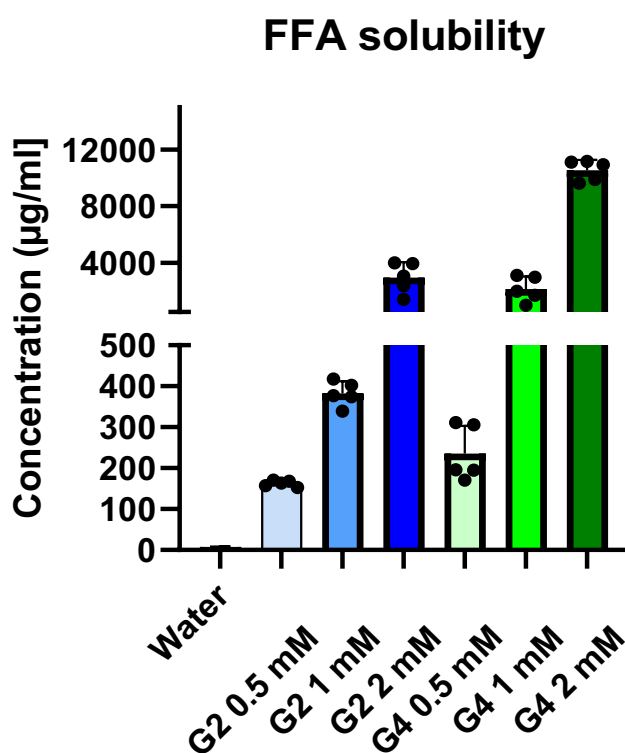
Vzorky připravené z akceptorové fáze a vzorky z kůže byly podrobeny HPLC analýze stejnou metodou, jak bylo předem napsáno.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Rozpustnost

Jak již bylo zmíněno, FFA je velmi lipofilní molekula s omezenou rozpustností ve vodě. V této práci byla hodnocena rozpustnost FFA ve vodném médiu obsahujícím různé koncentrace a generace PAMAM dendrimerů. Tyto typy dendrimerů byly vybrány jako potencionální solubilizátory, protože mají na své periférii aminoskupiny, díky čemuž se chovají jako organické báze. Očekávalo se, že zásaditost dendritických molekul zvýší rozpustnost mírně kyselé FFA. Byly vybrány dvě různé generace PAMAM dendrimerů (G2 a G4) ve třech různých koncentracích (0,5, 1,0 a 2,0 mM). Byl tedy hodnocen účinek velikosti a koncentrace dendrimeru na rozpustnost FFA. Literatura poukazuje na fakt, že právě výhodné vlastnosti PAMAM dendrimerů, jako například výborná rozpustnost ve vodě, by mohly pomoci v praxi u léčiv se špatnou rozpustností ve vodě. [40, 42]

Výsledky rozpustnosti FFA jsou zobrazené v následujícím grafu (Obr.16.).



Obr 16 Zpracované výsledky rozpustnosti FFA

Bylo zjištěno, že koncentrace nasyceného vodného roztoku FFA ve vodě je 7,8 µg/ml. Tento výsledek je ve shodě s předchozími zjištěními. [65] Začlenění PAMAM dendrimerů do vodného média dramaticky zvýšilo rozpustnost FFA. Konkrétně, rozpustnost FFA v roztoku

obsahujícím dendrimer G2 PAMAM byla zvýšena 20krát, 50krát a 380krát, když koncentrace G2 PAMAM byla 0,5, 1,0 a 2,0 mM, v daném pořadí. Podobně byla koncentrace zvýšena 30krát, 275krát a 1350krát, když koncentrace G4 PAMAM byla 0,5, 1,0 a 2,0 mM. Výsledky rozpustnosti FFA jsou zpracovány v přehledné tabulce (Tab.1.).

Tabulka 1 Výsledky rozpustnosti připravených roztoků

Typ roztoků	Rozpustnost FFA ($\mu\text{g/ml}$)
Pouze vodný roztok FFA	$7,8 \pm 0,6$
G2 0,5 mM	$162,4 \pm 7,6$
G2 1 mM	$382,2 \pm 30,0$
G2 2 mM	$2946,0 \pm 67,4$
G4 0,5 mM	$235,6 \pm 67,4$
G4 1 mM	$2142,0 \pm 885,2$
G4 2 mM	$10555,0 \pm 728,9$

Tato zjištění dokazují, že přítomnost PAMAM dendrimerů ve vodném médiu může zlepšit rozpustnost FFA, a to v závislosti na generaci a koncentraci. Nicméně neexistuje žádná korelace mezi koncentrací dendrimeru a zvýšením rozpustnosti. Dvojnásobná koncentrace dendrimeru stejné generace nezlepšuje rozpustnost pouze dvakrát (například změna koncentrace dendrimeru G2 z 1 mM na 2 mM zvýšila rozpustnost 8krát a změnou koncentrace G4 dendrimeru z 1 mM na 2 mM se zvýšila rozpustnost 5krát). To je důkaz, že zvýšení rozpustnosti je pravděpodobně způsobeno rozdílným pH ve vodném roztoku způsobeném přítomností dendrimeru. Tato hypotéza je v souladu s předchozí publikací, kde bylo uvedeno, že rozpustnost FFA se mění v závislosti na změně pH. [67]

Limitací terapeutického použití FFA je právě zmíněná špatná rozpustnost ve vodě, která je typickým rysem pro léčiva z kategorie NSAIDs. [40] Díky tomu dochází ke snížené biologické dostupnosti, kterou je řešena podáním vysoké dávky léčiv, z nichž plynou časté NÚ. Aplikací komplexů PAMAM dendrimerů-NSAIDs by bylo dosaženo redukce dávky pro dosažení ekvivalentního výsledku s redukcí NÚ. [29]

4.2. Kožní permeace

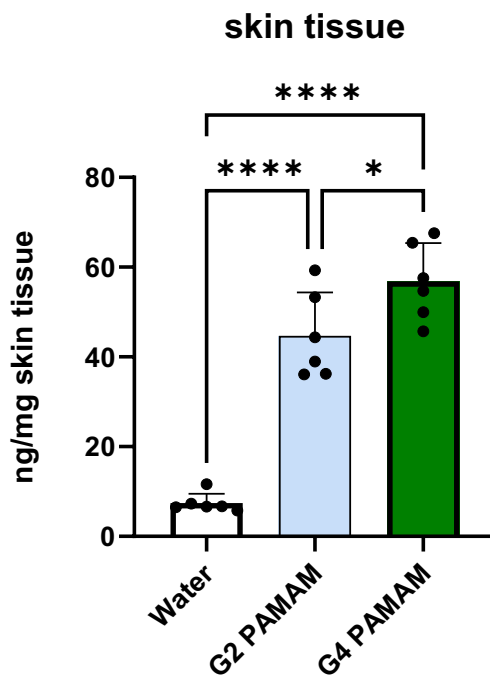
Kožní permeace byla prováděna pomocí Franzových difúzních cel, což je metoda, která je v některých publikacích označována jako zlatý standard jednotlivých permeačních pokusů. [15]

Dle výsledků z předcházejícího pokusu, kde byly prokázány výhodné vlastnosti PAMAM dendrimerů na rozpustnost FFA, byly zvoleny konkrétní koncentrace roztoků s obsahem PAMAM dendrimerů. Pro permeační experiment byly připravené roztoky s obsahem PAMAM dendrimerů o koncentraci 0,5 mM, především kvůli minimalizaci potencionálních toxických účinků na kůži. Přes jejich četné výhody bylo zjištěno, že dendritické molekuly vykazují významnou toxicitu vůči různým buněčným liniím. [68] I když nebyly provedeny žádné experimenty s lidskou kůží, ireverzibilní morfologické změny byly popsány u krysí kůže pro koncentrace dendrimerů vyšší než 6 mg/ml, což odpovídá ~ 2 mM pro G2 PAMAM dendrimer. Bylo také prokázáno, že PAMAM-NH₂ G2 a G3 byly dobře snášeny v koncentracích až 3 mg/ml, což odpovídá ~ 1 mM pro G2. [50]

Akceptorovou fází byl roztok PBS, protože má izotonický charakter a podobá se podmínkám převládajícím v hlubších vrstvách lidské kůže a v systémovém oběhu. [69] Kromě toho má FFA značnou rozpustnost v PBS ($0,87 \pm 0,01$ mg/ml), což umožňuje udržet „sink“ podmínky během permeačního experimentu. [55]

4.2.1. Množství FFA v kůži

Vliv PAMAM dendrimerů na penetraci FFA do kožní tkáně je zobrazen na následujícím grafu (Obr.17.).



Obr 17 Množství FFA naměřené v kůži

Přesné hodnoty jsou zpracovány v následující tabulce (Tab.2.) U vodného roztoku bez PAMAM dendrimeru bylo naměřeno pouze $7,4 \pm 2,1$ ng/ mg kůže. U PAMAM dendrimeru G2 0,5 mM došlo až k 6násobnému zvýšení množství FFA v kůži. U PAMAM dendrimeru G4 0,5 mM v porovnání s vodným roztokem došlo k 7násobnému zvýšení množství FFA v kůži.

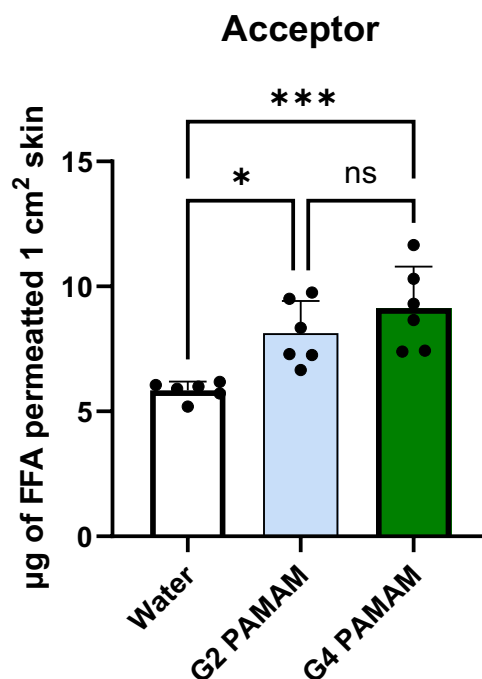
Tabulka 2 Množství FFA v naměřené v kůži

Typ roztoku	Množství FFA (ng) v 1 mg kůže
Nasycený vodný roztok FFA	$7,4 \pm 2,1$
Nasycený vodný roztok FFA s G2 0,5 mM	$44,7 \pm 9,7$
Nasycený vodný roztok FFA s G4 0,5 mM	$56,8 \pm 8,6$

Za zmínku stojí, že roztoky dendrimerů obsahovaly zvýšené množství FFA ve srovnání s kontrolním roztokem (G2 0,5 mM obsahoval 20krát více FFA a G4 0,5 mM obsahoval 30krát více FFA). Tento rozdíl koncentrací není podobný množství léčiva, které bylo detekováno v kožní tkáni, ale přítomnost dendrimeru zvyšovala množství léčiva, které bylo dodáno do kůže. Je tedy patrné, že PAMAM dendrimery jako kožní enhancery opravdu usnadňují penetraci FFA do kůže. Pokud by byla vytvořená léková formulace sloužící pouze k penetraci FFA do kůže, bylo by výhodnější použít roztoky s obsahem G4, jelikož došlo ke zvýšenému množství obsažené látky.

4.2.2. Množství FFA v akceptorové fázi

Vliv PAMAM dendrimerů na permeaci FFA je zobrazen na následujícím grafu (Obr.18.).



Obr 18 Vliv PAMAM dendrimerů na kožní permeaci FFA

U vodného roztoku s obsahem G2 0,5 mM došlo k 1,4násobnému zvýšení množství FFA v akceptorové fázi v porovnání s vodným roztokem bez obsahu PAMAM dendrimerů. U PAMAM dendrimerů G4 0,5 mM došlo k 1,6násobnému zvýšení množství FFA v akceptorové fázi. Mezi jednotlivými generacemi není signifikantní rozdíl v množství FFA nalezeného v akceptorové fázi. Hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce (Tab.3.).

Tabulka 3 Naměřené množství FFA v akceptorové fázi

Typ roztoku	Množství FFA v akceptorové fázi (µg)
Nasyčený vodný roztok FFA	5,8 ± 0,4
Nasyčený vodný roztok FFA s G2 0,5 mM	8,1 ± 1,3
Nasyčený vodný roztok FFA s G4 0,5 mM	9,1 ± 1,7

Lze tedy shrnout, že je prokázán významný vliv PAMAM dendrimerů jako kožních enhancerů usnadňující permeaci. Schopnost PAMAM dendrimerů jako kožních enhancerů je přímo úměrná použité generaci. Díky této formulaci by bylo možné v budoucnu usnadnit

permeaci lokálně aplikované FFA, a tím redukovat NÚ plynoucí z podávání perorálních přípravků. Některé publikace poukazují na perspektivní aplikaci PAMAM dendrimerů na zlepšení permeace celé skupiny NSAIDs. [40] Těto vlastnosti lze využít u topicky podávaných NSAIDs s cílem ulevit pacientům s akutní či chronickou bolestí u muskuloskeletálního aparátu. Lokální aplikace je výhodná především ve výrazném snížení NÚ plynoucí z perorálního podání léčiv z této skupiny. [55] Pro přípravu lékových formulací s cílem dosáhnout systémového účinku, by bylo výhodnější volit PAMAM dendrimery G2 díky menší toxicitě, snadnější syntéze a také výhodnější ceně v porovnání s PAMAM dendrimery G4. [70, 71]

5. Závěr

Cílem této práce bylo zvýšit rozpustnost špatně rozpustné FFA ve vodě pomocí PAMAM dendrimerů. Byl předpokládán vliv výhodných vlastností, které tyto dendritické molekuly poskytují. Byl potvrzen prvotní předpoklad, že vliv na rozpustnost je výrazný a přímo úměrný použité generaci a koncentraci.

Připravené formulace byly aplikovány na lidskou kůži s cílem zvýšit permeaci díky použití kožních enhancerů. Využití PAMAM dendrimerů jakožto kožních enhancerů usnadňují kožní permeaci přes SC bylo potvrzeno. Výsledkem permeačního experimentu bylo zvýšené množství FFA v kůži a také v akceptorové fázi, která svým složením a vlastnostmi představovala lidskou krev.

Při přípravě formulací FFA s PAMAM dendrimery usnadňující penetraci je výhodnější volit G4 díky signifikantnímu rozdílu mezi jednotlivými generacemi. Pro permeační formulaci by byla preferována spíše formulace FFA s PAMAM dendrimery G2, jelikož mezi testovanými generacemi nebyl významnější rozdíl a nabízí přívětivější vlastnosti.

Lze s jistotou shrnout, že všechny prvotní teze byly experimentálně potvrzeny. Pokud se bude navazovat na tento experiment, bylo by vhodné prostudovat toxicitu po aplikaci formulací s PAMAM dendrimery. Dále bude výhodné zvolit jiné aplikační formy. Například krémy, gely či masti. Aplikace roztoků je z hlediska pacienta dosti nepraktická.

6. Citace

- [1] HERCOGOVÁ, Jana. *Klinická dermatovenerologie*. První vydání. Praha: Mladá fronta, 2019. ISBN 978-80-204-5321-1.
- [2] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. 3. Vydání 3. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-9552-2.
- [3] TROJAN STANISLAV. *Lékařská fyziologie*. čtvrté. B.m.: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [4] BRUN, Paul Le, Sylvie CRAUSTE-MANCIET, Irene KRÄMER, Julian SMITH a Herman WOERDENBAG, ed. *Practical pharmaceuticals: an international guideline for the preparation, care and use of medicinal products*. Second edition. Cham: Springer, 2023. ISBN 978-3-031-20298-8.
- [5] PAULSEN, Douglas F., Václava KONRÁDOVÁ, Jiří UHLÍK a Luděk. VAJNER. *Histologie a buněčná biologie: opakování a příprava ke zkouškám*. Vyd. 1. Jinočany: H & H, 2004. ISBN 978-80-7319-024-8.
- [6] ROBERTS, Michael S. a Kenneth A. WALTERS, ed. *Dermal absorption and toxicity assessment*. 2nd ed. New York, N.Y: Informa Healthcare, 2008. Drugs and the pharmaceutical sciences, v. 117. ISBN 978-0-8493-7591-0.
- [7] MARTINA LANGEROVÁ. *Nové polyamidoaminodendrimery s etylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii: syntéza a potencionální využití při (trans)dermálním přenosu léčiv*. Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2018. Univerzita Karlova.
- [8] CEVC, Gregor. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, **56**(5), 675–711. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.10.028
- [9] ALEXANDR HRABÁLEK a KATEŘINA VÁVROVÁ. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*. nedatováno, **2005**(1), 8–11.
- [10] <https://www.mayoclinic.org/skin-layers-and-melanin/img-20007151>. In: . nedatováno.
- [11] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [12] ALEXANDR HRABÁLEK, PAVEL DOLEŽAL, ZDENKA ŠKLUBALOVÁ, OLDŘICH FARSA, a ALEŠ KREBS. Akceleranty transdermální aplikace. *Chemické listy*. nedatováno, **1999**(93), 107–119.
- [13] MGR. MONIKA KOPEČNÁ. *Syntéza a studium akcelerantů transdermální permeace léčiv*. Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2019. Univerzita Karlova.
- [14] KATEŘINA ŽOFKOVÁ. *Interakce PAMAM dendrimerů s lidským stratum corneum*. Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2023. Univerzita Karlova.
- [15] SUPE, Shibani a Pooja TAKUDAGE. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Research and Technology* [online]. 2021, **27**(3), 299–308. ISSN 0909-752X, 1600-0846. Dostupné z: doi:10.1111/srt.12968
- [16] MARIE SVOBODOVÁ. *Studium a hodnocení topicky podávaných ceramidů na poškozenou kožní bariéru*. Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2023. Univerzita Karlova.
- [17] VÁVROVÁ, Kateřina, Alexandr HRABÁLEK, Pavel DOLEŽAL, Tomáš HOLAS a Jarmila ZBYTOVSKÁ. l-Serine and glycine based ceramide analogues as transdermal

permeation enhancers: polar head size and hydrogen bonding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2003, **13**(14), 2351–2353. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-894X(03)00409-8

[18] MGR. MICHAL NOVOTNÝ. *Akceleranty transdermální permeace: studie vlivu struktury na akcelerační účinek*. Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2010. Univerzita Karlova.

[19] UCHINO, Tomonobu, Daichi KAMIYA, Hiroaki YAGI, Hiyori FUJINO-SHIMAYA, Ichiro HATTA, Shun FUJIMORI, Yasunori MIYAZAKI, Yukako KIRISHITA, Yuko SANNO, Hajime MIZUNO, Kenichiro TODOROKI a Yoshiyuki KAGAWA. Comparative analysis of intercellular lipid organization and composition between psoriatic and healthy stratum corneum. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 2023, **254**, 105305. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2023.105305

[20] XU, Yuyi, Ming ZHAO, Jinxue CAO, Ting FANG, Jian ZHANG, Yanli ZHEN, Fangling WU, Xiaohui YU, Yaming LIU, Ji LI a Dongkai WANG. Applications and recent advances in transdermal drug delivery systems for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2023, **13**(11), 4417–4441. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2023.05.025

[21] ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA, ed. *Farmakologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

[22] CHEN, Yang, Peng QUAN, Xiaochang LIU, Manli WANG a Liang FANG. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, **9**(2), 51–64. ISSN 18180876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2014.01.001

[23] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR, Lutz HEIN a Jiří SLÍVA. *Barevný atlas farmakologie*. 5. české vydání. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-271-2271-4.

[24] LANE, Majella E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **447**(1–2), 12–21. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.040

[25] HARTL, Jiří a Karel PALÁT. *Farmaceutická chemie I*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2033-6.

[26] BRISSON, P. Percutaneous absorption. *Canadian Medical Association Journal*. 1974, **110**(10), 1182–1185. ISSN 0008-4409.

[27] MARWAH, Harneet, Tarun GARG, Amit K. GOYAL a Goutam RATH. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery* [online]. 2016, **23**(2), 564–578. ISSN 1071-7544, 1521-0464. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2014.935532

[28] WILLIAMS, Adrian C a Brian W BARRY. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, **56**(5), 603–618. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.10.025

[29] CHIS, Adriana Aurelia, Carmen DOBREA, Claudiu MORGOVAN, Anca Maria ARSENIU, Luca Liviu RUS, Anca BUTUCA, Anca Maria JUNCAN, Maria TOTAN, Andreea Loredana VONICA-TINCU, Gabriela CORMOS, Andrei Catalin MUNTEAN, Maria Lucia MURESAN, Felicia Gabriela GLIGOR a Adina FRUM. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules* [online]. 2020, **25**(17), 3982. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25173982

- [30] ASADULLAH KHAN, Muhammad, Rui PENG, CanLi LIU a Zhen CHEN. Synthesis, dynamics and applications (cytotoxicity and biocompatibility) of dendrimers: A mini-review. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **181**, 111708. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111708
- [31] LYU, Z., L. DING, A.Y.-T. HUANG, C.-L. KAO a L. PENG. Poly(amidoamine) dendrimers: covalent and supramolecular synthesis. *Materials Today Chemistry* [online]. 2019, **13**, 34–48. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2019.04.004
- [32] TOMALIA, D A, H BAKER, J DEWALD, M HALL, G KALLOS, S MARTIN, J ROECK, J RYDER a P SMITH. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* [online]. 1985, **17**(1), 117–132. ISSN 0032-3896, 1349-0540. Dostupné z: doi:10.1295/polymj.17.117
- [33] CAMINADE, A, R LAURENT a J MAJORAL. Characterization of dendrimers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2005, **57**(15), 2130–2146. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2005.09.011
- [34] DING, Ling, Zhenbin LYU, Dinesh DHUMAL, Chai-Lin KAO, Monique BERNARD a Ling PENG. Dendrimer-based magnetic resonance imaging agents for brain cancer. *Science China Materials* [online]. 2018, **61**(11), 1420–1443. ISSN 2095-8226, 2199-4501. Dostupné z: doi:10.1007/s40843-018-9323-6
- [35] SOHAIL, Isra, Ijaz Ahmad BHATTI, Ambreen ASHAR, Fazli Malik SARIM, Muhammad MOHSIN, Rizwana NAVEED, Muhammad YASIR, Munawar IQBAL a Arif NAZIR. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers synthesis, characterization and adsorptive removal of nickel ions from aqueous solution. *Journal of Materials Research and Technology* [online]. 2020, **9**(1), 498–506. ISSN 22387854. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmrt.2019.10.079
- [36] MADAAN, Kanika, Sandeep KUMAR, Neelam POONIA, Viney LATHER a Deepti PANDITA. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2014, **6**(3), 139. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.130965
- [37] FOX, Laura J., Robert M. RICHARDSON a Wuge H. BRISCOE. PAMAM dendrimer - cell membrane interactions. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2018, **257**, 1–18. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2018.06.005
- [38] YA-TING HUANG, A., C.-L. KAO, A. SELVARAJ a L. PENG. Solid-phase dendrimer synthesis: a promising approach to transform dendrimer construction. *Materials Today Chemistry* [online]. 2023, **27**, 101285. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2022.101285
- [39] BOAS, U., J. B. CHRISTENSEN a P. M. H. HEEGAARD. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2006, **16**(38), 3785. ISSN 0959-9428, 1364-5501. Dostupné z: doi:10.1039/b611813p
- [40] GUPTA, Ankita, Shaifali DUBEY a Mayuri MISHRA. Unique Structures, Properties and Applications of Dendrimers. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2018, **8**(6-s), 328–339. ISSN 2250-1177. Dostupné z: doi:10.22270/jddt.v8i6-s.2083
- [41] YANG, Wenjun, Yiyun CHENG, Tongwen XU, Xueyuan WANG a Long-ping WEN. Targeting cancer cells with biotin–dendrimer conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **44**(2), 862–868. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2008.04.021
- [42] CASTRO, Ricardo I., Oscar FORERO-DORIA a Luis GUZMÁN. Perspectives of

Dendrimer-based Nanoparticles in Cancer Therapy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* [online]. 2018, **90**(2 suppl 1), 2331–2346. ISSN 1678-2690, 0001-3765. Dostupné z: doi:10.1590/0001-3765201820170387

[43] ARORA, Virali, Mohammed A.S. ABOUREHAB, Gyan MODI a Prashant KESHARWANI. Dendrimers as prospective nanocarrier for targeted delivery against lung cancer. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **180**, 111635. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111635

[44] SUREKHA, Bhavya, Naga Sreenu KOMMANA, Sunil Kumar DUBEY, A.V. Pavan KUMAR, Rahul SHUKLA a Prashant KESHARWANI. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, **204**, 111837. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111837

[45] DEY, Asmita Deka, Ashkan BIGHAM, Yasaman ESMAEILI, Milad ASHRAFIZADEH, Farnaz Dabbagh MOGHADDAM, Shing Cheng TAN, Satar YOUSEFIASL, Saurav SHARMA, Aziz MALEKI, Navid RABIEE, Alan Prem KUMAR, Vijay Kumar THAKUR, Gorka ORIVE, Esmaeel SHARIFI, Arun KUMAR a Pooyan MAKVANDI. Dendrimers as nanoscale vectors: Unlocking the bars of cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2022, **86**, 396–419. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2022.06.003

[46] YIYUN, Cheng, Man NA, Xu TONGWEN, Fu RONGQIANG, Wang XUEYUAN, Wang XIAOMIN a Wen LONGPING. Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Mediated by Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers**Cheng Yiyun and Wen Longping designed the experiments and wrote this manuscript, Man Na and other coauthors did the experiments and analyzed the data. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, **96**(3), 595–602. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20745

[47] IRVINE, Jake, Afrina AFROSE a Nazrul ISLAM. Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2018, **44**(2), 173–183. ISSN 0363-9045, 1520-5762. Dostupné z: doi:10.1080/03639045.2017.1391838

[48] KAUR, Amandeep, Navneet SINGH, Harmanpreet KAUR, Violina KAKOTY, Deep Shikha SHARMA, Rubiya KHURSHEED, Molakpogu Ravindra BABU, Vancha HARISH, Gaurav GUPTA, Monica GULATI, Puneet KUMAR, Harish DUREJA, Nahed S. ALHARTHI, Farhan R. KHAN, Zia Ur REHMAN, Mohammed Ageeli HAKAMI, Mrunali PATEL, Rashmin PATEL, Milad ZANDI, Sukriti VISHWAS, Kamal DUA a Sachin Kumar SINGH. Neurodegenerative diseases and brain delivery of therapeutics: Bridging the gap using dendrimers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2023, **87**, 104868. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2023.104868

[49] KHERALDINE, Hadeel, Ousama RACHID, Abdella M HABIB, Ala-Eddin AL MOUSTAFA, Ibrahim F. BENTER a Saghir AKHTAR. Emerging innate biological properties of nano-drug delivery systems: A focus on PAMAM dendrimers and their clinical potential. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2021, **178**, 113908. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2021.113908

[50] WINNICKA, Katarzyna, Magdalena WROBLEWSKA, Katarzyna SOSNOWSKA, Halina CAR a Irena KASACKA. Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers' dermal toxicity in the rat skin model. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. 2015, 1367. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S78336

- [51] GUINAMARD, Romain, Christophe SIMARD a Christopher DEL NEGRO. Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2013, **138**(2), 272–284. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.01.012
- [52] MARTIN DOLEŽAL. *Farmaceutická chemie*. B.m.: Univerzita Karlova, 2013. ISBN 978-80-246-2382-5.
- [53] ALSHEHRI, Sultan, Syed Sarim IMAM, Afzal HUSSAIN, Abdul Malik ALYOUSEF, Mohammad ALTAMIMI, Bader ALSULAYS a Faiyaz SHAKEEL. Flufenamic Acid-Loaded Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System for Oral Delivery: From Formulation Statistical Optimization to Preclinical Anti-Inflammatory Assessment. *Journal of Oleo Science* [online]. 2020, **69**(10), 1257–1271. ISSN 1347-3352. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess20070
- [54] BINDU, Samik, Somnath MAZUMDER a Uday BANDYOPADHYAY. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2020, **180**, 114147. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2020.114147
- [55] KOPEČNÁ, Monika, Andrej KOVÁČIK, Petr NOVÁK, Mila BONCHEVA BETTEX a Kateřina VÁVROVÁ. Transdermal Permeation and Skin Retention of Diclofenac and Etofenamate/Flufenamic Acid From Over-the-Counter Pain Relief Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **110**(6), 2517–2523. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2021.01.022
- [56] AINA, Adeyinka, Michael D. HARGREAVES, Pavel MATOUSEK a Jonathan C. BURLEY. Transmission Raman spectroscopy as a tool for quantifying polymorphic content of pharmaceutical formulations. *The Analyst* [online]. 2010, **135**(9), 2328. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/c0an00352b
- [57] Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iran J Pharm Res*. 2011;10(4):655-683. nedatováno.
- [58] BENADICT JOSEPH, Xavier, Balasubramanian SRIRAM, Sea-Fue WANG, Jeena N. BABY, Yung-Fu HSU a Mary GEORGE. Revealing the effect of multidimensional ZnO@CNTs/RGO composite for enhanced electrochemical detection of flufenamic acid. *Microchemical Journal* [online]. 2021, **168**, 106448. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2021.106448
- [59] MALINOVSKAJA-GOMEZ, K., H.I. LABOUTA, M. SCHNEIDER, J. HIRVONEN a T. LAAKSONEN. Transdermal iontophoresis of flufenamic acid loaded PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, **89**, 154–162. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2016.04.034
- [60] KATZUNG, Bertram G. *Základní & klinická farmakologie*. Vyd. v ČR 2., v nakl. H&H 1. Jinočany: H & H, 1995. ISBN 978-80-85787-35-1.
- [61] ELKSINAT, Anna-Lena, Paula ZSCHERPE, Karina KLEIN, Jessika Maximiliane CAVALLERI a Jessica MEISSNER. Effect of an Oxygen-Based Mechanical Drug Delivery System on Percutaneous Permeation of Various Substances In Vitro. *Pharmaceutics* [online]. 2022, **14**(12), 2722. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14122722
- [62] HOPPEL, Magdalena, Sonja JURIC, Hanna ETTL a Claudia VALENTA. Effect of monoacyl phosphatidylcholine content on the formation of microemulsions and the dermal delivery of flufenamic acid. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **479**(1), 70–76. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.048
- [63] MAHRHAUSER, Denise-Silvia, Hanspeter KÄHLIG, Ewa PARTYKA-

JANKOWSKA, Herwig PETERLIK, Lisa BINDER, Kristina KWIZDA a Claudia VALENTA. Investigation of microemulsion microstructure and its impact on skin delivery of flufenamic acid. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **490**(1–2), 292–297. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.056

[64] PANY, Astrid, Victoria KLANG, Caroline PEINHOPF, Angela ZECEVIC, Johanna RUTHOFER a Claudia VALENTA. Hair removal and bioavailability of chemicals: Effect of physicochemical properties of drugs and surfactants on skin permeation ex vivo. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, **567**, 118477. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118477

[65] SHAZLY, Gamal A., Mohamed A. IBRAHIM, Mohamed M. BADRAN a Khairy M. A. ZOHEIR. Utilizing P luronic F -127 and G elucire 50/13 Solid Dispersions for Enhanced Skin Delivery of Flufenamic Acid. *Drug Development Research* [online]. 2012, **73**(6), 299–307. ISSN 0272-4391, 1098-2299. Dostupné z: doi:10.1002/ddr.21013

[66] LUENGO, Javiana, Marc SCHNEIDER, Anna M. SCHNEIDER, Claus-Michael LEHR a Ulrich F. SCHAEFER. Human Skin Permeation Enhancement Using PLGA Nanoparticles Is Mediated by Local pH Changes. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **13**(10), 1608. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13101608

[67] ABIGNENTE, Enrico a Paolo DE CAPRARIIS. Flufenamic Acid. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* [online]. B.m.: Elsevier, 1982 [vid. 2024-04-28], s. 313–346. ISBN 978-0-12-260811-7. Dostupné z: doi:10.1016/S0099-5428(08)60268-3

[68] JAIN, Keerti, Prashant KESHARWANI, Umesh GUPTA a N.K. JAIN. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, **394**(1–2), 122–142. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.027

[69] MAKUCH, Edyta, Anna NOWAK, Andrzej GÜNTHER, Robert PEŁECH, Łukasz KUCHARSKI, Wiktoria DUCHNIK a Adam KLIMOWICZ. Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of eugenol by the esterification of eugenol to new derivatives. *AMB Express* [online]. 2020, **10**(1), 187. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-020-01122-3

[70] <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/412449>. In: . nedatováno.

[71] <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/412406>. B.m., nedatováno. b.n.