

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra farmaceutické technologie



Transdermální in vitro permeace cyklosporinu IV.
Rigorózní práce

Mgr. Hana Krejčová

konzultant: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, září 2006

Děkuji Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné vedení
a pomoc při vypracování předkládané rigorózní práce.

OBSAH:

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE.....	5
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
3.1. Kůže	6
3.1.1 Anatomie a fyziologie kůže.....	6
3.1.2 Funkce kůže.....	10
3.1.3 Fyziologické faktory, které ovlivňují transdermální aplikaci léčiv.....	10
3.1.4 Patologické faktory, které ovlivňují transdermální aplikaci léčiv.....	12
3.2 Transdermální lékové formy	14
3.2.1 Transdermální aerodisperze	14
3.2.2 Polotuhé léčivé přípravky pro transdermální aplikaci.....	14
3.2.1 Transdermální náplasti	14
3.3 Možnosti zvýšení transdermální absorpce léčiv.....	15
3.3.1 Iontoforéza	15
3.3.2 Elektroporéza	16
3.3.3 Sonoфорéza.....	16
3.3.4 Látky modifikující transdermální permeaci	17
3.4 Cyklosporin A	19
3.4.1 Imunosupresiva	20
3.4.2 Cyklosporin -aktualizované informace.....	21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1 Použité přístroje.....	23
4.2 Použité suroviny	23
4.3 Testované vzorky	24

4.4 Biologický materiál	26
4.5 Výběr akceptorové fáze.....	26
4.6 Uspořádání permeačních pokusů	26
4.7 Provedení strippingu	26
4.8 Stanovení cyklosporinu A	27
4.9 Naměřené údaje z permeačních měření.....	28
5. VÝSLEDKY	29
6. DISKUSE	33
7. ZÁVĚRY	41
8. SOUHRN	42
9. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	43
10. LITERATURA.....	44

1. ÚVOD

Cyklosporin A po řadu let představuje jednu z nejdůležitějších látek s imunosupresivním účinkem, jehož využití přináší významný pokrok v transplantační medicíně, terapii autoimunitních chorob a v neposlední řadě také v dermatologii. V současnosti je v humánní medicíně používán ve formě perorálních a injekčních léčivých přípravků. Jeho podání per os naráží hlavně na problémy související s vysokým jaterním first-pass efektem, inaktivací vlivem změn pH v gastrointestinálním traktu, přítomností enzymů v lumen trávicí trubice a metabolizací při pasáži buňkami střevní stěny. Injekční aplikace sice obchází gastrointestinální trakt a s ním spojené možnosti inaktivace, avšak cyklosporin má i při této aplikační cestě krátký biologický poločas v důsledku rychlé metabolizace játry.

Transdermální aplikace představuje variantu podání, která by v principu umožňovala lepší kontrolu hladiny cyklosporinu v organismu, což je v případě této látky s nízkým terapeutickým indexem velmi žádoucí. Byly by tak minimalizovány nevýhody spojené s perorální a injekční aplikací. Překážkou ovšem zůstává překonání bariérové funkce kůže vzhledem k poměrně vysoké molekulové hmotnosti a lipofilitě molekuly cyklosporinu A. Intenzivně se tedy studují techniky, které umožňují zvýšení permeace molekuly cyklosporinu kůží. Součástí experimentální části této diplomové práce bylo studium několika enhancerů (urychlovačů) transdermální aplikace. Konkrétně byl hodnocen transkarbam 12, **xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx** (arlasolve DMI), methylpyrrolidon a **xxxxxxxxxxxxxxxxxx**transcutol, které byly obsaženy v donorových vzorcích aplikovaných na prasečí kůži v in vitro permeačních pokusech.

Výzkum transdermálních permeačních enhancerů spadá do výzkumné oblasti společně řešené na katedře farmaceutické technologie a katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

2. CÍL PRÁCE

1. Podat aktualizovaný přehled informací o cyklosporinu a jeho léčebných aplikacích, včetně externí dermatologické.
2. Provéřit nový protokol realizace permeačních pokusů, zejména s ohledem na vhodnou dobu trvání in vitro permeací.
3. Získat nové údaje o průniku cyklosporinu A ze směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) přes kožní membránu z ucha prasečího boltce
4. Orientačně kvantifikovat efekt zadaných koncentrací transkarbamu 12, dimethylisosorbidu, methylpyrrolidonu a 2-(2-ethoxyethoxy)ethanolu jako čtyř dobře zavedených permeačních enhancerů pro hydrofilní donorové fáze na výsledky permeačních pokusů.

další) rohové vrstvy tvoří 7-9% celkové hmotnosti tkaniva. Stratum corneum je hlavní bariérou pro transdermální aplikaci léčiv.^{1,4}

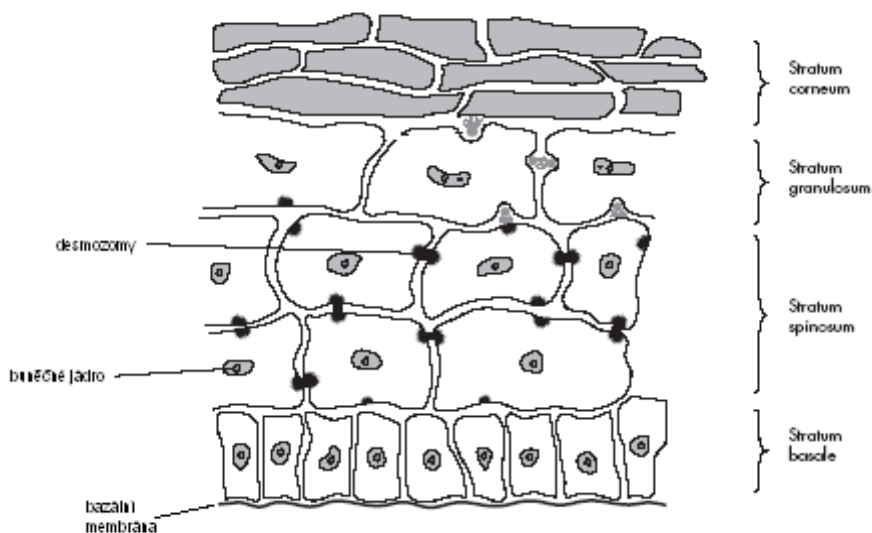
Stratum lucidum bývá někdy považována za spodní vrstvu stratum corneum. Tvoří ji zploštělé buňky, které rohovatí a jejich jádra jsou desintegrovaná. V buňkách jsou patrné malé kapičky, které zřejmě vznikají degradací lysozómů.⁴

Vrstva stratum granulosum je tvořena keratinocyty, které syntetizují keratin a začínají se zplošťovat. 1-3 vrstvy buněk obsahují enzymy, které začínají degradovat buněčné organely. V endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu jsou syntetizována granula, která obsahují prekurzor intercelulárního lipidu, který se nalézá ve stratum corneum. Z buněk se pak granula dostávají do intercelulárního prostoru.⁴

Stratum spinosum tvoří 2-6 řad keratinocytů, které produkují keratin a ten agreguje ve filamenta, která tvoří desmozomy. Buňky mají výběžky připomínající ostny (odtud název) a díky těmto výběžkům jsou v kontaktu s podobnými výběžky sousedních buněk.^{2,4}

Stratum basale bývá spolu se stratum spinosum nazývána stratum Malpighi. Buňky této vrstvy obsahují typické organely a jsou metabolicky aktivní. *Keratinocyty* jsou připojeny k bazální membráně hemidesmozomy a navzájem jsou spojeny (stejně jako ve stratum spinosum) proteinovými buněčnými můstky, desmozomy. *Melanocyty* syntetizují z aminokyseliny tyrosinu pigment melanin. Melanin má dvě formy: eumelanin (hnědočerná forma) a **phaeomelanin** (ten je červený nebo žlutý). Melanocyty obsahují granula se směsí obou forem melaninu. Tyto buňky jsou v kontaktu s keratinocyty díky dendritickým spojmům, což umožní přechod pigmentových granulí z melanocytů do keratinocytů. Při chronické expozici kůže slunečním paprskům roste relativní poměr melanocytů vůči ostatním buňkám ve stratum basale. Melanin je důležitá látka, která funguje jako zametač volných radikálů a absorbuje UV záření. Počet melanocytů je u lidí s tmavou či světlou pletí stejný, rozdíl je v tom, že u lidí s tmavou pletí jsou melanocyty aktivnější. *Langerhansovy buňky* jsou dendriticky spojeny s keratinocyty. Pocházejí z kostní dřeně a jsou to hlavní antigenprezentující buňky kůže. Antigeny prezentují lymfocytům z mízních uzlin a to hraje důležitou roli např. při kontaktní dermatitidě. *Merkelovy buňky* jsou asociovány s nervovými zakončeními a jsou důležité pro vnímání kůže. Vyskytují se hlavně v oblasti rtů a bříšek prstů.⁴

Obr. 1: Struktura epidermis ⁴



Corium

Corium (dermis, škára) vybíhá do epidermis výběžky- papilami, proto se část škáry sousedící s epidermis nazývá *stratum papillare*. Pod ní je *stratum reticulare*, síťovitě prostoupené vazivem obsahujícím vlákna kolagenní i elastinová. Škára obsahuje také buňky fibrocytů (tvořící vazivo), histiocyty (makrofágy) a žírné buňky (tvořící histamin a heparin). Základní hmota škáry obsahuje hlavně glykosaminoglykany, především kyselinu chondroitinsírovou a hyaluronovou.² Tato vrstva kůže je často znázorňována jako v podstatě strukturalizovaná voda, to znamená, že tvoří minimální bariéru pro transport většiny polárních léčiv a tudíž významnou bariéru pro vysoce lipofilní molekuly. Ve škáře nalezneme krevní a lymfatické cévy, nervová vlákna, pilosebaceózní jednotky a potní žlázy.

Bohaté krevní zásobení slouží k regulaci tělesné teploty, přívodu kyslíku a živin a dále odvádí toxiny a odpadní látky. Krevní zásobení sehrává svou úlohu i v regeneraci kůže. Pro permeaci léčiva je důležitý gradient tvořený rozdílem koncentrace léčiva na povrch kůže a

koncentrací v krevním řečišti. Krevní tok ovlivňuje clearance relativně malých molekul (např. lidokainu) a lymfatické řečiště ovlivňuje clearance větších molekul (např. interferonů).⁴

Podkožní vazivo

Podkožní vazivo (tela subcutanea) je řídké vazivo bohaté na tuk. Jeho tloušťka bývá několik mm, avšak na některých partiích těla ho nenajdeme, jako je tomu např. u očních víček.⁴ Připevňuje kůži k povrchovým povázkám pomocí pevných pruhů vaziva. Umožňuje značnou pohyblivost kůže ve vztahu k podložce. Tukový polštář tvoří v některých místech ochrannou vrstvu, která chrání v hloubce uložené orgány před tlakem apod. Podkožní tuk představuje dále zásobu energie, která se uvolňuje hladověním.³

Vlasy a nehty

Vlasy (pili) vyrůstají z vlasových folikulů (cibulek) s vícevrstevnou stavbou, šikmo protínajících kůži. Vlasové folikuly najdeme na celém povrchu těla mimo dlaní a chodidel. Vlasové folikuly představují spolu s potními žlázami potenciální cestu, kudy mohou molekuly vstoupit do nižších vrstev kůže. Vlasy stárím šedivějí, tj. obsahují bublinky vzduchu.^{2,4}

Neht (unguis, onyx) je rohová ploténka na prstu, silná asi 0,5mm. Tvoří se na nehtovém lůžku (odpovídá germinativní vrstvě pokožky), po němž se posouvá na koneček prstu rychlostí cca 0,1 mm denně.²

Kožní žlázy

V kůži jsou uloženy žlázy mazové (glandulae sebaceae); většinou ústí do vlasových folikulů. Vylučují sebum, složené hlavně z volných mastných kyselin, vosků a triacylglyceridů. Sebum slouží k promazávání pokožky a také se spolupodílí na udržování vhodného pH pokožky (přibližně pH 5). Dále kůže obsahuje žlázy potní (glandulae sudoriferae), z nichž velké apokrinní žlázy (v oblasti podpaží, prsních bradavek a genitálií) ústí v místech, kde vlas opouští kůži. Aktivizuje se nervově (sympatikem). Jejich sekret je aromatický díky obsahu speciálních proteinů. Malé potní žlázy (ekrinní) jsou umístěné difúzně o hustotě 100-200/cm² kůže. Vylučují pot, což je solný roztok o pH blízkém hodnotě 5. Aktivizuje se především teplem.^{2,4}

Nervové a cévní zásobení

Kůže je bohatě zásobena nervovými vlákny. Ta jsou buď volná (pro vnímání bolesti) nebo zakončena útvary, jejichž podstatou jsou jemná vazivová vlákna uspořádaná do tělísek.

Ta jsou morfologicky rozdělitelná do několika skupin, jimž se přisuzuje vnímavost pro určité kvality cití. V kůži se také nachází bohaté zásobení cévní, jde o cévy krevní i lymfatické.²

3.1.2 Funkce kůže⁵

Ochrana těla proti vniknutí škodlivých látek, mikroorganismů a před vlivem UV záření.

Udržování stálé tělesné teploty prostřednictvím kožních cév a potních žláz. V horkém prostředí dochází k rozšíření kožních cév, zvětšení průtočnosti krve, a tím k urychlení výdeje tepla, v chladném prostředí je tomu naopak. Mnoho tělesného tepla se spotřebuje k odpaření potu.⁵

Smyslová funkce- v kůži je uložena řada receptorů sloužících k vnímání mechanických, tepelných a bolestivých počitků.⁵

Skladovací funkce- v podkožním vazivu je uložen tuk, který kromě funkce zásobní má i funkci mechanickou a izolační. Jsou zde uskladněny i vitamíny rozpustné v tucích.⁵

Vylučovací funkce je zabezpečena mazovými a potními žlázami. Jejich sekrety- pot a maz- se uplatňují při ochraně kůže, pot svou kyselou reakcí omezuje růst mikroorganismů, a má proto slabé desinfekční účinky.⁵

Resorpční funkce zdravé neporušené kůže jsou poměrně malé. Přes kůži lze vpravovat látky rozpuštěné v tukových rozpouštědlech nebo v tucích, které lze do kůže vtírat. Poškozená kůže (např. popálením) má však velké resorpční schopnosti a organismus může být zaplavován mikroorganismy, které narušují stálost vnitřního prostředí.⁵

3.1.3 Fyziologické faktory, které ovlivňují transdermální aplikaci léčiv

Přítomnost enzymů v kůži

Kůže je metabolicky aktivní orgán, ve kterém probíhají obě fáze metabolických reakcí. Nejvíce enzymů se nachází v epidermis, mazových žlázách a vlasových folikulech. Na povrchu kůže se vyskytující mikroorganismy obsahují též řadu enzymů. Při transdermálním testování pomocí *in vitro* studií dochází ke zkreslení výsledků mimo jiné proto, že se zastaví metabolická aktivita kůže a dále také její schopnost regenerace a chybí imunitní odpověď.⁴

Stáří kůže

Bylo dokázáno, že stratum corneum zůstává během života v podstatě beze změny. Vlhkost lidské kůže klesá s věkem, a protože hydratace kůže ovlivňuje permeaci, je ovlivněno

také transdermální podání léčiva. Předpokládá se však, že existují významnější další faktory, které mění kožní hydrataci. Také krevní průtok kůže klesá s věkem, což má za následek redukci transdermálního fluxu léčiva. Existuje ovšem snaha, aby dermální clearance nebyla limitujícím faktorem v transdermální terapii. Pokusně bylo dokázáno, že stárnutí kůže nemá výrazný efekt na transdermální permeaci vody, estradiolu, kofeinu, methylnikotinátu či kyseliny acetylsalicylové, a tudíž nelze předpokládat velký vliv stárnutí kůže na transdermální podání dalších molekul. Patrný je ovšem rozdíl mezi kůží dospělého člověka a novorozence. Při narození a ještě dalších 3-5 měsíců dosahuje dětská dermis 60% tloušťky dermis dospělého člověka. Tato redukce bariérových vlastností novorozenecké kůže může být prospěšná pro aplikaci léčiv novorozencům, protože perorální terapie je problematická a intravenózní též obtížná. Transdermální aplikace byla úspěšně využita při léčbě novorozenců kofeinem a theofylinem.⁴

Partie těla

Na různých partiích těla můžeme naleznout různou tloušťku kůže. Například stratum corneum je silnější na dlaních, chodidlech a nejslabší na rtech a očních víčkách. Bylo zjištěno, že na některých částech těla s různou silou kůže dochází ke stejné absorpci látek a naopak u partií těla se stejnou tloušťkou je absorpce různá. Pro transdermální aplikaci je nejvhodnější kůže z oblasti genitálií, kde je permeace molekul léčiva nejvyšší. Dále vhodnost partií pro transdermální aplikaci klesá v pořadí hlava a šíje > trup > paže > noha. Například transdermální aplikace testosteronu je velice efektivní při využití kůže z varlat. Skopolamin je zase aplikován na pokožku hlavy, konkrétně do oblasti za uchem.⁴

Rasa

Studie neukazují rozdíly mezi Afričany, Asiaty a Evropany ve ztrátách vody z kůže či ve výsledcích po aplikaci kyseliny benzoové, nikotinu či kyseliny acetylsalicylové. Signifikantní rozdíly mezi rasami jsou v obsahu vody ve stratum corneum a tento rozdíl v hydrataci může mít vliv na rozdílnou absorpci. Zatím je ovšem o této skutečnosti získáno málo dat.⁴

Další faktory

Z dalších faktorů lze zmínit rozdíl mezi pohlavími. Tento rozdíl však není nijak výrazný, pouze u žen jsou nepatrně větší keratinocyty než u mužů. Podstatně důležitější faktor je hydratace stratum corneum. Zvyšováním hydratace se totiž zvyšuje absorpce po transdermálním podání. Proto se jako vhodná strategie jeví aplikace transdermálních léčivých

přípravků s okluzivním efektem. Také zvyšování teploty zvyšuje koeficient difuze permeantu. V klinické praxi je však snaha, aby teplota měla minimální vliv na transdermální aplikaci. Hladinu léčiva v krvi může zvýšit například horečka pacienta, nebo z vnějších příčin slunění či používání různých zdrojů tepla jako je elektrická dečka.^{4,6}

3.1.4 Patologické faktory, které ovlivňují transdermální aplikaci léčiv

U většiny kožních onemocnění je snížena bariérová funkce kůže, což usnadní pasáž léčiva do kůže i přes kůži. Také dochází k vyšším ztrátám vody z těla.⁴

3.2 Transdermální lékové formy

V souvislosti s moderními trendy orientovanými na racionalizaci farmakoterapie, přistoupil v šedesátých letech ke klasickému směru výzkumu v oblasti léků, zaměřenému na vyhledávání a optimalizaci chemických struktur, směr nový. Stále zřetelněji se totiž ukazovalo, že chemická entita léčiva představuje sama o sobě pouze jeden objekt pro výzkum vedoucí k dosažení optimální terapeutické hodnoty léku. Druhou možností představují prostředky a cesty, jakými je léčivo do organismu podáváno. Tato skutečnost vedla k explozivnímu nárůstu poznatků v oblasti lékových forem a v jeho rámci také k návratu pozornosti ke kůži jakožto orgánu absorpce léčiv.⁷

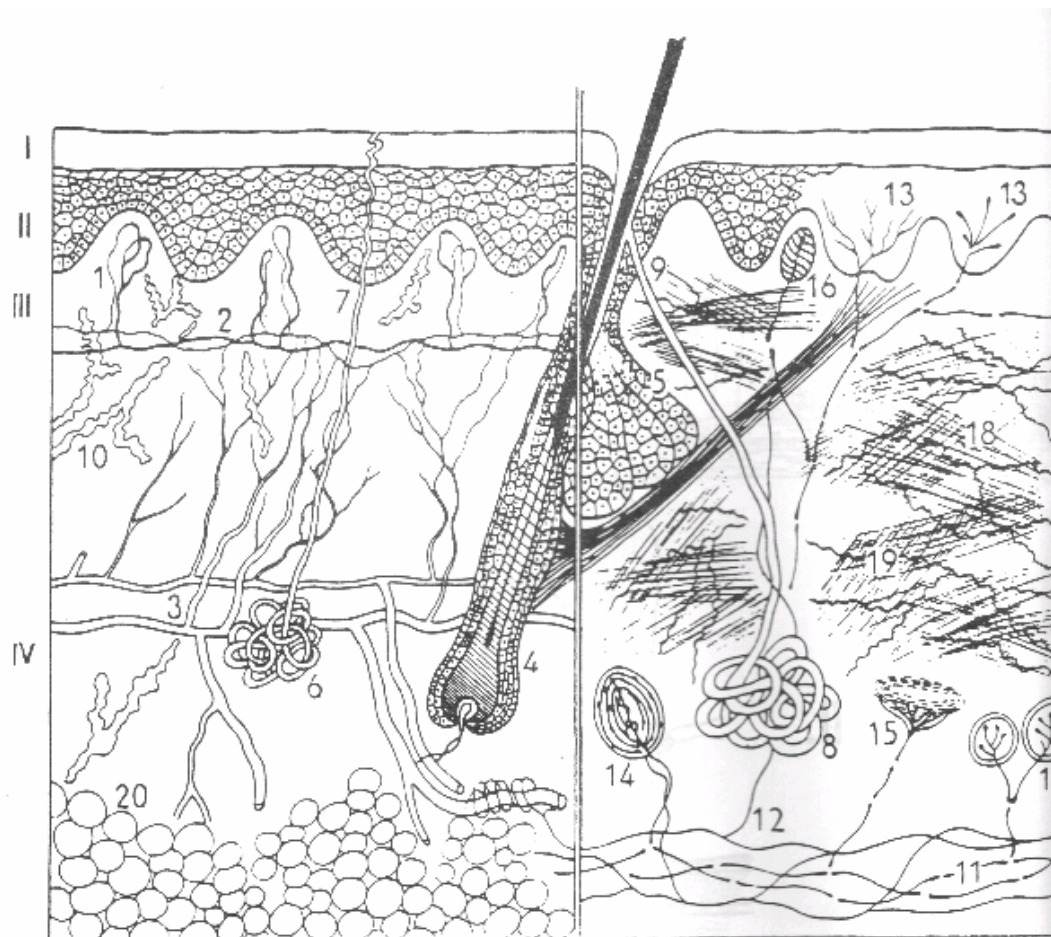
3.2.1 Transdermální aerodisperze

Tyto lékové formy jsou již ve své původní podobě překonány. Pomocí spreje byly po jistou dobu poměrně úspěšně například aplikovány koncem 80. let nitráty.

3.2.2 Polotuhé léčivé přípravky pro transdermální aplikaci

Jedná se o jednoduché přípravky typu masti, krému nebo gelu. Nanášejí se roztíráním na kůži (někdy s následným využitím okluzivního obkladu). Vymezení absorpční plochy a definování kinetiky pasáže takto aplikovaného léčiva přes kůži je u těchto transdermálních léčivých přípravků velmi problematické. Parametry liberace lze obecně řešit optimalizací polarit a viskozity příslušného vehikula. Tímto způsobem se aplikuje např. trinitrát glycerolu pro prevenci anginy pectoris, nebo také ženské hormony či lokální anestetika.⁸

Obr. 2: Struktura kůže²



Schema stavby kůže.

I - epidermis, stratum corneum

II - epidermis, stratum Malpighi

III a IV - corium

1 - kapilární klička

2 - subpapilární síť cévní

3 - hluboká síť cévní

4 - bulbus pili

5 - mazová žláza

6 - malá potní žláza

7 - vývod malé potní žlázy

8 - velká potní žláza

9 - vývod velké potní žlázy

10 - lymfatické cévy

11 - hluboká síť myelinisovaných nervových vláken

12 - nemyelinisovaná nervová vlákna (k cévám, žlázám, hladkému svalstvu, k některým čidlům)

13 - nervová zakončení intraepidermální

14 - corpuscula Vater-Pacini

15 - corpuscula Ruffini

16 - corpuscula Meissneri

17 - corpuscula Golgi-Mazzoni

18 - vazivo

19 - vlákna elastická

20 - podkožní tuková tkáň

3.2 Transdermální lékové formy

V souvislosti s moderními trendy orientovanými na racionalizaci farmakoterapie, přistoupil v šedesátých letech ke klasickému směru výzkumu v oblasti léků, zaměřenému na vyhledávání a optimalizaci chemických struktur, směr nový. Stále zřetelněji se totiž ukazovalo, že chemická entita léčiva představuje sama o sobě pouze jeden objekt pro výzkum vedoucí k dosažení optimální terapeutické hodnoty léku. Druhou možností představují prostředky a cesty, jakými je léčivo do organismu podáváno. Tato skutečnost vedla k explozivnímu nárůstu poznatků v oblasti lékových forem a v jeho rámci také k návratu pozornosti ke kůži jakožto orgánu absorpce léčiv.⁸

3.2.1 Transdermální aerodisperze

Tyto lékové formy jsou již překonány. Pomocí spreje byly například aplikovány nitráty.

3.2.2 Polotuhé léčivé přípravky pro transdermální aplikaci

Jedná se o jednoduché přípravky typu masti, krému nebo gelu. Nanášejí se roztíráním na kůži (někdy s následným využitím okluzivního obkladu). Vymezení absorpční plochy a definování kinetiky pasáže takto aplikovaného léčiva přes kůži je u těchto transdermálních léčivých přípravků velmi problematické. Parametry liberace lze obecně řešit optimalizací polaritativy a viskozity příslušného vehikula. Tímto způsobem se aplikuje např. trinitrát glycerolu pro prevenci anginy pectoris, nebo také ženské hormony či lokální anestetika.⁸

3.2.1 Transdermální náplasti

Transdermální náplasti (Emplastra transcutanea, Transdermal patches) jsou léčivé přípravky aplikované přilepením na zdravou kůži. Obsahují léčiva, která procházejí přes kůži do podkoží ke krevním nebo mízním kapilárám, do nichž se vstřebávají, aby potom působila systémově. Uvolňování léčiva z náplasti má být v principu řízeno vlastnostmi přípravku, nikoliv variabilními vlastnostmi kůže. Náplasti jsou uzpůsobené tak, aby v průběhu aplikačního intervalu přiváděly léčivo do organismu konstantní rychlostí. Je-li uvolňování léčiva z náplasti veličinou, která určuje celou farmakokinetiku podaného léčiva, potom se skutečně dosáhne déletrvajících, vyrovnaných hladin léčiva v krvi.¹

Základními součástmi transdermálních náplastí jsou: *krycí vrstva*, která chrání *vrstvu obsahující léčivo*. Krycí vrstva je pro léčivo nepropustná a může být propustná pro plyny.

Další součástí je *ochranná folie*, která se odstraňuje před nalepením náplasti a během skladování chrání formulaci.

Jednotlivé typy transdermálních náplastí byly popsány v teoretické části mé diplomové práce.⁹

3.3 Možnosti zvýšení transdermální absorpce léčiv

Při transdermálním podání vstupují molekuly do kůže intercelulárně, transcelulárně a transfolikulárně. *Intercelulárně* znamená přes lipidickou matrix kůže a přes póry, které zde vznikly při průchodu elektrického proudu. *Transcelulární* vstup není tak častý a znamená přestup přes korneocyty. *Transfolikulárně* znamená přes vlasové folikuly a potní žlázy.^{10,11}

Transdermální aplikace je pro převážnou většinu účinných látek jako takových limitována přirozenými bariérovými vlastnostmi kůže. Proto jsou používány různé přístupy umožňující transdermální absorpci účinných látek reverzibilně zvýšit. Zahrnují například využití okluze, manipulace s polaritními vlastnostmi vehikul, iontoforézu, sonoforézu a především využití akceleračních kožní absorpce neboli urychlovačů transdermální penetrace, respektive permeace.⁸

3.3.1 Iontoforéza

Iontoforéza je jednou z technik používaných k usnadnění transdermální absorpce léčiv. Hlavní bariérou transdermální absorpce léčiv je stratum corneum. Tato vrstva kůže má vysoký obsah lipidů a malý obsah vody. Proto má stratum corneum vysoký elektrický odpor, který je nepřímo úměrný obsahu vody v této vrstvě. Elektrický odpor však dramaticky klesá při aplikaci proudu o napětí 0,1-2,0 V. Iontoforéza využívá stejnosměrného elektrického proudu, při kterém se zvýší transdermální flux nabitých částic. Bylo zjištěno, že při této metodě je usnadněna transdermální aplikace kationů, anionů ale také nenabitých částic. Při iontoforéze mohou být změněny některé vlastnosti kůže.

Elektromigrace je metoda, založená na principu, že stejně nabitě částice se odpuzují, opačně nabitě přitahují. To znamená, že pokud chceme aplikovat záporně nabitě léčivo, pak je toto léčivo umístěno pod záporně nabitou elektrodu (katodu), od které je odpuzováno a jinde na těle umístěná kladně nabitá elektroda (anoda) léčivo naopak přitahuje.^{10,11}

Elektroosmóza využívá pohybu rozpouštědla, které je „elektricky“ taženo v elektrickém poli. Rozpouštědlo s sebou může táhnout i nenabitě částice.¹⁰

Faktory ovlivňující výsledek iontoforézy: ¹¹

- faktory související s vlastnostmi léčiva jsou: molekulová hmotnost, náboj a koncentrace.
 - faktory související s vlastnostmi formulace: typ rozpouštědla, přidaný pufr, pH, viskozita, výskyt dalších iontů
 - faktory související s přístrojovým vybavením: typ elektrod, rozsah proudu, použití stejného nebo pulzního proudu
 - faktory související s biologickými rozdíly: rozdílná část těla, regionální krevní zásobení, věk, pohlaví
- další faktory: teplota kůže, délka iontoforézy

Kontraindikace pro iontoforézu:

Použití iontoforézy je kontraindikováno u pacientů s implantáty citlivými na elektrický proud (např. kardiostimulátory), přecitlivělost na aplikované léčivo a u pacientů s poškozeným kožním povrchem. ¹¹

3.3.2 Elektroporéza

Tato metoda využívá elektrického pole k vytvoření mikroskopických pórů v biologické membráně. Jejich přítomnost dovolí iontům, molekulám a vodě prostup membránou. Elektrické póry jsou lokalizovány nejvíce v blízkosti elektrod. Pokud má elektrický pulz dobré parametry, vznikne pór během jedné mikrosekundy a jeho uzavření trvá několik minut. Některé buňky bývají vůči elektroporéze citlivější než ostatní. Pokud způsobí nevhodně zvolený elektrický pulz vznik velkých pórů, buňka není schopna defekt odstranit a dojde k jejímu zničení. ¹²

K tvorbě elektropórů dochází na rozhraní lipofilních a hydrofilních složek membrány interakcí dipólů molekul vody s elektrickým polem. Vzniklé póry jsou hydrofilní, lemované fosfolipidy. Elektroporéza nalézá uplatnění při podání DNA v onkologii a genové terapii, při vakcinaci a při systémovém podání léčiv. Takto lze transdermálně aplikovat i léčiva o vysoké molekulové hmotnosti. ¹³

3.3.3 Sonoforéza

Sonoforéza je metoda, která využívá vln ultrazvuku k tvorbě dočasných mikroskopických vodních kanálků v kůži. K jejich tvorbě dochází díky redukcii hustoty intercelulárních lipidů. Působením ultrazvuku o optimální frekvenci 20-25kHz (tedy nízké frekvenci) dochází k otevření intercelulárních cest a to umožňuje penetraci substancí o vysoké molekulové hmotnosti. Mechanismus účinku ultrazvuku spočívá v kombinaci několika efektů,

jako je kavitace, mikromechanické a termické účinky. Použití sonoforézy je bezpečné a další výhodou je možnost kombinovat sonoforézu s iontoforézou, čímž se efekt násobně zvyšuje.¹⁴

Použití sonoforézy je výhodné díky bezbolestnému použití, při kterém nehrozí poškození kůže. Může pouze dojít k mírnému zahřátí tkáně. Použití sonoforézy nalézá uplatnění např. při aplikaci inzulínu, kde je další výhodou to, že tuto metodu lze kombinovat s technikou, která díky senzorům monitoruje hladinu glukózy v organismu, a tím pacientovi odpadá nepříjemná povinnost měření hladiny glukózy.¹⁵

3.3.4 Látky modifikující transdermální permeaci

Akceleranty transdermální penetrace jsou poměrně novou skupinou farmaceutických pomocných látek. Slouží k usnadnění hluboké permeace léčiv přes kůži do přilehlých tkání, nebo k systémovému podání léčiv po jejich přechodu přes kůži do krevního či lymfatického oběhu.¹⁶

Transdermální aplikace je vzhledem ke značným bariérovým vlastnostem nepoškozené, intaktní kůže pro většinu léčiv poměrně obtížná. Ačkoliv pokusy o její terapeutické využití, například za použití látek lokálně dráždivých a místně prokrvujících, jsou známé již několik desítek let, teprve koncem 70. let, s nástupem poznatků z oblasti urychlovačů transdermální penetrace, začal být tento problém do značné míry zvládnutelný.¹⁶

V zásadě existuje několik rozdílných způsobů urychlení průchodu léčiva přes kůži. V současné době je běžné využití keratoplastik (močovina, salicylová kyselina), lokálního prokrvení kůže (deriváty kyseliny nikotinové), aplikace pomocí náplastí a nepropustných bandáží, optimalizace koncentračního spádu difuzibilní formy léčiva, malých inkluzních útvarů s obsahem léčiv (lipozómy, apod.) a tvorba lipofilních solí či lipofilních proléčiv.

Urychlovače, neboli akceleranty transdermální penetrace, představují další alternativu. Jejich úkolem je reverzibilně snížit bariérové vlastnosti kůže a umožnit průnik léčiva přes kůži v předem odhadnutelném množství a čase, což znamená kvalitativní posun ve srovnání se zmíněnými keratoplastiky či derivancii. Proto se akceleranty penetrace brzy staly bouřlivě se rozvíjející skupinou látek, která nachází využití při tvorbě topických a transdermálních léčivých přípravků. Na jejich vlastnosti jsou kladeny vysoké nároky. Stejně jako ostatní pomocné farmaceutické látky musí být nedráždivé, netoxické, a nealergizující a nesmějí mít vlastní farmakologickou aktivitu. Nástup jejich akceleračního účinku by měl být navíc rychlý, po odstranění léčivého přípravku musí dojít k rychlé obnově bariérových vlastností kůže, urychlení přestupu léčiva musí být pouze jednosměrné. Ideální akcelerační látka pak samozřejmě musí být kompatibilní s léčivem a ostatními součástmi léčivého přípravku, v neposlední řadě by

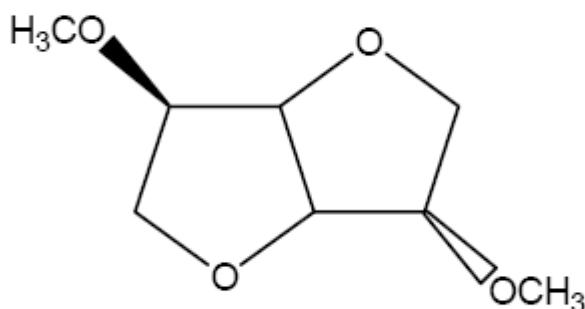
také měl být levný. Všechny dosud používané akceleranty uvedeným požadavkům vyhovují jen částečně.¹⁶

Mechanismus účinku akceleraantů není v současné době spolehlivě objasněn. Vzhledem k tomu, že se jedná o chemicky nejednotnou a velmi různorodou skupinu látek, je působení urychlovačů pravděpodobně založeno na jejich nesespecifických interakcích se strukturami kůže.¹⁶ Předpokládané mechanismy účinku transdermálních enhancerů jsou zmíněny v mé diplomové práci.⁹

3.3.4.1 2,5-dimethyl isosorbid, Arlasolve DMI

Látka 2,5-dimethyl isosorbid (dále jen arlasolve) je bezbarvá kapalina s jemným zápachem. Při dotyku způsobuje pocit sucha. Tato látka nalézá své uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu jako šetrné, neškodné rozpouštědlo. Arlasolve je mísitelný s vodou, většinou organických rozpouštědel a s neionogenními tenzidy. Je pH stabilní. Využívá se jako emolient kůže a jako transdermální enhancer. Modifikace transdermální penetrace spočívá v penetraci Arlasolve do stratum corneum, kde způsobí, že se tato lipofilní vrstva kůže stane polárnější, což je vhodné pro transdermální aplikaci hydrofilních substancí. Důležité je, že Arlasolve neirituje kůži. S oblibou je využíván ve formulacích transdermálních přípravků, přípravků k léčbě akné, v zubních pastách, antiperspirantech, vitamínových očích přípravcích, přípravcích proti stárnutí a samoopalovacích prostředcích.^{17, 18}

Obr. 3: Struktura 2,5-dimethyl isosorbidu (arlasolvu DMI)¹⁷



3.3.4.2 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol (*Transcutol P*)

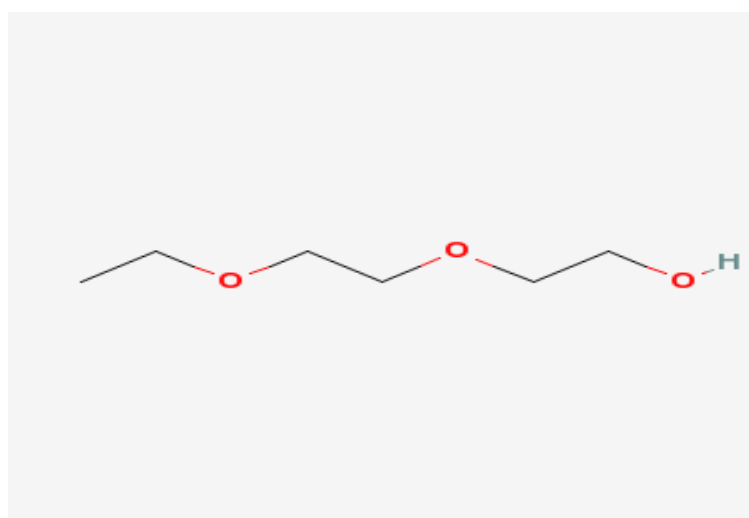
Látka 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol (dále jen transcutol) je permeační enhancer, který zvyšuje rozpustnost látek ve stratum corneum. Jako permeační enhancer je používán často v kombinacích, např. s azonem či propylenglykolem, protože dochází k synergismu jejich účinku.^{19, 20}

Byl u něj objeven antiproliferativní účinek, a transcutol zvyšuje antiproliferativní účinek xantinů. Z toho plyne jeho možné použití v léčbě hyperproliferativních onemocnění kůže.²¹

Obsah transcutolu v topických přípravcích s cyklosporinem A (k léčbě autoimunitních chorob) způsobuje vznik depozit tohoto imunopresiva ve stratum corneum a jeho průnik do hlubších vrstev kůže.²²

Transcutol je též využíván v perorálních formulacích s cyklosporinem A, kde slouží jako kotenzid.²³ Tento enhancer nachází i další uplatnění v perorálních formulacích s léčivými špatně rozpustnými ve vodě, kde zvyšuje jejich biologickou dostupnost.²⁴

Obr. 4: Struktura 2-(2-ethoxyethoxy)ethanolu (transcutolu)²⁵



3.4 Cyklosporin A

Cyklosporin je polypeptid využívaný při transplantaci orgánů, v terapii autoimunitních chorob, v dermatologii k léčbě psoriázy a atopické dermatitidy a také v oftalmologii.

3.4.1 Imunosupresiva

3.4.1.1 Imunitní systém

Jako imunitní systém je označován systém, který ochraňuje hostitele před poškozením patogeny, a tím brání vzniku nemoci. Při jeho optimální funkci dochází k eliminaci patogenů, a přitom schopnost rozeznat vlastní antigeny zůstává zachována. Ochrana před infekcí a nemocí je uskutečňována dvěma hlavními složkami- vrozenými a adaptivními (získanými) složkami. Je-li vrozená imunitní odpověď k překonání infekce nedostatečná, mobilizuje se adaptivní imunitní systém. Adaptivní imunitní systém má řadu rozpoznávacích charakteristik, které přispívají k úspěšnému vyloučení patogenů. Patří k nim schopnost: (1) reagovat na rozličné antigeny, na každý specifickým způsobem; (2) rozlišit mezi cizími, „nevlastními“ antigeny a „vlastními“ antigeny hostitele; a (3) pamatovat si antigeny, se kterými se setkal dříve, a při opakování kontaktu s nimi tak zajistit účinnou specifickou odpověď. Adaptivní odpověď vrcholí tvorbou protilátek, které jsou efektorové humorální imunity, a aktivací lymfocytů, jež jsou efektorovými buňkami imunity zprostředkované. Pro vznik specifické imunity je nutná účast antigenních buněk, jako jsou makrofágy, dendritické buňky, Langerhansovy buňky a B-lymfocyty. Tyto buňky hrají základní úlohu v imunitní odpovědi; rozrušují antigen, vzniklé odvozené peptidy se vážou na receptory T-buněk, které mají vztah s I. a II. třídou proteinů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Aktivace T-lymfocytů je závislá na spolupráci ostatních spolustimulujících molekul rozpoznávajících receptory na antigenních buňkách. Kromě rozpoznání antigenu je pro aktivaci lymfocytů nutná i stimulace pomocí cytokinů.²⁶

3.4.1.2 Makrolidová imunosupresiva

Cílem terapie imunosupresivy je potlačit nežádoucí imunitní odpověď. Hlavní indikací pro imunosupresi je léčba autoimunitních nemocí, prevence Rh hemolytické nemoci novorozenců a orgánová transplantace. K tomu, aby bylo možné transplantovat tkáň z jednoho jedince na druhého, je nezbytné potlačit normální imunitní odpověď příjemce, a tím zabránit rejekci, čili vypuzení „cizí“ tkáně.²⁶

Širšímu použití imunosupresivních látek brání řada omezení. Jedním z nich je zvýšené riziko infekcí všech typů (nejen obvyklých bakteriálních, virových a mykotických onemocnění, ale i poměrně neobvyklých, vzácně se vyskytujících infekcí). Dalším omezením

obecného použití těchto látek je zvýšené riziko vzniku lymfomů a příbuzných malignit, které byly po transplantaci zjištěny.²⁶

Do klinické praxe se dostalo již několik preparátů biologického původu, které se uplatňují působením na nitrobuněčné molekuly některých imunokompetentních buněk - imunofyliny. Jejich prostřednictvím je možno poměrně selektivně ovlivnit funkci hlavně lymfocytů T, v menší míře i některých dalších buněk- lymfocytů B, monocytů, granulocytů. Jako první se do praxe dostal cyklosporin A - přípravek izolovaný z houby *Tolypocladium inflatum*. Nově se dostávají do praxe takrolimus izolovaný z houby *Streptomyces tsukubaensis* a pimekrolimus ze *Streptomyces ascomyceticus*. V experimentech se používá k imunosupresi v trasplantologii i sirolimus (rapamycin).²⁷

Takrolimus je vysoce účinné imunosupresivum. Uplatňuje se imunosupresivně podobně jako cyklosporin A tak, že potlačují produkci interleukinu IL-2 a blokují rozvoj zánětlivé imunitní reakce. Protože má takrolimus mnohem menší molekulu, má mnohem větší potenciál pro lokální průnik.²⁷ U takrolimu je oproti cyklosporinu A redukován nepříznivý efekt na spektrum lipidů v organismu, renální funkci a na rozvoj hypertenze.²⁸

3.4.2 Cyklosporin- aktualizované informace

Souhrnné informace o cyklosporinu lze najít v mé diplomové práci.⁹ Zde se snažím shrnout zajímavé informace, které byly nově o cyklosporinu publikovány.

O cyklosporinu bylo zjištěno, že při krátkodobé aplikaci jeho nízkých dávek dochází k zástavě růstu buněk, při dlouhodobém podávání jeho vysokých dávek již nastává apoptóza a dochází k nekróze buněk.²⁹

Cyklosporin je substrátem cytochromu P450 a P-glykoproteinu, což vede k častým interakcím, například i s potravou. Pro zajímavost lze uvést grapefruitový džus, který zvyšuje biologickou dostupnost cyklosporinu a tím i jeho hladinu v organismu.³⁰

Při transplantacích srdce byl objeven srovnatelný vliv nízkých dávek cyklosporinu s účinkem derivátu vitamínu E- α -tocopheryl polyethylene glycol-100 succinate, který představuje zajímavou látku v transplantační medicíně.³¹

Cyklosporin je sice významným imunosupresivem, ale léčba cyklosporinem s sebou přináší řadu nežádoucích účinků, z nichž nejčastější a nejzávažnější je nefrotoxicita. Tento nežádoucí účinek se snaží vědci nejrůznějšími způsoby redukovat. Vhodná se jeví kombinace cyklosporinu s α -lipoovou kyselinou, která působí antioxidantně. Tím je redukován oxidační stres způsobený cyklosporinem a tím i nefrotoxicita.³² Další možností snížení tohoto nežádoucího účinku je kombinace cyklosporinu s propionylkarnitinem. Tato látka redukuje

peroxidaci lipidů a opět i nefrotoxicitu.³³ Jako slibné se jeví použití kombinace kyseliny mykofenolové s agonistou receptoru pro sfingosin-1-fosfát. Tato terapie s sebou nese nižší riziko nefrotoxixity a vaskulopatií, které jsou při léčbě cyklosporinem běžné.³⁴

Zajímavou možností pro oční aplikaci cyklosporinu se zdá být použití nanočástic s cyklosporinem. Nanočástice jsou tvořeny z modifikovaného chitosanu, konkrétně chitosanu, na jehož 100 anhydroglukosaminových jednotek připadá 1,7-4,7 cholesterolových skupin.³⁵

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy	Sartorius, Göttingen
Dávkovací ventil D	Ecom, Praha
Dávkovací ventil Rheodyne model 7125	Cottati, California
Digitální pH-metr BT 120	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod
Digitální váhy	Kern, Albstadt
Vysokotlaké čerpadlo	Ecom, Praha
Lednička s mrazničkou Ardo	Ardo, Itálie
Liberační zařízení	FaF UK, Hradec Králové
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble
UV-VIS detektor V4	Isco, Lincoln
Kolonový termostat LCO 101	Ecom, Praha

4.2 Použité suroviny

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Praha
Dimethylisoborbid (arlasolve (DMI)	Unichema, Bratislava
Azid sodný	Fluka, Buchs
Bílá vazelína	Kulich, Hradec Králové
Cyklosporin A, (CyA) (č.š. 14011CC0042019491)	IVAX/Galena, Opava
Isopropylmyristát, (IPM)	Merk, Schuchardt
Kyselina chlorovodíková 36%	Lachema, Neratovice
1-methyl-2-pyrrolidon, (MP) (č.š. 294166 1289)	Fluka, Buchs
Propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
Transcutol	Unichema, Bratislava
Transkarbam 12*, (T12)	FaF UK, Hradec Králové*
Tromethamol (TRIS-pufr)	Sigma-Aldrich, Praha
Voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové

Uvedené suroviny odpovídaly jakosti podle norem stanovených výrobcem, resp. dodavatelem.
*Transkarbam 12 byl syntetizován doc. PharmDr. Alexandrem Hrabálkem, CSc. na katedře anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové.

4.3 Testované vzorky

V *in vitro* permeační studii byly jako donorové vzorky použity 0,15% disperze CyA ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (tromethamolem) v poměru 1:1. Tato fáze měla také další výhodu v tom, že je díky ní zajištěno pH vhodné pro působení enhanceru transkarbam 12. Disperze byly zvoleny záměrně tak, aby i po průniku části CyA kůží byla donorová fáze neustále nasycena léčivou látkou. Některé vzorky byly dále obohaceny o permeační enhancery v předem zvolených koncentracích.

Příprava TRIS-pufru pH 7,1 pro permeační pokusy:

Složení:

TRIS pufr (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	24,00g
azid sodný	0,02g
kyselina chlorovodíková 36%	q.s.
ultračistá voda	975,98g

Postup přípravy:

Po navážení daného množství azidu sodného (konzervační přísada) a TRIS-pufru se obě substance rozpustí v předepsaném množství ultračisté vody za použití magnetické míchačky.

Roztok se ponechá na magnetické míchačce a pomocí kalibrovaného pH-metru měříme pH a přidáváním 36% kyseliny chlorovodíkové upravíme hodnotu pH na 7,1.

Pufr se uchovává v chladničce při 5°C a před každým použitím se vždy změří a případně upraví jeho pH.

Složení vzorků:

0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)

cyklosporin A	0,015g
směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)	9,985g

0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)

s 1% obsahem transkarbamu 12

cyklosporin A	0,015g
transkarbamu 12	0,100g
směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)	9,885g

0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)

s 5% obsahem arlasolve DMI

cyklosporin A	0,015g
arlasolve DMI	0,500g
směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)	9,485g

0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)

s 5% obsahem methylypyrrolidonu

cyklosporin A	0,015g
1-methyl-2-pyrrolidon	0,500g
směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)	9,485g

0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)

s 5% obsahem transkutolu

cyklosporin A	0,015g
transkutol	0,500g
směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1)	9,485g

10% disperze cyklosporinu A v IPM

cyklosporin A	1,0g
izopropylmyristátu	9,0g

Postup přípravy:

V kádince jsem smísila CyA se směsí propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1), případně také s uvedenými enhancery. Stejně jsem postupovala u 10% disperze CyA v IPM, kde se jednalo pouze o jiné rozpouštědlo. Roztok jsem nechala míchat na magnetické míchače zahřívané na 50°C přibližně 30 minut.

4.4 Biologický materiál

Ve studii jsem použila vzorky prasečí kůže z oblasti zevní strany ušního boltce, které byly odpreparovány pomocí skalpelu. Dále byla kůže depilována, očištěna fyziologickým roztokem a ošetřena roztokem azidu sodného. Vzorky byly zataveny do polyethylenové folie a uchovávány v mrazničce při -20°C .

4.5 Výběr akceptorové fáze

Pro malou rozpustnost cyklosporinu A ve vodě byla zvolena jako akceptorová fáze směs propylenglykolu s TRIS-pufrem (tromethamolem) v poměru 1:1.

4.6 Uspořádání permeačních pokusů

Jednotlivé vzorky kůže se fixují mezi dvě destičky z plexiskla. Obě destičky mají uprostřed kruhový otvor o ploše přibližně 2 cm^2 . Destička, která je umístěna na vnějším povrchu kůže, je silnější. Do jejího otvoru se aplikuje 0,5 ml testovaného vzorku. Je nutno předem obě destičky namazat adhezivním silikonovým filmem, aby byly dobře utěsněny všechny spoje. Po nanesení vzorku se vrchní destička přikryje krycím sklíčkem. K vrchní destičce se připojí donorová část permeační cely a ke spodní akceptorová část cely. Obě části cely se spojí pomocí gumiček. V pokusech byly použity modifikované permeační cely dle Franze. Akceptorová část buňky se naplní akceptorovou fází (TRIS-pufrem o pH 7,1 s obsahem 0,2% azidu sodného a propylenglykol v poměru 1:1). Tato část cely se umístí do vodní lázně, která je pomocí termostatu temperována na 37°C . Akceptorová fáze je kontinuálně míchána pomocí magnetických míchadel.

Pro zjištění množství léčiva prošlého kůží se odebírá akceptorová fáze (dále v textu, tabulkách a grafech značena **P**), ze které byl CyA stanovován.

4.7 Provedení strippingu

Předmětem zájmu bylo také množství léčiva, jaké se deponovalo do jednotlivých vrstev kůže. K tomuto účelu byla použita metoda strippingu. Její konkrétní provedení spočívalo ve využití proužků lepicí pásky, které se nalepují na exponovanou plochu kůže, která byla předem odmaštěna pomocí acetonu. Plocha exponované kůže byla 2 cm^2 . Lepicí páska se přiloží ke kůži, na ni se položí závaží o hmotnosti 1 kg a po 10 sekundách se závaží

odstraní a lepicí páska se s kůže strhne pomocí pinzety. Tato činnost byla opakována u každého vzorku dvacetkrát. První dva proužky lepicí pásky jsme k hodnocení nevyužili, protože se na ně dostanou pouze látky s povrchu kůže. Pomocí dalších osmi lepicích pásek se s kůže odstraní část rohové vrstvy, nazývaná stratum desquamans a část stratum compactum (v dokumentaci permeačních pokusů značena **SC**). Posledních deset proužků lepicí pásky slouží ke stržení hlubších vrstev epidermis (v dokumentaci permeačních pokusů značena **E**). Zbylá část kožního vzorku představovala převážně dermis a je značena písmenem **D**.

Z každého vzorku kůže tedy byly získány tři části: prvních osm lepicích pásek bylo přeneseno do jedné skleněné lahvičky, dalších deset proužků lepicí pásky do druhé a zbytek kůže značený písmenem **D** byl umístěn do třetí lahvičky. Do každé lahvičky bylo přidáno 10,0 ml směsi acetonitrilu a ultračisté vody v poměru 3:1. Po třiceti minutách byly lepicí pásky pomocí pinzety vyjmuty, aby se z pásek nevyluhovaly látky, které by následně rušily stanovení CyA. Vzorek dermis byl ve vyluhovací směsi ponechán, protože riziko vyluhování rušivých látek nehrozilo.

4.8 Stanovení cyklosporinu A

Pro stanovení CyA byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s těmito parametry:

Detekce: spektrofotometrická při 220 nm

Kolona: LiChroCART®, s náplní Purospher® STAR RP-18 o velikosti částic 5µm

Předkolona: LiChroCART® (Merck) o průměru 4nm

Mobilní fáze: acetonitril - 0,04M KH₂PO₄ v poměru 3:1

Průtok: 1,5ml/min.

Tlak: 5,8 MPa

Teplota: 70°C

Objem nanášeného vzorku: 200µl (dávkovací smyčka)

Před použitím každé nové mobilní fáze bylo nutno provést odplynění na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

Kalibrace

Pro stanovení CyA z akceptorové fáze či z výluhů získaných po strippingu byla připravena řada kalibračních roztoků a následně proměřena kalibrační křivka.

Příprava kalibračních roztoků:

Základní roztok CyA byl připraven navážením 10,0 mg CyA a jeho rozpuštěním ve 100 ml směsi TRIS-pufry s 0,2% azidu sodného a propylenglykolu v poměru 1:1. Tím jsem získala roztok CyA o koncentraci 10 mg/100ml.

Další roztoky byly připraveny naředěním základního roztoku tak, aby jejich koncentrace byla 5; 2,5; 1 a 0,5 mg/100 ml.

Každý roztok dané koncentrace byl stanovován pomocí HPLC 5krát. Z výsledků byla pomocí lineární regrese sestrojena kalibrační přímka.

Byla získána rovnice kalibrační křivky v lineárním tvaru :

$$AUC = 2973 \cdot c$$

kde: AUCplocha pod křivkou píku CyA

c.....koncentrace CyA (mg/100ml)

Príslušný korelační koeficient R lineární regrese činil: R = 0,9994

4.9 Zpracování údajů z permeačních měření

Data získaná při stanovení CyA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie z akceptorové fáze a z jednotlivých kompartmentů kůže byla přepočtena pomocí rovnice kalibrační křivky na koncentraci c (mg/100ml). Tyto číselné údaje byly dále přepočteny na množství Q ($\mu\text{g}/10\text{ml}$), které bylo obsaženo v 10,0 ml extrakční směsi acetonitrilu s ultračistou vodou v poměru 3:1. Protože bylo stanovení každého vzorku prováděno třikrát, byly jednotlivé hodnoty Q přepočteny na příslušné průměry a tyto průměrné hodnoty byly přepočteny na relativní procenta. Součet průměrů Q ($\mu\text{g}/10\text{ml}$) ze stratum desquamans a části stratum compactum (**SC**), hlubších vrstev epidermis (**E**), dermálního kompartmentu (**D**) a akceptorové fáze (**P**) jednotlivých vzorků činil 100 procent. Všechny tyto hodnoty jsou shrnuty v podobě tabulek v části **5. Výsledky** Hodnoty relativních procent byly pro znázornění distribuce CyA v příslušných kožních etážích využity k sestavení grafů, které jsou prezentovány v části **6. Diskuse**.

5. VÝSLEDKY

Tab. 5. 1: Procentuální distribuce CyA prasečí kůží po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1), bez enhanceru

	SC	E	D	P
vzorek č.1	43	18	34	4,0
vzorek č. 2	28	15	57	0,0
vzorek č. 3	13	16	70	1,2
průměr	28,0	16,3	53,7	1,7
SEM	15	2	18	2

Tab. 5. 2: Procentuální distribuce CyA prasečí kůží po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 1 % T12

	SC	E	D	P
vzorek č.1	30	4	29	36,0
vzorek č. 2	12	6	71	12,0
vzorek č. 3	10	8	80	2,0
průměr	11,0	7,0	75,5	7,0

Tab. 5. 3: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % **A-DMI**

	SC	E	D	P
vzorek č.1	15	5	55	25,0
vzorek č. 2	6	14	63	8,0
vzorek č. 3	4	4	75	17,0
Průměr	8,3	7,7	64,3	16,7
SEM	5,9	5,5	10,1	8,5

Tab. 5. 4: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % **MP**

	SC	E	D	P
vzorek č.1	6	59	29	6,0
vzorek č. 2	11	11	75	1,4
vzorek č. 3	9	33	57	1,0
Průměr	8,7	34,3	53,7	2,8
SEM	2,5	24,0	23,2	2,8

Tab. 5. 5: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % **TL**

	SC	E	D	P
vzorek č.1	22	6	58	14,0
vzorek č. 2	9	17	72	2,0
vzorek č. 3	11	12	77	0,4
Průměr	14,0	11,7	69,0	5,5
SEM	7,0	5,5	9,8	7,4

Tab. 5. 6: Porovnání hodnot Q **CyA** ($\mu\text{g}/10\text{ml}$) v případě hydrofilní a lipofilní donorové fáze

vzorky	SC		E		D		P	
	hydrofilní donorová fáze	lipofilní donorová fáze	hydrofilní donorová fáze	lipofilní donorová fáze	hydrofilní donorová fáze	lipofilní donorová fáze	hydrofilní donorová fáze	lipofilní donorová fáze
bez enhanceru	65,0	121,0	46,0	67,0	169,0	288,0	3,7	3,0
s 1% T12	63,5	387,7	52,0	93,3	510,5	899,7	17,5	3,7
s 5% MP	18,7	306,3	60,7	143,3	124,0	600,7	3,7	8,7

Tab. 5. 7: Procentuální distribuce **CyA** prasečí kůží po zvolených časových intervalech z 10% disperze cyklosporinu A v IPM, bez enhanceru

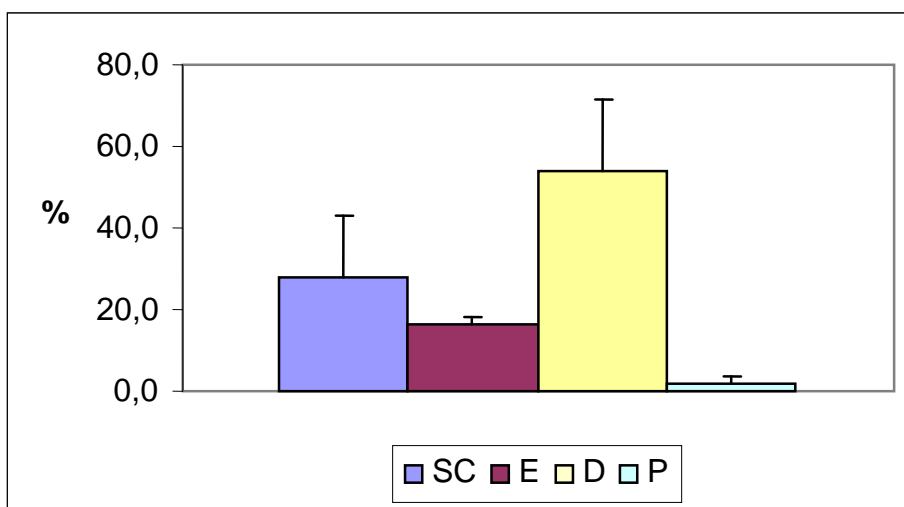
délka časového intervalu (hodiny)	SC	E	D	P
4,5	30,7	17,7	52,0	0,3
12,0	26,0	12,3	61,0	0,8
15,0	15,0	11,5	73,0	0,8
18,0	23,0	12,0	65,3	0,2
24,0	21,7	15,7	62,7	0,1

6. DISKUSE

Stanovení CyA v akceptorové fázi permeačních pokusů bylo dobře proveditelné. Při strippingu jsem využila lepicí pásku Scotch® firmy 3M, se kterou jsem měla dobré zkušenosti při dřívějších experimentech.⁹ Každý donorový vzorek byl testován paralelně pomocí tří permeačních cel. Naměřené údaje jsou v souhrnné podobě tabelárně uvedeny v části **5.Výsledky**. Pro potřeby diskuse budou postupně prezentovány v názornější grafické podobě. Poměrné rozložení CyA v jednotlivých etážích kůže tak ukazují **grafy 6.1 až 6.5**.

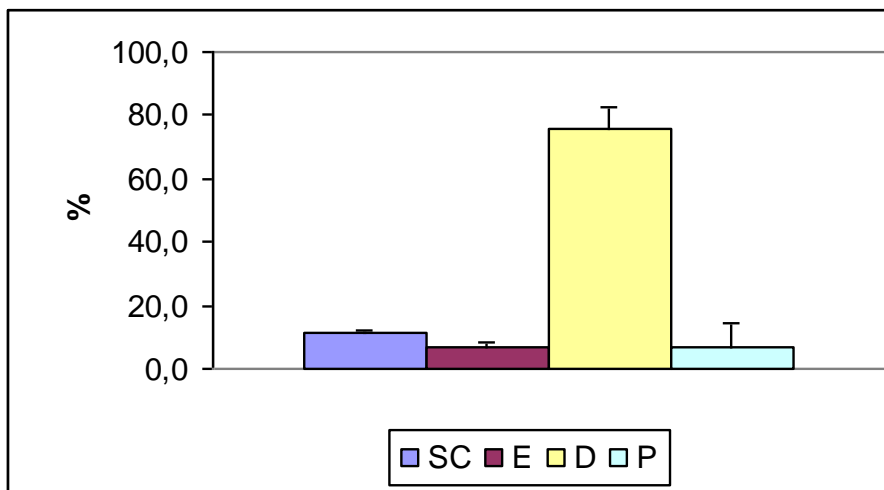
Z **grafu 6.1** je patrné, že po 12 hodinové expozici donorovým vzorkem zůstala více jak jedna čtvrtina CyA zachycena v SC, tedy v odlupující se části rohové vrstvy kůže. Menší díl zůstal zachycen v epidermálním kompartmentu E a více jak polovina pronikla do dermis (D). V akceptorové kapalině pod kůží byla nalezena přibližně 2% z celkově absorbovaného množství léčiva.

Graf 6.1: Procentuální distribuce CyA prasečí kůži po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1), bez enhanceru



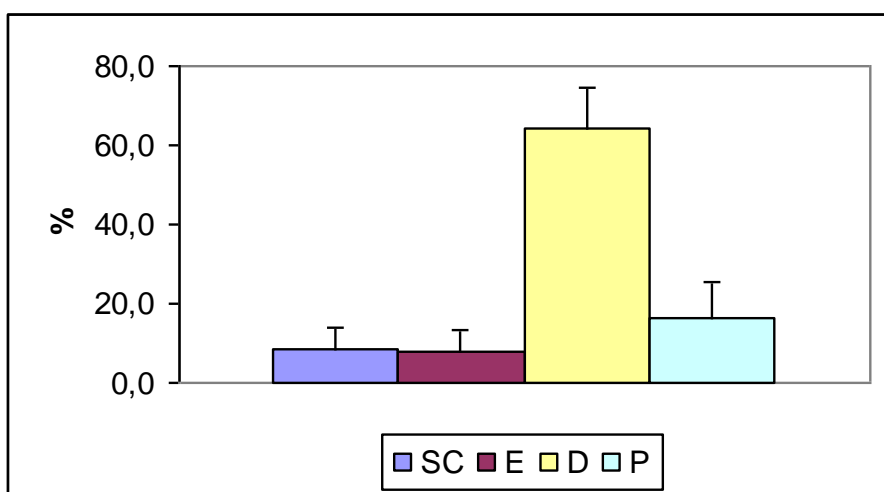
V **grafu 6.2** vidíme, že množství CyA zachycené v SC a E je značně menší oproti předchozímu grafu. Přídavek enhanceru T12 jasně zvýšil průnik CyA do dermis, konkrétně se v dermální vrstvě nacházelo více jak 75% CyA. Obsah CyA v D kompartmentu byl v rámci provedené studie nejvyšší. Přídavek transkarbamu 12 také zvýšil průnik CyA do akceptorové fáze.

Graf 6.2: Procentuální distribuce CyA prasečí kůži po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 1 % T12



Z grafu 6.3 je opět patrné, že přidavek enhanceru, v tomto případě arlasolve DMI, zvýšil průnik CyA do dermální vrstvy. Oproti enhanceru transkarbamu však navíc zvyšuje i průnik CyA do akceptorové fáze. Do kompartmentu P proniklo téměř 17% CyA, což je v rámci této studie nejvyšší hodnota.

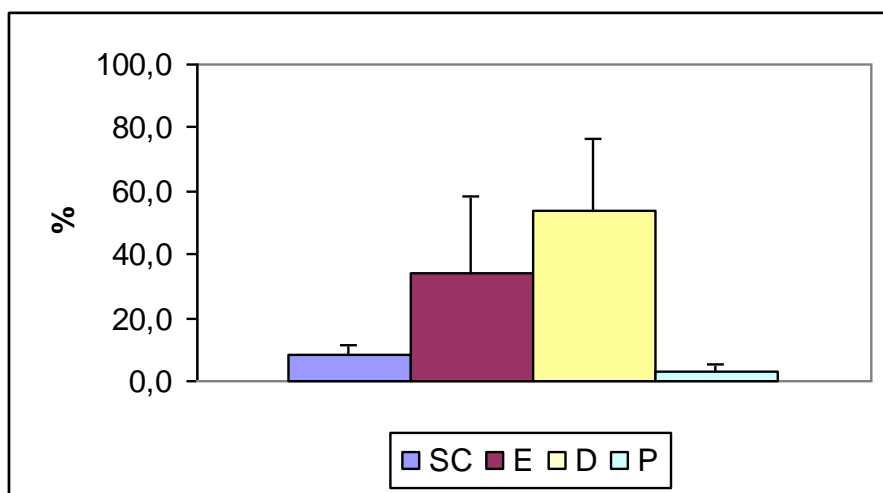
Graf 6.3: Procentuální distribuce CyA prasečí kůži po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % A-DMI



Graf 6.4 zachycuje výsledky permeačních pokusů po aplikaci vzorku s přidavkem enhanceru methylpyrrolidonu. Methylpyrrolidon zvyšuje průnik CyA do epidermálního

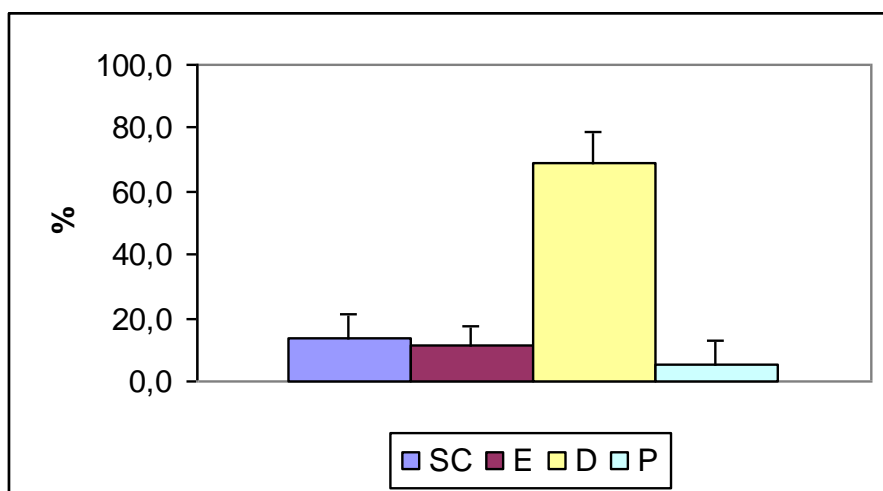
a dermálního kompartmentu. V kompartmentu E byla nalezena třetina množství CyA a v kompartmentu D více jak polovina množství tohoto léčiva. Methylpyrrolidon v tomto případě nijak výrazně průnik do akceptorové fáze nezvýšil.

Graf 6.4: Procentuální distribuce CyA prasečí kůži po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % **MP**



V **grafu 6.5** vidíme podobné rozložení CyA jako je tomu v grafu 6.3. Vliv enhancerů transcutolu a arlasolve DMI na distribuci CyA kůži je tedy v zásadě podobný .

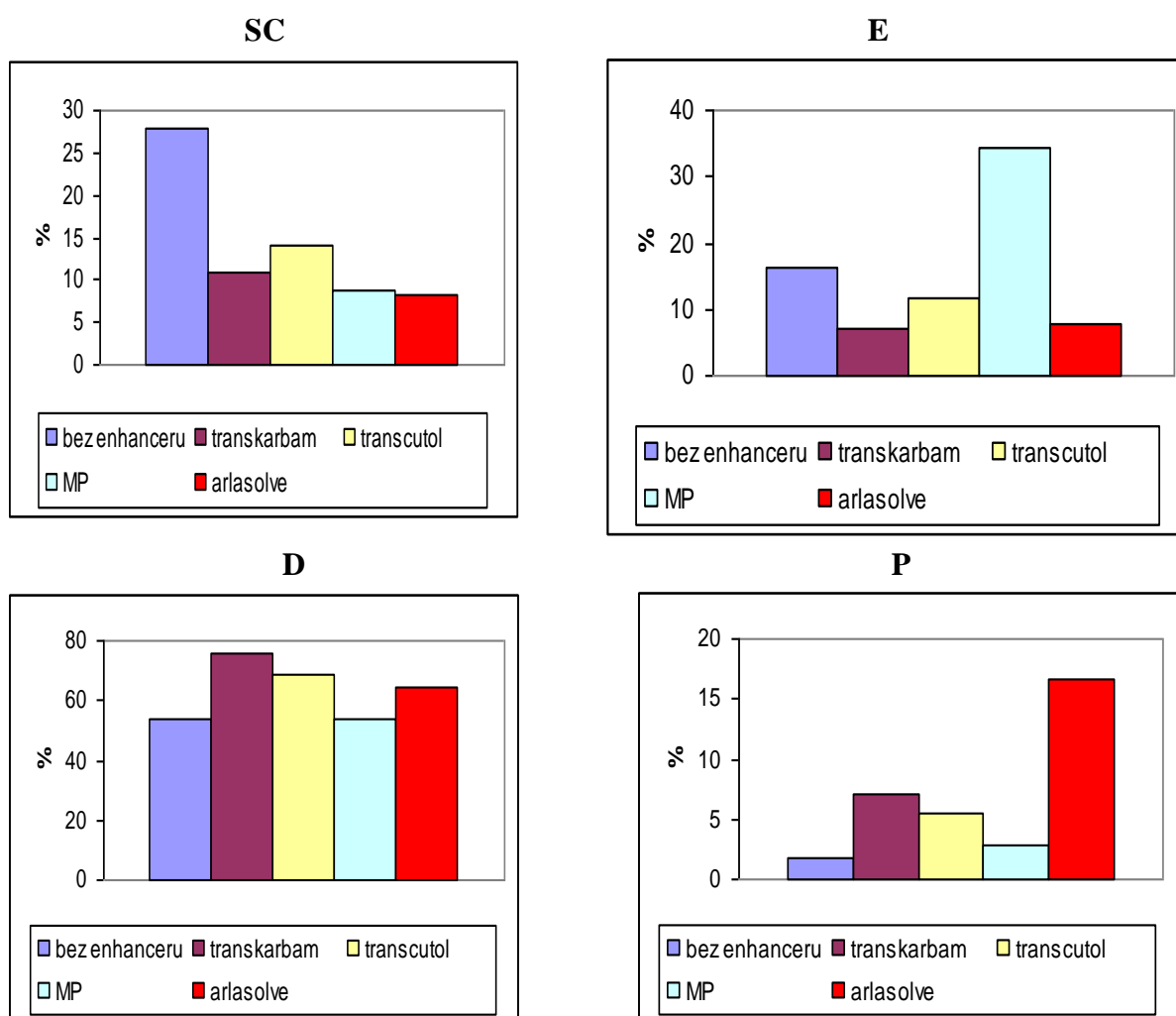
Graf 6.5: Procentuální distribuce CyA prasečí kůži po 12 hodinové penetraci z 0,15% disperze cyklosporinu A ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) s obsahem 5 % **TL**



Zaměříme-li se nyní na získané výsledky z jiného pohledu, a to na rozložení efektu enhancerů vůči CyA podle jednotlivých etází, jsou zřejmá další zajímavá srovnání, jak je

prezentuje kombinovaný **graf 6**. V odlupující se rohové části zůstává zachyceno nejvíce CyA u vzorků bez enhancerů. U vzorků s přísávkem enhancerů se množství zachycené v kompartmentu SC příliš neliší a pohybuje se v rozmezí 8-14%.

Graf 6: Procentuální distribuce CyA do stratum corneum (SC), epidermis (E), dermis (D) a akceptorové fáze (P) po 12 hodinové permeaci z 0,15% disperze CyA ve směsi propylenglykolu s TRIS-pufrem (1:1) bez enhanceru, s obsahem 1% transkarbamu 12, s obsahem 5% transcutolu, obsahem 5% methylpyrrolidonu (MP), nebo s obsahem 5% arlasolve.



V epidermálním kompartmentu zůstává zachyceno nejvíce CyA u vzorků s přísávkem methylpyrrolidonu. Tento enhancer pravděpodobně přednostně způsobuje tvorbu depa CyA v kompartmentu **E**, protože množství CyA v dermálním kompartmentu u tohoto vzorku je totožné jako u vzorku bez enhanceru.

Jako prakticky velice zajímavá se jeví tvorba depa CyA v dermis, odkud by se v reálných situacích mohl CyA postupně uvolňovat do lymfatického systému. Lymfatický

system by pak zajistil distribuci cyklosporinu v organismu. Z **grafu 6** vyplývá, že se depo tvořilo hlavně v kompartmentu **D** a velikost depa se pohybovala mezi 50-75%.

Výsledky získané měřením pronikuvšího CyA až do kompartmentu **P** je nutné chápat jako orientační vzhledem k jejich vysoké variabilitě. Umožňují konstatovat bezpečně jen tolik, že CyA pronikal ve všech případech celým profilem kůže a to ze všech donorových vzorků.

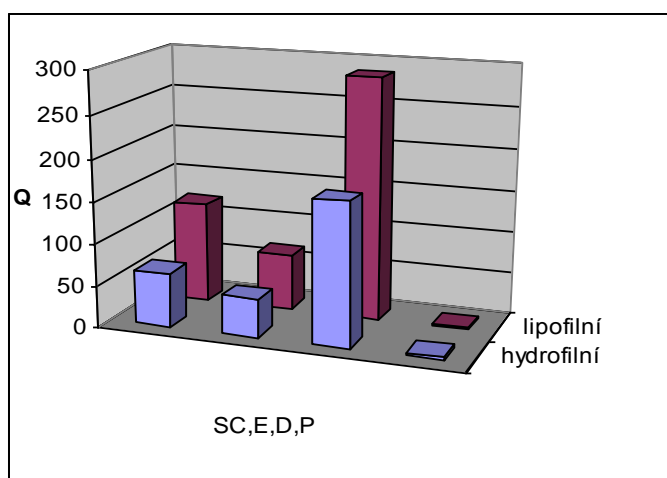
Pokud bychom porovnali výsledky průniku z donorových vzorků, které neobsahovaly enhancer, s výsledky vzorků obsahujících enhancer, pak je zřejmé, že procentuálně nejmenší byla tvorba dermálního depa u vzorků bez enhanceru a u vzorku s přídavkem methylpyrrolidonu. Z permeačních enhancerů se pro tvorbu depa zdá být nejlepším transkarbam 12 (75,5%), dále pak transcitol (69,0%) a arlasolve DMI (64,3%).

Co se týče stanovení cyklosporinu v akceptorové fázi, bylo zjištěno, že všechny testované enhancery zvyšují průnik cyklosporinu přes kůži, nejvíce arlasolve DMI (16,7%).

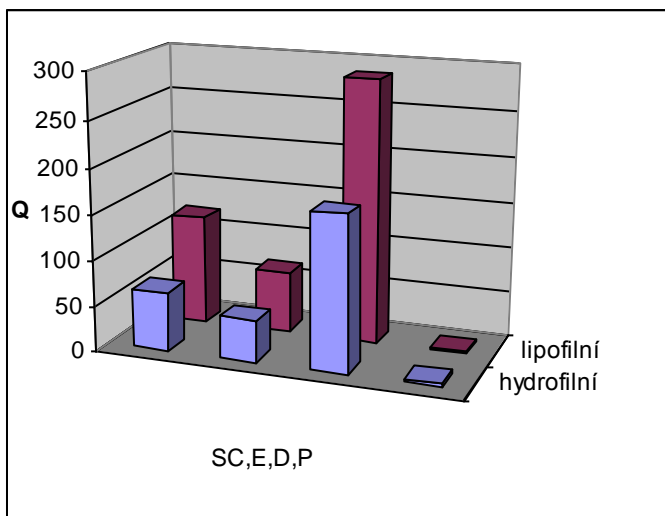
Vzhledem k tomu, že jsem se při své diplomové práci zabývala transdermální in vitro permeací cyklosporinu z lipofilního prostředí, konkrétně z izopropylmyristátu, zajímalo mě porovnání výsledků hodnot Q ($\mu\text{g}/10\text{ml}$) cyklosporinu při použití lipofilní a hydrofilní donorové fáze. Mohla jsem tak porovnat vzorky bez enhanceru, vzorky s přídavkem 1% transkarbamu a vzorky s 5% obsahem methylpyrrolidonu. Porovnání ukazuje **graf 6.6**.

Graf 6.6 Porovnání hodnot pronikuvších kvant CyA Q ($\mu\text{g}/10\text{ml}$) v případě hydrofilní a lipofilní donorové fáze

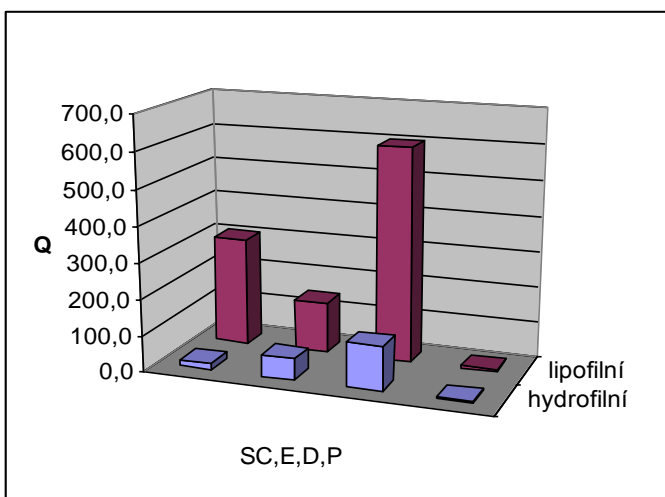
a) vzorky bez enhanceru



b) vzorky s 1% přídavkem T12

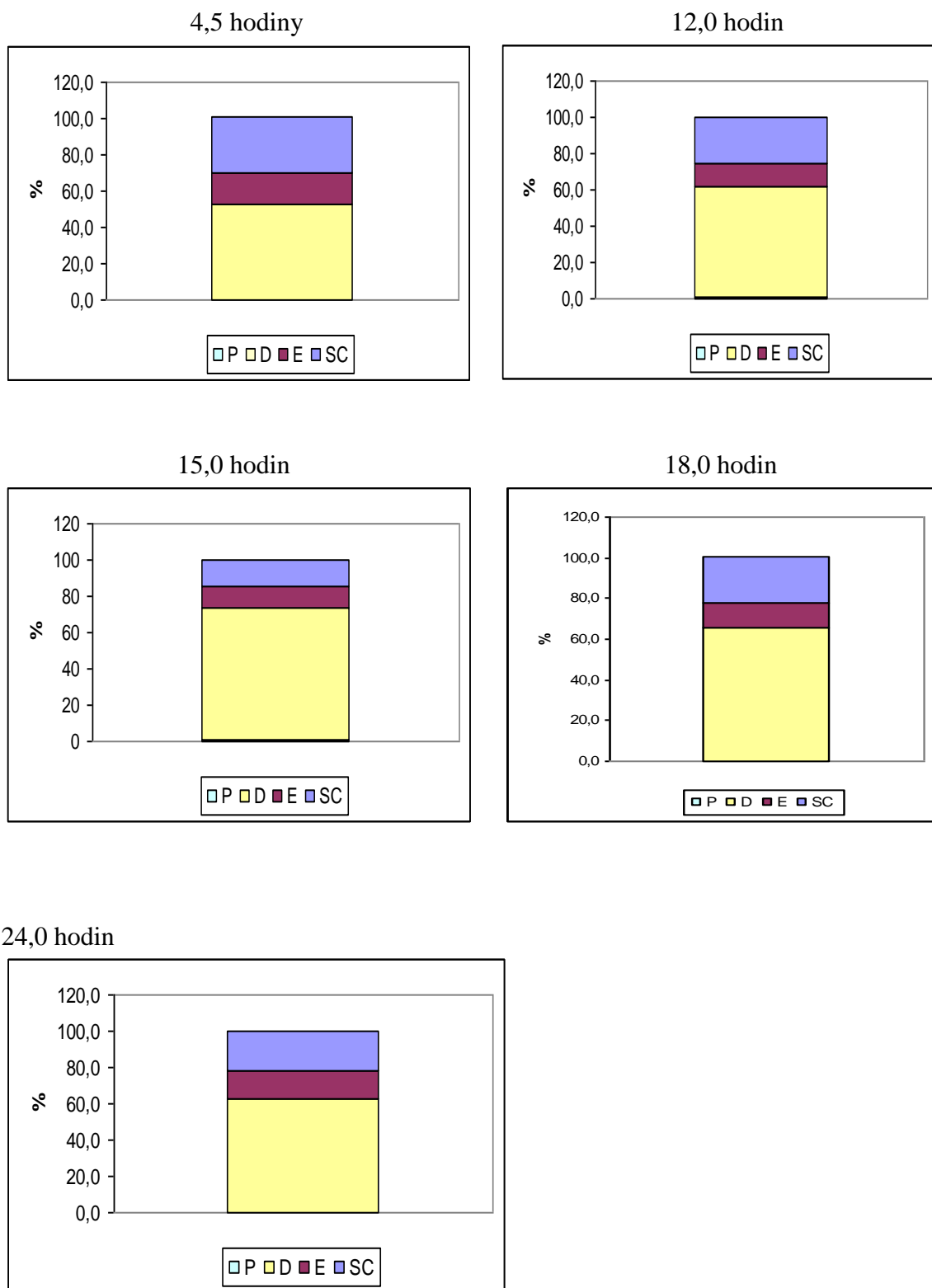


c) vzorky s 5% přídavkem MP



Z grafů 6.6 a) až c) je patrné, že při použití lipofilní donorové fáze je množství cyklosporinu, které se deponuje do jednotlivých vrstev kůže mnohem vyšší než při použití donorové fáze hydrofilní. Množství CyA, které proniklo do kompartmentu **P** u vzorku bez enhanceru a u vzorku s 1% přídavkem transkarbamu 12 je naopak vyšší v případě hydrofilní donorové fáze. Pro další pokusy bych doporučila využití lipofilní donorové fáze vzhledem k tomu, že je zajímavá hlavně tvorba depa v dermis, odkud by se CyA uvolňoval do lymfatického systému.

Graf 6.7: Distribuce CyA prasečí kůží po zvolených časových intervalech z 10% disperze cyklosporinu A v IPM, bez enhanceru.



Výše uvedené pokusy byly hodnoceny po 12 hodinovém intervalu od počátku aplikace donorových vzorků. Zajímalo mě, zda a jakým způsobem ovlivňuje doba expozice (penetrace a permeace) výsledky analogických strippingových a penetračních pokusů. V **grafu 6.7** je

zachycena distribuce CyA prasečí kůži po intervalech 4,5; 12; 15; 18 a 24 hodin z 10% disperze cyklosporinu A v IPM bez enhanceru.

Z **grafu 6.7** se jeví výhodná délka penetračních pokusů na úrovni 15 hodin. Po této době se již velikost depa ani množství CyA v kompartmentu P nezvyšuje.

7. ZÁVĚRY

1. Cyklosporin A z testovaných vzorků za daných pokusných podmínek kůže proniká, přičemž permeuje na úrovni spolehlivě analyticky měřitelných hodnot.
2. Vliv testovaných permeačních enhancerů na průnik CyA do kůže a na tvorbu jeho depa v kůži je značný.
3. Z hodnocených permeačních enhancerů se pro tvorbu depa zdá být nejúčinnějším transkarbam 12, dále transcitol a arlasolve DMI.
4. Všechny použité enhancery, konkrétně dimethylisosorbid (arlasolve DMI), transkarbam 12, methylpyrrolidon i a 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol (transcitol) zvýšily průnik cyklosporinu kůží ze směsi propylenglykolu s tromethamolovým pufrem pH 7,1 (1:1) jako hydrofilního vehikula.
5. Pro transdermální in vitro permeační pokusy CyA se jeví jako vhodnější lipofilní donorová fáze.
6. Jako ideální délka aplikace donorových vzorků v permeačních pokusech se jeví doba 15 hodin.

8. SOUHRN

Teoretická část podává stručný přehled informací o anatomii, fyziologii a funkci kůže, transdermálních lékových formách a možnostech zvýšení transdermální absorpce léčiv. Hlavní kapitola týkající se cyklosporinu zahrnuje aktualizované informace publikované o cyklosporinu, poznatky o imunitním systému člověka a o imunosupresivech.

Experimentální část přináší výsledky in vitro permeačních pokusů na prasečí kůži. Donorová i akceptorová fáze byla u většiny pokusů tvořena propylenglykolem a TRIS-pufrem o pH 7,1 v poměru 1:1. Pouze v několika málo pokusech byla jako donorová fáze použita 10% disperze CyA v IPM. Stanovení permeantu bylo prováděno pomocí HPLC s UV detekcí při 220nm.

Jako donorové vzorky byly použity přesycené soustavy CyA bez enhanceru, dále pak s 5% přídatkem arlasolve DMI nebo methylypyrrolidonu či transcutolu, nebo s 1% transkarbam 12. Všechny enhancery v použitých koncentracích tvorbu depa v kůži zvyšují, transkarbam 12 v použité nejnižší koncentraci nejvíce.

Pro transdermální in vitro permeační pokusy CyA se zdá být vhodnější lipofilní donorová fáze. Jako ideální délka permeačních pokusů se jeví doba 15 hodin.

9. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A-DMI	arlasolve DMI
CyA	cyklosporin A
D	dermis
E	epidermis
MP	methylpyrrolidon
P	akceptorová fáze
SEM	směrodatná odchylka průměru
T12	transkarbam 12
TL	transcutol
SC	stratum corneum

10. LITERATURA

- 1 Chalabala, M. a kol.: Technologie léků, 2. vydání, Galén, Praha 2001, s. 184-186
- 2 Kopáčová, L., Semecký, V., Hronek, M.: Nervový systém, Karolinum, Praha 1998, s. 36-40
- 3 Pěgřím, R., Valachovič, A.: Somatologie, 3. vydání, Avicenum, Praha 1975, s. 271-272
- 4 <http://www.pharmpress.com/shop/samples/T&TCh1.pdf>
- 5 Jelínek, J., Zicháček, V.: Biologie pro gymnázia, Nakladatelství Olomouc, Olomouc 1998, s. 269-270
- 6 Framm, J., Plaček, D.: Profily léčiv do kapsy, Grada Publishing, Praha 2002, s. 115
- 7 <http://med.muni.cz/biomedjournal/pdf/supplementa/1997/supplementa-97.pdf>
- 8 <http://med.muni.cz/biomedjournal/pdf/supplementa/1997/supplementa-97.pdf>
- 9 Krejčová H., Transdermální in vitro permeace cyklosporinu III. (Diplomová práce), Hradec Králové 2006, Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 42s.
- 10 http://etd.fcla.edu/UF/UFE1000142/membrino_m.pdf
- 11 http://www.perimed.se/p_Products/IontophoresisTheory.pdf
- 12 <http://www.cytopulse.com/electroporation.shtml>
- 13 <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/5/10>
- 14 <http://www.beautymagonline.com/pages/sonophoresis.htm>
- 15 <http://www.iit.edu/~ipro331s05/project/sonic.htm>
- 16 http://www.vscht.cz/chem_listy/docs/full/1999_02_107-119.pdf
- 17 <http://www.nicnas.gov.au/publications/CAR/new/Std/stdFULLR/std1000FR/std1052FR.pdf>
- 18 http://63.111.59.207/news/images/Arlasolve_DMI.pdf
- 19 <http://www.bentham.org/cdd/sample/cdd2-1/003AP.pdf>

-
- 20 Mura, P., Faucci, M. T., Bramanti G., Corti, P.: Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 2000, s. 365-372
- 21 <http://lib.bioinfo.pl/auth:Dayan,N>
- 22 Hongzhuo L., Sanming L., Yongjun W., Huimin Y., Yan Z.: Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A, *Int. J. Pharm.*, 311, 2006, s. 182-186
- 23 Zhong-Gao G., Han-Gon Ch., Hee-Jong S., Kyung-Mi P., Soo-Jeong L., Ki-Jun H., Chong-Kook K.: Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporin A, *Int. J. Pharm.*, 161, 1998, s. 75-86
- 24 Ji-Yeon H., Jin-Ki K., Yun-Kyoung S., Jeong-Sook P., Chong-Kook K.: A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption, *J. Control. Rel.*, 110, 2006, s. 332-338
- 25 <http://www.chemindustry.com/chemicals/369802.html>
- 26 Lincová D., Farghali H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002, s. 517-519
- 27 http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/81_1865.html#lecba
- 28 Kobashigawa, J. A., Patel, J., Furukawa, H., Moriguchi, J.D., Yeatman, L., Takemoto, S., Marquez, A., Shaw, J., Oeser, B.T., Subherwal, S.: Five-year results of a randomized, single-center study of tacrolimus vs microemulsion cyclosporine in heart transplant patients, *J. Heart Lung Transpl.*, 25, 2006, s. 434-439
- 29 Molay, K. R., Makiko T., Masuko K., Kazuhiko N., Seiichiro I., Tojiro T.: Apoptosis, necrosis and cell proliferation-inhibition by cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line), *Pharm. Res.*, 53, 2006, s. 293-302
- 30 Grenier, J., Fradette, C., Morelli, G., Merritt, G. J., Vranderick, M., Ducharme, M.P.: Pomelo juice, but not cranberry juice, affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 79, 2006, s.255-262

31 Nguyen, T.K., Nilakantan, V., Felix, Ch.C., Khanna, A.K., Pieper, G.M.: Beneficial effect of α -tocopheryl succinate in rat cardiac transplants, *J. Heart Lung Transpl.*, 25, 2006, s. 707-715

32 Amudha, G., Josephine, A., Varalakshmi, P.: Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A, *Clin. Chim. Act.*, 2006

33 Origlia, N., Migliori, M., Panici, V., Filippi, C., Bertelli, A., Carpi, A., Giovannini, L.: Protective effect of l-propionylcarnitine in chronic cyclosporine-a induced nephrotoxicity, *Biomed. Pharmacother.*, 60, 2006, s. 77-81

34 Fujishiro, J., Sužuji, Ch., Kudou, S., Yasue, T., Hakamata, Y., Takahashi, M., Murakami, T., Hashizume, K., Kobayashi, E.: Change from cyclosporine to combination therapy of mycophenolic acid with the new sphingosine-1-phosphate receptor agonist, KRP-203, prevents host nephrotoxicity and transplant vasculopathy in rats, *J. Heart Lung Transpl.*, 25, 2006, s. 825-833

35 Xu-bo, Y., Hong, L., Yan-bo, Y.: Preparation of cholesterol-modified chitosan self-aggregated nanoparticles for delivery of drugs to ocular surface, *Carbohydrate Polymers*, 2006