



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TRANSPORT LÉČIV V MODELOVÝCH HYDROGELECH

TRANSPORT OF PHARMACEUTICALS IN MODEL HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michal Horváth

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1925/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Michal Horváth**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Transport léčiv v modelových hydrogelech

Zadání diplomové práce:

1. Seznámit se s problematikou výskytu a chování léčiv v přírodních systémech.
2. Seznámit se s možnostmi studia transportu léčiv v modelových hydrogelech.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a formulovat závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michal Horváth
student

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa venovala transportným vlastnostiam diklofenaku v modelových hydrogélach. Gély boli pripravené z agarózy a niektoré boli obohatené o humínovú kyselinu IHSS Elliott Soil. Prídavok humínovej kyseliny do hydrogélu by mal napodobovať pôdne prostredie. A práve pôdne prostredie bolo vybraté na pozorovanie transportu a prestupu diklofenaku.

Difúzia bola pozorovaná v difúzných celách, kde v jednej časti bol roztok diklofenaku a v druhej MQ voda. A medzi celami sa nachádzal hydrogél. Z oboch ciel boli odoberané vzorky, ktoré boli spektrofotometricky premeriavané v rôznych časových intervaloch do nastolenia rovnováhy. Tieto merania boli nakoniec použité na opis pohybu diklofenaku v hydrogélach.

ABSTRACT

This thesis was devoted to the transport properties of diclofenac in model hydrogels. Gels were prepared from agarose and some were enriched with IHSS Elliott Soil humic acid. The addition of humic acid to the hydrogel should mimic the soil environment. And it was the soil environment that was chosen to observe the transport and transfer of diclofenac.

Diffusion was observed in diffusion cells, where one part contained diclofenac solution and the other MQ water. And there was a hydrogel between the cells. Samples were taken from both cells and measured spectrophotometrically at different time intervals until equilibrium was established. These measurements were finally used to describe the movement of diclofenac in the hydrogels.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

diklofenak, difúzia, humínové kyseliny, hydrogély

KEYWORDS

diclofenac, diffusion, humic acids, hydrogels

HORVÁTH, Michal. *Transport léčiv v modelových hydrogelech*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156505>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracoval samostatne a všetky použité literárne zdroje správne a úplne odcitoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcej práce, p. prof. Ing. Martine Klučákovej Ph.D., za odborné rady, energiu a čas, ktoré mi počas celého procesu venovala. Poďakovanie patrí aj Ing. Petre Závodskej za pomoc s experimentálnou časťou.

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
	2.1 Humínové látky.....	8
	2.1.1 Štruktúra a vlastnosti.....	8
	2.1.2 Väzbové možnosti.....	9
	2.1.2.1 Iónová väzba.....	9
	2.1.2.2 Kovalentná väzba.....	9
	2.1.2.3 Vodíkové mostíky.....	10
	2.1.2.4 Hydrofóbne interakcie.....	10
	2.1.2.5 Koordinačná väzba.....	10
	2.2 Difúzia.....	10
	2.2.1 Fickove zákony.....	11
	2.2.1.1 Prvý Fickov zákon.....	12
	2.2.1.2 Druhý Fickov zákon.....	12
	2.2.2 Difúzne cely.....	13
	2.3 Hydrogély.....	14
	2.3.1 Vznik hydrogélu.....	14
	2.3.2 Vlastnosti gélov.....	15
	2.3.3 Vlastnosti gélov humínových látok.....	16
	2.4 Diklofenak.....	17
	2.4.1 Štruktúra diklofenaku.....	17
	2.4.2 Mechanizmy účinku diklofenaku.....	18
	2.4.2.1 Inhibícia syntézy cyklooxygenázy a prostaglandínov.....	18
	2.4.2.2 Stimulácia oxidu dusnatého.....	19
	2.4.2.3 Centrálné sprostredkované a neuropatické mechanizmy.....	19
	2.4.2.4 Inhibícia gama receptoru.....	20
	2.4.2.5 Zníženie zápalových látok.....	20
	2.4.2.6 Inhibícia tromboxánového receptora.....	21
	2.4.2.7 Inhibícia iónových kanálov citlivých na kyslé prostredie.....	21
	2.5 Súčasný stav riešenej problematiky.....	21
	2.5.1 Difúzia v sústavách s obsahom humínových gélov.....	21
	2.5.2 Imobilita diklofenaku.....	22
	2.5.3 Interakcia medzi diklofenakom a humínovými látkami.....	23
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	24
	3.1 Použité chemikálie.....	24
	3.2 Použité prístroje.....	24
	3.3 Príprava roztokov a gélov.....	24
	3.3.1 Roztok humínovej kyseliny.....	24
	3.3.2 Roztok diklofenaku.....	25
	3.3.3 Gély.....	25
	3.3.4 Vlastný experiment.....	26
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	28
	4.1 Meranie absorbancie bez prídavku HK.....	28

4.2	Meranie absorbancie s prídavkom HK	32
4.3	Koncentračné profily bez HK.....	36
4.4	Koncentračné profily s HK.....	39
5	ZÁVER	43
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	44
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	52
7.1	Použité symboly	52
7.2	Použité skratky	52

1 ÚVOD

Pôda vytvára prostredie pre mnohé živočíchy a rastliny. Dôležitou súčasťou pôdy sú humínové látky. Tieto látky vznikajú rozkladom organickej hmoty a činnosťou mikroorganizmov. Môžu ovplyvňovať fyzikálne vlastnosti, kvalitu pôdy alebo vlhkosť. Humínové látky majú zložitú štruktúru, ktorá stále nie je úplne objasnená, a špecifické vlastnosti, ktoré môžu pomôcť v otázke životného prostredia. Humínové kyseliny dokážu v pôde interagovať s mnohými látkami, a to napríklad aj s kontaminantami.

Nesteroidné protizápalové liečivá, ktorých predstaviteľom je aj diklofenak, sú taktiež považované za kontaminanty. Farmaceutiká sa môžu do životného prostredia dostávať prostredníctvom moču ľudí. A mnohé z nich si môžu dokonca zachovávať aktívnu formu. Nesprávna likvidácia liekov je taktiež ďalším spôsobom, ako sa lieky dostávajú do životného prostredia. Ak zostanú niekomu nespotrebované lieky, zvyčajne ich hodia do toalety alebo umývadla. Lieky následne skončia v čističkách odpadových vôd, ktoré ale nie sú určené na filtrovanie týchto látok z odpadových vôd. Vďaka svojim vlastnostiam sú humínové látky schopné ovplyvňovať transport týchto kontaminantov a rôzne s nimi interagovať.

V otázke znečistenia životného prostredia má teda pôda jedno z horších postavení. Hromadia sa v nej rozličné produkty ľudskej činnosti s negatívnym dopadom na rastliny, živočíchy, a v konečnom dôsledku aj na človeka. V tejto problematike sa ponúka otázka zdravotne nezávadných potravín, kde môžu hlavnú rolu hrať práve humínové kyseliny. V pôde fungujú ako filter pre ťažké kovy a ďalšie jedovaté zlúčeniny, ktorým tak zabraňujú v prechode do rastlín a ďalej do potravinového reťazca.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Humínové látky

Humínové látky sú dôležitou súčasťou prírodnej organickej hmoty. Sú obsiahnuté v pôde, vode, a v geologických organických ložiskách, ako sú napríklad jazerné sedimenty, rašelina a hnedé uhlie. V pôdnom a vodnom ekosystéme majú vplyv na kolobeh a biologickú dostupnosť prvkov, ale aj na transport a degradáciu cudzorodých a prírodných organických látok. Prispievajú k charakteristickému hnedému až čiernemu zafarbeniu pôdy. Humínové látky sú teda veľmi dôležitými zložkami pôdy, ktoré ovplyvňujú fyzikálne a chemické vlastnosti, a tým napríklad zlepšujú úrodnosť pôdy. [1]

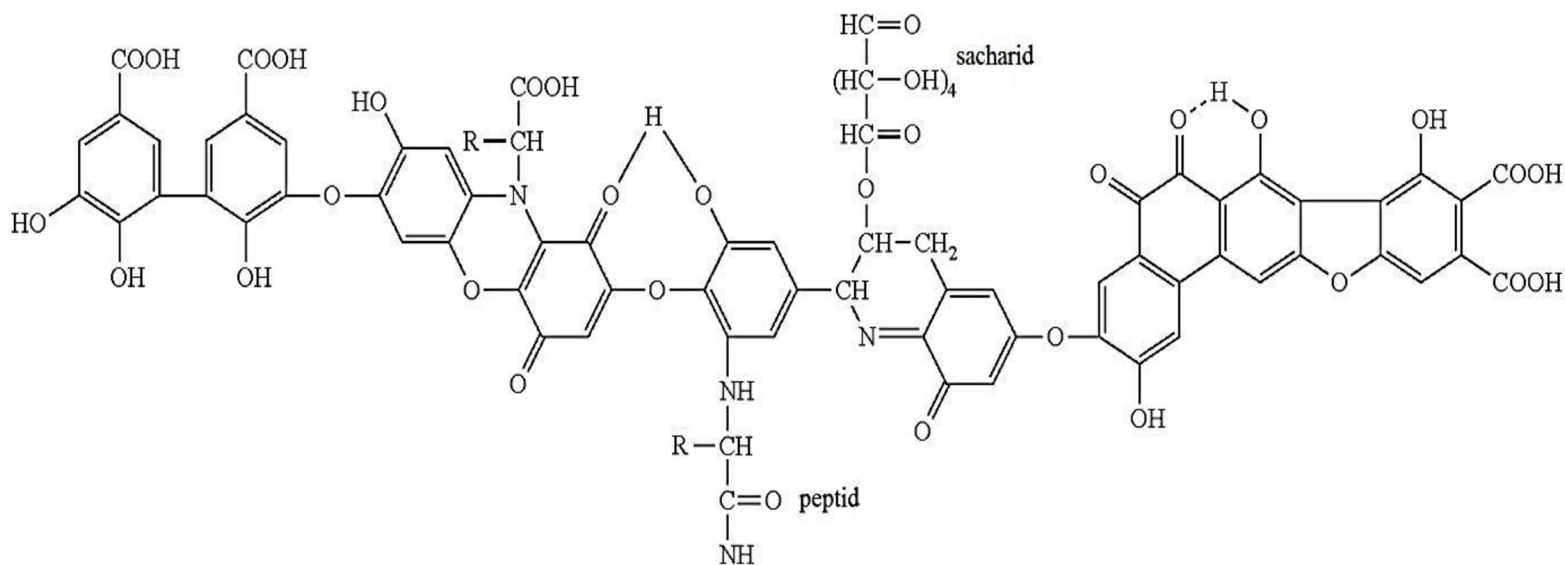
2.1.1 Štruktúra a vlastnosti

Humínové látky tvoria špecifickú skupinu vysoko molekulárnych látok, ktoré majú veľmi podobnú chemickú štruktúru. Existujú však rozdiely, ktoré ich rozlišujú. Jedným z nich je rozdiel rozpustnosti pri rôznych hodnotách pH, podľa ktorého môžeme humínové látky rozdeliť na tri frakcie: humínové kyseliny, fulvónové kyseliny a humíny. [2]

Humínové látky sú vysoko chemicky reaktívne a nie sú náchylné na biodegradáciu. Presné vlastnosti a štruktúry danej vzorky humínovej látky závisia od zdroja a konkrétnych podmienok extrakcie. Znalosť základnej štruktúry humínových látok je nutná pre pochopenie úlohy a funkcie týchto látok v životnom prostredí. Vzhľadom na mnohopočetnosť molekúl zložiek, z ktorých sa humínové látky skladajú, spoločne s mnohými typmi väzieb, ktorými sú viazané dohromady, je odvodenie presného štruktúrneho vzorca veľmi náročné. [1]

Hlavné prvky tvoriace humínové a fulvónové kyseliny sú uhlík, vodík, dusík, kyslík a síra, avšak zastúpenie týchto prvkov závisí od zdroja a pôvodu odobraných vzoriek. Uhlík je obsiahnutý prevažne v aromatických a alifatických častiach, zatiaľ čo kyslík sa vyskytuje v éterových mostíkoch, ale hlavne vo funkčných skupinách. [1, 3]

Hlavnými funkčnými skupinami humínových látok sú karboxylové, hydroxylové a metoxylové funkčné skupiny. Tieto skupiny môžu byť naviazané tak na cyklických, ako aj na postranných reťazcoch. Preto je vytvorenie presného štruktúrneho vzorca prakticky nemožné, existujú iba hypotetické vzorce. Tieto vzorce sú odvodené iba na základe elementárneho zloženia, fyzikálnych a chemických vlastností skúmaných látok a znalostí funkčných skupín. [4]



Obrázok č. 1: Hypotetický vzorec humínovej kyseliny podľa Stevenson [5]

2.1.2 Väzbové možnosti

Štruktúra humínových látok je veľmi zložitá a je v nej zahrnuté veľké množstvo funkčných skupín, ktoré sú schopné tvoriť interakcie s rôznymi typmi zlúčenín. A tieto zlúčeniny môžu byť viazané viacerými druhmi interakcií.

2.1.2.1 Iónová väzba

Tento typ väzby je spojený s pôsobením elektrostatických síl medzi iónmi v roztoku a fixnými nábojmi prítomných funkčných skupín humínových látok. Tento typ väzby možno predpokladať pri interakciách alkalických kovov a amoniaku spolu s karboxylovou skupinou humínových látok. [6]

2.1.2.2 Kovalentná väzba

Interakcie vedúce k vzniku kovalentnej väzby sa delia na reakcie prebiehajúce bez využitia aktivity enzýmov a reakcie s využitím biokatalýzy. Poznatok, že v makromolekulárnej štruktúre humínových látok dochádza k trvalej fixácii kontaminantov kovalentnou väzbou, je pomerne starý. [6]

2.1.2.3 Vodíkové mostíky

Z prítomnosti niektorých funkčných skupín sa dá predpokladať možnosť vzniku vodíkových mostíkov. Tieto väzby sa aj napriek svojmu nízkemu obsahu energie významne podieľajú na väzobných možnostiach medzi HL a kontaminantmi. Väzba vodíkovými mostíkmi je približne desaťkrát slabšia ako bežná kovalentná. [6]

2.1.2.4 Hydrofóbne interakcie

Táto interakcia vzniká pri kontakte nepolárnych skupín nesených molekulami vo vodnom prostredí, kde tieto interakcie môžu vychádzať z pôsobenia Van der Waalsových síl alebo presunu π elektrónov. Princípom je tendencia nepolárnych skupín spájať sa vo vode, a tým znižovať kontaktnú plochu so susednými molekulami vody. [6]

2.1.2.5 Koordinačná väzba

Z hľadiska imobilizácie toxických kovov, nachádzajúcich sa v podzemných alebo odpadových vodách, predstavuje najdôležitejší typ interakcie. Na tejto interakcii sa podieľajú najmä karboxylové a fenolické funkčné skupiny. Zastúpenie týchto skupín je ovplyvnené hodnotou pH, a tým aj mierou disociácie funkčných skupín. V slabo kyslej oblasti sa podieľajú na tvorbe koordinačnej väzby predovšetkým karboxylové skupiny. Pri vzraste hodnoty pH nad 7 dochádza k disociácii protónu z fenolického hydroxyly a k tvorbe koordinačnej väzby sa významne pridávajú aj fenolické funkčné skupiny. Tento jav je významný v oblasti štúdia imobilizácie toxických kovov. [6, 7, 8]

2.2 Difúzia

Difúzia je prestup látky na základe tepelného pohybu častíc, z prostredia s vyšším chemickým potenciálom do prostredia s nižším chemickým potenciálom. Chemický potenciál veľmi úzko súvisí s entropiou a s koncentráciou, môžeme teda tvrdiť, že difúzia je vlastne prestup látky z prostredia s vyššou koncentráciou do prostredia s nižšou koncentráciou. Ide teda o prestup látky na základe koncentračného gradientu. [9]

Rýchlosť, ktorou difúzia prebieha, závisí na veľkosti častíc, teplote a aj vlastnostiach prostredia. Počas difúzie sa energia nespotrebovávajú a výsledkom by malo byť rovnomerné rozptýlenie rozpustenej látky v rozpúšťadle. Neusporiadaný pohyb molekúl je spôsobený dôsledkom Brownovho pohybu. Molekuly sa nikdy nepohybujú po preferovanej dráhe, avšak pohyb je riadený smerom koncentračného spádu. V situácii, kedy budeme chcieť uskutočniť prechod látky vo fáze bez pohybu, tak pre pohyb molekúl bude kľúčový rozdiel koncentrácií určitej látky medzi dvoma miestami. [9]

Pokým budú v systéme, v ktorom je chemický potenciál funkciou priestorovej súradnice x , nastavené podmienky konštantnej teploty, konštantného tlaku a maximálnej práce dw , dostávame rovnicu [10]:

$$dw = \left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)_{p,T} dx. \quad (1)$$

Pokiaľ porovnáme rovnicu (1) so všeobecným teoretickým prejavom práce, dostávame vzťah:

$$dw = -Fdx, \quad (2)$$

kde F je sila pôsobiaca v opačnom smere a získavame výsledný vzťah:

$$F = -\left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)_{p,T}. \quad (3)$$

Táto sila popisuje samovoľnú schopnosť častíc rozptýliť sa do priestoru. Druhý termodynamický zákon hovorí o pôsobení tejto sily ako o zvýšení celkovej entropie, čo znamená, že sa systém dostane do stavu najnižšej vnútornej energie. [11, 12]

Nemusi vždy ísť o jednostrannú difúziu. Bežne sa stretávame aj s binárnou difúziou. Ide o typ difúzie, kedy obidve látky do seba vzájomne difundujú. Ako príklad môžeme uviesť systém pevnej látky a rozpúšťadla, kedy difunduje pevná látka do rozpúšťadla a súčasne difundujú aj molekuly rozpúšťadla medzi molekuly pevnej látky. [13]

Ďalším príkladom difúzie môže byť tzv. samodifúzia. Ide o difúziu prebiehajúcu v rovnovážnych zmesiach, kedy sa hodnota koncentračného gradientu rovná nule. Rýchlosť takejto difúzie bude ovplyvňovať predovšetkým teplota, tlak, veľkosť častíc, viskozita okolia, zatiaľ čo pri nerovnovážnych systémoch je difúzia záležitosťou najmä koncentračného gradientu, ktorý nenadobudne nulové hodnoty. Všeobecne môžeme povedať, že difúzia závisí od rozmerov difundujúcich častíc, teploty a od vlastností prostredia. Difúzia najrýchlejšie prebieha v plynch, pomalšie v kvapalinách (posúvanie častíc) a najpomalšie v pevných látkach, kde častice preskakujú na prázdne miesta kryštálovej mriežky. [14]

2.2.1 Fickove zákony

Na základe neusporiadaného pohybu molekúl Adol Eugene Fick definoval dva zákony. Prvý z týchto zákonov definuje súvislosť medzi rýchlosťou prenosu látky difúziou a koncentračným gradientom v určitom mieste. Podľa druhého zákona je rýchlosť zmeny koncentrácie v určitom mieste spôsobená difúziou, ktorá je úmerná zmene koncentračného spádu v danom mieste. Konštantou tejto úmernosti je difúzny koeficient D . [11, 13]

2.2.1.1 Prvý Fickov zákon

Jednorozmerný difúzny tok je definovaný ako:

$$J_1 = A j_1 = AD \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (4)$$

kde symbol A znázorňuje veľkosť plochy, cez ktorú látka difunduje, J_1 je difúzny tok cez jednotkovú plochu, c_1 predstavuje molárnu koncentráciu látky a x je vzdialenosť. Difúzny koeficient D je veličina udávajúca mieru mobility molekúl v danej látke a je priamo úmerná difúznemu toku. Niekedy sa stretávame s označením difúzneho koeficientu pojmom difúzivita. Ide teda o totožnú veličinu, ktorá sa udáva v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Difúzny koeficient závisí od tlaku, teploty a veľkosti difundovaných častíc. [13]

V prípade už spomínanej binárnej difúzie platí, že ak existuje koncentračný gradient 1. zložky, ktorý spôsobuje difúzny tok, musí v ustálenom stave zároveň existovať aj koncentračný gradient 2. zložky, ktorý má rovnakú veľkosť. Ten spôsobuje difúzny tok 2. zložky v smere opačnom. Z tohto dôvodu je jedna rovnica popisujúca difúzny tok jednej látky v danom systéme dostačujúca. Všeobecne je teda možné 1. Fickov zákon zapísať v tvare:

$$j_1 = -D \cdot \text{grad } c_1, \quad (5)$$

kde difúzny tok má vektorový charakter a je rovný množstvu látky, ktorá je prenesená cez jednotkový objem za jednotku času. Difúzia prebieha proti smeru koncentračného spádu a z tohto dôvodu je na pravej strane rovnice (5) záporné znamienko. Pre popis nestacionárnej difúzie slúži 2. Fickov zákon. [15]

2.2.1.2 Druhý Fickov zákon

Tento zákon popisuje nestacionárnu difúziu v systémoch, kde dochádza k zmene koncentrácie difundujúcej látky s časom. Pokiaľ D nie je funkciou c , je možné ho všeobecne zapísať v tvare:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D \cdot \text{grad } c_1) = D \cdot \text{div grad } c_1 \quad (6)$$

Takto zapísaná rovnica je úplne nezávislá na súradnicovom systéme a môže byť vyjadrená pre rôzne súradnicové systémy (napr. cylindrický, sférický a karteziánsky). Nestacionárnu difúziu v smere osi x je možné zapísať v tvare (ale len v prípade, že sa zanedbá nútená konvencia a D nie je funkciou c):

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} \right) + \frac{1}{A} \frac{\partial A}{\partial x} \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (7)$$

ak je plocha A nemenná, je možné výraz zapísať v tvare:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (8)$$

Pretože vyjadrenie difúzných procesov je často totožné s procesmi vedenia tepla, je možné túto rovnicu previesť pri zhodne zadaných počiatočných a okrajových podmienkach na úlohy, ktoré sa zaoberajú difúznou problematikou a naopak. [16]

2.2.2 Difúzne cely

Pred metódou difúzie v difúzných celách bola metóda Stokesovej diafragmovej cely, ktorá je celkom presná a lacná. Z tohto dôvodu sa používa ako štartovacia metóda pri skúmaní difúzií v kvapalinách alebo plynach a pri štúdiu difúzných vlastností membrán. Nevýhodou je potreba veľkých objemov študovaných látok. Diafragmová cela sa skladá z dvoch častí, z vertikálne usporiadaných ciel, ktoré oddeľuje sklenená fritá alebo porézna membrána, a ktoré sú naplnené roztokmi o rôznej koncentrácii difundujúcej látky. Vhodnou analytickou metódou sa meria koncentrácia v oboch celách v jednom alebo viacerých časoch a difúzny koeficient sa môže vypočítať z rovnice [17]:

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \ln \left[\frac{(c_{dolná} - c_{horná})_0}{(c_{dolná} - c_{horná})_t} \right], \quad (9)$$

kde β je konštanta aparatury a môže sa vypočítať z rovnice:

$$\beta = \frac{A \cdot \varepsilon}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{horná}} + \frac{1}{V_{dolná}} \right), \quad (10)$$

A označuje plochu, cez ktorú látka difunduje, ε je rozdeľovací koeficient na rozhraní, l je efektívna hrúbka membrány a V je objem cely. Konštanta β sa musí zistiť experimentálne, pretože výrazne závisí od vlastností membrány, ako je veľkosť jej pórov a pod. Najoptimálnejšie je použitie menších pórov, ktoré znižujú nebezpečenstvo miešania v membráne. Okrem klasického vertikálneho usporiadania môžu byť difúzne cely usporiadané aj horizontálne. [17]

Medzi hlavné výhody vykonávania difúzných experimentov v difúzných celách patrí nízka cena a komerčná dostupnosť aparatury. Difúzia v horizontálnej aparatúre prebieha cez študovaný materiál medzi dvoma roztokmi a tým umožňuje sledovať inak ťažko dostupné doplnkové parametre, ako je pH alebo vodivosť. [17]

2.3 Hydrogély

Za hydrogély sú označované polymérne siete hydrofilného alebo amfifilného charakteru, ktoré sú schopné absorbovať a udržať značné množstvo vody pri zachovaní svojho tvaru. Vďaka týmto vlastnostiam nadobúdajú na význame ako biomateriály pre potenciálne biomedicínske aplikácie. Hydrogély dnes už nachádzajú svoje uplatnenie v lekárstve a v biomedicíne v podobe kontaktných šošoviek, hrudných implantátov, umelých orgánov, bioepitelií a bio-senzorov. Farmácia postupne začína využívať vlastnosti hydrogélom, a to vo forme obväzov na popáleniny a na riadené uvoľňovanie liečiv. [18, 19]

2.3.1 Vznik hydrogélom

Existuje široká škála sieťovacích techník, vrátane UV-fotopolymerizácie a ďalších chemických sieťovacích metód. Tieto techniky sietenia sú vhodné iba za predpokladu, že sú dôkladne odstránené všetky toxické reagenty pred samotnou aplikáciou hydrogélom. Takto pripravené hydrogély majú definované rozmery a vysokú pružnosť. V niektorých aplikáciách môže byť hydrogél vytvorený in situ, ale je nevyhnutné brať do úvahy potenciálne riziká vznikajúce napr. pôsobením sieťovacích činidiel alebo expozíciou UV-žiarením. Ako alternatívu k chemicky zosieťovaným hydrogélom je možné použiť fyzikálne hydrogély. Fyzikálne zosieťovanie polymérnych reťazcov môže byť dosiahnuté zmenou environmentálnych podmienok (teplota, pH, iónová sila) a rôznymi fyzikálno-chemickými interakciami (hydrofóbne interakcie, vodíkové väzby, iónové interakcie, Coulombove interakcie, stereoselektívne interakcie atď.). [20]

Polyméry tvoriace gél na základe hydrofóbnych interakcií vykazujú vo vodnom prostredí tzv. sol-gél fázové správanie. Tieto polyméry sú zložené z hydrofóbnej a hydrofilnej časti, a sú teda nazývané ako amfifilné. Miera hydrofobicity celého systému riadi geláciu. Amfifilné kopolyméry sú rozpustné vo vode pri nízkych teplotách. Hneď ako dôjde k zvýšeniu teploty, hydrofóbne segmenty začínajú agregovať za účelom minimalizácie plochy kontaktu hydrofóbneho povrchu s veľkým množstvom vody. Teplota gelácie závisí od koncentrácie polyméru, dĺžky hydrofóbneho segmentu a chemickej štruktúry polyméru. Platí, že s rastúcou hydrofobicitou polyméru klesá gelačná teplota celého systému. [20]

Pre zosietenie in situ gélujúcich polymérov boli široko skúmané interakcie medzi nábojmi. Výhoda tohto gélujúceho systému je, že biodegradácia môže nastať pomocou iónov, ktoré sa bežne vyskytujú v extracelulárnej tekutine. Zosietenie, alebo jeho opačný proces, tak môže byť vyvolaný zmenami pH, kedy dochádza k ionizácii alebo protonizácii funkčných skupín, ktoré spôsobia geláciu. Hydrogél môže vzniknúť na základe interakcií nábojov medzi nabitým reťazcom polyméru a nabitou molekulou s nízkou molekulovou hmotnosťou alebo dvoma reťazcami polymérov s opačnými nábojmi. [20]

Na vzniku injektovateľných hydrogélom sa podieľajú aj vodíkové väzby. Zmes dvoch a viacerých prírodných polymérov môže vykazovať viskozitno-elastické vlastnosti, tj pripomínajú gél, ako konvenčné syntetické polyméry. Tento synergický efekt je obvykle

výsledkom interakcií vodíkových väzieb medzi polymérnymi reťazcami, ktorý je posilnený kompatibilitou vzájomne pôsobiacich polymérov. Pokiaľ je táto zmes prírodných polymérov vystavená tlaku, dochádza k rozrušeniu vodíkových väzieb a systém sa stáva tekutým, čo uľahčuje injekčnú aplikáciu. Nevýhodou je aplikácia týchto zmesí prírodných polymérov in vivo, pretože dochádza k veľmi rýchlemu rozpadu v dôsledku prenikania vody, čo obmedzuje ich použitie pri uvoľňovaní liečiv. [20]

Fyzikálne hydrogély môžu vznikáť aj pri vzájomnom synergickom pôsobení medzi polymérnym reťazcom a malými molekulami rovnakého chemického zloženia líšiacimi sa stereochemiou. [20]

Zatiaľ čo fyzikálne hydrogély majú výhodu v tom, že tvoria gél in vivo bez nutnosti chemickej modifikácie alebo pridaním sieťovacích činidiel, majú tiež svoje obmedzenia. Stabilita gélu je priamo závislá od vlastností gélujúcich segmentov. Na základe experimentálneho merania je potom nutné určiť čas potrebný na vytvorenie gélu a zároveň aj na degradáciu. [20]

2.3.2 Vlastnosti gélov

Vlastnosti gélov je možné rozdeliť na niekoľko skupín. Prvou dôležitou skupinou sú mechanické vlastnosti. Aj keď je disperzné prostredie kvapalné, mechanické vlastnosti gélov sú charakteristické pre tuhý stav. Do určitej hodnoty odolávajú dotyčnému napätiu a pod touto hodnotou sa chovajú ako elastické tuhé telesá. Ak nie je napätie príliš veľké, nedeformujú sa trvalo, ale vratne alebo elasticky. Hodnota kritického napätia závisí na koncentrácii uzlov, na ich pevnosti a na druhu spoja. Chemické spoje majú menšiu pevnosť ako spoje fyzikálne. Niektoré reverzibilné aj ireverzibilné gély s fyzikálnymi spojmi majú tixotropné vlastnosti. Sily pútajúce pôvodné disperzné prostredie sú slabé, a preto je možné prudkým pretrepaním tieto gély previesť na sol. Trepaním sa rušia slabé väzby medzi časticami. Ak necháme tekutý sol v kľude, väzby sa obnovia a dochádza k vzniku nového gélu. [21]

Ďalšou skupinou je elektrická vodivosť a difúzivita. Disperzné prostredie gélu obsahuje disociované nízkomolekulárne elektrolyty a elektrická vodivosť v ňom zostáva skoro rovnako vysoká ako v pôvodnom sole, z ktorého tento gél vznikol. Difúzivita nízkomolekulárnych látok je tiež o niečo menšia ako v sole, aj keď pri gelácii vzrástla viskozita systému. Malé molekuly a ióny rozpustených látok sa pohybujú v disperznom prostredí medzi sieťovým disperzným podielom takmer rovnako rýchlo ako v sole. Difúzivita nízkomolekulárnych látok nie je vďaka sieťovitej štruktúre ovplyvňovaná prúdením ani tepelnými konvekciami. Nerušená difúzia v géloch umožňuje vznik tzv. Liesegangových obrazcov. Keď do gélu s nízkomolekulárnou látkou difundujeme ďalšiu, ktorá s ňou tvorí nerozpustnú zrazeninu, prebieha zrážanie, ale len v niektorých miestach systému. Tieto miesta sa striedajú s miestami, kde sa zrazenina netvorí. [21, 22]

Skoro všetky gély v rastlinách a v živočíšnom tele vykazujú anizotropiu, ktorá je zapríčinená rôznymi podmienkami pri tvorbe gélov. U umelých gélov je príčinou anizotropie nerovnomerná objemová kontrakcia pri vysušaní alebo deformácia pri tvorbe gélu. [22]

Ďalšou dôležitou skupinou sú optické vlastnosti vysokomolekulárnych lyogélov. Stuhnutím vysokomolekulárneho roztoku vznikne gél a vzrastie intenzita tzv. Tyndalovho javu. Röntgenogram vysokomolekulárneho roztoku je typický pre amorfnú kvapalinu. V priebehu gelácie sa pri takmer všetkých vysokomolekulárnych systémoch objavujú prvé sústredné kruhy, ktoré indikujú vznik kryštálov. Kryštály sú orientované všetkými smermi v priestore, a preto vzniknú neprerušované kruhy. Na röntgenograme gélu podrobeného jednostrannému ťahu sa kruhy rozrušia a objavujú sa prerušované oblúky, kryštály nie sú orientované všetkými smermi, ale iba v smere ťahu. [21, 22]

Pri reverzibilných i ireverzibilných čerstvých géloch dochádza k mnohým samovoľným dejom, pretože nie sú v termodynamickej rovnováhe. Pri starnutí gélov rastie s časom počet styčných bodov, sieťovitá štruktúra sa zmršťuje. Časť prítomnej kvapaliny, pre ktorú nie je v géle miesto, je vytlačená a z gélu vyteká. Tento jav nazývame syneréza. Je podporovaný teplotou a pridaním elektrolytov. [21]

2.3.3 Vlastnosti gélov humínových látok

Väčšina podzemných vôd má kyslý charakter, preto sa humínové kyseliny v prírode vyskytujú prevažne v nerozpustnej podobe. V prítomnosti vody môžu humínové kyseliny prechádzať do formy gélu. Preto sa humínové gély javia ako vhodné systémy na štúdium transportných javov ťažkých kovov, liečiv a iných látok v prírode. Typickou vlastnosťou gélov je, že difúzny koeficient v géle je nižší ako v roztoku. [22]

Pri určovaní chemickej štruktúry humínovej kyseliny sa vychádza z celého radu parametrov. Mnoho vlastností humínových kyselín môžeme získať pomocou UV-VIS spektrofotometrie ich zásaditého roztoku. Absorpčný pomer $A(280 \text{ nm}) / A(465 \text{ nm})$ znázorňuje pomer medzi lignínovými štruktúrami odolnými voči humifikácii a množstvom mladých kyselín. Pomer $A(465 \text{ nm}) / A(665 \text{ nm})$ predstavuje tzv. humifikačný index, ktorý sa znižuje s rastúcou molekulárnou váhou alebo stupňom disperzity. Nízky pomer ukazuje vysoké molekulové hmotnosti použitých humínových kyselín. Vysoký pomer naznačuje nízky obsah aromatických častíc a relatívne väčší obsah alifatických štruktúr. [23]

Ak je vyššie spomínaný pomer pri humínovom materiáli veľmi vysoký, má tento materiál najnižšiu odolnosť, substancie sú viac humifikované a viac kondenzované (aromatické), a teda sú staršieho pôvodu. Ďalšiu spektrálnu charakteristiku predstavuje koeficient $\Delta \log K = \log A(400 \text{ nm}) / A(600 \text{ nm})$. Vyššia hodnota $\Delta \log K$ predstavuje vyššiu humifikáciu gélu. Materiál sa môže rozdeliť do troch základných typov: typ A ($\Delta \log K < 0,6$), typ B ($\Delta \log K = 0,6 - 0,8$) a typ Rp ($\Delta \log K = 0,8 - 1,1$). [24]

2.4 Diklofenak

Diklofenak sodný je biely až sivobiely kryštalický, mierne hygrokopický prášok bez zápachu. Je to nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID) novej chemickej štruktúry, ktoré vykazuje vysoký stupeň protizápalovej, analgetickej a antipyretickej aktivity na rôznych farmakologických modeloch. Diklofenak je taktiež účinný pri liečbe rôznych akútnych a chronických bolestí. Jeho gastrointestinálna znášateľnosť je tiež lepšia ako u iných vysoko účinných nesteroidných protizápalových látok. [25]

2.4.1 Štruktúra diklofenaku

Na základe analýzy iných nesteroidných protizápalových liekov sa predpokladalo, že účinné antireumatikum by malo mať tieto vlastnosti: konštantu kyslosti medzi 4 a 5, rozdeľovací koeficient približne 10 a dva aromatické kruhy zatočené do seba. Výber týchto kritérií bol založený na štrukturálnych a fyzikálno-chemických vlastnostiach spoločných pre fenylobutazón, kyselinu mefenámovú a indometacín, z ktorých všetky sa ukázali ako klinicky účinné pri kontrole zápalu a bolesti. Význam zvolených kritérií je zrejmý. Rozdeľovací koeficient kyseliny, ktorý závisí od pK látky, do značnej miery určuje vzorec farmakokinetického správania lieku, zatiaľ čo sterické usporiadanie aromatických kruhov môže mať vplyv na špecifickú interakciu s receptorom.

Z viac ako 200 analógov sa zistilo, že najzaujímavejšie farmakologické vlastnosti vykazuje [o-[(2,6-dichlórfenyl)-amino]fenyl]acetát sodný, teda diklofenak sodný. Táto zlúčenina spĺňa fyzikálno-chemické cieľové kritériá: má pK 4,0 a rozdeľovací koeficient 13,4. Röntgenová štrukturálna analýza jeho molekuly ukazuje, že dva aromatické kruhy sú vo vzťahu k sebe skrútené. Dva atómy chlóru v orto-polohe jedného fenylového kruhu spôsobujú maximálne skrútenie tohto kruhu. [25-30]

Diklofenak inhibuje syntézu prozápalových a nociceptívnych prostaglandínov v krvi a synoviálnom tkanive. Diklofenak patrí medzi najefektívnejšie inhibítory produkcie prostaglandínu E₂ a bolo zistené, že je mnohokrát účinnejší na molárnom základe v porovnaní s inými nesteroidnými protizápalovými liečivami, pokiaľ ide o jeho schopnosť inhibovať aktivitu COX. [33, 34]

2.4.2.2 *Stimulácia oxidu dusnatého*

Dráha oxidu dusnatého a cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) má okrem svojej úlohy pri modulácii reakcie vaskulárneho a hladkého svalstva tráviaceho traktu aj dôležitú úlohu v periférnej a centrálnej analgézií. [35]

Ferreira a Nakamura uviedli analgetický účinok cGMP na modeli potkaních labiek. Následne navrhli, že mechanizmus účinku niektorých periférnych analgetík môže byť cez dráhu L-arginín-oxid dusnatý-cGMP za predpokladu, že analgetické účinky boli blokované inhibítormi guanylátacyklázy a tvorbou oxidu dusnatého z L-arginínu a analgetikami. [36]

Pomocou dvoch rôznych zvieracích modelov bolesti Tonussi a Ferreira ukázali, že okrem inhibície COX je analgetický účinok diklofenaku tiež spôsobený funkčnou down-reguláciou senzibilizovaných periférnych receptorov bolesti, ktorá je výsledkom stimulácie dráhy L-arginín-oxid dusnatý-cGMP. Navrhli, že jasnejšie pochopenie mechanizmu účinku diklofenaku môže pomôcť vysvetliť, prečo sú niektoré analgetiká účinnejšie za iných podmienok ako iné. [37]

Diklofenak využíva dráhu L-arginín-oxid dusnatý-cGMP na aktiváciu draslíkových kanálov citlivých na ATP a poskytuje antinociceptívny účinok, čo ďalej ilustruje rozdiely v mechanizme účinku niektorých NSAID. Ukázalo sa, že aktivácia draslíkových kanálov citlivých na ATP diklofenakom je inhibovaná inhibítorom syntázy oxidu dusnatého, inhibítorom guanylátacyklázy a otváračom draslíkových kanálov citlivých na ATP. [38, 39, 40]

2.4.2.3 *Centrálne sprostredkované a neuropatické mechanizmy*

COX-dependtnú antinociceptívnu aktivitu NSAID v centrálnom nervovom systéme (CNS) zhodnotili Burian a Geisslinger. Dospeli k záveru, že antinociceptívna aktivita NSAID v CNS závisí od umiestnenia cieľových liečiv, miesta podávania liečiva, príjmu a distribúcie do miesta účinku. [41]

N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory sa podieľajú na synaptickom nociceptívnom prenose v mieche. Bolo preukázané, že niekoľko NSAID má antinociceptívny účinok na miechu. Diklofenak zmiernuje hyperalgiu sprostredkovanú NMDA receptorom u potkanov prostredníctvom dráhy L-arginín-oxid dusnatý-cGMP. Diklofenak sa tiež preukázal ako selektívny, kompetitívny inhibítor NMDA receptorov v čeľustných svaloch potkanov. [42, 43]

2.4.2.4 Inhibícia gama receptoru

Vzhľadom na to, že COX-2 je okamžitý skorý gén, výsledky niektorých štúdií naznačujú, že inhibícia COX-2 môže byť zodpovedná za protirakovinový účinok NSAID. Zvýšenie expresie COX-2 bolo skutočne hlásené u rôznych druhov rakoviny a experimentálnych modelov rakoviny. [44]

Časť protinádorovej aktivity NSAID je pravdepodobne spôsobená inhibíciou produkcie COX a PGE₂. V prípade mnohých nešpecifických a COX-2-selektívnych NSAID je protinádorový účinok nezávislý od COX prostredníctvom jadrového faktora kappa B (NF-κB), aktivačného proteínu 1 (AP-1), mitogénom aktivovanej kinázy a regulačných dráh bunkového cyklu. Nie všetky NSAID však využívajú tieto dráhy, čo naznačuje, že existujú iné cesty pre protinádorovú aktivitu, čo podporuje názor, že jednotlivé NSAID môžu mať jedinečné profily mechanizmu účinku (MOA). [45]

Jednou z takýchto navrhovaných alternatívnych ciest pre protinádorovú aktivitu nezávislú od COX pomocou NSAID je modulácia aktivity jadrového receptora, najmä receptora gama aktivovaného peroxizómovým proliferátorom (PPAR γ). Ukázalo sa tiež, že dráha PPAR γ sa podieľa na indukcii proteínu COX-2 v rôznych typoch buniek. [46, 47, 48]

Uvádza sa, že diklofenak má afinitu k PPAR γ 50-krát vyššiu ako afinitu uvádzanú pre iné NSAID. Okrem toho sa ukázalo, že indometacín a diklofenak sú skôr selektívnymi agonistami pre PPAR γ ako pre iné izoformy PPAR. Uvádza sa tiež, že diklofenak je antagonistou signalizácie PPAR γ , čo vedie k 60 % zníženiu diferenciácie tukových buniek sprostredkovanou PPAR γ . [49, 50]

Tieto posledné výsledky naznačujú, že diklofenak môže inhibovať signalizáciu PPAR γ tým, že pôsobí ako kompetitívny antagonist. To paradoxne naznačuje, že diklofenak môže za určitých podmienok podporovať zápal blokovaním protizápalovej aktivity PPAR γ . [51]

2.4.2.5 Zníženie zápalových látok

Substancia P je prozápalový neuropeptid, ktorý hrá úlohu pri niekoľkých zápalových ochoreniach. Spolu s rôznymi cytokínmi sa substancia P nachádza v plazme a synoviálnej tekutine pacientov s artritídou. Pretože NSAID sa bežne používajú na liečbu bolesti spojenú s artritídou, bola vyslovená hypotéza, že NSAID môžu interferovať s chemotaktickým účinkom substancie P na monocyty a peritoneálne bunky, čo je rozhodujúci krok pri artritickom ochorení. [52, 53, 54]

Na počiatkoch zápalu sa podieľa nespočetné množstvo cytokínov. Interleukín-6 (IL-6) je prozápalový aj protizápalový cytokín, ktorý je udržiavaný v rovnováhe mediátorom akútneho zápalu IL-10. Existuje niekoľko línií dôkazov, ktoré naznačujú, že NSAID môžu hrať úlohu pri znižovaní prozápalových cytokínov mechanizmom nezávislým od prostaglandínov. Diklofenak znižuje expresiu a produkciu IL-6 nezávisle od produkcie PGE₂ v ľudských T bunkách. [55]

2.4.2.6 Inhibícia tromboxánového receptora

Tromboxán A₂ prostredníctvom tromboxán-prostanoidného (TP) receptora spojeného s G-proteínom podporuje aktiváciu a agregáciu krvných doštičiek. Predpokladá sa, že diklofenak je účinnejší ako meloxicam, špecifický inhibítor COX-2, pri zastavení tvorby sérového tromboxánu B₂ krvnými doštičkami pri zrážaní plnej krvi. Tromboxán B₂ je neaktívnym produktom, a teda markerom tvorby tromboxánu A₂ prostredníctvom aktivity COX-1. [56, 57]

Okrem inhibície tvorby tromboxánu A₂ sa predpokladá, že diklofenak sa viaže na terapeutických úrovniach a môže pôsobiť ako kompetitívny antagonista TP receptora. [58]

2.4.2.7 Inhibícia iónových kanálov citlivých na kyslé prostredie

Tkanivová acidóza je súčasťou zápalu, ktorý prispieva k pociťovaniu bolesti priamou excitáciou nociceptívnych senzorických neurónov cez iónové kanály citlivé na kyslé prostredie (ASIC). Bolo zistené, že diklofenak selektívne inhibuje ASIC3 a ibuprofén selektívne inhibuje ASIC1. [59]

Ukázalo sa tiež, že diklofenak a ibuprofén inhibujú protónmi indukované prúdy v hipokampálnych interneurónoch potkanov. Obidve tieto činidlá znižovali amplitúdu a rýchlosť rozpadu prúdov vyvolaných kyselinou; avšak iba diklofenak posunul krivku desenzibilizácie v ustálenom stave na alkalickejšie pH, čo pravdepodobne spomalilo zotavenie z desenzibilizácie ASIC. Ukázalo sa, že lokálny diklofenak znižuje bolesť vyvolanú kyselinou u ľudí prostredníctvom útlmu aktivity ASIC. [60, 61]

2.5 Súčasný stav riešenej problematiky

2.5.1 Difúzia v sústavách s obsahom humínových gélov

Wang a kol. v [62] študovali efekt HK na voľnú difúziu Eu³⁺ iónov v bentonite a zistili, že vznik komplexov HK-Eu na povrchu bentonitu spôsobil spomalenie migrácie iónov materiálom.

Naopak Wold a Eriksen uvádzajú v publikácii [63] štúdium zamerané na difúziu Eu³⁺ a Co²⁺ iónov cez bentonit a zistili, že prítomnosť koloidnej formy humínovej kyseliny difúzy koeficient iónov výrazne zvyšuje. Humínové kyseliny potláčajú sorpciu iónov v bentonite a pôsobia ako prenášače Eu³⁺ a Co²⁺ iónov. Z toho vyplýva, že interakcia iónov s koloidnou formou humínovej kyseliny má komplexný vplyv na ich mobilitu pevným prostredím.

V štúdiu [64] bola skúmaná metóda difúzie z konštantného zdroja difúzie Co²⁺ iónov do trubičiek naplnených humínovým gélom. Tieto trubičky boli ponorené do roztoku chloridu kobaltnatého a po určitej dobe gél vytiahnutý a narezaný na plátky. Co²⁺ ióny boli vylúhované koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. U vylúhovaných Co²⁺ iónov boli premeriavané UV-VIS spektrá. Tým bol stanovený koncentračný profil Co²⁺ iónov v géli.

V štúdiách [65, 66, 67, 68] sa diskutujú prvé výsledky jednoduchých difúzných experimentov. V publikácii [65] bol stanovený difúzny koeficient Cu^{2+} iónov v géle humínovej kyseliny pomocou metódy difúzneho páru. V tomto experimente bol použitý gél, do ktorého bola meď zasadená z roztoku CuCl_2 s koncentráciou 5 M a gél humínovej kyseliny bez prítomnosti iónov. Experiment bol zopakovaný pre gél vzniknutý zrážaním roztoku humínovej kyseliny roztokom CuCl_2 s koncentráciou 5 M, výsledná hodnota difuzivity bola oveľa nižšia. Hodnoty difúzných koeficientov v tejto práci neboli overené ďalšou difúznou metódou.

Autori v [69] študovali difúziu ťažkých kovov cez humínové látky. Najviac sa zaoberali šírením Cu^{2+} iónov v humínovom hydrogèle. Zistili, že všetky stanovené difúzne koeficienty Cu^{2+} iónov v géle sú nižšie, ale rádovo v rovnakom rozsahu v porovnaní s difúznymi koeficientmi získanými vo vode. Tento objav môže slúžiť ako dôležitý fakt pre hodnotenie a štandardizáciu ich použitia v rozsiahlom spektre aplikácií.

V práci [70] bola použitá jednoduchá difúzna metóda na hodnotenie transportu kovu v modeli humínovej matrice. Aj tu bola študovaná difúzia Cu^{2+} iónov cez humínové hydrogély. Zistilo sa, že teoreticky konštantná oblasť Cu^{2+} iónov na rozhraní roztok/gél závisí od času. Posun ε je výraznejší pri vyššom toku Cu^{2+} iónov a spôsobuje ohnutie teoreticky lineárnej závislosti difúzneho toku na druhej odmocnine času.

2.5.2 Imobilita diklofenaku

Diklofenak, rovnako ako ostatné NSAID, pretrváva vo vodnom prostredí, odkiaľ sa ďalej dostáva do pôdneho systému. Prítomnosť diklofenaku v povrchových vodách môže viesť k merateľným hladinám v pitnej vode aj za ošetrovaných podmienok. [71]

Mobilita liečiv v pôde závisí najmä na adsorpcii liečiv v pôde a na miere vylúhovania liečiva do pôdneho roztoku. Potenciálne vylúhovanie závisí od rovnováhy vzniknutej na rozhraní pôda-roztok. Následne záleží na pevnosti väzby liečiva k pôde a na okolitých podmienkach. Mobilita sa dá chápať ako miera a pravidelnosť vylúhovania daného liečiva, ale záleží na mnohých ďalších faktoroch, ako je pH, zloženie organickej hmoty, vlhkosť a textúra pôdy. Imobilita je zasa miera pretrávania liečiva napríklad v pôde [72].

Rastliny fungujú ako indikátory globálneho znečistenia, pretože sú prítomné takmer na všetkých miestach planéty a hromadia chemické látky prítomné v atmosfére, vo vode a v pôde. Výskum, ktorý sa zameriaval na detekciu liečiv a produktov osobnej starostlivosti v rôznych typoch rastlín, ukázal pomerne variabilné koncentrácie liečiv v rozmedzí od nulovej detekcie až po $487 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$. Diklofenak svojou prítomnosťou zapríčinil hlavne spomalenie rastu rastliny a obmedzenie prísunu živín. [73, 74].

Počet možných kombinácií rastlinných druhov, kontaminantov a podmienok prostredia je teda takmer nekonečný. V súčasnosti sú dostupné všeobecné modely, podľa ktorých možno kontaminanty zaradiť a určiť ich toxicitu. Kontaminanty sa z prostredia do potravín môžu

dostávať rozličnými spôsobmi – absorpciou vody z pôdných pórov pomocou koreňov, difúziou z pôdy alebo vzduchu, alebo prichytením pôdných častíc a následnou difúziou do rastlinného tkaniva. Odolné, polárne a neprchavé kontaminanty, kam patrí aj diklofenak, majú najvyšší potenciál pre akumuláciu z pôdy. [73, 75].

2.5.3 Interakcia medzi diklofenakom a humínovými látkami

Chemicky je diklofenak slabá kyselina. Preto je možné predpokladať, že v pôde prebieha obmedzená interakcia s humínovými kyselinami, pretože pri subneutrálnom až subalkalickom pH je diklofenak negatívne nabitý, zatiaľ čo funkčné skupiny HK sú hlavne deprotonované. Za takýchto podmienok diklofenak naozaj vykazuje len nízku sorpčnú tendenciu na pôdne koloidy potiahnuté HK. [76]

Interakcia medzi nesteroidným protizápalovým liečivom diklofenakom a HK v objemovom roztoku bola študovaná pomocou dvoch komplementárnych analytických metód: UV-VIS spektroskopie a voltametrie. Pozorované UV-VIS spektrá a Ip/V krivky naznačujú, že v týchto experimentálnych podmienkach, aj keď sú obe látky negatívne nabité pri pH 6,5, môže interakcia medzi liečivom a pôdnymi humínovými kyselinami viesť k vytvoreniu supramolekúl diklofenaku a humínových kyselín. Tieto výsledky by mohli prispieť k poskytnutiu informácií o správaní diklofenaku v pôdnom prostredí, čo naznačuje jeho migráciu v podobe micel s humínovými látkami cez profil hrubej pôdy. [77]

Humínové kyseliny tvoria supramolekulárne celky s niekoľkými neutrálnymi alebo nabitými xenobiotikami, na základe čoho je možné predpokladať, že aniónový diklofenak a HK by mohli interagovať prostredníctvom supramolekulárneho procesu, čím by ovplyvnili osud liečiva v pôde. [78]

Humínové kyseliny sú stále predmetom výskumu a je vynaložené veľké úsilie na objasnenie ich definovanej štruktúry. Súčasné poznatky naznačujú, že ich základným väzbovým blokom je hydrofóbna štruktúra aromatických kruhov s pripojeným alkoholom, amidom, amínom, karboxylovými, karbonylovými, fenolovými, hydroxylovými a chinónovými funkčnými skupinami. Vďaka tejto polyfunkčnosti vykazujú HA schopnosť interagovať s xenobiotikami za vzniku komplexov rôznej rozpustnosti a chemickej a biochemickej stability. Ovplyvňujú najmä príjem, biologickú dostupnosť, transport, fixáciu a toxicitu xenobiotík v pôde a v životnom prostredí. [79, 80]

Zavádzanie liečiv do životného prostredia prostredníctvom splaškových kalov, hnoja alebo odpadových vôd a ich potenciálne vylúhovanie v podzemných vodách sa len nedávno objavilo ako environmentálny problém. Ukázalo sa, že adsorpcia na minerálne a organo-minerálne pôdne frakcie spomaľuje a dokonca zabraňuje vyplavovaniu liečiv cez pôdny profil. [81, 82, 83]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie

- humínová kyselina IHSS Elliott Soil
- agaróza – Sigma-Aldrich Co.
- diklofenak
- MQ voda
- hydroxid sodný
- kyselina chlorovodíková
- lukosan

3.2 Použité prístroje

- UV-VIS spektrofotometer HITACHI U-3900H
- analytické váhy – ScalTec SBC 31
- váhy – ScalTec SPB 42
- elektrický varič
- digitálny teplomer
- magnetická miešačka
- bežné laboratórne pomôcky

3.3 Príprava roztokov a gélov

3.3.1 Roztok humínovej kyseliny

Prvým krokom bola príprava roztoku hydroxidu sodného. Návažka 0,2059 g hydroxidu sodného bola rozpustená v 50 ml vody. Týmto postupom sa získal 0,1 M roztok hydroxidu sodného. Následne pokračovala príprava roztoku humínovej kyseliny Elliott Soil. Návažka 0,0972 g humínovej kyseliny bola rozpustená v 50 ml pripraveného roztoku hydroxidu sodného. Pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej sa hodnota pH upravila na 7. Tento roztok bol doplnený vodou na 100 ml.

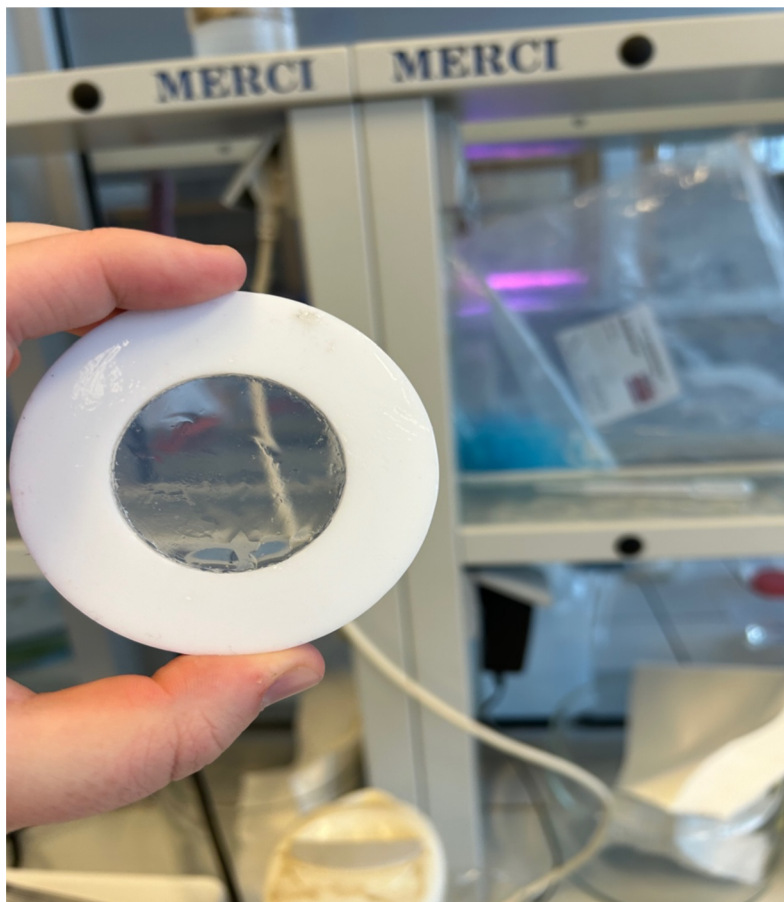
3.3.2 Roztok diklofenaku

Navážka 0,0051 g práškoveho diklofenaku bola rozpustená v 2 l vody. Toto množstvo bolo zvolené kvôli horšej rozpustnosti diklofenaku. Roztok bol uskladnený v zásobnej nádobe a udržiavaný v chlade počas celého experimentu.

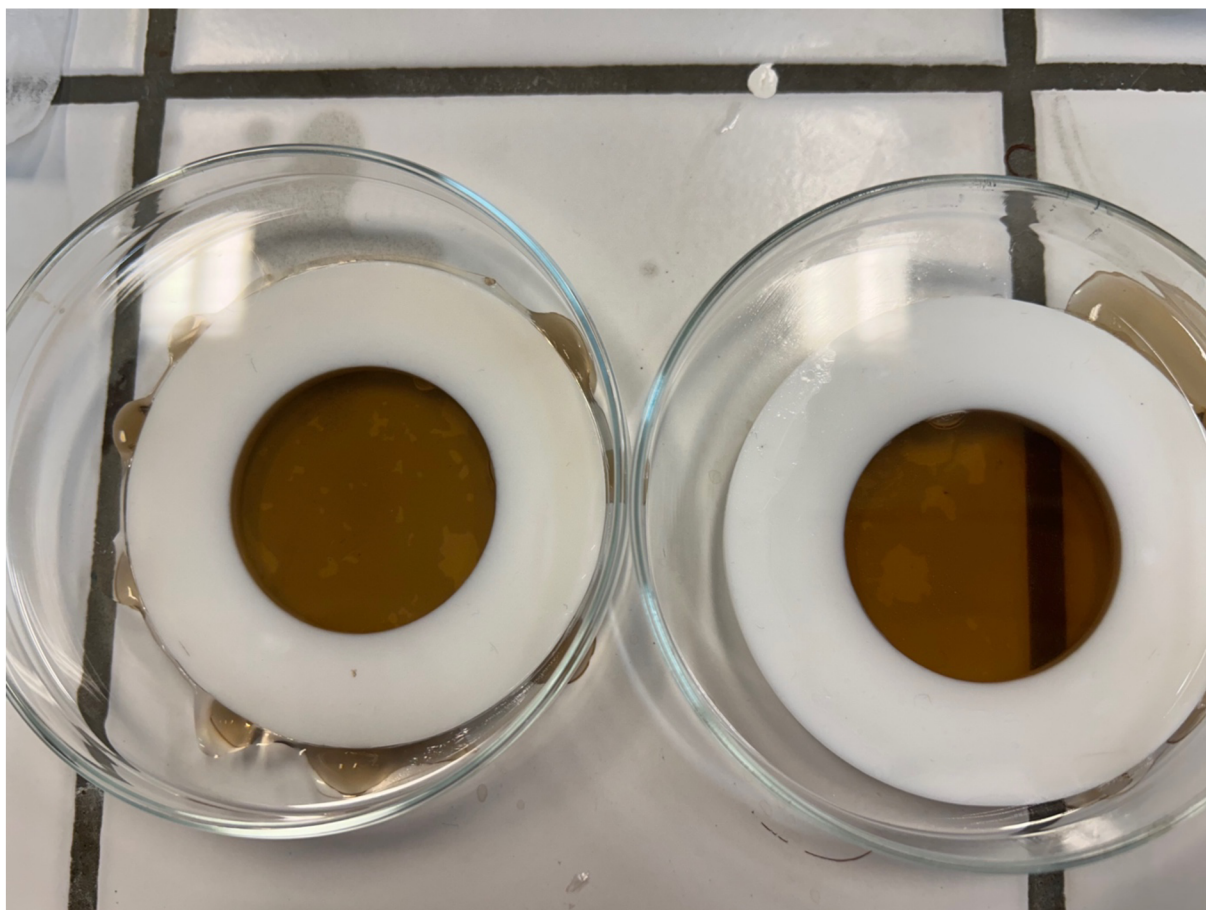
3.3.3 Gély

K experimentu boli pripravené dva druhy gélov. Jeden bez prídavku humínovej kyseliny a druhý s prídavkom. Návažka 0,201 g agarózy boli rozpustená v 20 ml vody, tým sa získal 1 % roztok agarózy. Tento roztok bol následne zahrievaný za občasného miešania a premeriavania teploty. Po dosiahnutí teploty 75-85 °C bola tekutá zmes ešte za tepla naliata do kruhovej formy, ktorá bola namazaná lukosanom. Zmes sa nechala vychladnúť a stuhnúť.

Ďalej boli potrebné gély aj s obsahom humínovej kyseliny. Na získanie 1 % roztoku agarózy bola použitá návažka 0,4993 g agarózy a 50 ml roztoku v pomere 1:9. To znamená, že sa použilo 45 ml vody a 5 ml roztoku humínovej kyseliny. Ďalší postup bol totožný s prípravou gélu bez HK. Zmes bola zahriata na požadovanú teplotu a potom preliata do kruhovej formy namazanej lukosanom, kde sa nechala stuhnúť.



Obrázok č. 3: Pripravený gél bez obsahu HK vo forme



Obrázok č. 4: Pripravený gél s obsahom HK vo forme

3.3.4 Vlastný experiment

K vlastnému experimentu boli použité difúzne cely. Medzi 2 difúzne cely bola umiestnená kruhová forma s gélom a cely boli následne uchytené v držiakoch. Do jednej difúznej cely bolo naliatych 50 ml roztoku diklofenaku a druhej 50 ml vody. Obe tekutiny museli byť nalievané naraz kvôli zmenám tlaku. Do každej cely bolo vhoďené magnetické miešadlo a potom sa cely zaštopľovali, aby nič neunikalo.

Difúzne cely boli umiestnené na magnetickú miešačku, aby boli roztoky pravidelne premiešavané. Následne už bola pozorované difúzia medzi jednotlivými celami. Z každej cely bola odobraná vzorka do kyvety, ktorá bola premeriavaná na UV-VIS spektrofotometri HITACHI v rôznych časových intervaloch. Merania prebiehali až do nastolenia rovnováhy v oboch celách. Premeriavané boli difúzie cez 3 gély bez obsahu HK a cez 3 gély s obsahom HK.

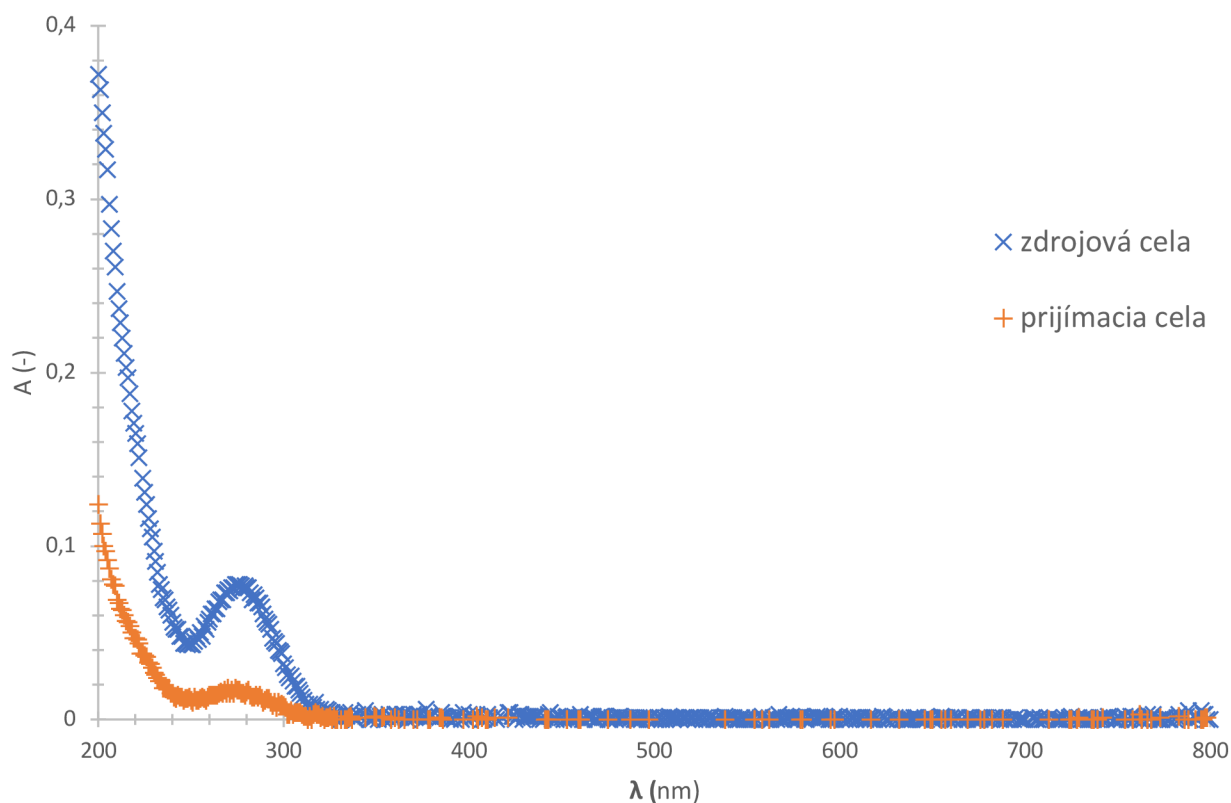


Obrázok č. 5: Difúzne cely spojené gélovou formou s obsahom HK

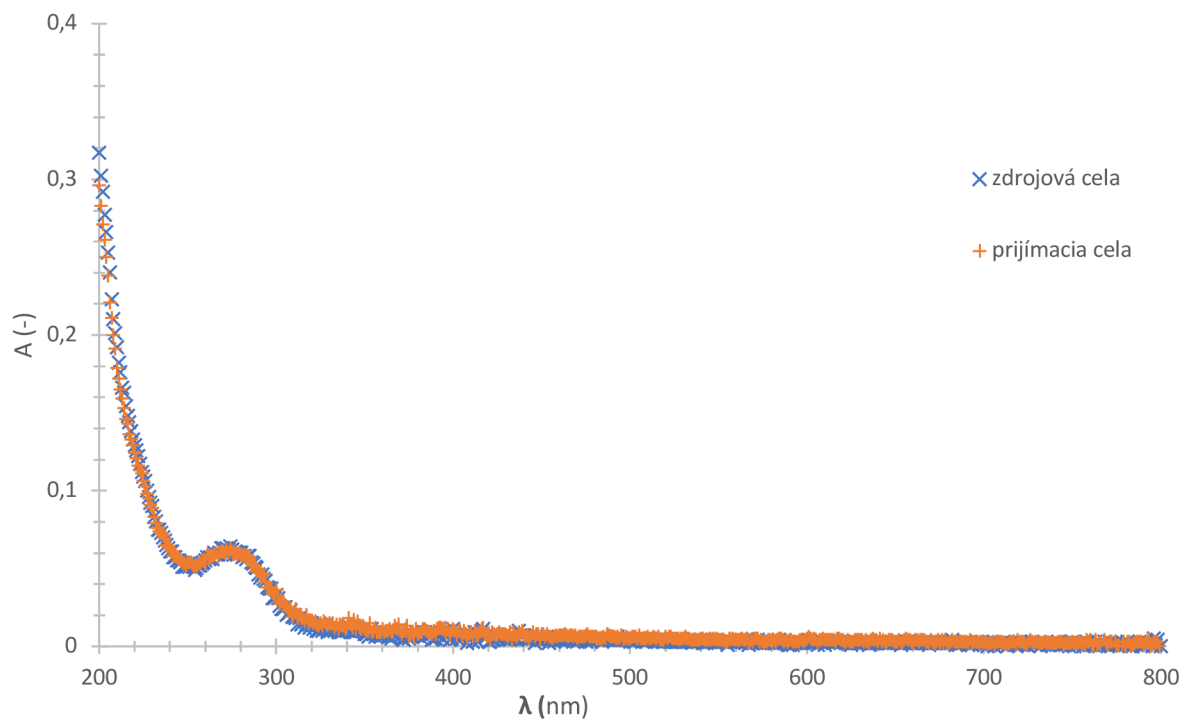
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Merania prebiehali v rôznych časových intervaloch. Síce boli všetky vzorky pripravované rovnakým spôsobom, ale rovnováha nebola ustálená vždy v tom istom momente. Merania bez prídavku humínovej kyseliny boli premeriavané po jednom za sebou a s prídavkom humínovej kyseliny boli premeriavané naraz. Aj tento fakt sa mohol podpísať na výsledkoch.

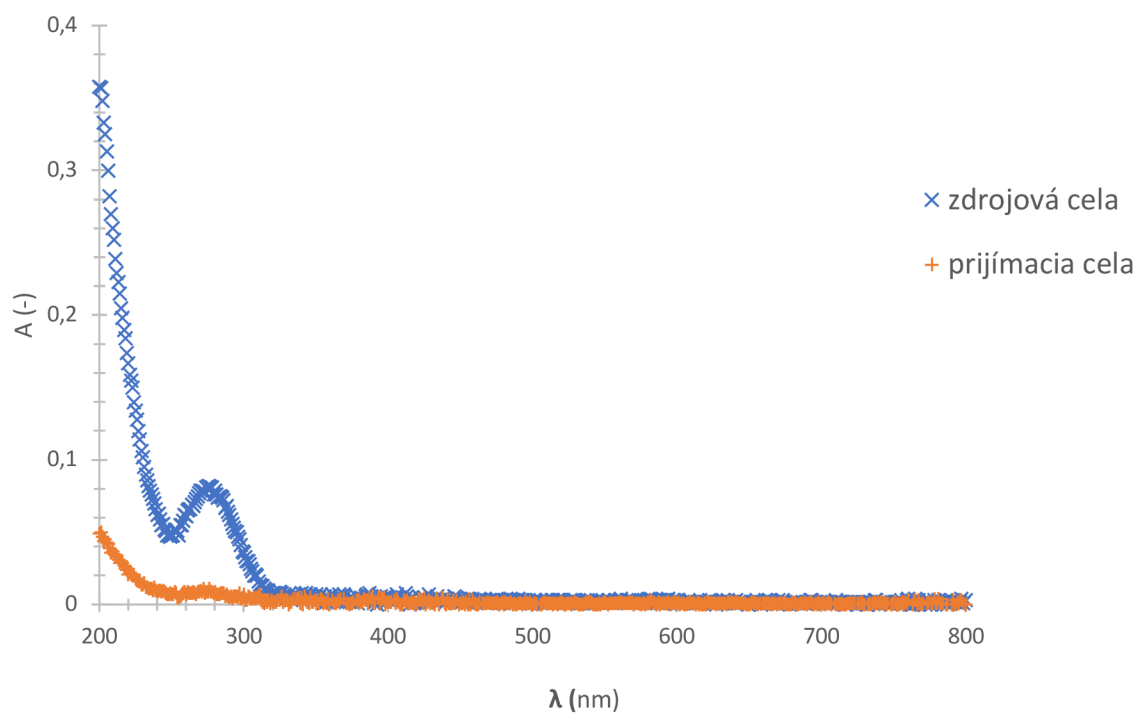
4.1 Meranie absorbancie bez prídavku HK



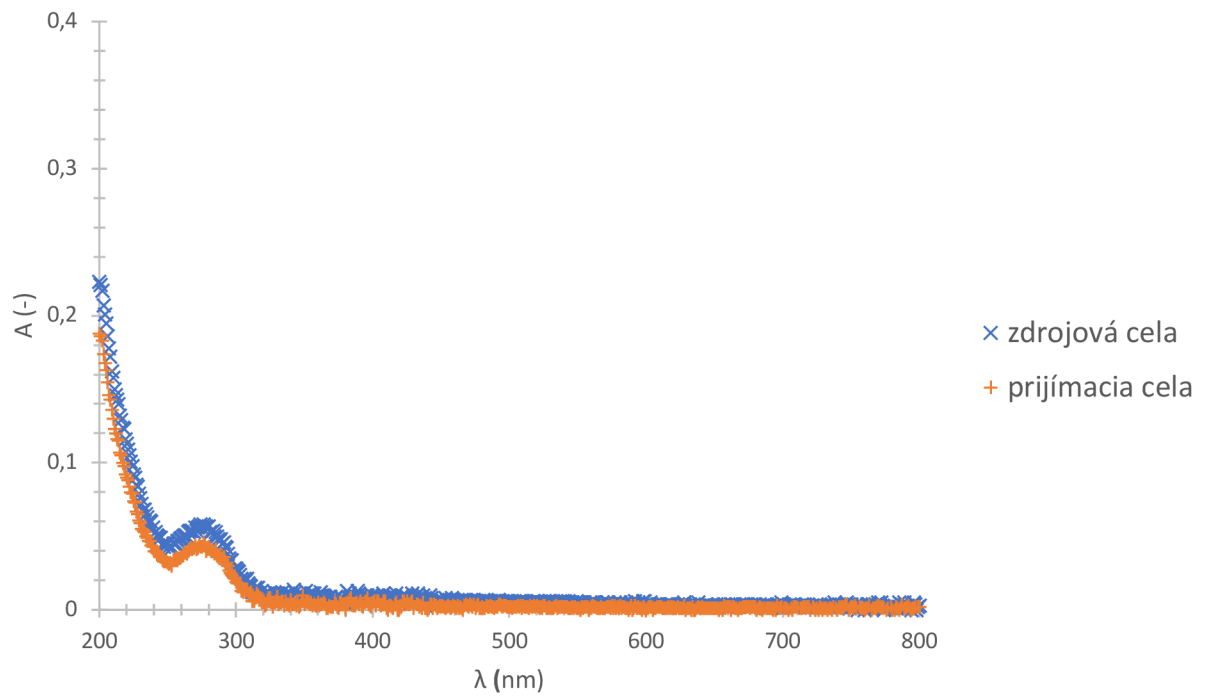
Obrázok č. 6: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 1. vzorku bez HK po 24 h



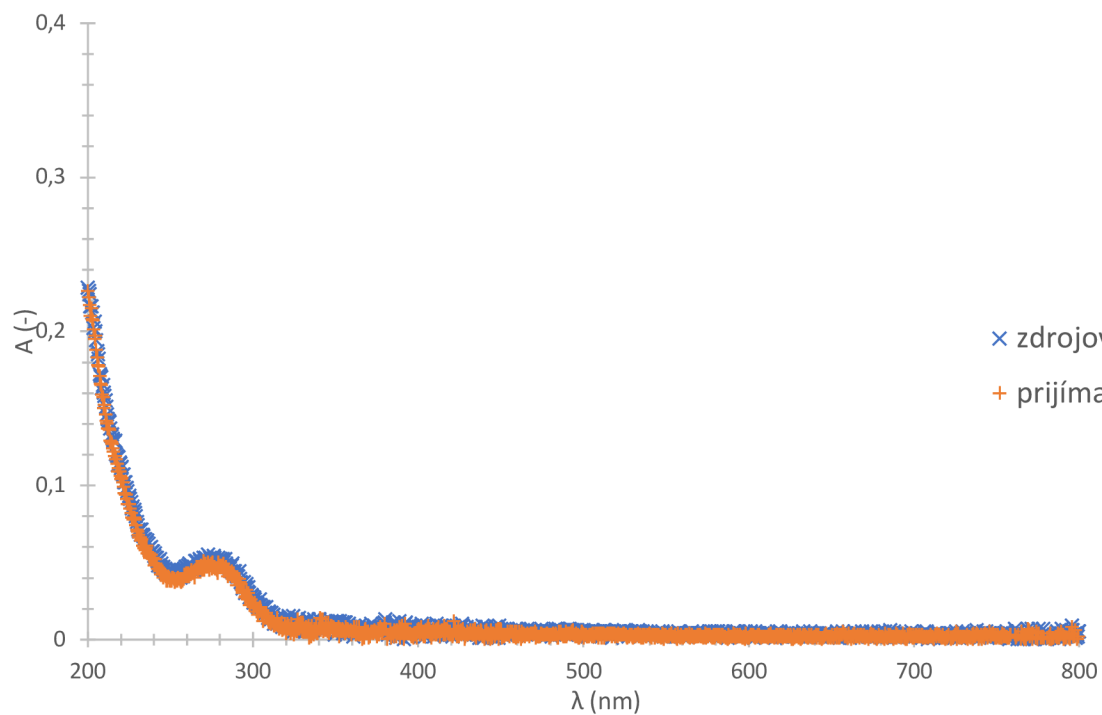
Obrázok č. 7: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 1. vzorku bez HK po 288 h



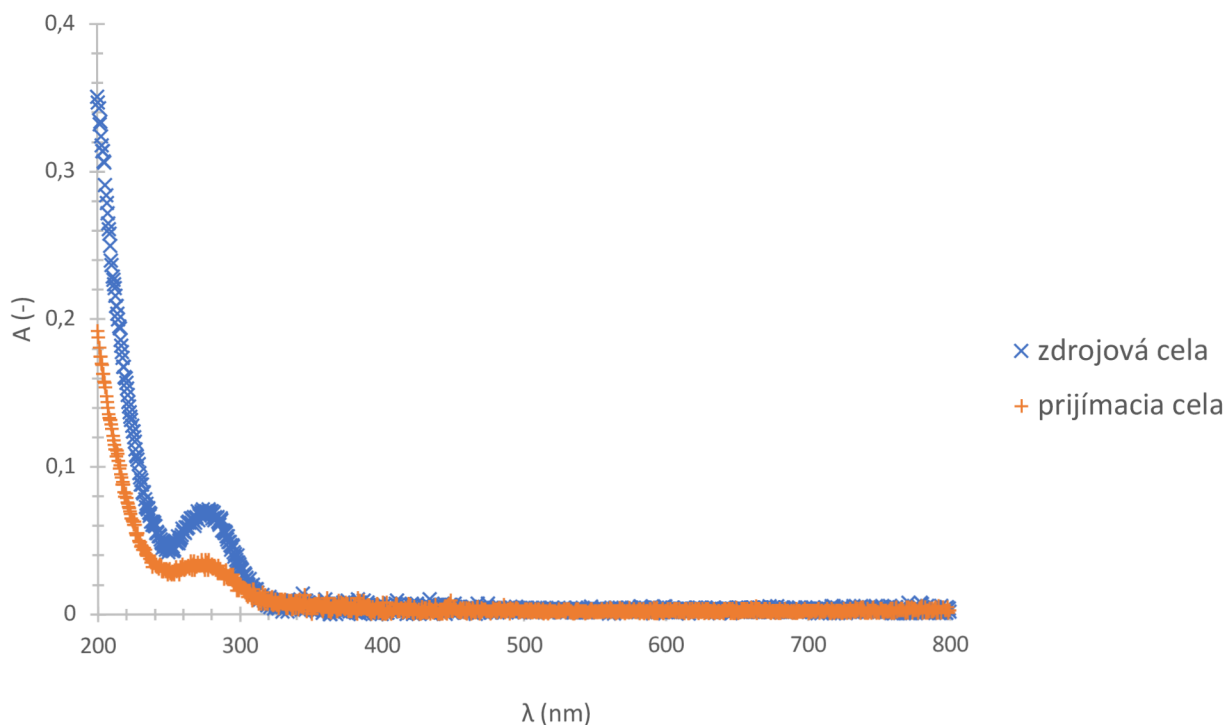
Obrázok č. 8: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 2. vzorku bez HK po 24 h



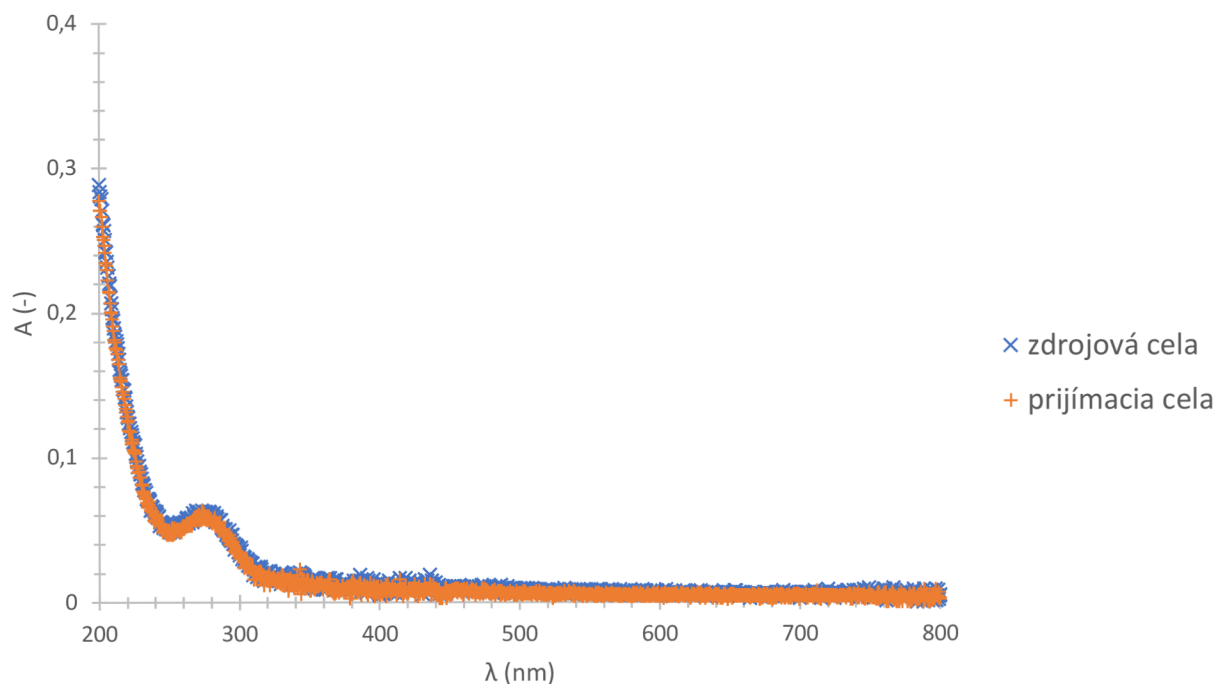
Obrázok č. 9: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 2. vzorku bez HK po 312 h



Obrázok č. 10: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 2. vzorku bez HK po 648 h



Obrázok č. 11: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 3. vzorku bez HK po 24 h



Obrázok č. 12: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 3. vzorku bez HK po 288 h

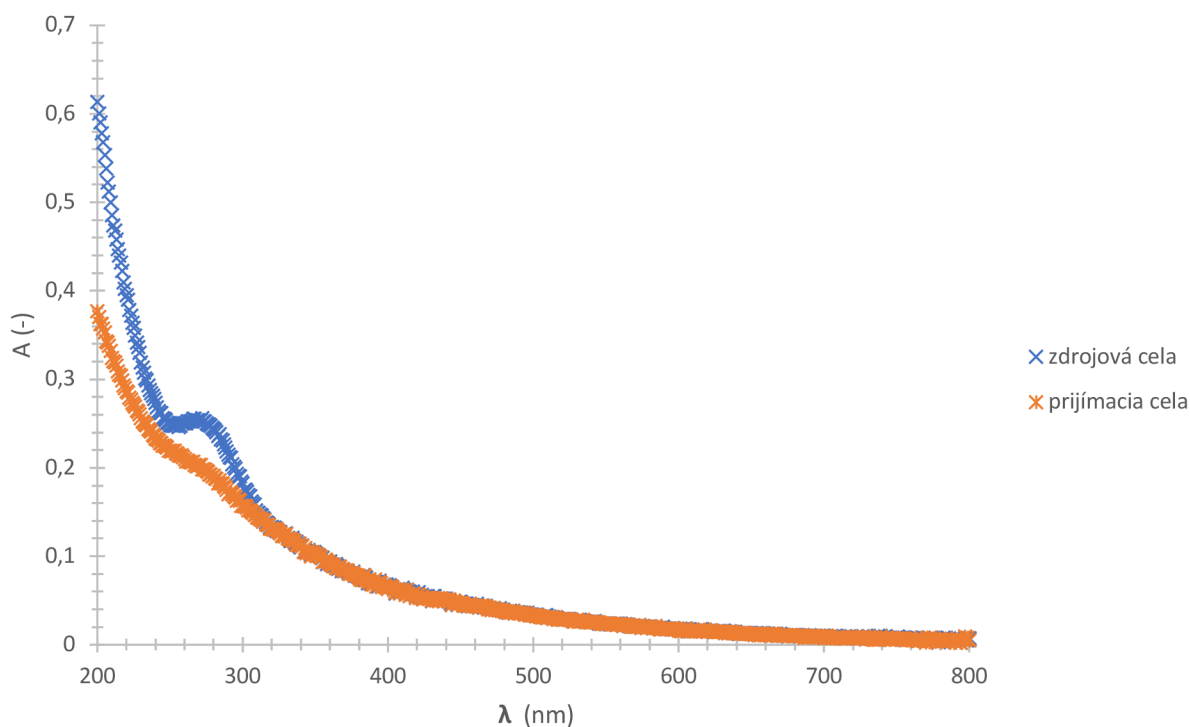
V zdrojovej cele sa nachádzal roztok diklofenaku, ktorý bol inak skladovaný v chlade, aby nedošlo k jeho degradácii, čo by mohlo ovplyvňovať výsledky. V prijímacej cele sa nachádzala

MQ voda, ktorá je vysoko čistá a nemala by nijak ovplyvňovať priebeh difúzných experimentov.

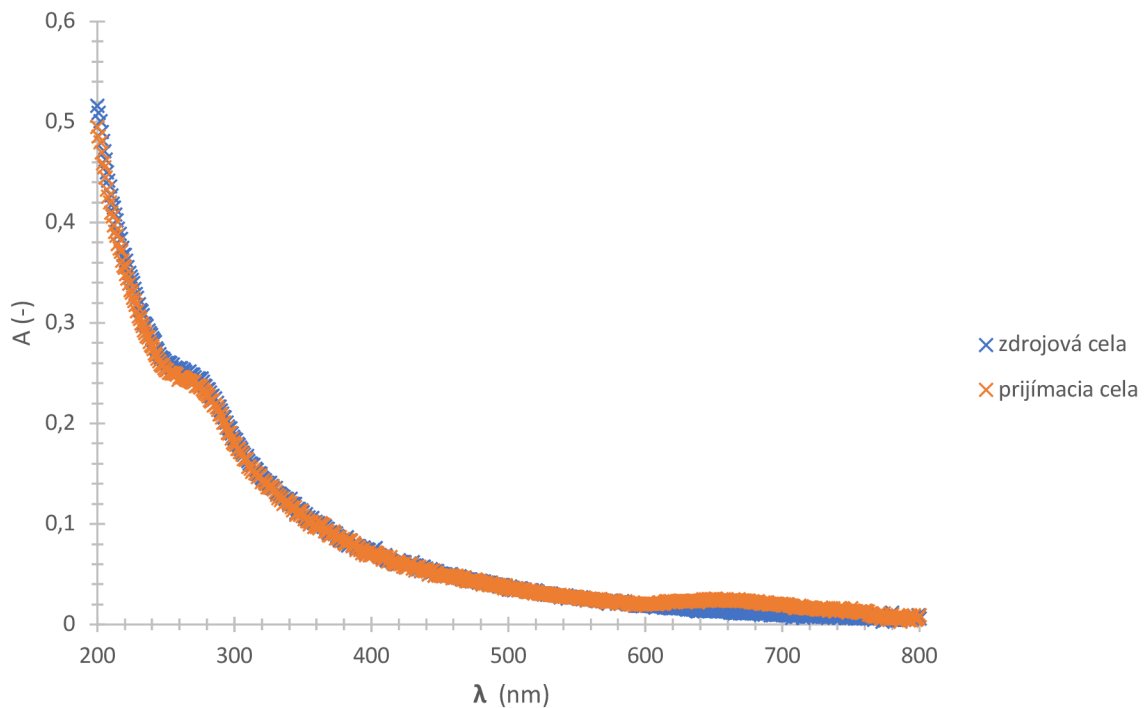
V prvej a tretej vzorky nastala rovnováha približne po 288 h. Druhá vzorka mala trochu odlišnú trajektóriu a do relatívne ustáleného stavu sa dostala až po 648 h. Keďže boli pripravované rovnakým spôsobom a rovnakými pomermi, bolo očakávané, že výsledky budú rovnaké. Ako bolo spomenuté vyššie, táto anomália môže byť spôsobená meraním v odlišných časoch, alebo vplyv môže mať aj teplota v laboratóriu. V každej cele bolo aj magnetické miešadlo, ktoré malo dopomáhať k difúzii. Aj to mohlo mať určitý vplyv.

V neposlednom rade závisí aj na pripravenom hydrogéli medzi difúznymi celami. Agaróza je považovaná v tomto prípade za látku, s ktorou by použité látky nemali interagovať. Hydrogély boli teda pripravené rovnakým spôsobom, ale vzniknuté póry v hydrogéli môžu mať odlišné veľkosti, a tým ovplyvňovať rýchlosť celého procesu.

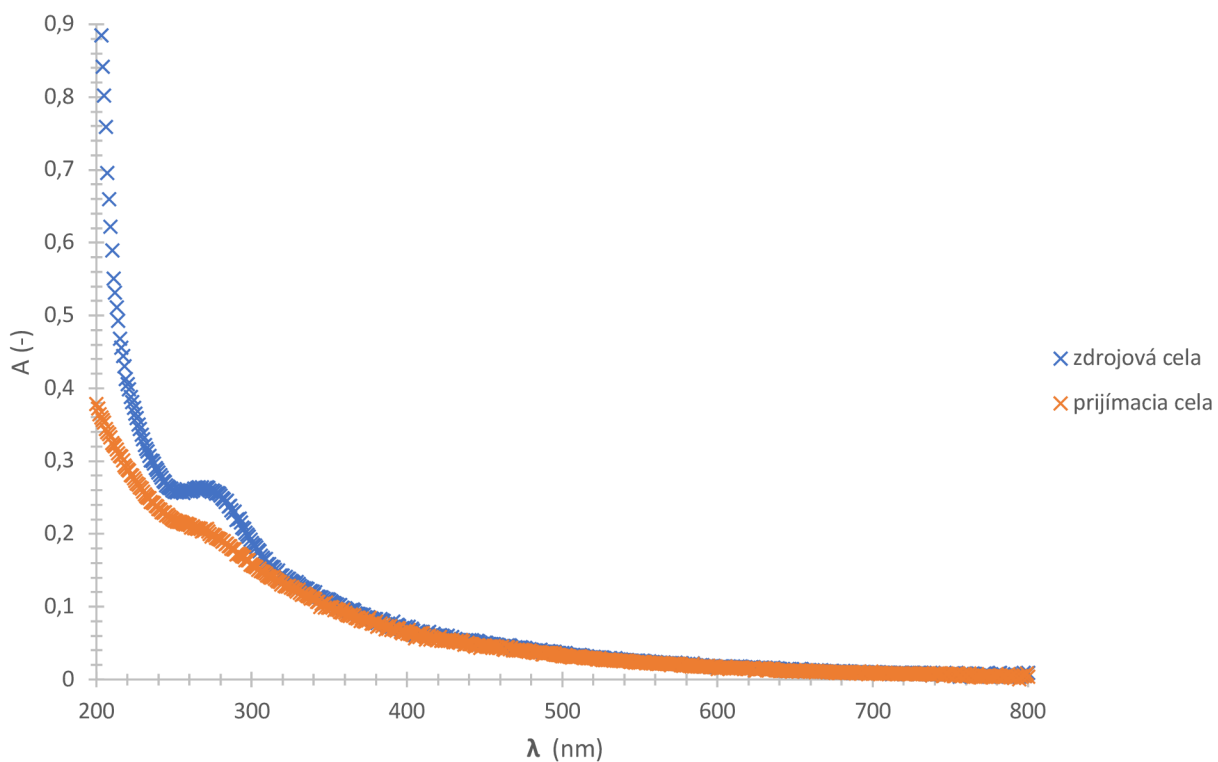
4.2 Meranie absorbancie s prídavkom HK



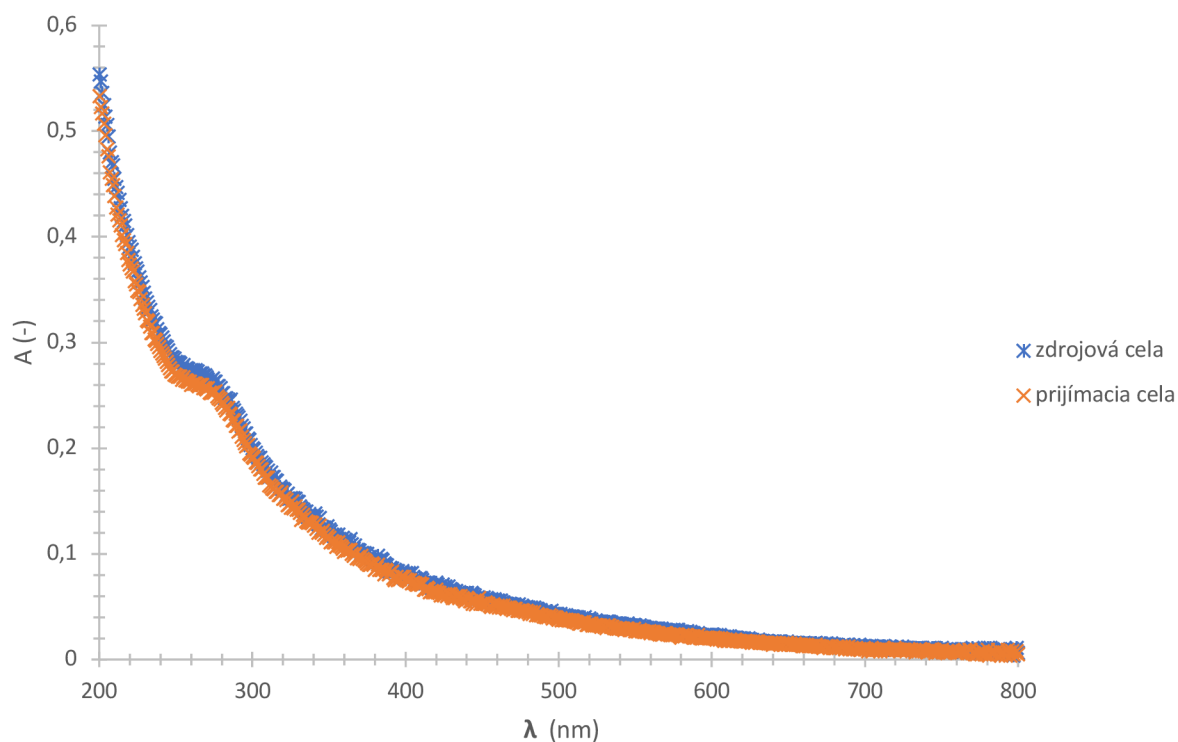
Obrázok č. 13: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 1. vzorku s HK po 24 h



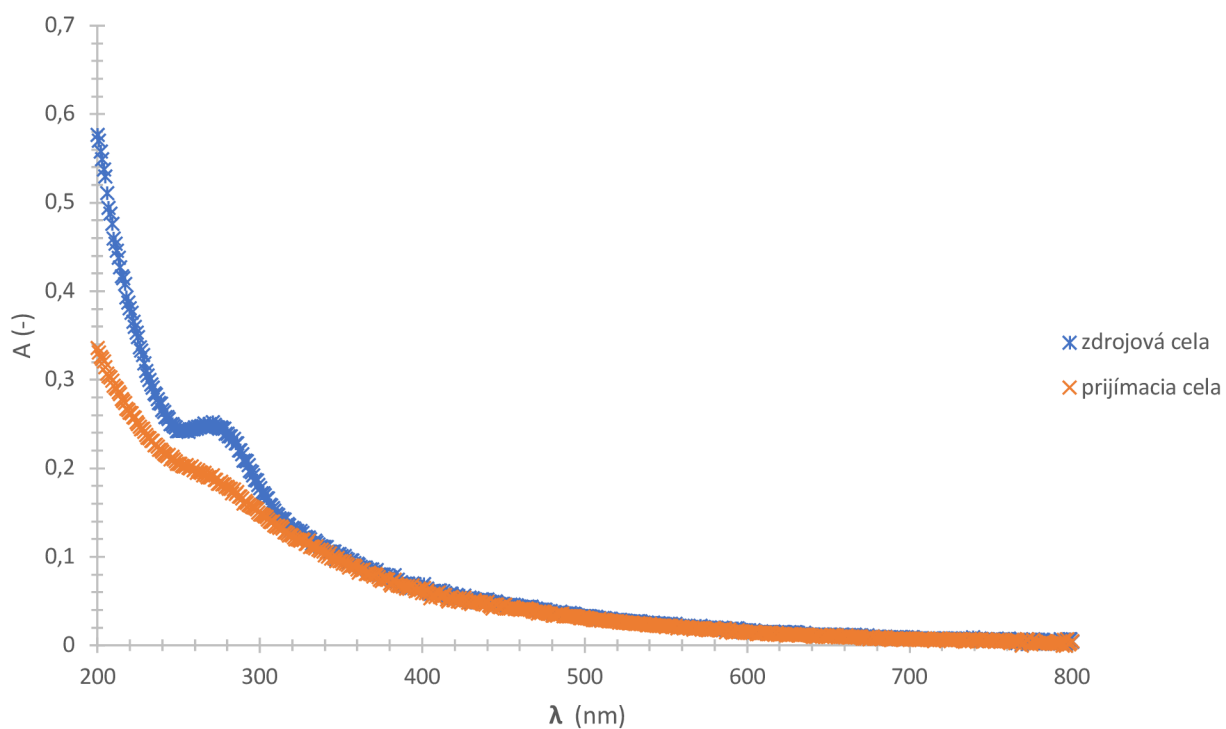
Obrázok č. 14: Závislosť absorbcie na vlnovej dĺžke pre 1. vzorku s HK po 676 h



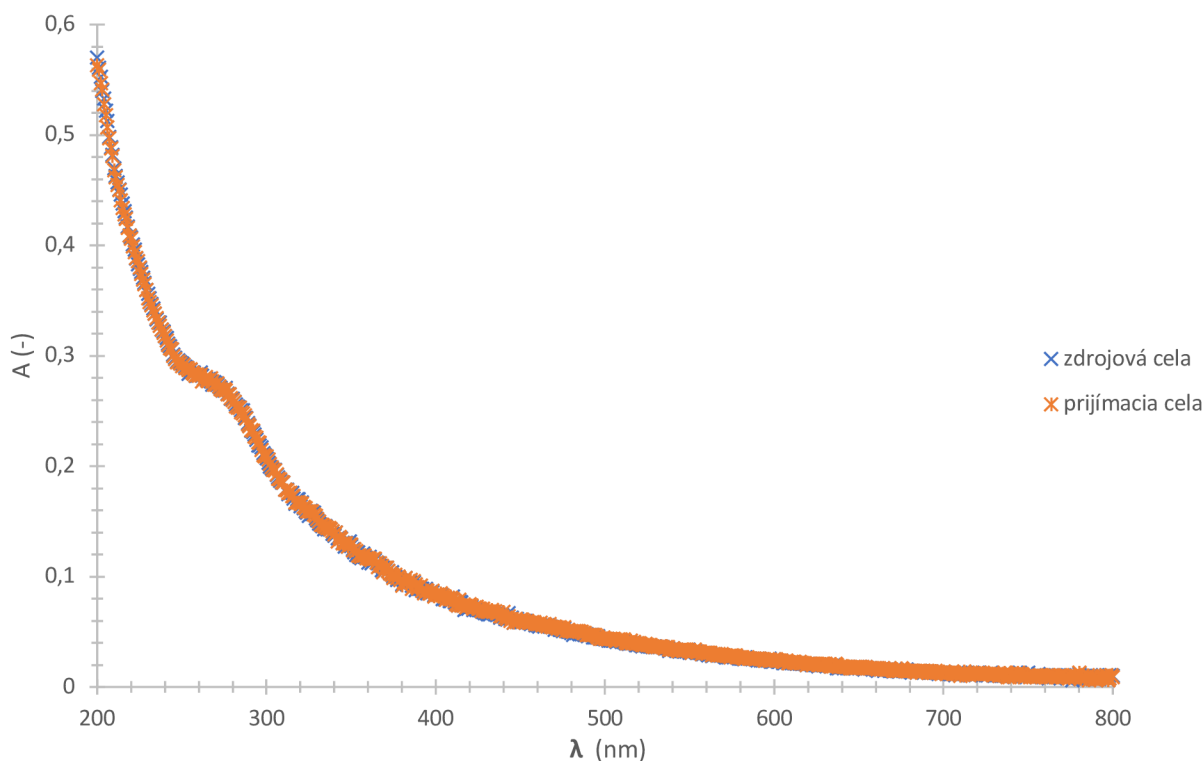
Obrázok č. 15: Závislosť absorbcie na vlnovej dĺžke pre 2. vzorku s HK po 24 h



Obrázok č. 16: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 2. vzorku s HK po 676 h



Obrázok č. 17: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 3. vzorku s HK po 24 h



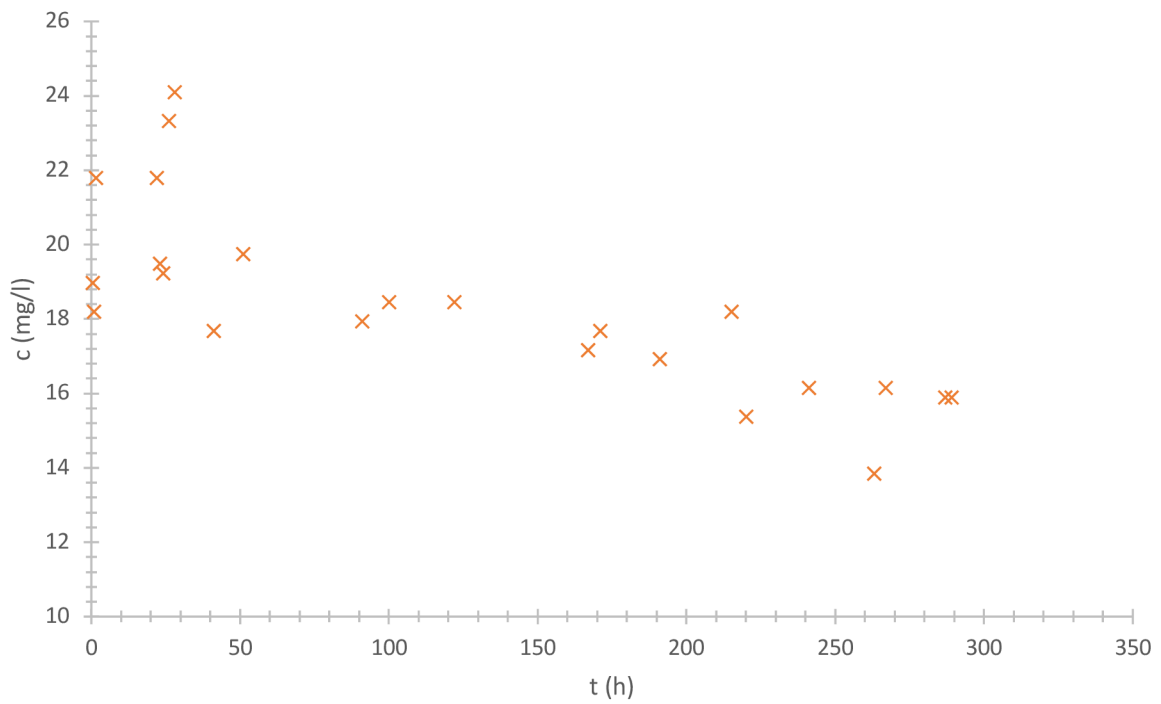
Obrázok č. 18: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre 3. vzorku s HK po 650 h

Pridanie humínovej kyseliny IHSS Elliott Soil malo značný vplyv na dosiahnutie rovnováhy. Oproti rovnováhe s hydrogélmi bez prídavku humínovej kyseliny bol čas viac ako dvojnásobný. V prvých dvoch vzorkách išlo približne o 676 h a tretia vzorka bola o niečo rýchlejšia, konkrétne 650 h.

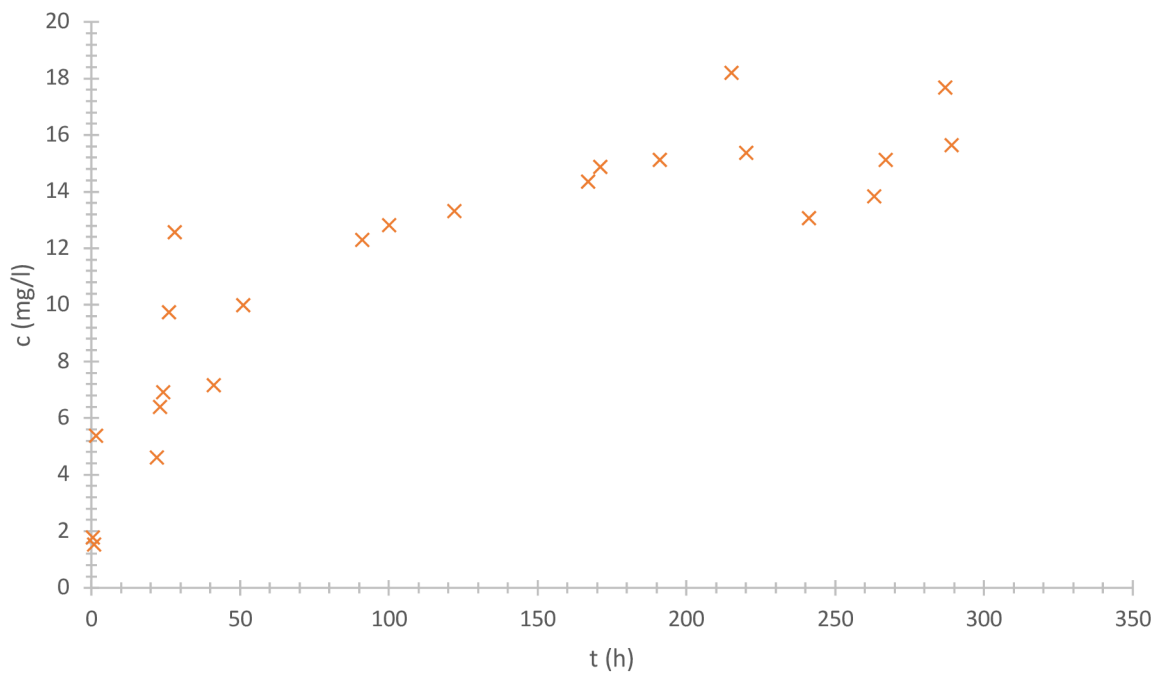
Tento fakt je pripisovaný interakciám medzi humínovou kyselinou a diklofenakom. Humínové kyseliny majú zložité zloženie s väčším množstvom funkčných skupín. Práve toto unikátne zloženie môže byť príčinou týchto interakcií s diklofenakom. Ale presný charakter týchto interakcií nebol objasnený.

V publikáciách [76, 77] bol načrtnutý charakter interakcií medzi humínovými kyselinami a liečivami. Diklofenak vystupuje ako slabá kyselina, a preto môže v neutrálnom prostredí interagovať s HK. Opisuje sa aj vzniknutie supramolekul diklofenaku a HK a prechod diklofenaku v podobe micel cez pôdny profil. Keďže hydrogély s HK napodobujú tento profil, toto môže byť príčinou pomalšieho ustálenia rovnováhy.

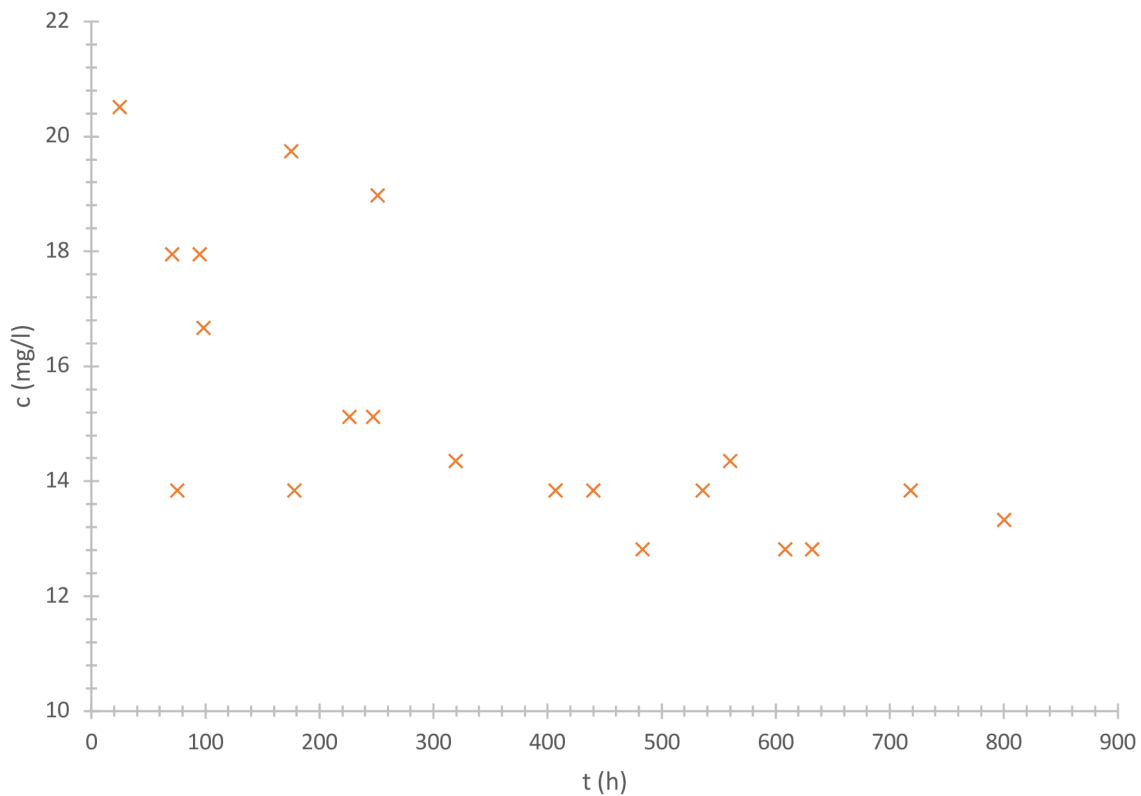
4.3 Koncentračné profily bez HK



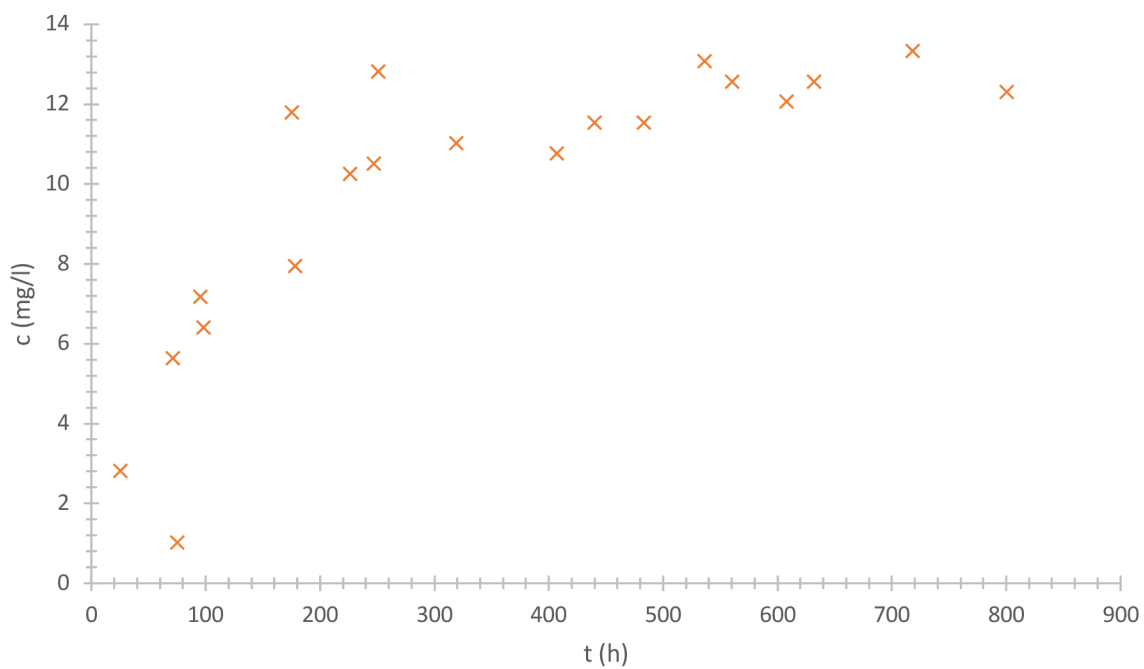
Obrázok č. 19: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 1 bez HK



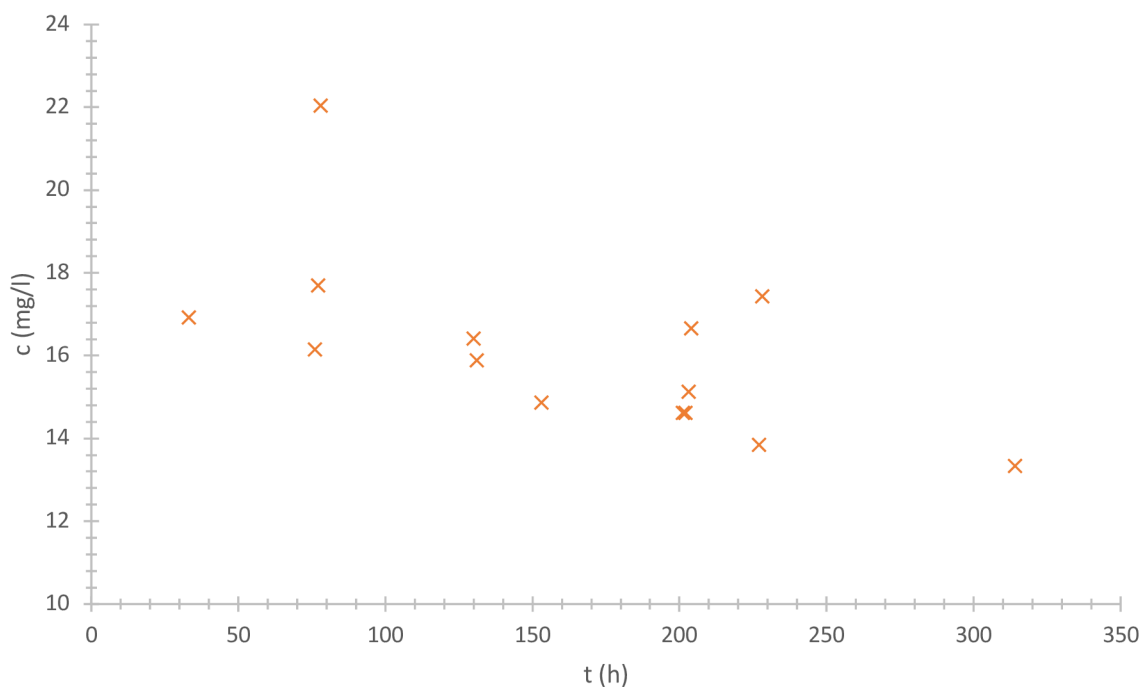
Obrázok č. 20: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijímacej cele vo vzorke 1 bez HK



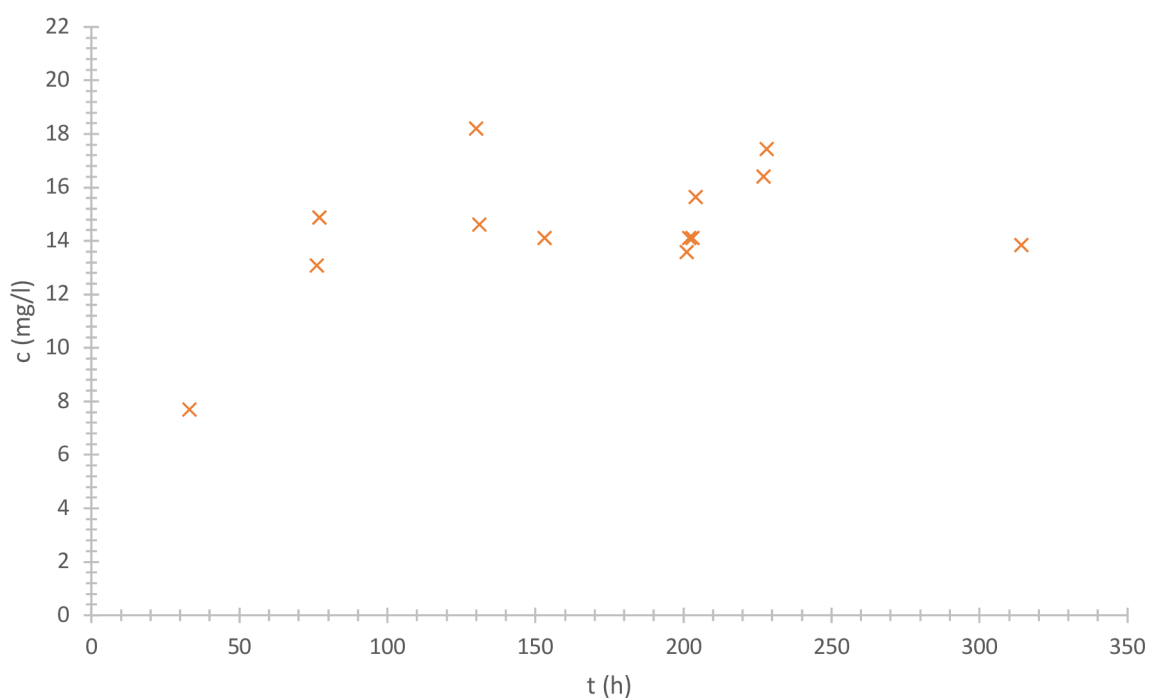
Obrázok č. 21: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 2 bez HK



Obrázok č. 22: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijímacej cele vo vzorke 2 bez HK



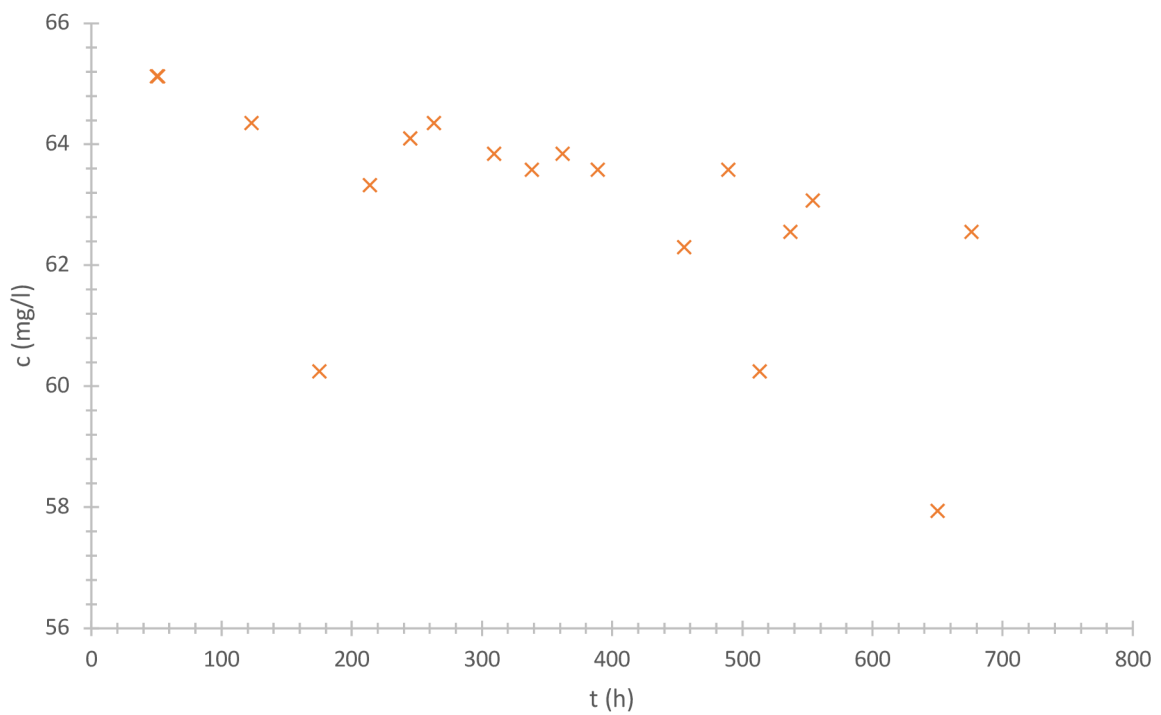
Obrázok č. 23: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 3 bez HK



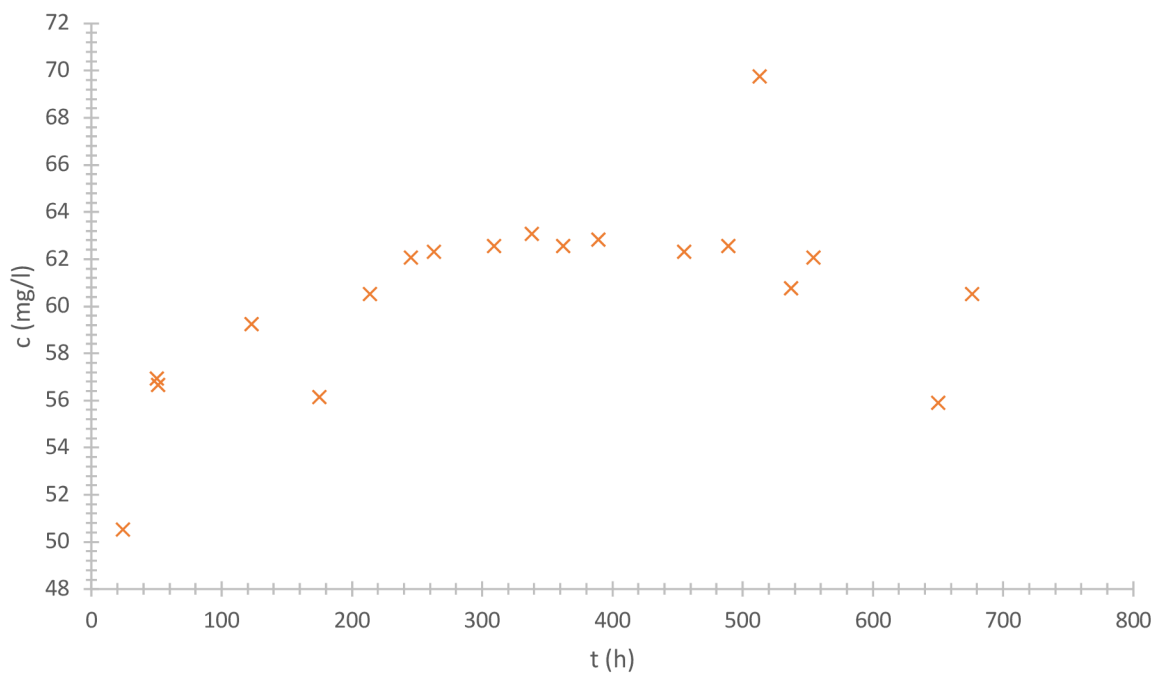
Obrázok č. 24: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijímacej cele vo vzorke 3 bez HK

Pri difúznom experimente bez prídavku humínovej kyseliny by agaróza nemala interagovať s diklofenakom, pretože je do istej miery považovaná za inertnú látku. Difúzia je proces, ktorý je poháňaný rozdielom koncentrácií, v tomto prípade v dvoch difúznych celách. Hodnoty koncentrácií sa trochu líšili, čo mohlo byť spôsobené napríklad pri odoberaní vzoriek k meraniu alebo, vplyvom teploty alebo rôznymi cestami prechodu hydrogélom.

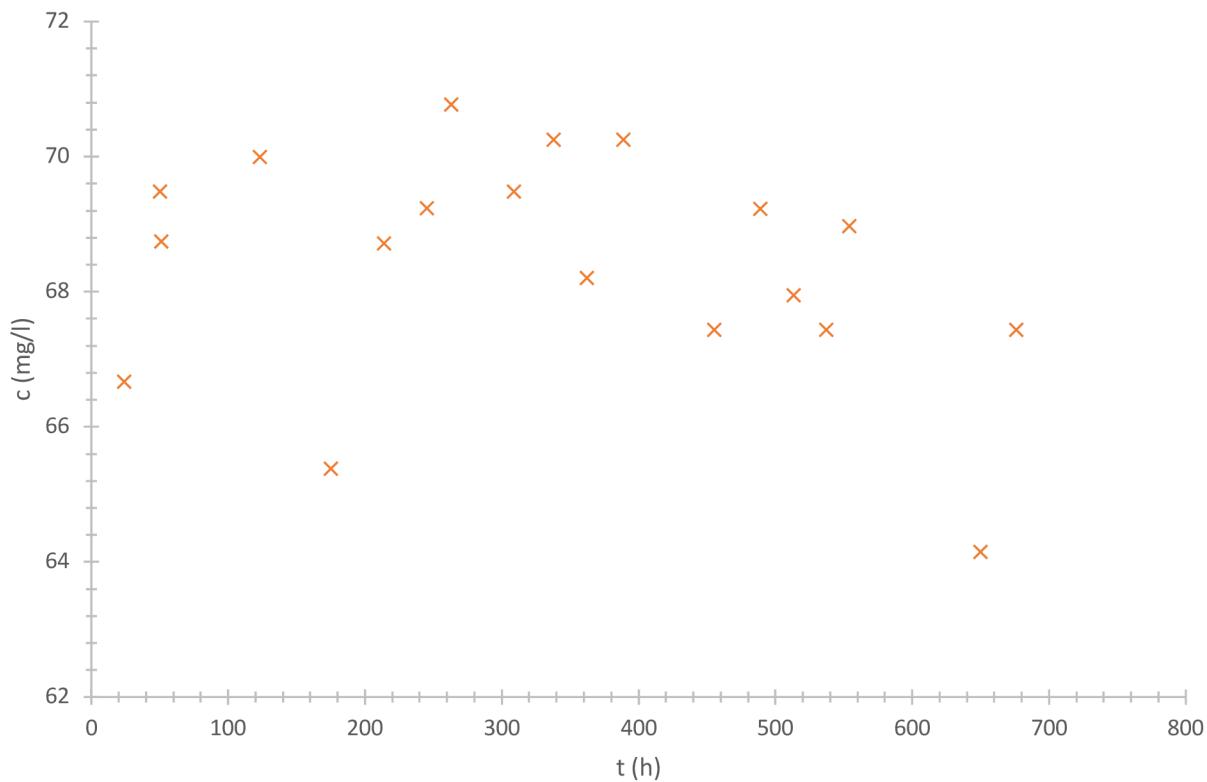
4.4 Koncentračné profily s HK



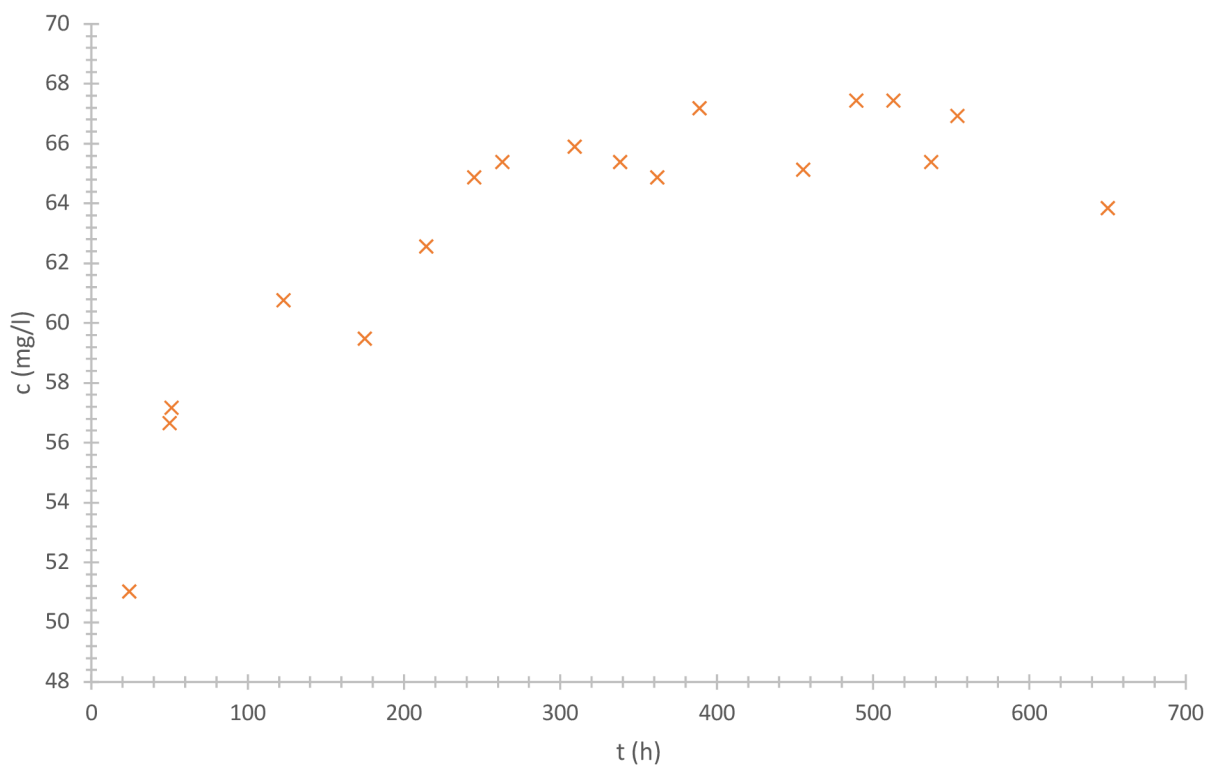
Obrázok č. 25: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 1 s HK



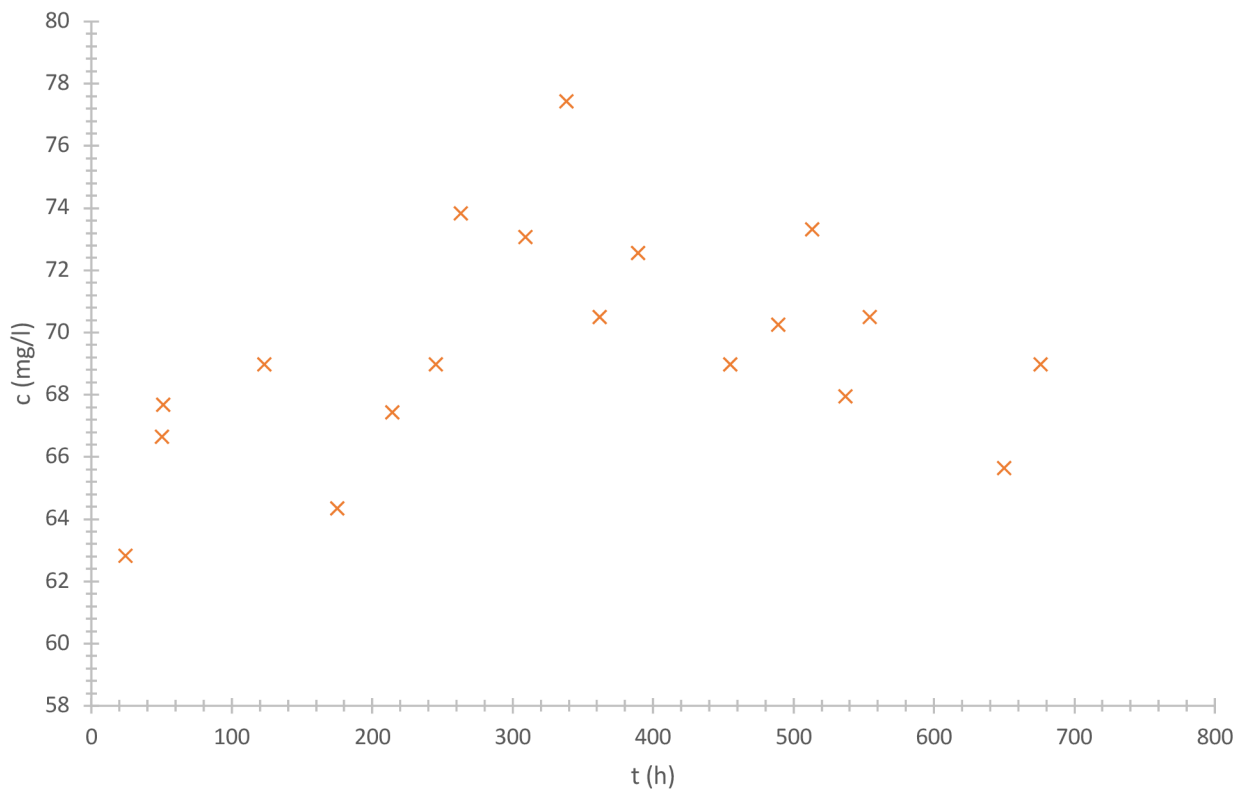
Obrázok č. 26: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijimacej cele vo vzorke 1 s HK



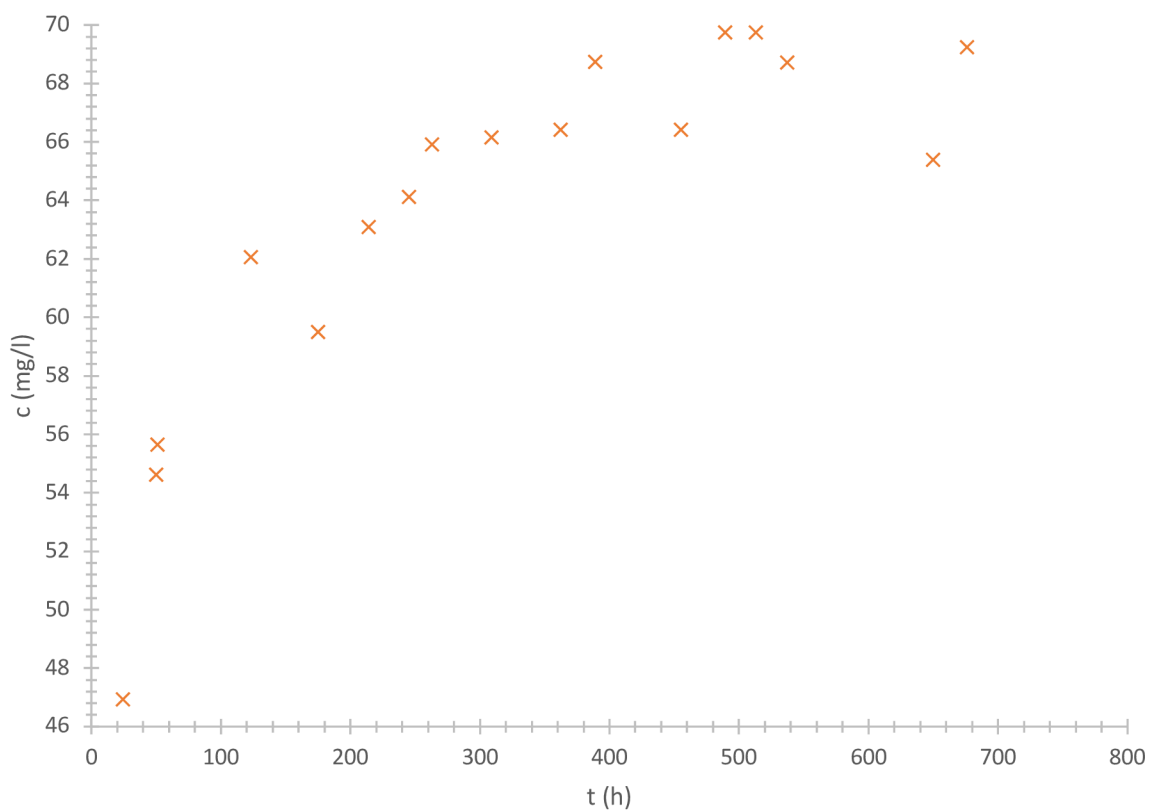
Obrázok č. 27: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 2 s HK



Obrázok č. 28: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijímacej cele vo vzorke 2 s HK



Obrázok č. 29: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v zdrojovej cele vo vzorke 3 s HK



Obrázok č. 30: Koncentračná závislosť diklofenaku na čase v prijímacej cele vo vzorke 3 s HK

Po pridaní humínovej kyseliny do pripravovaného agarózového hydrogélu je situácia už rozdielna. Diklofenak je schopný s humínovými kyselinami interagovať, a preto sa dostávame do iných hodnôt koncentrácií. Liečivá sú aj v prírode schopné reagovať s humínovými látkami v pôde, a rovnako to platí aj v humínových kyselinách v použitom hydrogéli.

Charakter interakcií nie je úplne objasnený, predpokladá sa, že ide o tvorbu micel medzi diklofenakom a HK. Interakcia diklofenaku a HK má následne vplyv na difúziu. Jednotlivé póry v géloch môžu prepúšťať rôzne veľké agregáty rôznou rýchlosťou. Každý agregát si taktiež môže nájsť svoju vlastnú cestu cez pórovú maticu agarózového hydrogélu.

V neposlednej rade je dôležité spomenúť aj spôsob prípravy hydrogélu s prídavkom humínovej kyseliny. Gél je pripravovaný zahrievaním na vyššiu teplotu a to môže narušiť štruktúru HK a celkovo je zakomponovanie do gélovej matrice, potenciálne so vznikom odlišnej štruktúry ako v géloch bez HK.

5 ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na transport liečiv v modelových hydrogélom. Ako pozorované liečivo bol zvolený diklofenak. Diklofenak patrí medzi nesteroidné protizápalové liečivá, ktoré sa v poslednej dobe často používajú, a tým častejšie sa dostávajú ako kontaminanty do životného prostredia. Existuje veľa spôsobov, ktorými sa diklofenak môže dostať do vodného a pôdneho prostredia. Nielenže môže negatívne ovplyvňovať rastliny a živočíchy, ale môže mať negatívny dopad aj na život človeka.

Súčasťou pôdy sú aj humínové kyseliny, ktoré taktiež hrajú v tejto problematike dôležitú úlohu. V laboratórnom vyhotovení bola použitá agaróza, ktorá by nemala interagovať s ostatnými látkami a humínová kyselina IHSS Elliott Soil. Boli uskutočnené dve série meraní, kedy boli pripravené hydrogély s prídavkom a bez prídavku humínovej kyseliny. Na prevedenie difúzných experimentov boli využité difúzne cely, medzi ktorými sa nachádzali hydrogély.

Ustálenie rovnováhy bolo výrazne ovplyvnené prítomnosťou humínových kyselín. V difúzných celách s hydrogélom bez HK prebiehala difúzia rýchlejšie. Prítomnosť humínovej kyseliny spomalila difúzia diklofenaku. Spôsobené to môže byť vznikajúcimi agregátmi diklofenaku a HK. Tieto agregáty sa následne pomalšie presúvajú cez pórovitú maticu hydrogélom. Agregáty môžu byť aj v rôznych veľkostiach, čo taktiež ovplyvňuje priebeh difúzie. Už aj samostatná príprava hydrogélom s HK má určitý vplyv, pretože v nej môžu nastať priestorové zmeny, ktoré nútia diklofenak prechádzať inou rýchlosťou ako keď humínová kyselina nie je prítomná. Aj koncentračné profily v oboch celách boli ovplyvnené prítomnosťou HK. Hodnoty koncentrácií diklofenaku boli výrazne odlišné medzi jednotlivými celami. Presný mechanizmus interakcií medzi diklofenakom a HK ale nie je známy, a na jeho určenie a stanovenie ďalších difúzných parametrov budú potrebné ďalšie experimenty.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, c1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [2] WEBER, J.: Definition of soil organic matter, *Humintech*. [online]. 2002 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: <http://www.humintech.com/001/>
- [3] VRBA, Vladimír, HULEŠ, Ludvík: Humus - půda - rostlina (2) Humus a půda. *Biom.cz* [online]. 2006-11-14 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-2-humus-a-puda>. ISSN: 1801- 2655.
- [4] SKOKANOVÁ, M.; DERCOVÁ, K. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy 102* [online]. 2008, s 262 – 268 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_04_262-268.pdf
- [5] WEBER, J.: Definition of soil organic matter, *Humintech*. [online]. 2002 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: <http://www.humintech.com/001/>
- [6] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy 99* [online]. 2005, s 711 – 717 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf
- [7] HERING, Janet G. a Francois M. M. MOREL. Humic acid complexation of calcium and copper. *Environmental Science & Technology* [online]. 1988, vol. 22, issue 10, s. 1234-1237 [cit. 2024-04-17]. DOI: 10.1021/es00175a018.
- [8] ISO, Christl, MILNE, Chris J. KINNIBURGH David G and KRETZSCHMAR Ruben. Relating Ion Binding by Fulvic and Humic Acids to Chemical Composition and Molecular Size. 2. Metal Binding. *Environmental Science & Technology* [online]. 2001 35 (12), s. 2512-2517 [cit. 2024-04-17]. DOI: 10.1021/es0002520
- [9] DOJČANSKÝ, Ján. a Jaroslav. LONGAUER. *Chemické inžinierstvo II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. Bratislava: Malé Centrum, 2000. ISBN 80-967-0648-9.

- [10] ATKINS, P. W. a Julio. DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 01-987-0072-5.
- [11] SEDLÁČEK, Petr. *Hydrogely huminových kyselín - experimentální model i aplikační forma = Hydrogels of Humic Acids - Experimental Model and Application Form: autoreferát disertační práce*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009, 44 s.
- [12] NOVÁK, Josef P. a Julio. DE PAULA. *Fyzikální chemie II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0436-X.
- [13] CUSSLER, E. L. a Julio. DE PAULA. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 05-218-7121-2.
- [14] KALINA, Michal. *Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech = Utilization of flow-coulometry in study of transport metal ions in humic gels*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 62 l. : il.
- [15] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav: mass transfer in fluid systems* Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [16] HLAVÁČ, Jan. *Základy technologie silikátů*. 2. uprav.vyd. Praha: SNTL, 1988, 516 s.
- [17] SEDLÁČEK, P.: *Difúze kovových iontů v huminových gelech*. Disertační práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2008.
- [18] CALO, E., KHUTORYANSKIY, V. V. *Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products*. *European Polymer Journal*, 2015, roč. 65, str. 252- 267.
- [19] PEPPAS, N. A., BURES, P., LEOBANDUNG, W., ICHIKAWA, H. *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, roč. 50, č. 1, str. 27-46.
- [20] HOARE, T. R., KOHANE, D. S. *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*. *Polymer*, 2008, roč. 49, č. 8, str. 1993-2007.
- [21] NOVÁK, J., P.: *Fyzikální chemie II*. VŠCHT v Praze, 2001, ISBN 80-7080-436-x.
- [22] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. VŠCHT v Praze, 2001, ISBN 80-7080-422-x.

- [23] MACIEJEWSKA, A., KWIATKOWSKA, J.: Fractional composition of humic acids and some physico-chemical properties of soil as a result of addition of brown coal fertilizer. In *Humic Substances in Ecosystems 5* (Gonet, S., S., Zaujec, A., Debska, B., Eds.). Polish Humic Substances Society, Duszniki Zdrój 2003. ISBN 83-919331-0-5.
- [24] KUMANDA, K.: The chemistry of soil organic matter. *Food Fertilization Technology Centre*, 1975, vol. 22, p. 10-36.
- [25] Alfred R. Sallmann, The history of diclofenac, *The American Journal of Medicine*, Volume 80, Issue 4, Supplement 2, 1986, Pages 29-33, ISSN 0002-9343, Dostępne z: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90076-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90076-8).
- [26] Leo, A., Hansch, C. & Elkins, D.: Partition coefficients and their uses. *Chem Rev* 71:525, 1971.
- [27] Moser, P., Jakel, K., Krupp, P., Menasse, R. & Sallmann, A.: Structure-activity relations of analogs of phenylbutazone. *Eur J Med Chem* 10:613, 1975.
- [28] Fried, J. H., Hamson, I. T., Lewis, B., Riegl, J., Rooks, W. & Tomolonis, A.: Structure activity relationship among 6-substituted-2-naphthylacetic acids. *Scand J Rheumatol, Suppl.* 2: 7, 1973.
- [29] Schemer, R. A., Winder, C. V. & Short, F. W.: The anti-inflammatory N-arylanthranilic acids. In Abstracts of the IXth National Medicinal Chemistry Symposium of the American Chemical Society, Minneapolis, Minn., 1964, p. 11a.
- [30] Shen, T. Y.: Synthesis and biological activity of some indomethacin analogs. In *International Symposium on Non-Steroidal Drugs, Milan*. 1W (ed. S. Garattini & M. N. G. Dukes), p. 13. International Congress Series No. 82. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1965.
- [31] Menassé R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1978;(22):5-16. doi: 10.3109/03009747809097211. PMID: 98835.
- [32] Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheum* 1996;102:9-21
- [33] Ku EC, Lee W, Kothari HV, et al. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. *Semin Arthritis Rheum* 1985;15:36-41
- [34] Ku EC, Lee W, Kothari HV, et al. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* 1986;80:18-23

- [35] Salter M, Stribos PJ, Neale S, et al. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neuroscience* 1996;73:649-55
- [36] Ferreira SH, Nakamura M. I – Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins* 1979;18:179-90
- [37] Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 1994;251:173-9
- [38] Ortiz MI, Granados-Soto V, Castaneda-Hernandez G. The NO-cGMP-K⁺ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;76:187-95
- [39] Deciga-Campos M, Lopez-Munoz FJ. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *Eur J Pharmacol* 2004;484:193-9
- [40] Alves DP, Tatsuo MA, Leite R, et al. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. *Life Sci* 2004;74:2577-91
- [41] Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the anti- nociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther* 2005;107:139-54
- [42] Bjorkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;103:1-44
- [43] Dong X-D. The analgesic action of topical diclofenac may be mediated through peripheral NMDA receptor antagonism. *Pain* 2009;147:36-45
- [44] Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 2004;18:790-804
- [45] Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001;15:2057-72
- [46] Ledwith BJ, Pauley CJ, Wagner LK, et al. Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 1997;272:3707-14
- [47] Callejas NA, Castrillo A, Bosca L, et al. Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:1235-41

- [48] Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, et al. Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2002;277:13029-36
- [49] Adamson DJ, Frew D, Tatoud R, et al. Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling. *Mol Pharmacol* 2002; 61:7-12
- [50] Kojo H, Fukagawa M, Tajima K, et al. Evaluation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype selectivity of a variety of anti-inflammatory drugs based on a novel assay for PPAR delta(beta). *J Pharmacol Sci* 2003;93:347-55
- [51] Na HK, Surh YJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1381-91
- [52] Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990;33:87-90
- [53] Sacerdote P, Carrabba M, Galante A, et al. Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. *Inflamm Res* 1995; 44:486-90
- [54] Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43:143-201
- [55] Tsuboi I, Tanaka H, Nakao M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production in human lymphocytes: up-regulation of TNF, IFN-gamma and IL-2, in contrast to down-regulation of IL-6 production. *Cytokine* 1995;7:372-9
- [56] Armstrong RA. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther* 1996;72: 171-91
- [57] Tegeder I, Lotsch J, Krebs S, et al. Comparison of inhibitory effects of meloxicam and diclofenac on human thromboxane biosynthesis after single doses and at steady state. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:533-44
- [58] Selg E, Buccellati C, Andersson M, et al. Antagonism of thromboxane receptors by diclofenac and lumiracoxib. *Br J Pharmacol* 2007;152:1185-95
- [59] Voilley N, de Weille J, Mamet J, et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001;21:8026-33
- [60] Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, et al. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* 2008;106:429-41

- [61] Jones NG, Slater R, Cadiou H, et al. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 2004;24:10974-9
- [62] WANG, X., CHEN, Y., WU, Y.: Diffusion of Eu(III) in compacted bentonite—effect of pH, solution concentration and humic acid. *Appl. Radiat. Isot.*, 2004, vol. 60, p. 963–969.
- [63] WOLD, S., ERIKSEN, T.: Diffusion of humic colloids in compacted bentonite. *Phys. Chem. Earth*, 2007, vol. 32, p. 477–484.
- [64] KLUČÁKOVÁ, M.: Huminový gel jako model pro studium transportu těžkých kovů v přírodních systémech. In *CHEMagazín*, číslo 3, ročník 14, 2004.
- [65] MALENOVSKÁ, M.: *Studium difúzních procesů v huminových gelech*. 55 stran. Diplomová práce na VUT, FCH Brno 2005. Vedoucí diplomové práce Ing. Martina Klučáková PhD.
- [66] KLUČÁKOVÁ, M., PEKAŘ, M.: Study of Structure and Properties of Humic and Fulvic Acids. IV. Study of Interactions of Cu^{2+} Ions with Humic Gels and Final Comparison, *J. Polym. Mater.*, 2003, vol. 20, no. 2, p. 155–162.
- [67] KLUČÁKOVÁ, M., PEKAŘ, M.: Study of Diffusion of Metal Cations in Humic Gels. In *Humic Substances: Nature's most Versatile Materials*. Ed. E. A. Ghabbour, G. Davies, p. 263–274, Francis & Taylor, New York, 2004.
- [68] BURIAN, M., KLUČÁKOVÁ, M., PEKAŘ, M. Diffusion studies in humic gels. *Humic Substances in the Environment*, 2003, vol. 3, pp. 9–12.
- [69] SEDLÁČEK, P., KLUČÁKOVÁ, M.: Diffusion experiments as a new approach to the evolution of copper transport in humics-containing systems. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication*, 2009, roč. 74, č. 9, p. 1323–1340. ISSN: 0010–0765.
- [70] SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M.: Simple diffusion method applied in evaluation of metal transport in model humic matrices. *GEODERMA*, 2009, roč. 153, č. 1–2, p. 286–292. ISSN 0016–7061.
- [71] SATHISHKUMAR, Palanivel, Ramakrishnan ANU ALIASMEENA, Thavamani PALANISAMI, Veeramuthu ASHOKKUMAR, Thayumanavan PALVANNAN a Feng LONGGU. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment*. 2020, 789(698), 134057. ISSN 0048-9697.

- [72] ASCAR, Loreto, Inés AHUMADA, Natalia MORALES, Tatiana GARRIDO, Ady GIORDANO a Karla LEIVA. Mobility of nonsteroidal anti-inflammatory Ddrugs in soil Wwith and without amendment od biosolid. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2017, 62(3), 3593-3596. ISSN 0717-9707. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072017000303593>
- [73] BARTRONS, Mireia a Josep PEÑUELAS. Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends in Plant Science*. 2017, 3(22), 185-272. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.010>
- [74] GONZÁLEZ GARCÍA, Mariano, Carmen FERNÁNDEZ-LÓPEZ, Francisco PEDRERO-SALCEDO a Juan JOSE ALARCÓN. Absorption of carbamazepine and diclofenac in hydroponically cultivated lettuces and human health risk assessment. *Agricultural Water Management*. Elsevier, 2018, 1(206), 42-47. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.04.018>
- [75] TRAPP, Stefan a Charlotte N. LEGIND. Uptake of Organic Contaminants from Soil into Vegetables and Fruits. *Dealing with Contaminated Sites: From Theory towards Practical Application*. 1. Švýcarsko: Springer Science, 2011, s. 369-408. ISBN 978- 90-481-9757-6.
- [76] Ra , J. S. , Oh , S.-Y. , Lee , B. C. and Kim , S. D. 2008 . The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens and phenolic compounds. *Environ. Int.* , 34 (2) : 184 – 192 .
- [77] Margon, A., Pastrello, A., Mosetti, D., Cantone, P., & Leita, L. (2009). Interaction between Diclofenac and Soil Humic Acids. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 18(4), 489–496. <https://doi.org/10.1080/15320380902962353>
- [78] Pacheco , M. L. , Peña-Méndez , E. M. and Havel , J. 2003 . Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. *Chemosphere* , 51 : 95 – 108.
- [79] Kreuzig , R. , Christoph , K. , Birthe , M. , Hoetge , S. and Dieckmann , H. 2003 . Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils . *Fresenius Environm. Bull.* , 12 (6) : 550 – 558.
- [80] Lubal , P. , Šíroký , D. , Fetsch ; , D. and Havel , J. 1998 . The acidobasic and complexation properties of humic acids. Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta* , 47 : 401 – 412.
- [81] Drillia , P. , Stamatelatu , K. and Lyberatos , G. 2005 . Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices . *Chemosphere* , 60 : 1034 – 1044.

[82] Scheytt, T. , Mersmann , P. , Lindstädt , R. and Heberer , T. 2005 . Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments . *Chemosphere* , 60 : 245 – 253.

[83] Scheytt, T. J., Mersmann, P. and Heberer, T. 2006. Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible-displacement experiments . *J. Contam. Hydrol.* , 83:53 – 69.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

7.1 Použité symboly

Symbol	Význam symbolu	Jednotka
F	pôsobiaca sila	N
J_i	difúzny tok	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
A	difúzna plocha	m^2
c_i	koncentrácia častice	$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$
D_i	difúzny koeficient častice	$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
x	priestorová súradnica	m
t	čas difúzie	s
T	termodynamická teplota	K
l	efektívna hrúbka membrány	m

7.2 Použité skratky

Skratka	Význam skratky
IHSS	International Humic Substance Society
UV	ultrafialová oblasť spektra elektromagnetického žiarenia
VIS	viditeľná oblasť spektra elektromagnetického žiarenia
NSAID	nesteroidné protizápalové liečivá
HK	humínová kyselina
HL	humínová látka
COX	cyklická oxygenáza
PGE ₂	prostaglandín E ₂
ATP	adenozíntrifosfát
PPAR	peroxizómový proliferátor
ASIC	látky citlivé na kyslé prostredie
CNS	centrálny nervový systém
MOA	mechanizmus účinku