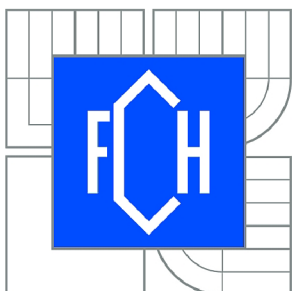




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

PENETRAČNÍ VLASTNOSTI POLYMERNÍCH MICEL NA BÁZI HYDROFOBIZOVANÉ KYSELINY HYALURONOVÉ.

THE PENETRATION FEATURES OF THE HYDROFOBIZED HYALURONIC ACID – BASED
POLYMERIC MICELLES.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MONIKA MISCHINGEROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. TOMÁŠ MUTHNÝ, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0808/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Monika Mischingerová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D. Ing. Tereza Halasová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Penetrační vlastnosti polymerních micel na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové.

Zadání diplomové práce:

- 1) Shromáždit literární poznatky o nosičových systémech aktivních látek s důrazem na polymerní micely a jejich penetrační vlastnosti.
- 2) Provést penetrační experimenty se dvěma typy polymerních micel (C6 a C18:1 HA) s využitím niškové červeně jako nesené látky.
- 3) Provést základní charakterizaci polymerních micel (C6 a C18:1 HA) pro potenciální kosmetickou aplikaci s využitím CoQ10 jako nesené látky.

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Monika Mischingerová
Student(ka)

Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo provést penetrační experimenty polymerních micel na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové s využitím nilské červeně jako nesené látky. Dále pak provést základní charakterizaci těchto polymerních micel pro potenciální kosmetickou aplikaci s využitím Coenzymu Q10 (CoQ10) jako nesené látky. Bylo zjištěno, že velikost polymerních micel s navázaným CoQ10 nepřesahovala 100 nm. Nosičové systémy na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové se ukázaly jako vhodné pro potenciální topické použití. Tyto systémy s navázanou nilskou červení prokázaly výborné penetrační vlastnosti. Dá se předpokládat, že stejně dobré penetrační vlastnosti prokáže také systém s navázaným CoQ10. Byl zde také zmíněn problém: zda se nosič rozbije ve SC nebo zda prostupuje spolu s NR skrz SC do kůže. Byly navrženy další experimenty, které by také mohly ověřit penetrační vlastnosti těchto systémů.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate the penetration features of the hydrofobized hyaluronic acid – based polymeric micelles using Nile red as carried tracer. Furthermore, to implement basic characterization of polymeric micelles for potential cosmetic applications using Coenzyme Q10 (CoQ10) as carried substance. It was found that the size of the polymeric micelles with carried CoQ10 did not exceed 100 nm. Applied delivery systems based on hydrophobic hyaluronic acid were suitable for potential topical application. Delivery systems with Nile Red as carried tracer demonstrated excellent penetration features. We assume that delivery systems with CoQ10 will exhibit similar penetration features. An issue has appeared whether the carrier breaks or proceeds along with NR to the skin. Moreover, another experiments have been designed which could also verify the penetration features of these systems.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Penetrace, kůže, polymerní micely, nilská červeň, Coenzym Q10, fluorescenční mikroskopie, fluorescenční spektroskopie, zeta potencial.

KEYWORDS:

Penetration, skin, polymeric micelles, Nile Red, Coenzyme Q10, fluorescence microscopy, fluorescence spectroscopy, zeta potential.

MISCHINGEROVÁ, M. *Penetrační vlastnosti polymerních micel na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 67 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tomáši Muthnému PhD. za odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky k této práci. Rovněž bych ráda poděkovala celému kolektivu oddělení Kosmetických surovin společnosti Contipro Biotech s.r.o. za odbornou pomoc a čas, který mi věnovali.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kůže	8
2.1.1	Epidermis (pokožka)	8
2.1.2	Dermis (škára, cutis)	9
2.1.3	Funkce kůže	10
2.2	Kožní bariéra	11
2.3	Transport látek přes kůži (penetrace, permeace kůží)	11
2.4	Kyselina hyaluronová (HA)	12
2.4.1	Historie HA	12
2.4.2	Struktura HA	13
2.4.3	Kyselina hyaluronová v kosmetice	13
2.5	Koloidně disperzní soustavy	14
2.5.1	Micely	15
2.5.2	Velikost a tvar micel	17
3	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	18
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	19
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
5.1	Seznam použitých chemikálií, materiálů a přístrojů	23
5.2	Zeta potenciál, velikost částic, polydisperzita a stabilita částic	25
5.2.1	Použitá metoda – Dynamický rozptyl světla (DLS)	25
5.2.2	Pracovní postup	27
5.3	Cryo SEM	28
5.3.1	Použitá metoda	28
5.3.2	Pracovní postup	28
5.4	Penetrační experimenty	29
5.4.1	Příprava ušního boltce pro penetrace	29

5.4.2	Příprava difuzních cel	30
5.4.3	Pracovní postup – penetrace NR v nosiči (HA C6 a HA C18:1)	31
5.4.4	Pracovní postup – penetrace NR v oleji	31
5.4.5	Pracovní postup – penetrace NR v PBS	31
5.4.6	Pracovní postup – penetrace NR v emulzi	31
5.4.7	Odběr vzorků po penetraci	32
5.5	Analýza vzorků na fluorescenčním mikroskopu	33
5.5.1	Použité metody – Fluorescenční mikroskopie (fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti)	33
5.5.2	Pracovní postup	34
5.6	Kvantifikace NR v kůži (TECAN infinite M200)	35
5.6.1	Použité metody – Fluorescenční spektroskopie	35
5.6.2	Pracovní postup	36
5.7	Zpracování experimentálních dat	37
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
6.1	Výsledky měření – Zeta potenciál, velikost částic, polydisperzita a stabilita částic	38
6.2	Výsledky měření – Cryo SEM	42
6.3	Výsledky měření – penetrační experimenty	44
6.3.1	Penetrace NR v nosiči (HA C6 a HA C18:1)	44
6.3.2	Penetrace NR v oleji	51
6.3.3	Penetrace NR v PBS – disperze	53
6.3.4	Penetrace NR v emulzi	55
6.4	Shrnutí všech výsledků	58
6.5	Statistické zpracování výsledků	59
7	ZÁVĚR	62
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	67

1 ÚVOD

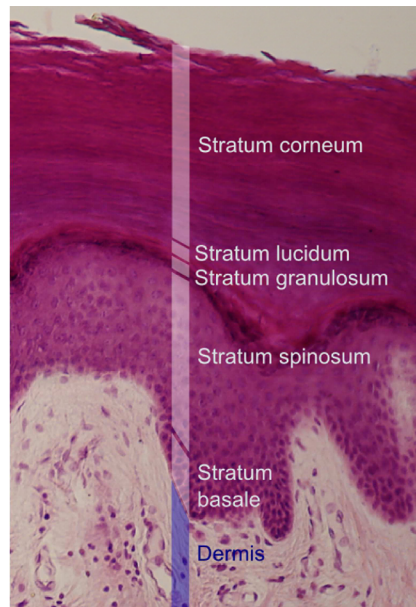
Lidská kůže má hodně funkcí, ale tou nejdůležitější je funkce ochranná. Chrání totiž vnitřní orgány před ataky mikroorganismů, chemickými i fyzikálními vlivy atd. Její stavba je taková, aby tento úkol zvládla téměř za všech okolností. Skládá se z několika vrstev, které dohromady vytváří důmyslnou a těžce prostupnou bariéru.

Pro výrobu kosmetického prostředku (KP) musí výrobce použít tělu příbuzné látky, které nebudou zasahovat do přirozeného prostředí v kůži, nebo ji jakkoliv narušovat. Cílem kosmetiky je dopravit účinné látky tam, kde jsou potřeba, a ne vždy to musí znamenat dostat se co nehlouběji do kůže. Stratum corneum (SC) - svrchní část epidermis, je první překážkou, na kterou KP narazí. Pro řadu přípravků je to také „konečná stanice“. Tato část kůže totiž funguje jako štít, který zbylé vrstvy chrání před infekcí, nečistotami, mikroorganismy a zároveň zamezuje tomu, aby pokožka ztrácela hydrataci. Obecně lze říci, že kosmetické prostředky slouží především k ochraně pokožky [1] a k oddálení procesu stárnutí [2]. K tomuto účelu jsou používány takzvané anti-ageing prostředky.

KP by měl obsahovat složky konkrétní činnosti. V některých případech je žádoucí dosáhnout co nejlepšího penetračního efektu, u jiných je tomu právě naopak.

Jedinečným aspektem je v současné době také samotný vzhled finálního přípravku. Inovace kosmetických formulací není motivována pouze z hlediska chování aktivních látek, ale také tím, jak spotřebitel vnímá vlastnosti a vzhled kosmetického produktu, a jaké jsou jeho potřeby a požadavky. Tento aspekt vedl k vývoji velkého počtu nosičových systémů kosmeticky aktivních látek, někdy i bez skutečného, vědecky ověřeného zlepšení vlastností nosičů oproti stávajícím produktům. Proto můžeme při analýze mnoha kosmetických výrobků sledovat různé trendy v KP, jako jsou například transparentní emulze, gely bez použití olejové fáze, nebo použití přírodních povrchově aktivních látek a účinných přírodních látek [1]. V úvahu se ale musí brát také to, že trvanlivost a stabilita kosmetických prostředků by měla být minimálně 2 až 3 roky.

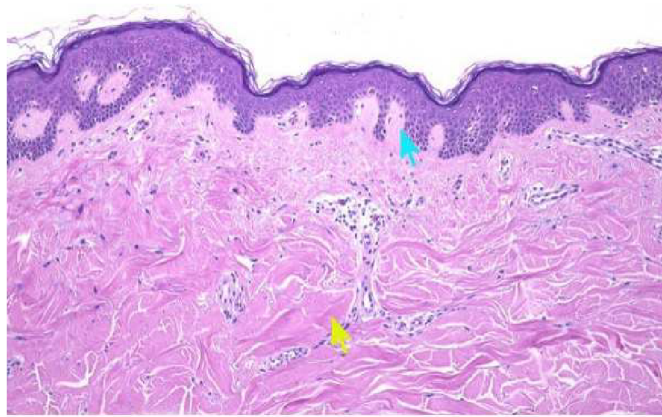
Stratum granulosum, která tvoří 3 až 5 vrstev plochých buněk, které již nejsou mitoticky aktivní. *Stratum spinosum* pak tvoří několik vrstev buněk s vysokým stupněm proteosyntézy. Buňky jsou zde stále mitoticky aktivní a mají velmi dobře vyvinuté spojovací komplexy. Jako poslední, nejhluběji uložená vrstva epidermis je *Stratum basale*. Jedná se o zárodečnou vrstvu, která je tvořena jednou vrstvou nízkých cylindrických buněk. Jde o kmenové buňky kůže, které jsou mitoticky velmi aktivní. Tato vrstva se nachází ve spodní části pokožky. Princip regenerace pokožky spočívá v tom, že živé buňky se neustále dělí a vytlačují starší buňky k povrchu. Tím se tyto buňky zplošťují, rohovatí a odlupují se. Na povrch se buňka dostane za 3 až 4 týdny. Vrstvy kůže pak můžeme vidět na Obr. 2.





Obr. 2: Histologický řez ukazující rozdělení vrstev kůže [7].

2.1.2 Dermis (škára, cutis)

Dermis je vrstva nacházející se pod epidermis a nad podkožní tukovou vrstvou. Jedná se o pevnou a pružnou vazivovou vrstvu kůže. Je tvořena svazky kolagenních a elastických vláken [8]. Dermis také obsahuje vlasové folikuly, potní žlázy, mazové žlázy a krevní cévy. Cévy zásobují živinami nejen buňky dermis, ale také stratum basale v epidermis. Hranice mezi epidermis a dermis není rovná. Epidermis vysílá do dermis bradavčité výběžky, tzv. papily [5]. Tloušťka dermis se pohybuje v rozmezí 1 až 4 mm. Dermis je tedy mnohem silnější než epidermis. Dermis se dá rozdělit do dvou vrstev: papilární a retikulární dermis, což můžeme vidět na Obr. 3. Dermis je pevně připojena k epidermis membránou zvanou bazální membrána. V dermis se nachází také množství nervových zakončení, kterými vnímáme např. hmat a teplo.



 papilární dermis
 retikulární dermis

Obr. 3: Histologický řez: papilární a retikulární dermis [9].

2.1.3 Funkce kůže

Jak již bylo výše uvedeno, kůže je největším orgánem lidského těla. Tento orgán má několik základních a velmi důležitých funkcí, bez kterých bychom nemohli existovat.

Kůže nás chrání před:

- vniknutím mikroorganismů do těla;
- UV zářením;
- vysušením těla;
- mechanickými, fyzikálními a chemickými vlivy [3].

Velmi důležitými funkcemi kůže jsou:

- dýchací;
- zásobní;
- izolační;
- termoregulační, kdy se vlivem kožních cév a potních žláz udržuje stálá tělesná teplota;
- smyslová funkce, která slouží k vnímání mechanických, tepelných i bolestivých podnětů;
- schopnost tvorby vitamínu D z provitaminu D za přispěvku UV záření;
- vylučování chemických látek z těla – zajištěno potními a mazovými žlázami, jejichž sekrety přispívají k ochraně kůže.

2.2 Kožní bariéra

Stratum corneum je vrstva, která je pro bariérové vlastnosti kůže rozhodující. Je tvořena obvykle 18 až 21 vrstvami buněk a intercelulární hmotou složenou ze specifických lipidů. Pro pochopení bariérové funkce je nezbytné znát chemické složení SC. To totiž určuje její fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou příčinou a podstatou bariérového chování. SC je složena ze 75–80 % proteinů, 5–15 % lipidů a zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda [4,5]. Proteiny jsou obsaženy především v korneocytech (asi 70 % α -keratinu a přibližně 10 % β -keratinu), a asi 15 % proteinů představuje jiné peptidické struktury, včetně kožních enzymů. Korneocyty jsou vysoce nerozpustné a velmi rezistentní k působení chemikálií. Intercelulární prostor SC je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Lipidy tvoří lamely složené z několika dvojrstev, které jsou uspořádány tak, že směřují svou hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní, tvořenou hydroxylovými a karbonylovými skupinami, vně do vodného prostředí. Lamely jsou tvořeny přibližně z 50 % ceramidy, 25 % cholesterolem, 10 % volnými mastnými kyselinami. Díky tomuto složení a uspořádání se ze stratum corneum stává vrstva mimořádně odolná vůči chemickým a fyzikálním vlivům [5].

I když je kůže mimořádně odolnou bariérou, můžeme v ní najít místa, která přichází v úvahu jako možné cesty průniku látek do organismu. Jsou to především: průnik potní žlázou, mazovou žlázou, transfolikulární, intercelulární a transcelulární cestou [10]. Při průniku látek do kůže záleží také na velikosti a struktuře penetrovaných látek [11].

2.3 Transport látek přes kůži (penetrace, permeace kůži)

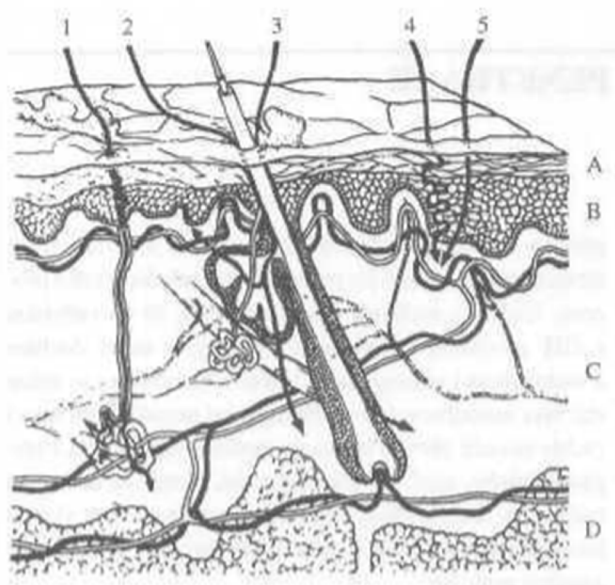
Kůže je málo propustná pro tekutiny a plyny, čímž chrání organismus před vysycháním. Chemické látky, jako např. léky určené k topickému (lokálnímu, místnímu) použití, vnikají do kůže hlavně cestou mazových a potních žláz. Transport látek do kůže přes potní žlázy ale není úplně běžně používaným způsobem. To především pro obtížnou, velmi klikatou cestu, kterou dávkovaná látka musí projít, navíc proti toku potu, který potními žlázami z těla odchází.

Obecně platí, že v tucích rozpustné látky se vstřebávají nejvíce žlázami mazovými, látky ve vodě rozpustné zase žlázami potními. Sama kůže je pak pro většinu látek těžko propustná [12].

Další možností transportu látek do kůže jsou vlasové folikuly. Ty jsou běžným způsobem transportu, především iontů, polyfunkčních polárních sloučenin a vysokomolekulárních molekul [6,13]. Možnostmi pasivního transportu látek přes kůži jsou pak dále cesty intercelulární (pomocí rozpuštění látky v extracelulárních lipidové dvojrstvě) a transcelulární (pomocí korneocytům a lipidové dvojrstvě).

Navzdory efektivní bariérové vlastnosti kůže existují látky [14], které mohou penetrovat přes její vrstvy. Stratum corneum je mírně propustná jak pro hydrofilní, tak i pro lipofilní látky. Neporušenost SC a koncentrace aplikovaných látek na kůži jsou důležitými aspekty, které mají vliv na penetrační profil [15].

Na schematickém průřezu kůže (Obr. 4) je znázorněno pět možných cest průniku (penetrace) látek do kůže a průchodu přes její strukturu (permeace) do krevního řečiště.



Obr. 4: Schematický řez kůží; A – stratum corneum; B – epidermis; C – dermis ; D – podkožní tuk; 1 – cesta potní žlázou; 2 – cesta mazovou žlázou; 3 – transfolikulární cesta; 4 – intercelulární cesta; 5 – transcelulární cesta [16].

Důležitým faktorem při transportu látek do kůže, je také rozdělovací koeficient lékové formy penetrané látky a epidermis. Tento faktor pak velmi ovlivňuje difuzní rychlost prostupu látky přes kůži [14].

2.4 Kyselina hyaluronová (HA)

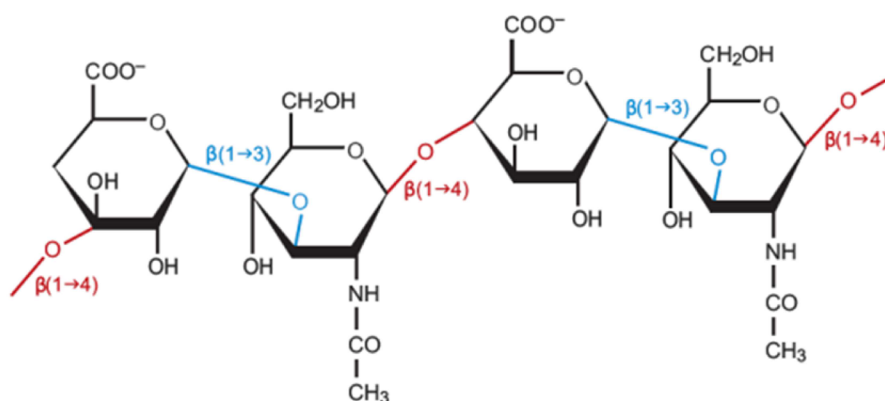
Kyselina hyaluronová; jedná se o uhlovodík, přirozeně se vyskytující ve všech živých organismech. Jeden řetězec může zahrnout až několik tisíc sacharidových jednotek. Volná kyselina je velmi hygroskopická, ale ne moc rozpustná ve vodě. Soli kyseliny hyaluronové jsou ve vodě dobře rozpustné a tvoří vysoce viskózní roztoky v závislosti na molekulové hmotnosti.

2.4.1 Historie HA

Izolace hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti z očního sklivce dobytka byla poprvé popsána v roce 1934 Karlem Mayem a Johnem Palmerem. Dvě hlavní složky, které byly v této kyselině rozpoznány, byly kyselina uronová a sacharid s aminovou skupinou. Název kyselina hyaluronová pak vznikl spojením slov „hyaloid“ (skelný) a „uronová kyselina“ [17].

2.4.2 Struktura HA

HA je negativně nabitý nesulfátovaný lineární glykosaminoglykan. Jedná se o lineární polysacharid sestávající ze dvou pravidelně se střídajících disacharidových jednotek, tvořených D – glukuronovou kyselinou a N – acetyl – D – glukosaminem, vzájemně spojených střídající se β – 1,3 a β – 1,4 glykosidickou vazbou. Strukturu kyseliny hyaluronové můžeme vidět na Obr. 5.



Obr. 5: Kyselina hyaluronová.

Obě sacharidové jednotky jsou prostorově podobné glukose, která v beta konfiguraci umožňuje všem objemným skupinám (hydroxyly, karboxyláty či anomerní uhlíky na přilehlých sacharidových jednotkách) zaujmout stericky výhodnější pozice, zatímco všechny malé vodíkové atomy obsazují méně výhodné pozice [18].

2.4.3 Kyselina hyaluronová v kosmetice

Kyselina hyaluronová se přirozeně vyskytuje v lidských tkáních; velký podíl této látky nalezneme v kůži - v epidermis i v dermis, kde zajišťuje především hydrataci, ale i ochrannou a strukturně-stabilizační funkci. Celkové množství hyaluronanu v lidské kůži se odhaduje na zhruba třetinu z celkového množství kyseliny hyaluronové v lidském těle [17]. Kyselina hyaluronová může být formulována v různých kosmetických přípravcích, jako jsou krémy, pleťové vody, séra, šampony, kondicionéry, koupelové oleje, rtěnky či balzámy na rty.

2.5 Koloidně disperzní soustavy

Koloidně disperzní soustavy představují tzv. disperzum (disperzní podíl) a disperzní prostředí. Disperzum jsou rozptýlené (dispergované) částice o velikosti 1 – 500 (1000) nm [19], které jsou rozptýleny v disperzním prostředí. Koloidně disperzní soustavy, které vznikají z povrchově aktivních látek, se nazývají micely.

Lyofobní koloidy (fázové koloidy, soly); jejich stabilizujícím faktorem je elektrická dvojrůstava. Mají charakter vícefázového systému a jsou termodynamicky nestálé. O náboji zde rozhoduje pevná část elektrické dvojrůstvy – náboj sorbovaného iontu dle Fajánsova pravidla. Jsou nerozpustné v disperzním prostředí. Nemají tedy afinitu k molekulám rozpouštědla [19]. Dalším typem jsou **lyofilní koloidy**. Jejich stabilizujícím faktorem je solvatační obal. Lyofilní koloidy se skládají z pevné vnitřní fáze a z difuzní vnější fáze. Chovají se podobně jako pravé roztoky – mají charakter homogenního systému a poutají na svůj povrch částice rozpouštědla. Lyofilní koloidy se dále rozdělují na *molekulové koloidy* – roztoky polymerů a *micelární (agregační, asociativní) koloidy* – roztoky nízkomolekulárních látek (př. mýdla) [19].

Molekulové koloidy - jedná se o látky, které při pouhém smíšení s rozpouštědlem vytvoří lyofilní koloidní roztok, homogenní soustavu s dispergovanými makromolekulami či makromolekulárními ionty. Ty pak lze z roztoku vyloučit změnou rozpustnosti, např. ochlazením či přidávkem jiných látek.

Micelární (asociativní, agregační) koloidy: micely, tedy koloidně disperzní částice, vznikají vratnou asociací z pravých roztoků některých nízkomolekulárních látek po překročení určité koncentrace – kritická micelární koncentrace (CMC). Nepotřebují umělou stabilizaci. Jejich velikost a koncentrace jsou určeny okamžitými stavovými veličinami (teplotou, tlakem a koncentrací). Tyto systémy jsou termodynamicky stabilní a lze pro ně do jisté míry použít termodynamiku pravých roztoků. Tyto látky jsou označovány jako povrchově aktivní látky (PAL), nebo také jako tenzidy. V praxi jsou tenzidy velmi často využívány. Díky jejich smáčecím, emulgačním a čistícím účinkům se s nimi lze setkat téměř na každém kroku, a to v podobě sprchových gelů, šamponů, prostředků na mytí nádobí a podobně [19].

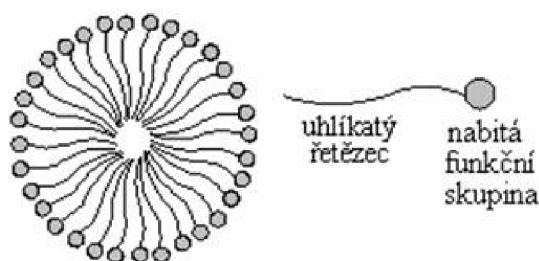
Jedna micela je tvořena desítkami až stovkami molekul (závisí vždy od dané micely), které jsou orientovány podle druhu rozpouštědla. Molekuly těchto látek mají vždy polární a nepolární část. V případě polárního rozpouštědla budou na povrchu micely polární části molekul. Polární skupina může být schopna disociace (je ionogenní). Pokud skupina uvolňuje kation a dále nese záporný náboj, nazývá se anionaktivní. Pokud přijímá protony a dále nese kladný náboj, nazývá se kationaktivní.

Ve stavu dosažení kritické micelární koncentrace (počátek asociace) platí rovnováha mezi volnými molekulami A a micelami A_m , popsaná vztahem (1) [20]:

$$m \cdot A \leftrightarrow A_m \Rightarrow K = \frac{[A_m]}{[A]^m} \quad (1)$$

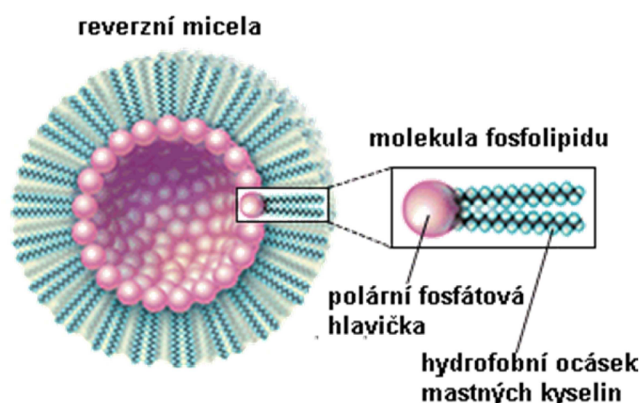
2.5.1 Micely

Jedná se o agregáty koloidních rozměrů. Jsou tvořeny molekulami, které mají relativně nízké molekulární hmotnosti. Základní rozdělení micel je odvozeno od prostředí, ve kterém se nacházejí. V polárním prostředí (voda) je jádro micely tvořeno hydrofobním uhlíkovým řetězcem, a povrch micely je tvořen vysoce polární hydrofilní hlavou, rozpustnou v polárním prostředí [21] (Obr. 6).



Obr. 6: Micela v polárním prostředí [21].

Naopak v nepolárním prostředí se vytváří reverzní micely, kde jádro micel tvoří hydrofilní hlavy tenzidů a uhlíkaté řetězce jsou orientovány do nepolárního prostředí [22] (Obr. 7).



Obr. 7: Micela v nepolárním prostředí [22].

Pokud koncentrace amfifilních molekul v roztoku zůstává nad hranicí CMC, micely jsou termodynamicky stabilní a nejsou náchylné k rozpadu. Při zředění koncentrace amfifilních molekul pod hodnotu CMC se micely začínají rozpadat. Takováto disociace vede k nechtěnému, nadměrnému rozpadu micel. Tím pádem dochází k uvolnění nesených léčiv,

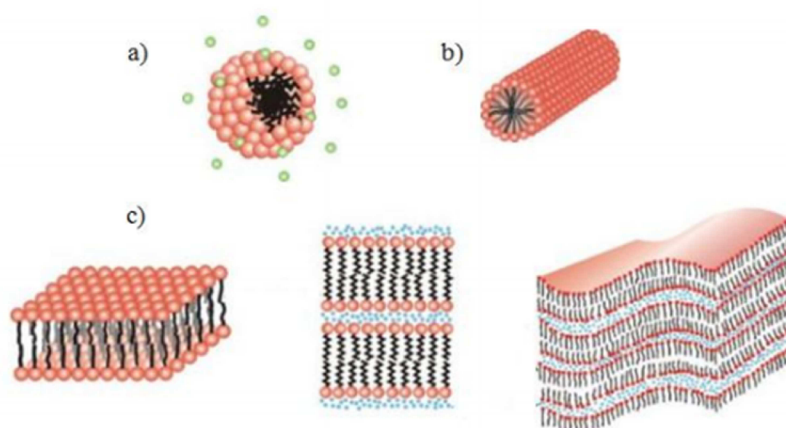
či aktivních látek z micely. Tento rozpad pak brání cílenému přenosu těchto aktivních látek v micle na požadované místo [23].

Dalším typem micel jsou tzv. **polymerní micely**. Ty mají obvykle průměr v rozmezí od 10 do 200 nm a jsou charakterizovány strukturou jádro – povrch. Vnitřní jádro je složeno z hydrofobních částí amfifilních molekul, ve kterých se vytváří prostor pro rozpuštění lipofilních látek (léčiv, aktivních látek). Oblast jádra je obklopena „obalem“ složeným z hydrofilních částí amfifilních molekul – povrch micely. Při silném zředění mají amfifilní polymerní micely výraznou výhodu oproti těm vytvořeným z běžných povrchově aktivních látek. V některých případech mohou fyzikální interakce mezi řetězci v jádru micely zabránit rozpadu této micely, a to i při koncentraci mnohem nižší, než je samotná CMC. Polymerní micely jsou často složeny z polyesterů nebo polyaminokyselin, které jsou kovalentně vázány s biologicky kompatibilní hydrofilní částí, často se jedná o polyethylenglykol [24].

2.5.2 Velikost a tvar micel

Jedná se buď o izometrické micely, což znamená, že všechny tři rozměry jsou přibližně stejné, nebo o anizometrické, kdy dva rozměry převládají nad ostatními. Podstatné ale je, že alespoň jeden rozměr odpovídá rozměru koloidní částice.

Je známo několik typů micel. **Hartleyovy micely** – jedná se o **sférické micely** (Obr. 8: a). Tyto micely vznikají ve zředěných vodných roztocích. Jsou nejjednodušším typem, poloměr těchto micel je téměř shodný s délkou jedné molekuly tenzidu. Se zvyšující se koncentrací roztoku se přestávají tvořit sférické micely a začínají se tvořit **micely válcové** (Obr. 8: b). Jedná se o micely podobné sférickým. Rozdíl tvoří jen jejich prodloužené jádro. Micelární délka není jednoznačná – jedná se o polydisperzní micely. Dalším typem **jsou laminární, McBainovy micely** (Obr. 8: c), které vznikají ještě při vyšších koncentracích roztoku. Tyto micely jsou složeny ze dvou vrstev PAL (micely jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci). V důsledku tvorby laminárních micel a jejich charakteristickému uspořádání mohou dostatečně koncentrované roztoky přecházet v gel. Dalším typem je výše zmíněná **reverzní micela**. Jádro těchto micel tvoří polární skupiny a uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí [19].



Obr. 8: a) Hartleyova (sférická) micela, b) válcovitá micela, c) McBainova (laminární) micela [19].

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

V této diplomové práci byla pozornost věnována především penetračním vlastnostem nosičových systémů na bázi polymerních micel, konkrétně hydrofobizované kyseliny hyaluronové. A to především z důvodu myšlenky, že obecně penetrují lépe relativně malé molekuly [13,14]. Kyselina hyaluronová, je ale výjimka, do kůže totiž procházejí i větší molekuly. Nastává zde otázka: Jedná se tedy o speciální transportní systém? Pokud ano, mohl by tento systém na sebe navázat některé aktivní látky používané v kosmetice? Mohl by tyto látky dopravit do kůže efektivněji?

Abychom ale mohli na kyselinu hyaluronovou navázat nepolární kosmetickou aktivní látku, je nutné ji modifikovat – hydrofobizovat.

Takto modifikovaná – hydrofobizovaná kyselina hyaluronová vytváří tzv. polymerní micely. Tyto micely jsou považovány za potenciální nosičový systém. Ten je ale vhodný pouze pro transport hydrofobních látek. Obecně ale platí, že hydrofóbní látky procházejí přes kůži lépe než hydrofilní [13].

Proč tedy nosičový systém? Zkusme tedy do nosičového systému navázat některé extrémně hydrofobní látky. Koenzym Q10 (CoQ10) by mohl být vhodnou látkou k navázání na tyto polymerní micely, a to především z důvodu jeho hydrofobicity. Dalším důvodem je také to, že CoQ10 je látka tělu vlastní. Navíc s věkem obsah CoQ10 v kůži klesá. Tento pokles je mimo jiné spojen také s tvorbou vrásek a vyšší náchylností kůže k poškození UV zářením.

Pokud bychom ale chtěli penetrovat CoQ10, mohl by nastat problém s jeho kvantifikací v kůži. Z tohoto důvodu byl CoQ10 nahrazen hydrofobní fluorescenční látkou – nilskou červení.

Hlavním cílem tedy bylo provést penetrační experimenty se dvěma typy polymerních micel s využitím nilské červeně jako nesené látky. Dále pak provést základní charakterizaci těchto polymerních micel pro potenciální kosmetickou aplikaci s využitím CoQ10, jako nesené látky.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Xiao Wu a spol [25] chtěli svou práci zjistit, zda velikost a vlastnosti polymerních částic mají vliv na schopnost nést lipofilní „aktivní látku“ (v jejich případě se jednalo o nilskou červeň (NR)) v sub-mikronové polymerní částici. Problémy které v tomto článku řešili a důvody, proč se jim věnovali, jsou následující: chtěli vědět, co se stane se sub-mikronovou polymerní částicí, když se přiblíží ke kůži. Dále pak zjistit, zda existuje nějaký důkaz, že tyto částice mohou prostoupit kožní bariérou (stratum corneum - SC); a v neposlední řadě také to, co se stane s aktivní látkou (např. léky, kosmetické aktivní látky), které jsou navázány na sub-mikronové polymerní částice. Metody, které použili pro zkoumání těchto vlastností, byly následující: dynamický rozptyl světla pro zjištění velikosti a polydisperzity částic; množství navázané NR pomocí HPLC; in vitro průnik do kůže; stratum corneum tape-stripping; a LSCM (Laser Scanning Confocal Microscopy). V jejich pokusech byly použity tyto polymery: Poly-(ϵ -caprolactone) – CAPA, cellulose acetate butyrate – CAB a polystyrene – PS, a jako aktivní částice pak NR.

Ve své práci zjistili, že v částicích vyrobených z CAPA bylo navázáno relativně konstantní množství NR (46 – 49 %). Zjistili, že více NR se navázalo do hydrofobních polymerních částic PS (cca 77 %), a méně NR do více hydrofilní formulace CAB (24 %). Výsledkem bylo, že v supernatantu se nacházelo relativně konstantní množství NR a to u všech zkoumaných částic. Tento fakt si vysvětlili tím, že zbytek NR bylo navázáno do micel. Ukázalo se, že ve větších částicích bylo výsledně navázáno větší množství NR, a že větší částice byly schopny „aktivní látku“ donést do stratum corneum efektivněji. Podle jejich výsledků byly hydrofobní polymery schopny do kůže donést větší množství lipofilní „aktivní látky“ než polymery hydrofilní. Z použití metody LSCM bylo zjištěno, že NR navázaná v CAB pronikala do kůže mezibuněčnými cestami. Tento postup byl ale omezen pouze na SC, protože v hlubší vrstvě kůže byly jen malé náznaky průniku do kůže (po 6 – ti hodinové aplikaci).

Chování nano a mikro částic jako nosičových systémů zkoumali **Tarl W. Prow a kolektiv** [26]. Nejpoužívanější způsob transportu lokálních léčiv je přes kůži. Tento způsob je také potenciální cestou k dopravení nanočástic do kůže. Kůže jako taková poskytuje přirozenou, fyzikální bariéru a zabraňuje prostupu částic. Existují ale možnosti, kdy do kůže můžeme dopravit terapeutické nanočástice. Především tehdy, pokud je kůže nemocná - narušená, anebo pomocí vlasových folikulů. Zatímco nanočásticové nosičové systémy byly zvoleny jako možná technologie budoucnosti, jejich potenciál v léčbě lokálních kožních onemocnění musí být ještě prověřen. Většina nosičových systémů je založena na lipidových nosičích, tj. pevné lipidové nanočástice a nanoemulze s částicemi o velikosti v průměru 300 nm, kterým nyní říkáme mikročástice.

Ve svém článku prezentovali své nepublikované klinické údaje o pronikání nanočástic do kůže a také dříve publikované výsledky, které podporovaly hypotézu, že pravděpodobnost toho, že nanočástice v průměru větší než 10 nm, proniknou skrz stratum corneum do živé lidské kůže, je velmi malá. Tyto nanočástice se hromadí u otvorů vlasových folikulů, a to zejména po masáži. Nicméně byl pozorován zvýšený výskyt nanočástic v kůži

a to především u poškozené a nemocné kůže. V tomto článku se věnují kůži jako nanočásticové bariéře, nedávné práci v oblasti nanočásticových nosičových systémů pro aplikaci do kůže a budoucím směrům, které jsou nyní zkoumány.

Dopravení ibuprofenu (IBU) do kůže se věnovala skupina **Avnish Patel a kolektiv** [27]. Ibuprofen je dostupný jako kožní přípravek více než dvacet let. Jeho primární indikace je k úlevě od bolesti a zánětů u revmatických onemocnění a také při dalších obtížích pohybového aparátu. Tento článek shrnuje různé strategie, které byly doposud zkoumány pro perkutánní dodání IBU. Důraz je kladen na studie, které byly provedeny s IBU v jeho základní formě na lidské nebo prasečí kůži. Dále se věnoval rozvíjejícím se technologiím pro lepší dodání IBU do kůže, včetně metod, které vyžadovaly fyzické narušení membrány. V článku byla také diskutována úloha biofyzikálních technik, jako je konfokální Ramanova spektroskopie v racionálním rozvoji ibuprofenových formulací.

Aktuálně používaná lokální analgetika byla populární po mnoho let. K lokálním aplikacím ve formě mastí a mazadel se používá methyl salicylát. Tyto masti se používaly desetiletí pro úlevu od bolesti při sportovních zraněních. Více než 50 let po objevu IBU stále poskytuje terapeutický přínos pro pacienty a je komerčně velmi úspěšný. Kožní podání nabízí mnoho výhod ve srovnání s perorálním. Jsou zde patrné i značné inovace ve vývoji formulací v průběhu několika let. Je však stále nejasné, jak ibuprofen dosáhne účinku v lokálním místě působení. Poškozená tkáň by mohla vysvětlit účinnost lokálního analgetika. Nicméně hlavním úkolem bude navrhnout "inteligentní" formulace, které účinně dopraví optimální množství léku do své cílové lokality.

Kazunori Kataoka a spol. [28] se v článku *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance* věnovali užitečnosti polymerních micel vytvořených pomocí multimolekulární komplety blokových kopolymerů jako nového typu „jádrového“ koloidního nosiče pro léčiva a genové cílení. Proces micelizace ve vodném prostředí zde byl podrobně popsán na základě rozdílů v hnací síle jaderné segregace, včetně hydrofobní a elektrostatické interakce.

Oddělené jádro v hydrofilním obalu ukázalo, že může fungovat jako rezervoár pro geny, enzymy a variaci léčiv s různými vlastnostmi. Možnost vnějšího povrchu polymerní micely změnit své fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti zde byla zmíněna z hlediska navrhování nových nosičových micelárních systémů. Dále zde byla zmíněna také distribuce polymerních micel, kdy tyto micely prokazovaly dlouhou životnost a značnou akumulaci u nádorů. Tím se tyto systémy stávají slibným nástrojem pro budoucí cílené léčení nádorových onemocnění.

Lenka Kotingová a kolektiv [29] se v článku *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro* věnovali především stručnému přehledu možností a pravidel laboratorního testování dermální formy přenosu chemických látek s cílem přispět k dalšímu rozvoji této oblasti výzkumu. Zlatým standardem pro testování transdermální absorpce chemických látek přes absorpční membránu *in vitro* je lidská kůže. Tato kůže je získávána z tkáňové banky anebo od dárců, většinou pacientů při chirurgických operacích (zde je

nezbytný informovaný souhlas dárce). Alternativou k lidské kůži je kůže prasečí nebo opičí, které jsou lidské kůži velice blízké svou anatomí, fyziologií a chemickým složením. Vzhledem k dostupnosti se více používá kůže prasečí. Velmi vhodné je použití kůže ušního boltce, který je svou anatomickou stavbou lidské kůži nejvíce podobný.

V tomto článku také zmiňují možnosti použití kůží. Lidskou nebo zvířecí kůži je možno použít v plné tloušťce 500 – 1000 μm . Takovéto vzorky kůže obsahují rohovou vrstvu, zbývající vrstvy pokožky a škáru. Lze též použít tzv. dermatomovanou kůži, která je dermatomem seříznuta na tloušťku 200 – 500 μm a obsahuje rohovou vrstvu, zbývající vrstvy pokožky a jen horní část škáry.

Další možností je použití zmrazené kůže. Vzorky odebrané kůže se po ošetření zmrazí při -18 až -20 $^{\circ}\text{C}$. Zmrazená kůže nemá zachovaný aktivní enzymatický systém a je mírně anatomicky poškozena krystalizací vody (bezvodá rohová vrstva je poškozena minimálně). Při srovnání s čerstvou kůží vykazuje vyšší úroveň ustáleného průtoku testované látky (steady state flux) a je zde i kratší doba do začátku pronikání testované látky do akceptorové tekutiny.

Glen S. Kwon a Teruo Okano [30] se v článku *Polymeric micelles as new drug carriers* zabývají pokroky v syntéze blokových kopolymerů, které vedly k tvorbě polymerních micel. Tyto polymerní micely mohou sloužit jako nosiče léčiv. Pro potencionální použití v medicíně, tedy podávání léků, byly micely připraveny z biokompatibilních a biologicky odbouratelných kopolymerů. Polymerní micely mají své funkční skupiny na povrchu, kde se mohou navázat další důležité molekuly. Vědci se snaží do polymerních micel navázat léčivo jak chemickou, tak i fyzikální cestou. Polymerní micely by měly sloužit zejména k rozpuštění hydrofobního léčiva, které je samo o sobě ve vodě nerozpustné. Nedávné studie naznačují, že polymerní micely mohou mít velmi pevná jádra. Mohou tedy zůstat beze změny, a to po velmi dlouhou dobu. Díky této vlastnosti mohou také postupně uvolňovat léky.

V článku *Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers* [31], se **Marie-Christine Jones spolu s Jean-Christophe Leroux** zabývali polymerními micelami a jejich schopností transportovat léčiva. Polymerní micely se v poslední době objevily jako nové, velmi slibné koloidního nosičové systémy pro cílený transport ve vodě špatně rozpustných a amfifilních léčiv. Polymerní micely jsou mnohem stabilnější než povrchově aktivní micely a ve svém vnitřním jádru mohou rozpouštět značné množství hydrofobních sloučenin. Vzhledem k jejich hydrofilnímu obalu a malé velikosti někdy vykazují prodlouženou cirkulaci *in vivo* a také se mohou hromadit u nádorových tkání. Tento článek se zabývá jak chemickou povahou polymerních micel, tak i metodami používanými k jejich charakterizaci s ohledem na způsob podávání léků. Zvláštní důraz je zde kladen na stanovení kritické micelární koncentrace a na proces transportu léčiva. V článku jsou také popsány potenciální aplikace v lékařství, zejména v chemoterapii při léčbě rakoviny.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové práce byla rozdělena do dvou fází.

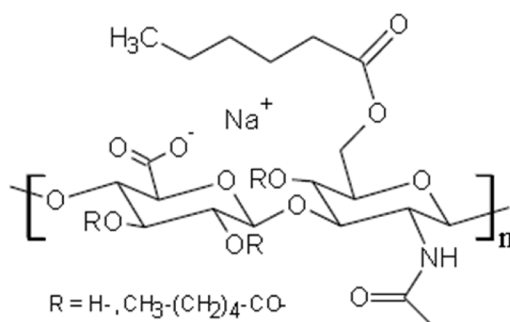
V první fázi byla provedena základní charakterizace polymerních micel pro potenciální kosmetickou aplikaci s využitím CoQ10 jako nesené látky. Ta stejná charakterizace byla provedena také u systémů s navázanou nilskou červení.

Ve druhé fázi byly penetrovány nosičové systémy HA C6 (kaproylhyaluronát sodný) a HA C18:1 (oleylhyaluronát sodný) s navázanou NR. Vzorky získané po těchto penetračních experimentech byly vždy rozpůleny. Jedna polovina kůže byla nakrájena a vyfocena pomocí fluorescenčního mikroskopu, a druhá polovina této kůže byla použita na kvantitativní vyhodnocení (extrakce a proměření NR na fluorescenčním readeru).

5.1 Seznam použitých chemikálií, materiálů a přístrojů

Příprava nosičových systémů probíhala na základě patentové přihlášky PV 2012 – 842, která je v řízení.

Kaproylhyaluronát sodný - kyselina hexanová (kapronová) navázaná na kyselinu hyaluronovou (Obr. 9). **Kaproyl HA**; HA C6, MW 15 kDa, stupeň substituce DS – 55 %.



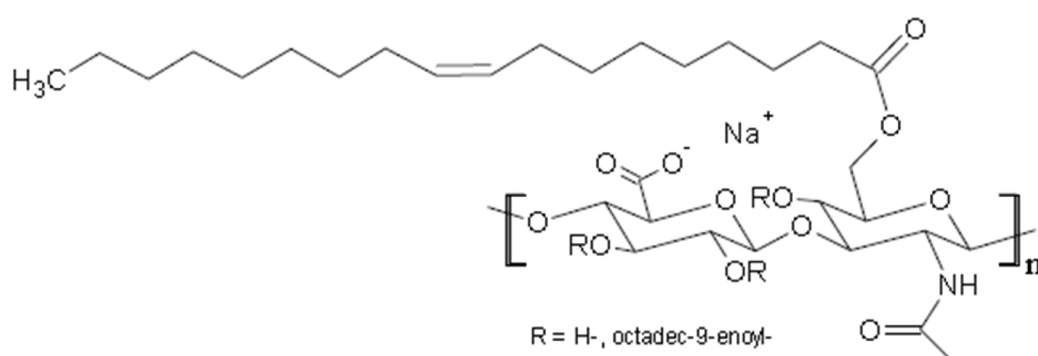
Obr. 9: Kaproylhyaluronát sodný.

Kaproylhyaluronát sodný s fyzikálně navázanou niiskou červení nebo koenzymem Q10.

HA C6 – navázáno 0,034 % (hm.) NR.

HA C6 – navázáno 8 % (hm.) CoQ10.

Oleylhyaluronát sodný - kyselina olejová navázaná na kyselinu hyaluronovou (Obr. 10). **Oley HA**, HA C18:1; šarže: OA1-081112, MW 15 kDa, stupeň substituce DS – 14,4 %.



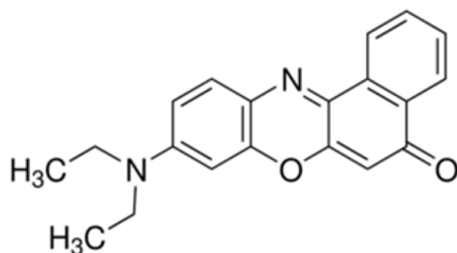
Obr. 10: Oleylhyaluronát sodný.

Oleylhyaluronát sodný s fyzikálně navázanou niiskou červení nebo koenzymem Q10.

HA C18:1 – navázáno 0,068 % (hm.) NR.

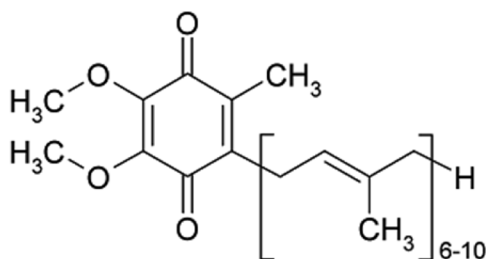
HA C18:1 – navázáno 17 % (hm.) CoQ10

Fluorescenční sonda – Nilská červeň: **Nile Red** (Obr. 11); výrobce – Sigma; $C_{20}H_{18}N_2O_2$; CAS number: 7385-67-3; MW 318,37 g.mol⁻¹.



Obr. 11: Nilská červeň.

Koenzym Q10: Mitsubishi Japan Ubiquinone, Batch: 60341101, Selco. $C_{59}H_{90}O_4$; CAS number: 303-98-0; MW 863,34 g.mol⁻¹ (Obr. 12)



Obr. 12: Koenzym Q10.

PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Fosfátový pufr - pufovaný fyziologický roztok – 10mM. Složení, postup přípravy: 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,85 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; 0,2 g KH_2PO_4 – bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody, a autoklávováno.

ACN (acetonitril): C_2H_3N ; CAS number:75-05-8; MW 41,05 g/mol; čistota > 96 %; Lot # SZBC356SV; 34851 – 2,5 L.

Destilovaná voda, stolní olej. Kůže z boltce prasete. Histologická sklíčka MENZEL-GLÄSER, Thermo Scientific, 76 x 26 mm, Braunschweig, Německo. Penetrační cely; PermeGear, Inc.; Pennsylvania; USA. Destičky pro fluorescenční reader, 96 jamek, TPP, Švýcarsko. Mikropipety eppendorf (100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l a 5000 μ l), Polsko. Mikrozkuřavky eppendorf (500 μ l, 1500 μ l, 2000 μ l a 5000 μ l), Polsko. Parafilm, Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA. Inkubátor Jouan, IGO 150, ThermoFisher SCIENTIFIC, USA. Minicentrifuga MiniSpin Eppendorf; Polsko. Microcentrifuga eppendorf 5418; Polsko. ZetaSizer Nano range; Malvern Instruments Ltd; Anglie. Cryostat Leica CM 1950; Německo. Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti; Amsterdam, Nizozemí. Fluorescenční reader; TECAN infinite M200; Männedorf; Švýcarsko.

5.2 Zeta potenciál, velikost částic, polydisperzita a stabilita částic

5.2.1 Použitá metoda – Dynamický rozptyl světla (DLS)

Někdy je také označován jako kvazielastický rozptyl světla (QELS). Jedná se o neinvazivní, dobře zavedenou techniku, která se využívá pro měření velikosti a distribuce velikosti molekul a částic (zpravidla v submikronových rozměrech). Mezi hlavní aplikace dynamického rozptylu světla patří charakterizace částic, emulzí nebo molekul, které jsou rozptýlené nebo rozpuštěné v kapalině [32]. DLS měří Brownův pohyb, který pak vztahuje k velikosti částic. Jedná se o nahodilý pohyb částic v důsledku bombardování okolními molekulami rozpouštědla. Se zvyšující se velikostí částic dochází ke zpomalování Brownova pohybu [33].

Velikost částic je vypočtena z translačního difuzního koeficientu za použití Einstein – Stokesova vztahu (2):

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (2)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr, k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota, η je viskozita a D je translační difuzní koeficient. Průměr částic získaný tímto měřením je vlastně průměr koule, která má stejný translační difuzní koeficient jako daná částice [33].

Pokud je korelační funkce fitována monoexponenciální funkcí, je získána střední velikost částic a je odhadnuta šířka distribuce (index polydisperzity - PDI). Tento přístup se nazývá kumulativní analýza. Index polydisperzity se v tomto případě počítá následovně (3):

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{d} \right)^2, \quad (3)$$

kde PDI je index polydisperzity, σ je standardní odchylka a d je průměrná velikost (průměr) částice.

Vhodnou charakteristikou tepelného pohybu disperzních částic v kapalném prostředí není průměrná rychlost, ale střední kvadrát posuvu x zaznamenaného za dobu t , což je v úzkém vztahu s difuzním koeficientem (4).

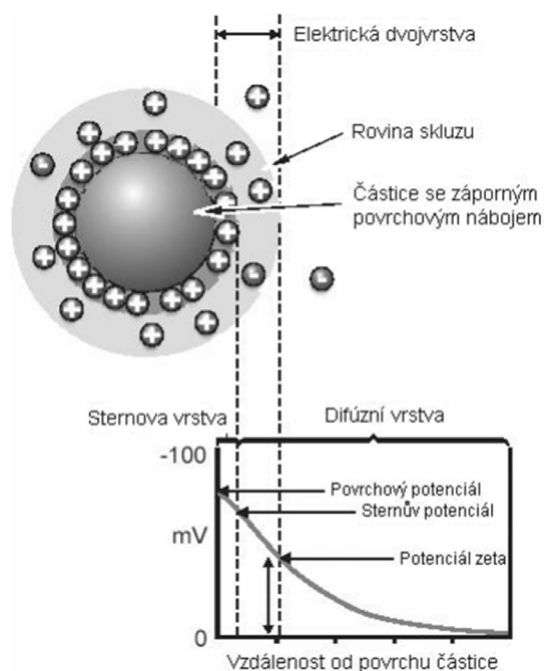
$$\frac{\langle x^2 \rangle}{t} = 2D, \quad (4)$$

kde $\langle x^2 \rangle$ je střední kvadrát posuvu x , t je čas a D je difuzní koeficient.

Zeta potenciál (ζ -potenciál; ζ – z latinského dzéta) je funkcí povrchového náboje, který vzniká v případě, že je jakýkoliv materiál umístěn v kapalině. Zeta potenciál je velmi dobrým indexem rozsahu elektrostatických odpudivých interakcí mezi částicemi. Běžně se používá

k předpovězení a kontrole disperzní stability [34]. Aby systém zůstal v disperzním stavu, je nutné udržovat zeta potenciál nad 25 mV (pozitivní nebo negativní). Obecně řečeno, čím bude vyšší absolutní hodnota zeta potenciálu, tím více stabilní systém bude [35]. Znaménko ζ potenciálu je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy (podle konvence je potenciál v objemové fázi roven nule) [35].

Rozlišujeme dvě části vrstvy kapaliny, která obklopuje částici. Za prvé, oblast vnitřní, kterou nazýváme Sternovou vrstvou. V této vrstvě jsou ionty vázány silně. Za druhé, oblast vnější, tzv. difúzní oblast, ve které jsou ionty vázány méně pevně. Schéma je znázorněno na obrázku níže (Obr. 13). Uvnitř difúzní vrstvy se nachází teoretická hranice, kde tvoří ionty a částice stabilní subjekty. Pokud se částice pohybuje, např. díky gravitaci, ionty uvnitř této hranice se pohybují s částicí. Všechny ionty za touto hranicí s částicí ale neputují. Tuto hranici nazýváme jako povrch hydrodynamického smyku nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici je znám jako potenciál zeta [33].



Obr. 13: Částice a její elektrická dvojvrstva [33].

5.2.2 Pracovní postup

Měření velikosti částic a stability systému bylo provedeno metodou dynamického rozptylu světla, a to tak, že byly proměřeny 2 koncentrace vzorků v prostředí voda a PBS. Měření probíhalo na přístroji ZetaSizer Nano range (měřeno při 25 °C; laser 532nm, 50mW zelený laser).

Touto metodou byly proměřeny vzorky HA C6 s navázanými 0,034% NR a s navázanými 8% CoQ10. Dále pak vzorky HA C18:1 s navázanými 0,068% NR a navázanými 17% CoQ10. Toto měření bylo provedeno proto, abychom věděli, jak se měnily vlastnosti zkoumaných systémů v čase. Ze všech čtyř připravených nosičových systémů polymerních micel na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové byly připraveny roztoky o koncentraci 1 mg/ml a 5 mg/ml; a to ve dvou prostředích (voda a PBS).

Měření připravených vzorků bylo provedeno tentýž den. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Byly proměřeny nosičové systémy ve dvou koncentracích: 1 mg/ml a 5 mg/ml. Proměření stejných vzorků bylo provedeno také 3 dny po přípravě vzorků. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Přístroje řady Zetasizer Nano provádějí měření velikosti částic s použitím procesu nazývaného dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering (DLS)). Metoda je založena na měření Brownova pohybu, který je uváděn do vztahu s velikostí částic. To je provedeno osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle.

Velikost částic byla měřena včetně solvatačního obalu a byla uvedena v jednotce [*d.nm*] (průměr částice v nanometrech). Zéta potenciál určuje, jak moc byl měřený systém stabilní. Za kritérium stability se považuje absolutní hodnota zeta potenciálu. Pokud byla tato absolutní hodnota vyšší než 25 mV (30 mV), systém byl považován za stabilní.

Co se týká polydisperzity, ta byla označena jako Pdi a její hodnoty byly ve stupnici 0 až 1 (Tabulka 2). Pokud by výsledek byl roven 1, znamenalo by to, že měřený systém byl polydisperzní. Za monodisperzní by se dal považovat systém, pokud by Pdi bylo 0,1 [36].

5.3 Cryo SEM

5.3.1 Použitá metoda

Rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie za velmi nízké teploty (Cryo - SEM) se stala zavedenou technikou pro zachycení a sledování biologických vzorků v jejich přirozeném stavu. Je vhodnou metodou zvláště tam, kde tradiční způsob přípravy vzorků (např. sušení) způsobuje nežádoucí změny ve struktuře vzorku. Cryo - SEM obvykle zahrnuje fixaci vzorku buď pomocí zmrazení v kapalném dusíku, nebo vysokým tlakem. Tyto zmražené vzorky jsou pak přeneseny ve vakuu na kryo-katodové rozprašování, kde jsou potaženy vodivou vrstvou kovu nebo uhlíku. Nakonec jsou vzorky vloženy do SEM komory vybavené kryo-fází a jsou pozorovány za vysokého vakua.

5.3.2 Pracovní postup

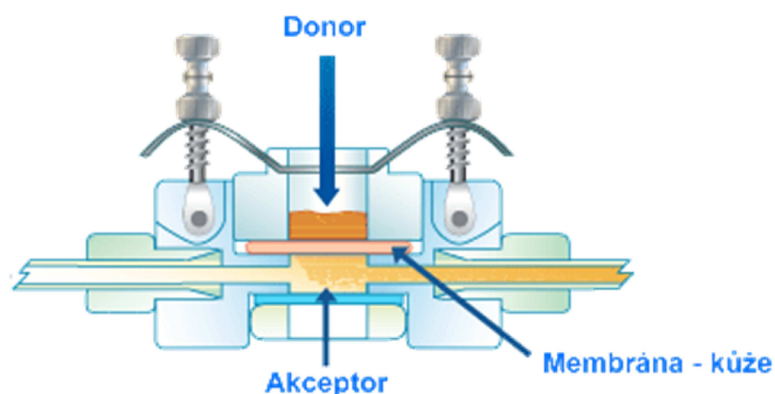
Vzorky byly poslány na stanovení velikosti micel pracovišti Akademie věd ČR v Českých Budějovicích.

5.4 Penetrační experimenty

Pro penetrační experimenty byla na základě provedených předexperimentů zvolena jedna konečná koncentrace nosiče s navázanou niiskou červení a jeden dávkovaný objem. Byl vybrán systém o koncentraci 1 mg/ml a dávkovaný objem 200 μ l.

5.4.1 Příprava ušního boltce pro penetrace

Pro penetrační experimenty byly použity ušní boltce prasete, které byly dodány z jatek Letohrad. Jednalo se o čerstvé vzorky získané ihned po porážce. Podmínkou bylo získat ušní boltce nepoškozené, tzn. netetované, nespážené a bez jakýchkoliv vnějších poranění tak, aby nebyla porušena kožní bariéra a nedošlo ke zkreslení výsledků. Ušní boltce byly omyty, odmaštěny mýdlem a oholeny holítkem, opatrně tak, aby nedošlo k poškození kůže. Na boltcích byly vyznačeny čtverečky o velikosti Franzovy cely (cca. 2x2 cm) v místech, kde nebyla kůže poškozená. Tyto čtverečky byly vyříznuty. Pro samotné experimenty byla použita kůže zbavená chrupavky. Nařezané kousky kůže byly vloženy do PBS a použity na penetrační experimenty ještě ten den. Schéma Franzovy cely je znázorněna na Obr. 14. Z ušních boltců byla odebírána kůže vždy z vnitřní strany, která je nejvíce podobná kůži lidské. Použití kůže z prasečího ušního boltce je popsáno v literatuře i obecně platných guidelines (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method [37]), které uvádějí, jakým způsobem by měly penetrační experimenty probíhat.

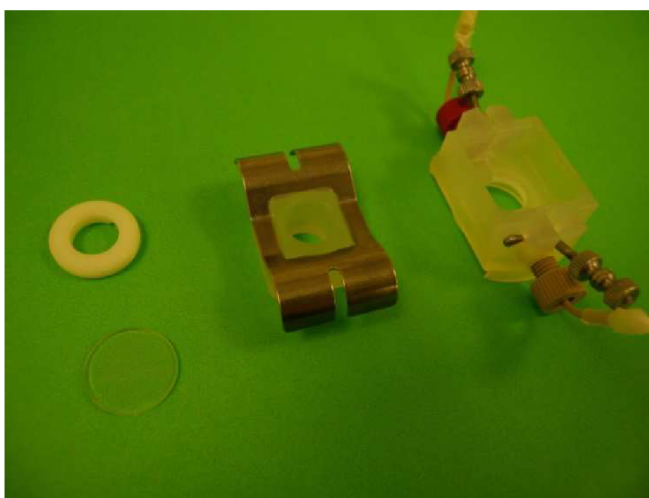


Obr. 14: Franzova cely [38].

5.4.2 Příprava difuzních cel

Cela byla zkompletována, důkladně dotažena a do spodní akceptorové části bylo napipetováno 370 μ l PBS. Kůže byla vyjmuta z PBS, lehce osušena papírovým ubrouskem a vložena jako membrána mezi části cely. Kůže byla napnuta. Cely byly zkompletovány, dostatečně utaženy a temperovány po dobu 15 minut při 37°C. Na povrch kůže (Obr. 10 – donor) bylo poté napipetováno dané množství vzorku. Cela byla překryta parafilmem (minimálně dvě vrstvy), aby nedošlo k odpaření dávkované látky.

Takto připravené cely se vzorky byly ponechány v inkubátoru při teplotě 37 °C. Cely byly z inkubátoru odebírány dle předem stanoveného harmonogramu (po 5 nebo 20 hodinách). Fotografie cel, které byly pro penetrační experimenty použity, jsou na obrázcích níže (Obr. 15 a 16).



Obr. 15: Rozložená penetrační cela.



Obr. 16: Zkompletovaná penetrační cela; pohledu z boku a shora.

5.4.3 Pracovní postup – penetrace NR v nosiči (HA C6 a HA C18:1)

Byla provedena penetrace nosičových systémů HA C6 (navázáno 0,034 % NR) a HA C18:1 (navázáno 0,068 % NR) v PBS o koncentraci 1 mg/ml. Dávkován byl objem 200 μ l.

5.4.4 Pracovní postup – penetrace NR v oleji

Penetrace NR v oleji (koncentrace NR $c = 1,15 \mu\text{g/ml}$). Tento pokus byl použit jako kontrola, zda do kůže penetruje také NR rozpuštěná ve stolním oleji. Byl dávkován objem 200 μ l. V tomto objemu bylo obsaženo 0,23 μg NR. Byly zvoleny dva časy penetrace: 5 a 20 hodin.

5.4.5 Pracovní postup – penetrace NR v PBS

Penetrace NR v PBS – disperze. Koncentrace NR v oleji byla $c_1 = 0,339 \mu\text{g/ml}$; a $c_2 = 0,687 \mu\text{g/ml}$. Koncentrace NR byly shodné jako výsledné koncentrace NR u penetračních experimentů nosičů. Tento pokus byl opět proveden jako kontrola a srovnání penetračních vlastností s nosičovými systémy. Byly zvoleny dva časy penetrace: 5 a 20 hodin.

5.4.6 Pracovní postup – penetrace NR v emulzi

Jako další kontrola byl zvolen systém NR v emulzi. Tato emulze byla připravena následovně:

1) NR byla rozpuštěna v oleji. Výsledná koncentrace NR v celém systému (emulzi) byla $c = 0,687 \mu\text{g/ml}$. Samotný nosič HA C18:1 byl rozpuštěn v PBS, výsledná koncentrace nosiče v emulzi byla $c = 1 \text{ mg/ml}$.

2) NR byla rozpuštěna v oleji. Výsledná koncentrace NR v celém systému (emulzi) byla $c = 0,339 \mu\text{g/ml}$. Samotný nosič HA C6 byl rozpuštěn v PBS, výsledná koncentrace nosiče v emulzi byla $c = 1 \text{ mg/ml}$.

Penetrovány byly obě emulze a to vždy v časech 5 a 20 hodin.

5.4.7 Odběr vzorků po penetraci

Po skončení penetračního experimentu byla odebrána kapalina, která zbyla v donoru i v akceptoru. Kůže byla vyjmuta z cely, lehce osušena papírovou utěrkou a následně rozpůlena (Obr. 17). Jedna polovina byla zamražena pro fluorescenční mikroskopii a druhá byla určena pro kvantifikaci množství NR v epidermis a dermis.



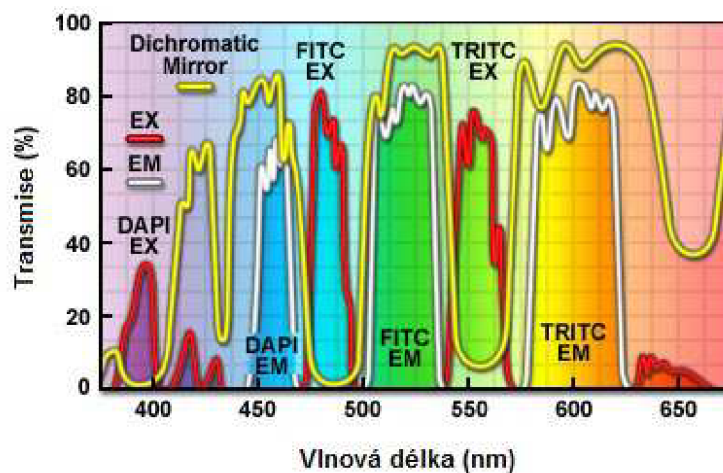
Obr. 17: Rozpůlení penetrované kůže.

5.5 Analýza vzorků na fluorescenčním mikroskopu

5.5.1 Použité metody – Fluorescenční mikroskopie (fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti)

Klíčovým termínem fluorescenční mikroskopie je fluorofor – látka schopná absorbovat světlo určité vlnové délky a poté emitovat světlo o delší vlnové délce. Světlo různých vlnových délek je možné od sebe oddělit pomocí filtrů – do okuláru tak může proniknout pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí (excitující záření je odfiltrováno), čímž se výrazně zvyšuje citlivost celé techniky. Fluorofory jsou detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu – přístroje, který je velice podobný klasickému světelnému mikroskopu – odlišností je doplnění o velice silný zdroj světla a dva typy filtrů. První sada filtrů je umístěna mezi zdroj světla a vzorek (umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách), druhá pak vpouští do objektivu světlo, které bylo emitováno příslušným fluoroforem. V této diplomové práci byl použit filtr TRITC (TRITC – tetramethylrhodaminizothiokyanát); jedná se o červenou emisi – excitace je zde nastavena mezi 545 až 565 nm, a emise se detekuje v rozmezí 580 až 620 nm. Výsledkem byly struktury barevně zářící v temném poli [39].

Ultrafialové a viditelné spektrální přenosové profily pro kombinaci DAPI-FITC-TRITC filtry fluorescenčního mikroskopu Nikon jsou uvedeny níže na Obr. 18. Tento filtr je určen k optimální detekci DAPI, FITC (fluorescein isothiokyanátem) a TRITC (tetramethylrhodamin isothiokyanát) sond. Zahrnuje excitační filtry s úzkými úseky ve fialové (385-400 nanometrů), modré (475-490 nm) a zelené (545-565 nanometrů) spektrální oblasti.



Obr. 18: Excitační filtry DAPI, FITC a TRITC a rozsahy vlnových délek snímání emise [40].

5.5.2 Pracovní postup

Zpracování vzorku pro fluorescenční mikroskopii

Kůže určená k fluorescenční mikroskopii byla nakrájena na plátky tloušťky 10 μm na kryostatu – z každého vzorku cca 10 ks, z různých míst. Pro krájení kůže byl použit Cryostat Leica CM 1950, který je zobrazen níže na obrázku (Obr. 19).



Obr. 19: Cryostat CM 1950 [41].

Následné nafocení nakrájených vzorků proběhlo pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse Ti (Obr. 20) – pomocí software NIS – Elements. Podmínky fluorescenční mikroskopie: použit filtr TRITC, fotografie bez filtru – automatický čas expozice (5 ms), fotografie TRITC – čas expozice vždy 3 s. Fotografie byly uloženy ve dvou formátech (.jpeg a .nd2).

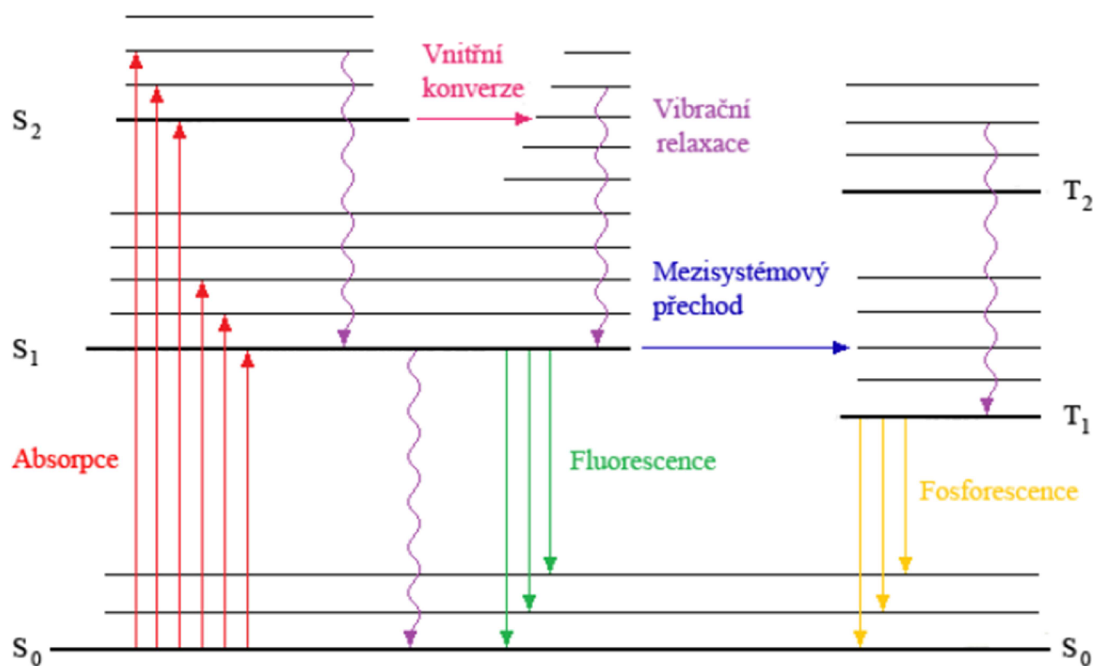


Obr. 20: Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti [42].

5.6 Kvantifikace NR v kůži (TECAN infinite M200)

5.6.1 Použité metody – Fluorescenční spektroskopie

Jedná se o metodu, která se využívá v mnoha odvětvích. Jde především o genetickou analýzu, stopovou analýzu, medicínu a analýzu polymerů [43]. Základní fyzikální děje mezi absorpcí (pohlcením) a emisí (vyzářením) světla popisuje Jabloňského diagram.



Obr. 21: Jabloňského diagram.

Jabloňského diagram (Obr. 21) vysvětluje děje a procesy, které mohou nastat po absorpci světla. Jedná se o zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy molekuly. Diagram názorně ukazuje molekulární procesy, které se dějí při excitaci sledovaného fluoroforu a při jeho cestě zpět na základní hladinu – do základního stavu, který se označuje symbolem S_0 . [44]

Fluorofor v základním stavu absorbuje světlo (foton). Touto absorpcí dojde k excitaci elektronu, který přejde do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Elektrony mají tendenci se vracet zpět na základní hladinu S_0 ; tento jev nazýváme deexcitací [43].

Proces fluorescence je opakovatelný. Pokud není fluorofor zničen v excitovaném stavu (fotovybělování – dochází k nevratnému zničení excitovaného fluoroforu); je možné tento fluorofor opakovaně excitovat [45].

Fluorescenční sondy; jedná se o nevlastní fluorofory, které se ke zkoumané látce váží nekovalentně. Na volbě fluorescenční sondy závisí výsledky experimentů ve fluorescenční spektroskopii – její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. V současné době je známo několik tisíc různých sond. Fotochemické vlastnosti sond jsou ale ovlivňovány prostředím, ve kterém se nachází. Nejpoužívanějšími sondami ve výzkumu systémů, jak ve vědeckých, výzkumných tak i v průmyslových odvětvích, jsou například pyren, prodan nilská červeň a další.

Nilská červeň (NR) slouží jako fluorescenční sonda. Tato fluorescenční sonda je citlivá na polaritu svého okolí. Se zvyšující se polaritou klesá intenzita fluorescence a maximum vlnové délky emisního spektra se posouvá k vyšším hodnotám. V polárním prostředí se maximum pohybuje okolo 640-650 nm, v nepolárním prostředí maximum klesá až k 610 nm. V prostředí pufru se emisní maximum obvykle pohybuje v rozmezí 635 - 650 nm. Bylo zjištěno, že nilská červeň je dobře rozpustná a silně fluoreskující v organických rozpouštědlech, nicméně ve vodném prostředí je zhasena. Díky své rozpustnosti v lipidech může nilská červeň sloužit jako výborná fluorescenční sonda lipidů; a používá se pro detekci intracelulárních lipidů pomocí fluorescenční spektrofotometrie [46] a průtokové cytofluorometrie [47]. Nilskou červeň lze vhodně využít pro měření biologických membrán nebo micelárních systémů [48].

5.6.2 Pracovní postup

Po uskutečněném penetračním experimentu (5 nebo 20 hodin) byla kapalina zbylá v donorové a akceptorové části cely odebrána do mikrozkušavek (k 50 μ l vzorku bylo přidáno 250 μ l ACN). Polovina kůže určená pro kvantifikaci byla opláchnuta v 400 μ l PBS. K tomuto oplachu byl přidán pětinasobný obsah (2 ml) ACN. Seškrabem, pomocí skalpelu, byla odebrána epidermis, která byla extrahována v 300 μ l směsi ACN:PBS = 5:1. Dermis byla nakrájena na co nejmenší kousky a byla extrahována v 500 μ l směsi ACN:PBS = 5:1. Vše bylo extrahováno přes noc ve tmě na třepačce. Druhý den byly všechny vzorky zcentrifugovány (14000 rpm, 10 min), odebrány a proměřeny.

Kvantifikace se prováděla na fluorescenčním readeru TECAN infinite M200 (Obr. 22), kdy se podle předem stanoveného schématu napipetovaly vzorky (150 μ l), blanky a kalibrace do 96 – jamkových destiček. Pro měření intenzity fluorescence NR byla excitační vlnová délka nastavena na 545 nm a emise byla snímána při 610 nm.



Obr. 22: TECAN infinite M200 [49].

5.7 Zpracování experimentálních dat

Všechna data byla zpracovávána v programu MS Excel. V tabulkách kvantifikovaného množství NR v kůži jsou hodnoty uvedeny vždy jako průměr \pm SEM (vždy v hmotnostních %). Odchylka SEM jako střední chyba průměru (Standard Error of Mean).

Všechny pokusy byly provedeny vždy v minimálně 3 nezávislých opakováních (penetrační experimenty nosičových systémů HA C6, HA C18:1 a NR v oleji byly provedeny v 6 nezávislých opakováních; penetrační experimenty NR v PBS a NR v emulzi pak pro každou koncentraci vždy ve 3 nezávislých opakováních). Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí párového T.TESTu.

Jako kontrola byl zvolen systém NR v oleji. Pokud při srovnání dvou systémů vyšly hodnoty $p \leq 0.05$, byly výsledky považovány za statisticky významné. V grafech byly následně označeny symbolem * výsledky pro $p \leq 0,05$ (nosičový systém vs kontrola – NR v oleji v daném čase), a ** pro $p \leq 0,01$ nosičový systém vs kontrola – NR v oleji v daném čase).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

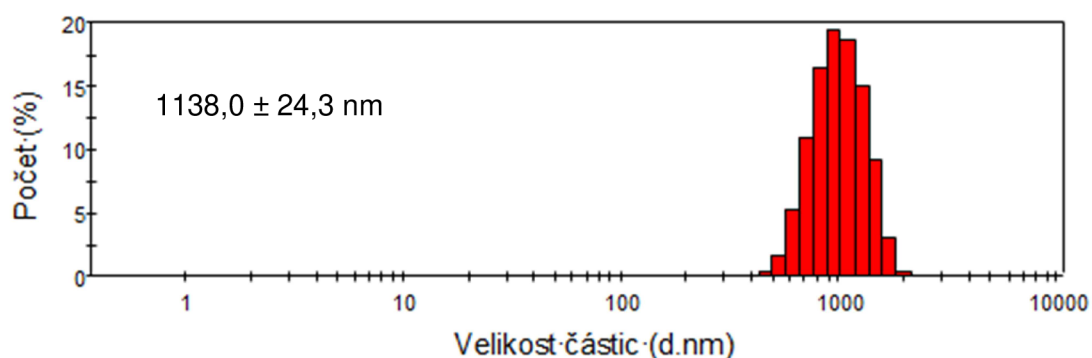
6.1 Výsledky měření – Zeta potenciál, velikost částic, polydisperzita a stabilita částic

Tabulka 1: Proměřené vlastnosti – průměrná velikost, zeta potencial.

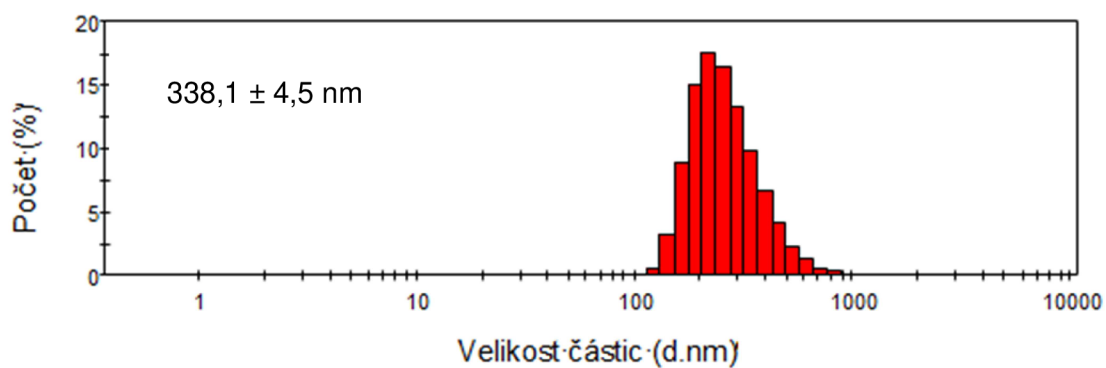
Vzorek	Průměrná velikost částic [nm]		Zeta potenciál [mV]	
	den přípravy	po 3 dnech	den přípravy	po 3 dnech
HA C6 s NR ve vodě, c = 1 mg/ml	423,9 ± 27,0	399,8 ± 20,7	-49,8	-54,4
HA C18:1 s NR ve vodě, c = 1 mg/ml	212,8 ± 29,6	193,2 ± 39,1	-46,2	-47,3
HA C6 s NR ve vodě, c = 5 mg/ml	586,8 ± 20,2	521,4 ± 19,4	-43,8	-43,3
HA C18:1 s NR ve vodě, c = 5 mg/ml	242,8 ± 6,3	255,0 ± 18,8	-37,7	-39,6
HA C6 s NR v PBS, c = 1 mg/ml	244,9 ± 4,0	267,3 ± 27,2	-20,2	-21,0
HA C18:1 s NR v PBS, c = 1 mg/ml	171,3 ± 24,8	127,3 ± 3,3	-15,2	-13,2
HA C6 s NR v PBS, c = 5 mg/ml	352,5 ± 5,7	326,1 ± 4,2	-20,0	-18,5
HA C18:1 s NR v PBS, c = 5 mg/ml	191,5 ± 2,7	206,6 ± 13,1	-21,3	-18,0
HA C6 s CoQ10 ve vodě, c = 1 mg/ml	1138,0 ± 24,3	1099,7 ± 18,8	-55,0	-56,2
HA C18:1 s CoQ10 ve vodě, c = 1 mg/ml	338,1 ± 4,5	336,3 ± 3,1	-49,4	-47,3
HA C6 s CoQ10 ve vodě, c = 5 mg/ml	1654,0 ± 16,5	1619,0 ± 2,6	-40,9	-40,6
HA C18:1 s CoQ10 ve vodě, c = 5 mg/ml	432,4 ± 4,8	426,9 ± 5,7	-44,9	-39,7
HA C6 s CoQ10 v PBS, c = 1 mg/ml	651,5 ± 24,3	563,9 ± 6,6	-19,8	-20,2
HA C18:1 s CoQ10 v PBS, c = 1 mg/ml	373,3 ± 2,7	316,5 ± 19,7	-21,6	-21,0
HA C6 s CoQ10 v PBS, c = 5 mg/ml	1015,0 ± 13,1	902,1 ± 18,9	-20,1	-20,7
HA C18:1 s CoQ10 v PBS, c = 5 mg/ml	295,6 ± 4,1	206,6 ± 4,4	-20,1	-20,3

Tabulka 2: Polydisperzita vzorků v čase.

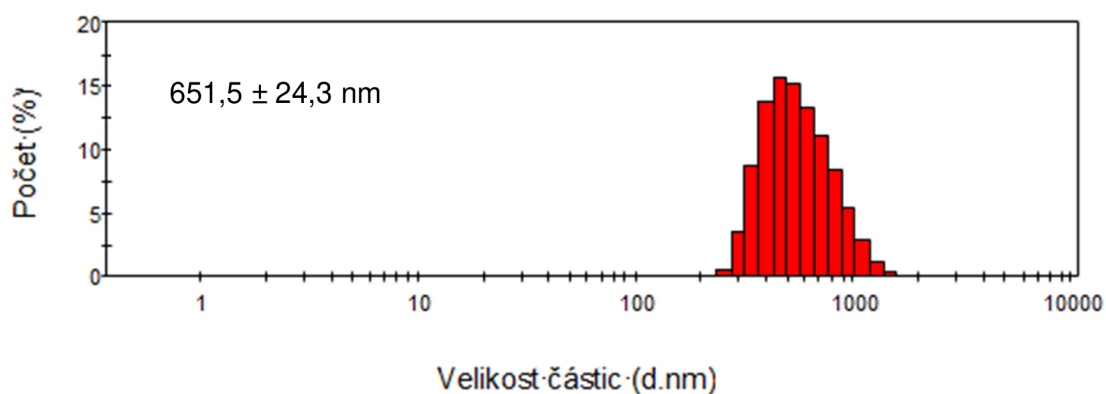
Vzorek	Polydisperzita (Pdi)	
	den přípravy	po 3 dnech
HA C6 s NR ve vodě, c = 1 mg/ml	0,371	0,368
HA C18:1 s NR ve vodě, c = 1 mg/ml	0,364	0,436
HA C6 s NR ve vodě, c = 5 mg/ml	0,370	0,320
HA C18:1 s NR ve vodě, c = 5 mg/ml	0,306	0,333
HA C6 s NR v PBS, c = 1 mg/ml	0,329	0,438
HA C18:1 s NR v PBS, c = 1 mg/ml	0,369	0,411
HA C6 s NR v PBS, c = 5 mg/ml	0,407	0,332
HA C18:1 s NR v PBS, c = 5 mg/ml	0,331	0,354
HA C6 s CoQ10 ve vodě, c = 1 mg/ml	0,194	0,157
HA C18:1 s CoQ10 ve vodě, c = 1 mg/ml	0,158	0,145
HA C6 s CoQ10 ve vodě, c = 5 mg/ml	0,194	0,173
HA C18:1 s CoQ10 ve vodě, c = 5 mg/ml	0,165	0,208
HA C6 s CoQ10 v PBS, c = 1 mg/ml	0,214	0,260
HA C18:1 s CoQ10 v PBS, c = 1 mg/ml	0,163	0,260
HA C6 s CoQ10 v PBS, c = 5 mg/ml	0,165	0,241
HA C18:1 s CoQ10 v PBS, c = 5 mg/ml	0,179	0,200



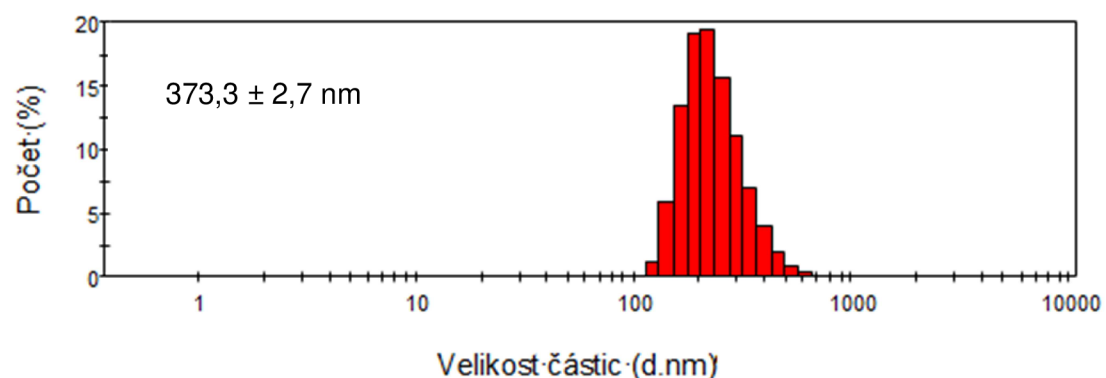
Obr. 23: Distribuce velikosti dle počtu; HA C6 s navázaným CoQ10 ve vodě o koncentraci 1 mg/ml, získaná pomocí metody DLS (histogramová analýza).



Obr. 24: Distribuce velikosti dle počtu; HA C18:1 s navázaným CoQ10 ve vodě o koncentraci 1 mg/ml, získaná pomocí metody DLS (histogramová analýza).



Obr. 25: Distribuce velikosti dle počtu; HA C6 s navázaným CoQ10 v PBS o koncentraci 1 mg/ml, získaná pomocí metody DLS (histogramová analýza).



Obr. 26: Distribuce velikosti dle počtu; HA C18:1 s navázaným CoQ10 v PBS o koncentraci 1 mg/ml, získaná pomocí metody DLS (histogramová analýza).

Z uvedených výsledků měření velikosti částic a zeta potenciálu (Tabulka 1) vyplývá, že částice systému HA C6 byly větší než u systému HA C18:1. U většiny vzorků platilo, že velikost částic HA C6 byla zhruba dvakrát větší než u HA C18:1. Důležité je připomenout, že velikost částic zde byla měřena jako hydrodynamický průměr dané částice.

Zeta potenciál poukazoval na to, že oba nosičové systémy byly stabilní. Pokud byly rozpuštěny ve vodě, absolutní hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly kolem 40 mV a více. Absolutní hodnoty zeta potenciálu polymerních micel v PBS se pohybovaly okolo 20 mV. Toto snížení zeta potenciálu v PBS oproti vodě si vysvětlují přítomností solí v PBS. Za kritérium stability systému se obecně považuje absolutní hodnota zeta potenciálu 25 mV.

Myslíme si, že větší velikost částic u více koncentrovaných roztoků je způsobena možnou asociací molekul, kdy se mohly začít tvořit agregáty. Pokud se na oba systémy podíváme s odstupem času (čerstvě připravené a po 3 dnech), můžeme vyzorovat, že téměř u všech systémů se snížila průměrná velikost částic. Tento jev si vysvětlují ustálením rovnováhy v systému.

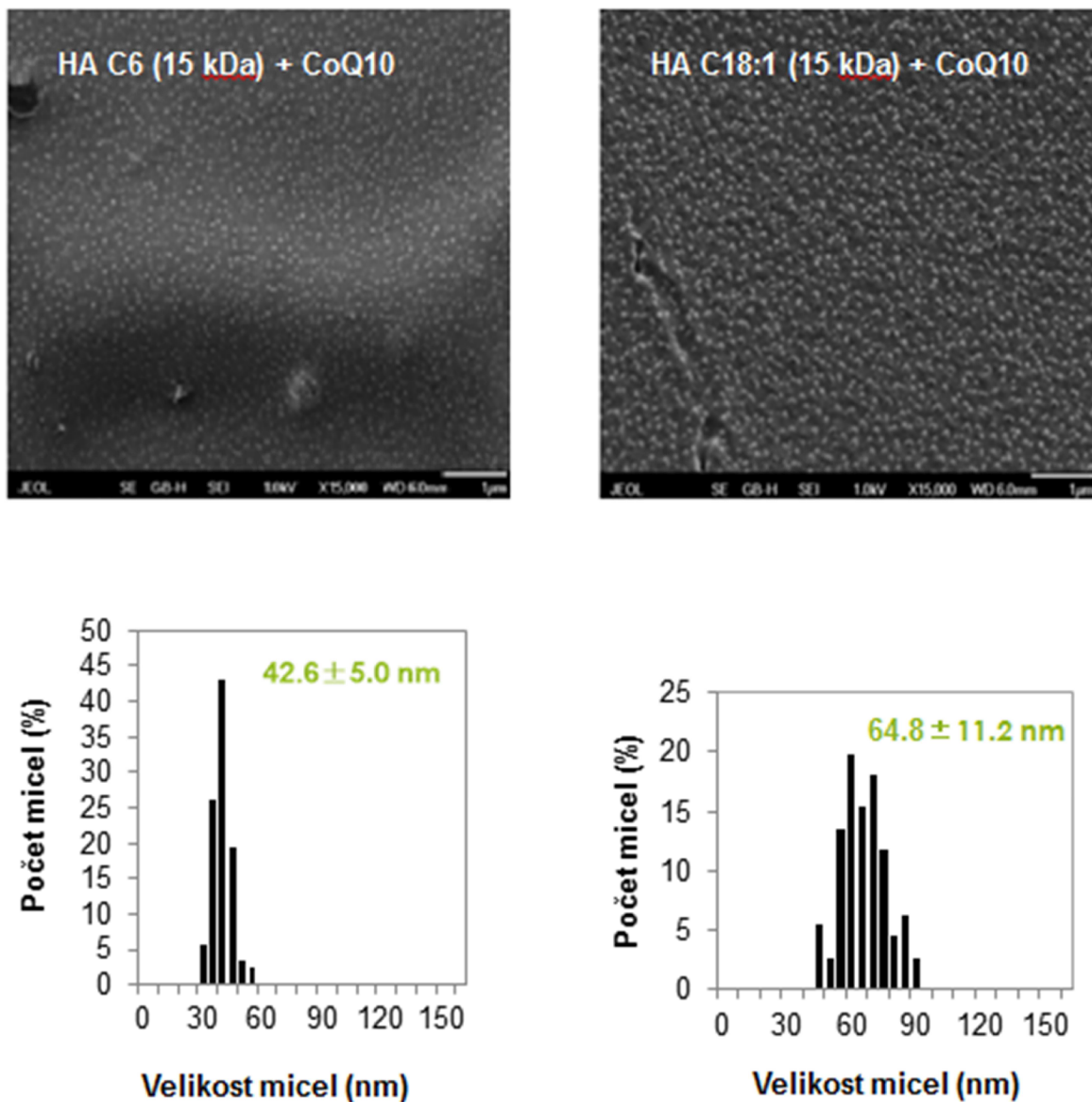
Další vyzorovanou vlastností těchto systémů je, že velikost částic nosičových systémů v prostředí PBS byla vždy menší než v prostředí vody. Myslíme si, že tento jev byl způsoben tím, že v prostředí PBS byly molekuly schopné se více sbalit do sebe a tím zmenšit svou celkovou velikost. V tomto prostředí na sebe také polymerní micely nenavázaly tolik vody a v důsledku toho byl jejich hydrodynamický průměr celkově nižší.

Pokud se podíváme na výsledky měření indexu polydisperzity (Pdl), které jsou uvedeny v tabulce výše (Tabulka 2), vidíme, že se hodnoty Pdl u vzorků s navázanou NR pohybovaly v rozmezí cca 0,31 až 0,46. U vzorků s navázaným CoQ10 se pak hodnoty Pdl pohybovaly v rozmezí cca od 0,15 do 0,26. Za monodisperzní se dle literatury [36] považuje systém, který má hodnotu Pdl 0,1.

Pro ukázkou byly zobrazeny grafické závislosti distribucí velikostí částic vzhledem k jejich početnímu zastoupení (Obr. 23, 24, 25 a 26). Tyto ukázkové grafy byly vybrány pro nosičové systémy HA C6 a HA C18:1 v prostředí vody a PBS o koncentraci nosiče 1 mg/ml. Tyto grafické závislosti byly v průběhu měření sledovány také pro systémy s navázanou NR.

6.2 Výsledky měření – Cryo SEM

Díky této metodě byly získány fotografie z elektronového mikroskopu, distribuce částic a průměrná velikost micel.



Obr. 27: Fotografie z elektronového mikroskopu (měřítko 1 μm) a distribuce velikostí micel.

Průměrná velikost polymerních micel systému HA C6 s navázaným CoQ10 byla stanovena na $42,6 \pm 5,0$ nm. Velikost polymerních micel systému HA C18:1 s navázaným CoQ10 byla stanovena na $64,8 \pm 11,2$ nm (Obr. 27). Z výsledků jasně vyplývá, že velikost polymerních micel HA C18:1 je nepatrně větší než velikost polymerních micel HA C6.

Při srovnání těchto výsledků s výsledky měření hydrodynamického průměru částice (metodou DLS) tomu bylo právě naopak. U měření velikosti částic pomocí DLS bylo zjištěno, že větší byly částice systému HA C6 oproti systému HA C18:1.

Výsledky v článku *Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity* [25], ukázaly, že více NR se navázáno do více hydrofobních polymerních částic PS (cca 77 %) a méně NR do více hydrofilní formulace CAB (24 %). Zde je nyní nutné zdůraznit fakt, že v polymerních micelách HA C18:1 bylo navázáno vždy větší množství (zhruba dvakrát) NR než v polymerních micelách HA C6. Vzhledem k výsledkům uvedeným ve zmíněném článku se dá předpokládat, že polymerní micely HA C18:1 jsou hydrofóbnější než polymerní micely HA C6.

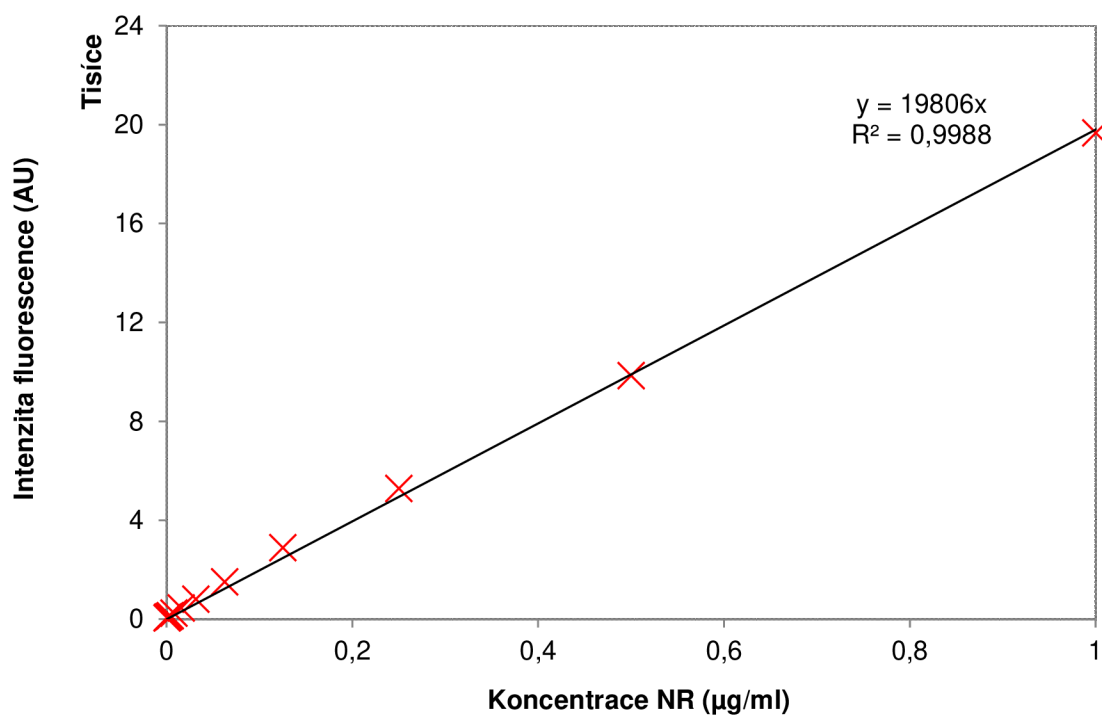
Tento předpoklad potvrzuje také to, že kyselina olejová má velmi dlouhý uhlíkatý řetězec, který se nebude ochotně rozpouštět ve vodě. Za tohoto předpokladu by se dal vysvětlit fakt, že při měření velikosti částic pomocí DLS byla změřena větší velikost částic u systému HA C6. Pokud je systém HA C6 opravdu méně hydrofóbnější než systém HA C18:1, dá se předpokládat, že jeho molekuly byly schopny na sebe navázat mnohem větší množství vody, a tím pádem se zvětšil celý jeho hydrodynamický průměr. Naopak, pokud byl systém HA C18:1 opravdu více hydrofóbnější než systém HA C6, dá se předpokládat, že jeho molekuly na sebe nevázály vodu tak ochotně, jako v případě HA C6. Díky tomu se ve výsledku tolik nezvětšoval hydrodynamický průměr tohoto systému (HA C18:1), i když jsou ve skutečnosti (výsledky Cryo SEM) jeho micely větší.

6.3 Výsledky měření – penetrační experimenty

Penetrovány byly systémy NR v nosiči, NR v oleji, NR v PBS a NR v emulzi.

6.3.1 Penetrace NR v nosiči (HA C6 a HA C18:1)

Byla provedena čerstvá kalibrace nilské červeně v prostředí ACN:PBS = 5:1; tuto kalibraci můžeme vidět na Obr 28. Kalibrace a veškeré extrakce probíhaly v prostředí ACN:PBS = 5:1. Podobné experimenty byly totiž uskutečněny a popsány v článku *Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity* [25], kde NR extrahovali ze SC z adhezivních pásek (metoda Tape – Stripping) v ACN a to třepáním po dobu minimálně 12 hodin. V našem případě jsme extrahovali NR jak z epidermis tak z dermis. Kvantifikováno ale bylo také množství NR v donoru a akceptoru. Vzhledem k tomu, že nosičové systémy byly dávkovány na kůži v prostředí PBS a faktu, že se nosičový systém rozbije po přidání pětinasobku organiky, byl zvolen systém extrakce a veškerého kvantifikačního stanovení v prostředí ACN:PBS = 5:1. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

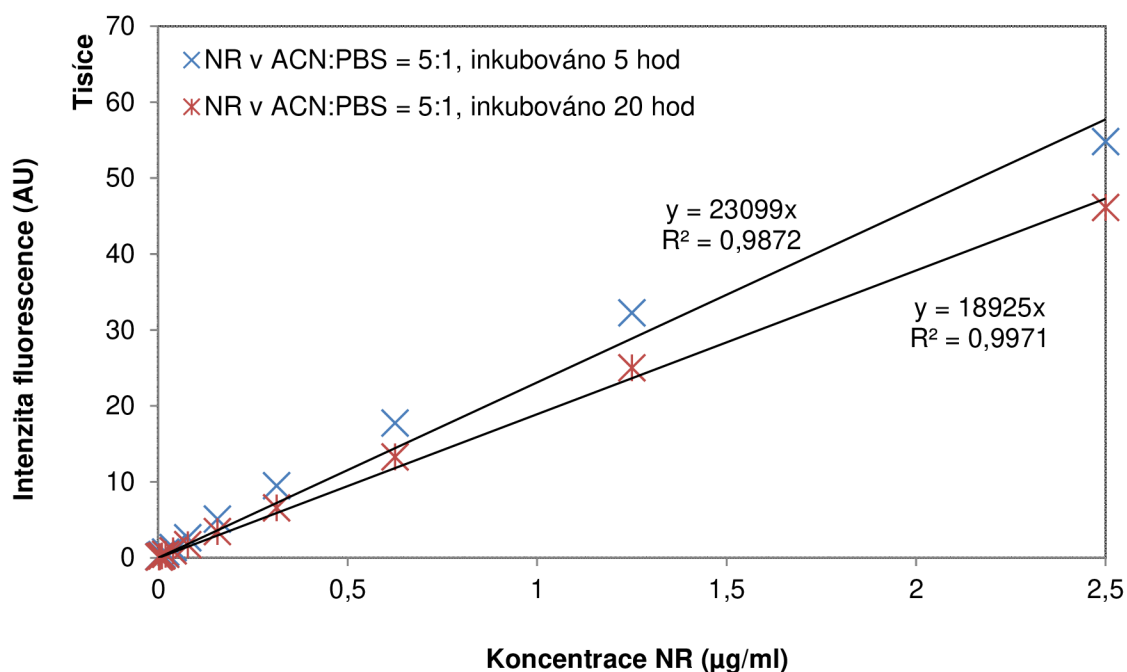


Obr. 28: Čerstvá kalibrace NR v ACN:PBS = 5:1.

Tabulka 3: Přehled výsledků penetrací nosičů, vyhodnoceno dle čerstvé kalibrace NR v ACN:PBS = 5:1; Výsledky ukazují detekované množství NR oproti dávkovanému množství NR: průměr ± SEM (hm. %), n = 6.

Vzorek	Donor	Epidermis	Dermis	Akceptor	Recovery
HA C18:1, 5 hodin	37,51 ± 0,85 %	17,09 ± 2,86 %	8,44 ± 2,78 %	0,00 %	63,04 ± 4,07 %
HA C18:1, 20 hodin	21,93 ± 0,74 %	13,16 ± 2,42 %	18,95 ± 2,56 %	0,00 %	54,04 ± 5,67 %
HA C6, 5 hodin	50,19 ± 3,19 %	10,24 ± 0,95 %	4,64 ± 0,83 %	0,00 %	65,07 ± 5,48 %
HA C6, 20 hodin	36,29 ± 0,99 %	10,69 ± 1,11 %	16,68 ± 1,46 %	0,00 %	63,66 ± 1,84 %

Vzhledem k velmi nízkému celkovému recovery a zjištění, že intenzita fluorescence se mění v čase, byla proměřena kalibrační křivka NR v ACN:PBS = 5:1 v časech 5 a 20 hodin. Vzorky byly před proměřením uloženy v inkubátoru, za stejných podmínek, jako měly penetrované vzorky. Tuto kalibrační křivku vidíme na Obr. 29.

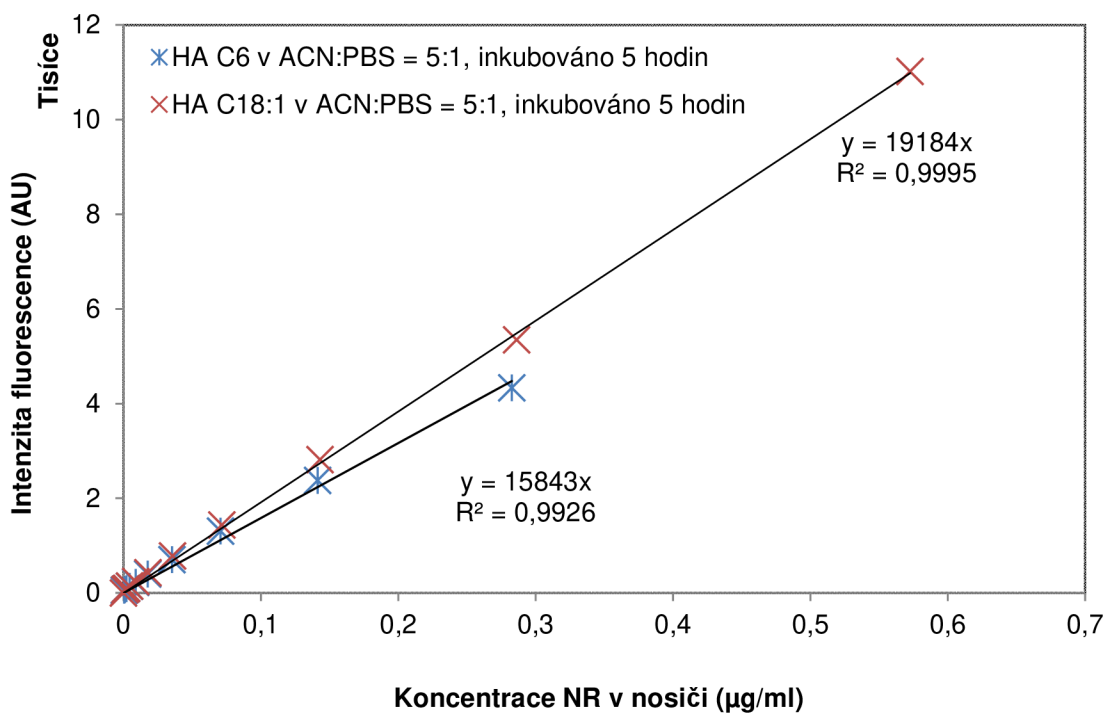


Obr. 29: Kalibrační křivka NR v ACN:PBS = 5:1 v inkubátoru 5 a 20 hodin.

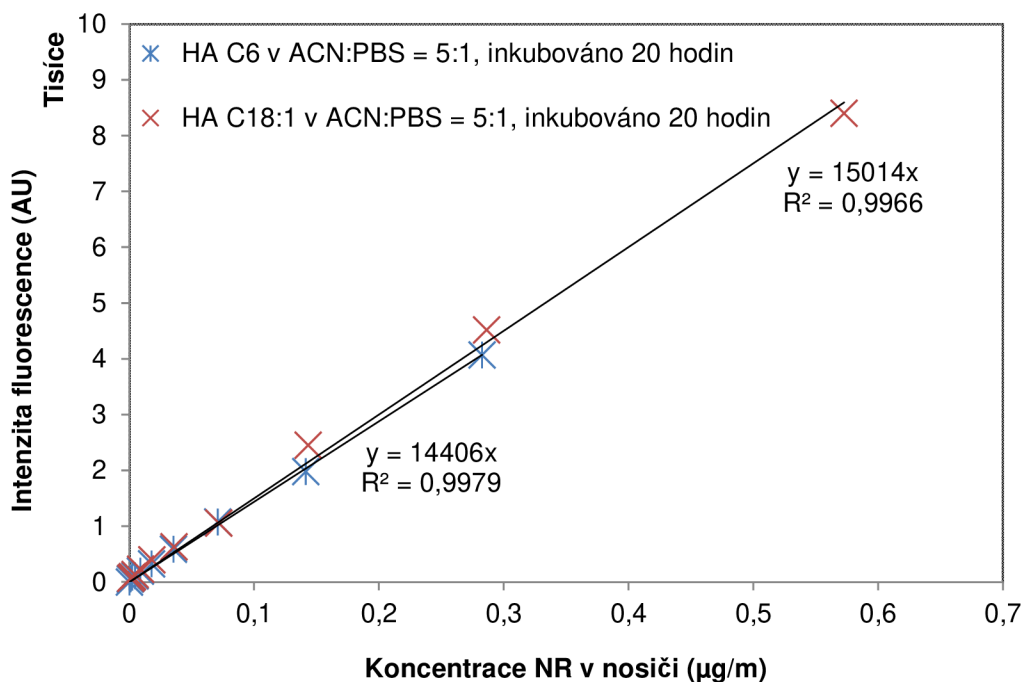
Z rovnic získaných touto kalibrací (Obr. 29) je jasně patrné, že pro čas 5 hodin celkové recovery poklesne. Tento pokles činil asi 10 % (hm.) oproti čerstvé kalibraci. Konkrétně u HA C6 z 63,04 ± 4,07 % (hm.) na 54,05 ± 3,49 % (hm.). Podobně tomu bylo u systému HA C18:1. U 20ti hodinové penetrace se výsledné recovery nepatrně zvýšilo.

Na základě poznatků z literatury [50] jsem předpokládala, že se nosičové systémy rozbijí ve SC, a do epidermis, případně dermis pak penetruje pouze nišská červeň. Nápadně nízká výsledná recovery, získaná prozatím vyzkoušenými kalibracemi ale naznačila jiný problém. Výsledky naznačovaly, že by se do kůže spolu s NR mohl dostat také samotný nosič.

Na základě těchto výsledků byla připravena ještě jedna nová kalibrační křivka. Tato kalibrační křivka byla pro nosičové systémy HA C6 a HA C18:1 s navázanou NR v prostředí ACN:PBS = 5:1 v časech penetrace 5 a 20 hodin. Vzorky před proměřením této kalibrační křivky byly uchovány za stejných podmínek, jaké měly vzorky při samotné penetraci (5 a 20 hodin v inkubátoru při 37 °C, po odebrání byly minimálně 15 hodin na třepačce a poté bylo provedeno proměření vzorků). Kalibrační křivky obou nosičových systémů v časech 5 a 20 hodin jsou znázorněny níže (Obr. 30 a 31).



Obr. 30: Kalibrační křivka nosičových systémů HA C6 a HA C18:1; 5 hodin v inkubátoru, minimálně 15 hodin na třepačce a následné proměření.



Obr. 31: Kalibrační křivka nosičových systémů HA C6 a HA C18:1; 20 hodin v inkubátoru, minimálně 15 hodin na třepače a následné proměření.

Na základě těchto kalibračních křivek byly znovu vyhodnoceny výsledky a to vždy pro každý čas zvlášť. Výsledky vztažené ke kalibračním křivkám nosičů v čase jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled výsledků penetrací nosičů, kvantifikace vyhodnocena dle kalibrace nosičů s navázanou NR v ACN:PBS = 5:1 pro časy 5 a 20 hodin. Výsledky ukazují detekované množství NR oproti dávkovanému množství NR: průměr ± SEM (hm. %), n = 6.

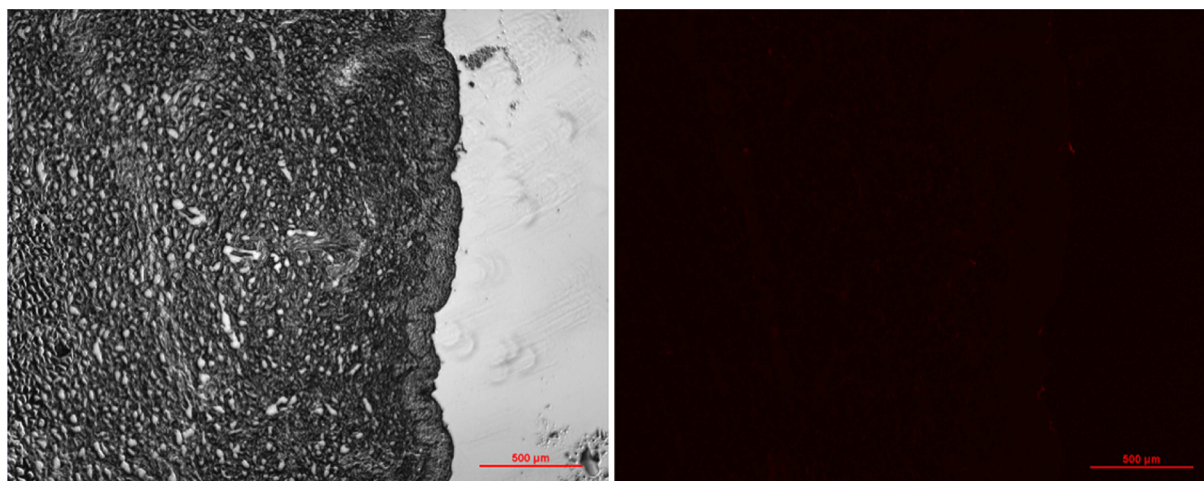
Vzorek	Donor	Epidermis	Dermis	Akceptor	Recovery
HA C18:1, 5 hodin	38,73 ± 0,88 %	17,64 ± 2,95 %	8,71 ± 2,87 %	0,00 %	65,08 ± 4,20 %
HA C18:1, 20 hodin	28,92 ± 0,97 %	17,36 ± 3,19 %	25,00 ± 3,38 %	0,00 %	71,28 ± 7,48 %
HA C6, 5 hodin	57,87 ± 2,32 %	12,81 ± 1,18 %	5,80 ± 1,04 %	0,00 %	76,48 ± 6,85 %
HA C6, 20 hodin	49,90 ± 1,34 %	14,70 ± 1,52 %	22,93 ± 2,01 %	0,00 %	87,53 ± 2,53 %

Při vyhodnocení výsledků dle kalibrační křivky nosičů v daných časech bylo zjištěno celkově vyšší recovery. U systému HA C6 jsou výsledná recovery vyšší než u systému HA C18:1. U systému HA C6 v čase 20 hodin se vč. odchylky dostáváme k recovery

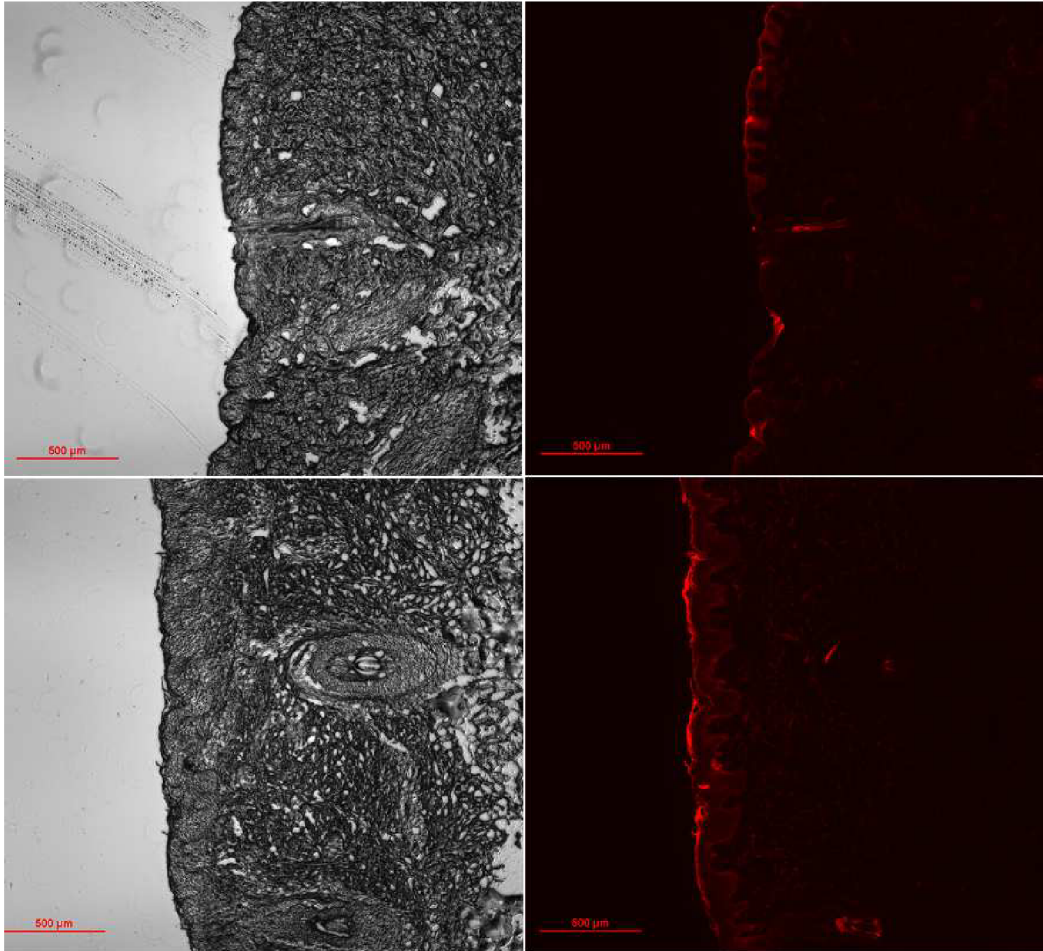
90 % (hm.). Tyto výsledky by mohly naznačovat, že se do epidermis i dermis dostala NR v nosiči, nikoli samotná NR.

Z výsledků (Tabulka 4) je také patrné, že množství detekované v epidermis je pro všechny systémy a časy téměř shodné. U dermis toto pravidlo ale neplatí. Pro penetrace v čase 20 hodin je v dermis mnohem vyšší množství NR, než pro penetrace v časech 5 hodin.

Veškeré získané výsledky byly také ověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy byly všechny penetrované vzorky – resp. jejich histologické řezy vyfoceny. Jako první byla vyfocena čistá kůže penetrovaná pouze PBS. Tyto snímky můžeme vidět na Obr. 32.



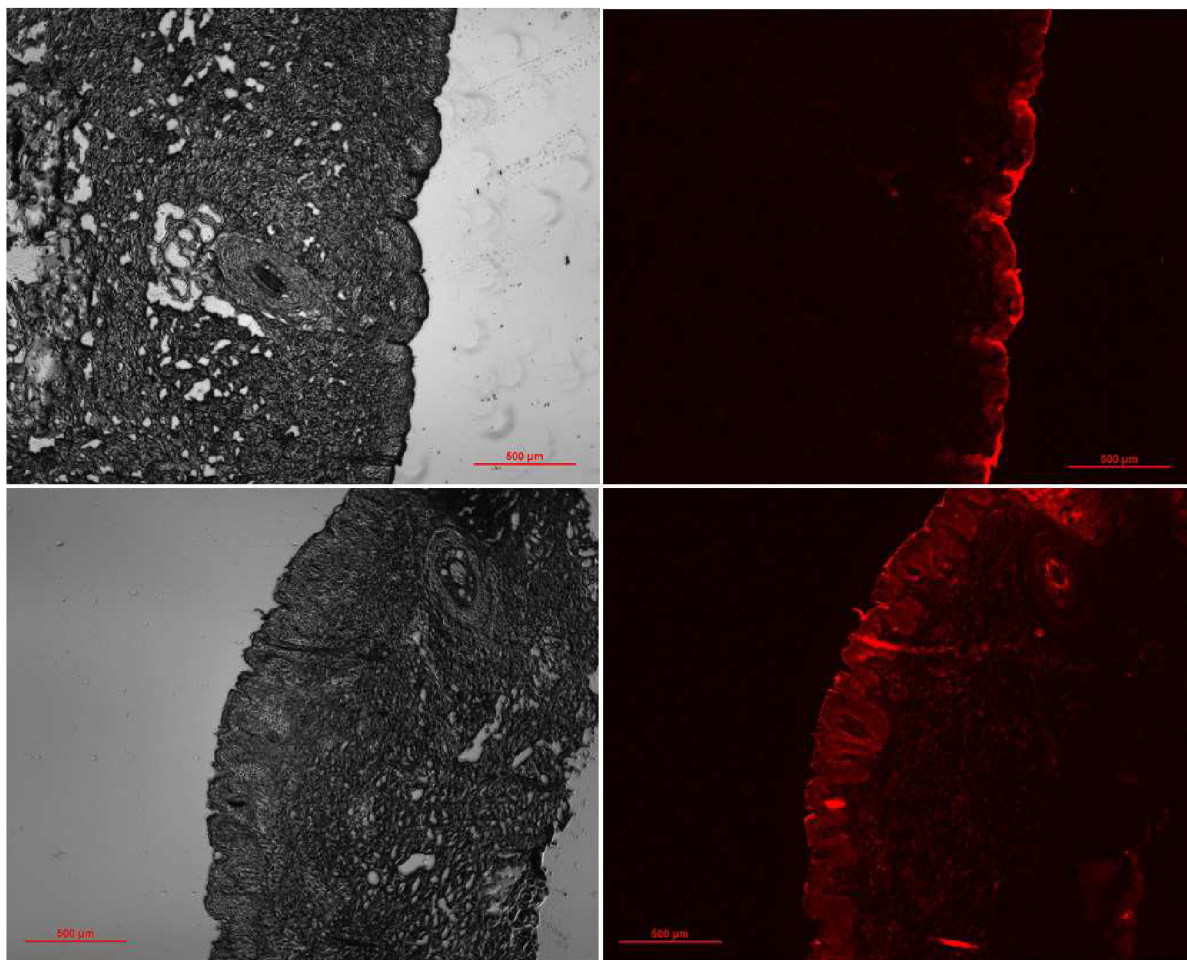
Obr. 32: Histologický řez - čistá kůže. Vlevo fotografie bez filtru, čas expozice 5 ms. Vpravo fotografie s filtrem TRITC, čas expozice 3 s. Měřítka 500 µm.



Obr. 33: Histologický řez: nosič HA C6. V levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3 s). V horní části obrázku systém HA C6, čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části systém HA C6, čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.

Na Obr. 33 vidíme histologické řezy jednotlivých kůží s penetrovanou NR v nosiči HA C6. Tyto snímky byly nafoceny stejným způsobem jako čistá kůže (důležité jsou stejné expoziční časy). U systému HA C6 je rozdíl mezi 5 a 20 hodinami málo viditelný, ale přesto vidíme, že u 20ti hodinové penetrace je větší množství NR v dermis. Tyto vizuální výsledky nám potvrdily kvantitativní vyhodnocení NR v epidermis a dermis.

Na Obr. 34 pak vidíme stejné fotografie pro systém NR v nosiči HA C18:1. U systému HA C18:1 je rozdíl v časech penetrace zřetelnější. Na první pohled je patrné, že u 20ti hodinové penetrace je množství NR v dermis mnohem větší, než u 5ti hodinové penetrace. Tyto fotografie nám opět potvrdily výsledky u kvantitativního vyhodnocení vzorků.



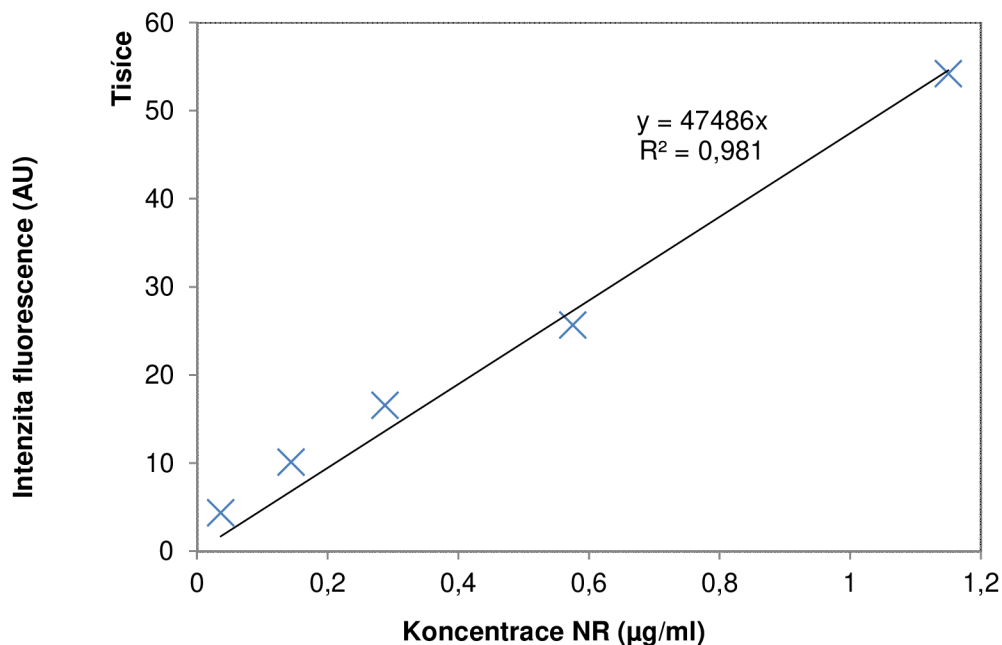
Obr. 34: Histologický řez: nosič HA C18:1. V levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3 s). V horní části obrázku systém HA C6, čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části systém HA C6, čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.

V případě penetrovaných polymerních micel HA C6 a HA C18:1 bylo množství NR navázané v micelle HA C18:1 vždy vyšší a to zhruba dvakrát oproti množství NR navázané v polymerní micelle HA C6.

Z provedených penetračních experimentů vyplývá, že polymerní micely HA C18:1 vykazují lepší penetrační vlastnosti než polymerní micely HA C6. Tento fakt koresponduje s výsledky v článku *Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity* [25].

6.3.2 Penetrace NR v oleji

Byla proměřena kalibrační křivka NR v oleji (Obr. 35), dle této kalibrační křivky pak bylo vyhodnoceno množství NR v donoru. Množství NR v epidermis a dermis bylo stanoveno dle čerstvé kalibrační křivky NR v ACN:PBS = 5:1 (Obr. 28).

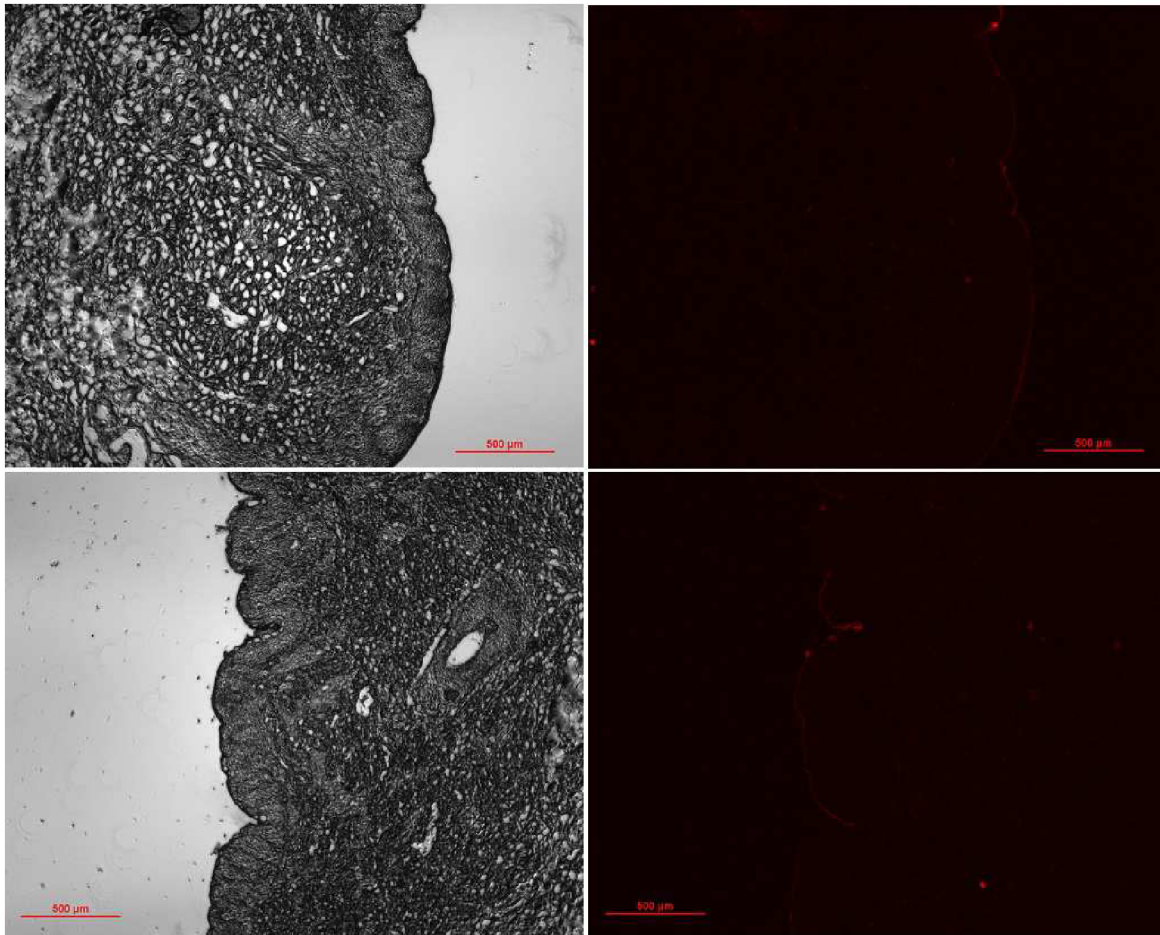


Obr. 35: Kalibrační křivka NR v oleji

Tabulka 5: Přehled výsledků penetrací NR v oleji. Výsledky ukazují detekované množství NR oproti dávkovanému množství NR: průměr ± SEM (hm. %), n = 6.

Vzorek	Donor	Epidermis	Dermis	Akceptor	Recovery
NR v oleji, 5 hodin	79,57 ± 3,46 %	0,67 ± 0,04 %	0,92 ± 0,08 %	0,00 %	81,16 ± 3,44 %
NR v oleji, 20 hodin	52,61 ± 3,05 %	0,93 ± 0,12 %	0,93 ± 0,06 %	0,00 %	54,47 ± 3,15 %

Fotografie z fluorescenčního mikroskopu můžeme vidět na Obr. 36.



Obr. 36: Histologický řez: nilská červeň v oleji. V levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3s). V horní části obrázku čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.

Z uvedených výsledků (Tabulka 5) a při pohledu na snímky z fluorescenčního mikroskopu (Obr. 36) je evidentní, že nilská červeň v oleji do kůže nepenetrovala téměř vůbec. Jediné, co na snímcích svítí oproti čisté kůži je SC, které svou bariérovou funkci kůže v tomto případě splnilo dokonale. Detekované množství NR v epidermis i dermis bylo pro oba časy penetrace pod hranicí 1 % (hm.) oproti dávkovanému množství NR.

6.3.3 Penetrace NR v PBS – disperze

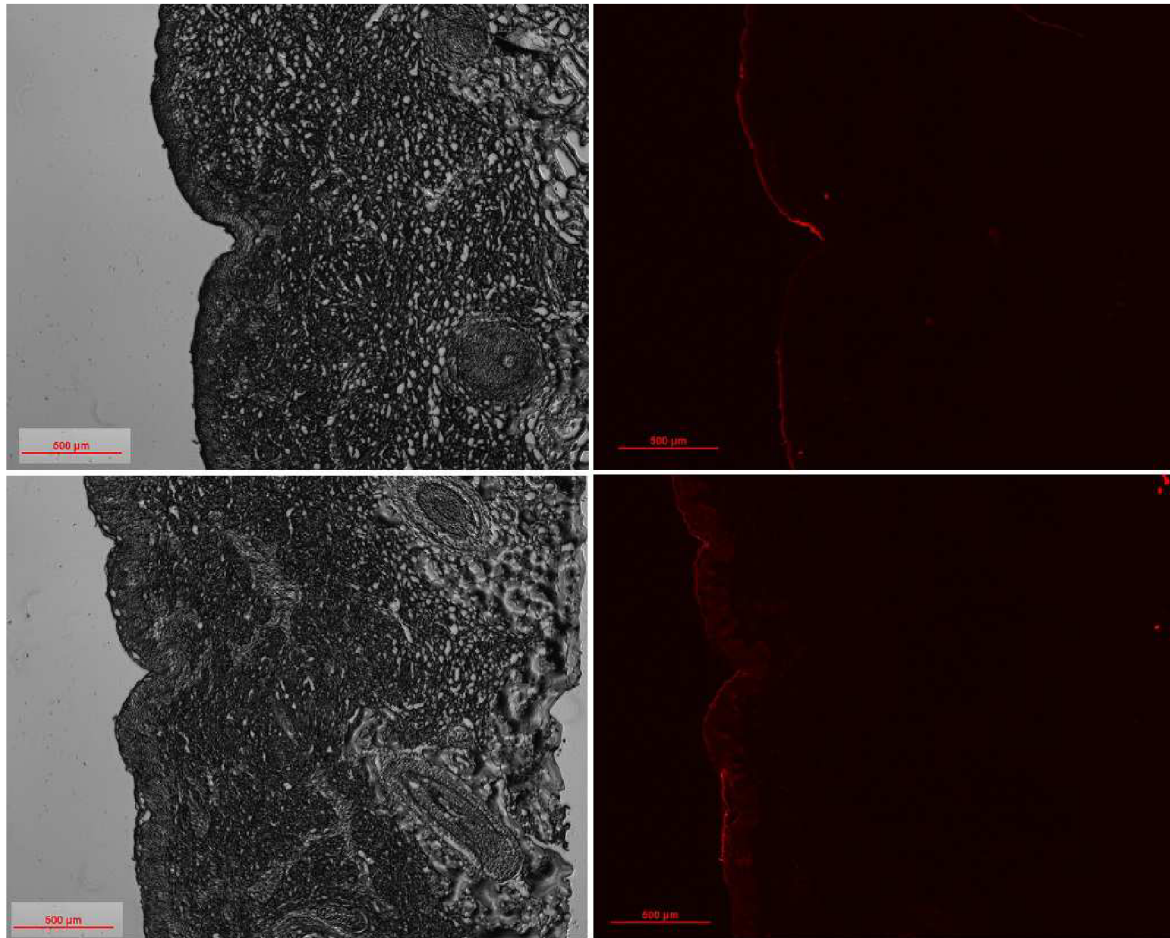
Tento pokus byl opět proveden jako kontrola a srovnání penetračních vlastností s nosičovými systémy. Pro vyhodnocení všech částí, které byly kvantifikovány, byla použita čerstvá kalibrace NR v ACN:PBS = 5:1. Tuto kalibrační křivku můžeme vidět výše na Obr. 28.

Tabulka 6: Přehled výsledků penetrací NR v PBS. Výsledky ukazují detekované množství NR oproti dávkovanému množství NR: průměr \pm SEM (hm. %), n = 3. Údaje u vzorku (v závorce) značí: HA C18:1 – koncentrace nilské červeně v PBS byla stejná jako navázané množství NR v systému HA C18:1. To samé platí pro systém HA C6. Údaj 5 a 20 hodin značí dobu penetrace.

Vzorek	Donor	Epidermis	Dermis	Akceptor	Recovery
NR v PBS, (HA C18:1, 5 hodin)	69,48 \pm 4,02 %	2,32 \pm 0,31 %	1,67 \pm 0,70 %	0,00 %	73,47 \pm 6,55 %
NR v PBS, (HA C18:1, 20 hodin)	77,11 \pm 4,41 %	6,00 \pm 2,89 %	6,21 \pm 1,16 %	0,00 %	89,32 \pm 8,92 %
NR v PBS, (HA C6, 5 hodin)	66,57 \pm 4,91 %	1,85 \pm 0,31 %	1,09 \pm 1,07 %	0,00 %	69,51 \pm 8,73 %
NR v PBS, (HA C6, 20 hodin)	63,73 \pm 1,34 %	3,86 \pm 0,86 %	3,28 \pm 0,54 %	0,00 %	70,87 \pm 4,43 %

Z výsledků uvedených v tabulce (Tabulka 6) vyplývá, že se do kůže napenetrovalo relativně velké množství NR a to hlavně v případě penetrace 20 hodin. NR je nerozpustná v PBS. NR byla v tomto případě dávkována jako disperze – tedy pevný, nerozpuštěný podíl NR dispergovaný v PBS.

Předpokládala jsem, že časem částice sedimentovaly na kůži. Kůže je sama o sobě mastná a tím si také vysvětluji výsledky penetračních experimentů. NR, která sedimentovala na kůži, se postupně rozpustila v tuku z kůže a díky tomu se snáze dostala i do hlubší vrstvy kůže – dermis. Pro vizuální ověření těchto výsledků byly opět pořízeny fotografie z fluorescenčního mikroskopu. Tyto snímky můžeme vidět na Obr. 37. Zobrazeny jsou fotografie, kde bylo penetrováno větší množství NR (tedy stejné množství NR, jako bylo obsaženo v systému HA C18:1).



Obr. 37: Histologický řez: Nilská červeň v PBS, koncentrace NR jako v HA C18:1. V levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3s). V horní části obrázku čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.

Na Obr. 37 vidíme v horní části fotografie penetraci v čase 5 hodin. Můžeme zde vidět, že fluoreskuje v podstatě jen SC a lehce epidermis, u dermis není fluorescence příliš patrná. Na spodní části obrázku vidíme stejný systém v čase penetrace 20 hodin. Zde je jasně fluoreskující SC, epidermis a částečně i dermis. Tyto vizuální výsledky opět korespondují s výsledky kvantitativního vyhodnocení obsahu NR v epidermis i dermis.

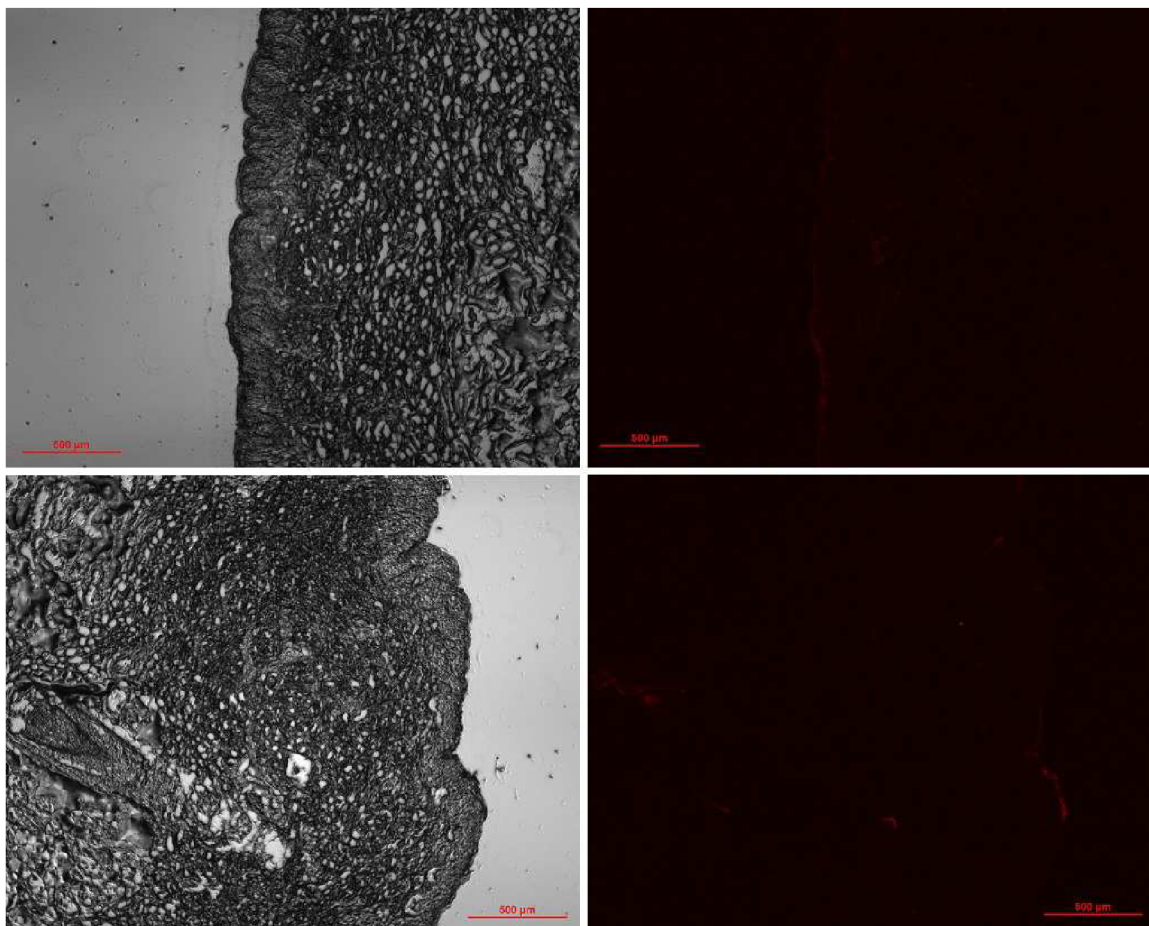
6.3.4 Penetrace NR v emulzi

Vše bylo vyhodnoceno dle kalibrace nosičů s NR v časech 5 a 20 hodin.

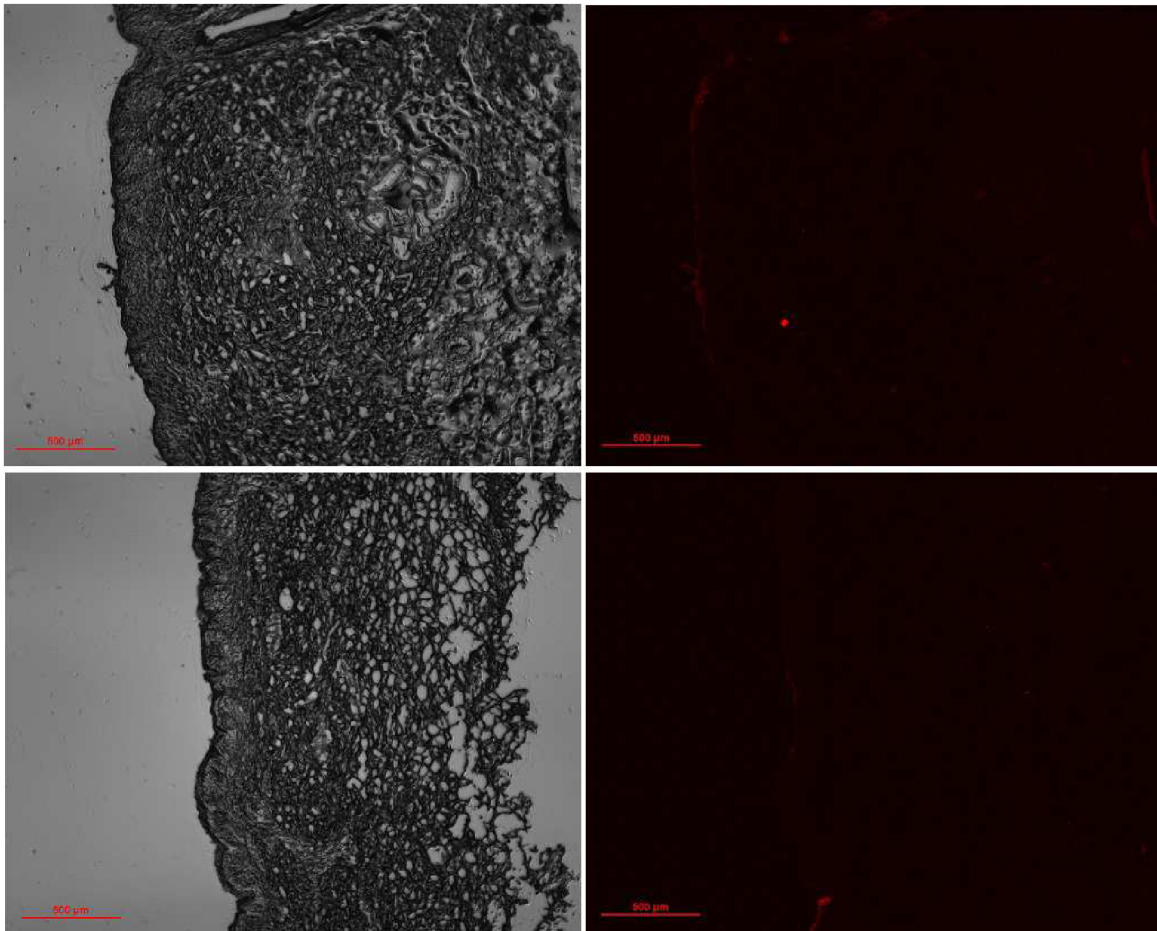
Tabulka 7: Přehled výsledků penetrací NR v emulzi. Výsledky ukazují detekované množství NR oproti dávkovanému množství NR: průměr ± SEM (hm. %), n = 3.

Vzorek	Oplach	Epidermis	Dermis	Akceptor	Recovery
NR v oleji + HA C18:1; 5 hodin	19,89 ± 2,07 %	0,54 ± 0,13 %	0,60 ± 0,18 %	0,00 %	21,03 ± 1,97 %
NR v oleji + HA C18:1; 20 hodin	27,44 ± 0,89 %	0,66 ± 0,09 %	0,82 ± 0,00 %	0,00 %	28,92 ± 0,98 %
NR v oleji + HA C6; 5 hodin	34,96 ± 2,69 %	1,18 ± 0,17 %	1,19 ± 0,09 %	0,00 %	37,33 ± 2,93 %
NR v oleji + HA C6; 20 hodin	46,63 ± 8,02 %	0,74 ± 0,20 %	1,48 ± 0,31 %	0,00 %	48,85 ± 8,49 %

Donor nebyl v případě emulze na fluorescenčním readeru proměřen. Emulze by se na fluorescenčním readeru proměřovala velmi špatně. Kůže byla pouze opláchnuta v PBS. Množství NR kvantifikované v oplachu je uvedeno ve sloupci „Oplach“. Dále byla extrahována nilská červeň z epidermis a dermis. Z uvedených výsledků (Tabulka 7) vyplývá, že v případě penetrovaného systému NR v emulzi, do epidermis a dermis penetrovalo jen minimální množství NR. Fotografie z fluorescenčního mikroskopu jsou zobrazeny níže (Obr. 38 a 39). Na těchto fotografiích lze vidět pouze lehce fluoreskující SC. U systému HA C6 je i na fotografiích vidět, že se do epidermis i dermis dostalo nepatrně větší množství NR.



Obr. 38: Histologický řez: Nilská červeň v emulzi + nosič HA C6; v levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3s). V horní části obrázku čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.



Obr. 39: Histologický řez: Nilská červeň v emulzi + nosič HA C18:1; v levé části – fotografie bez filtru (čas expozice 5 ms), v pravé části – fotografie s filtrem TRITC (čas expozice 3s). V horní části obrázku čas penetrace 5 hodin. Ve spodní části čas penetrace 20 hodin. Měřítko 500 µm.

6.4 Shrnutí všech výsledků

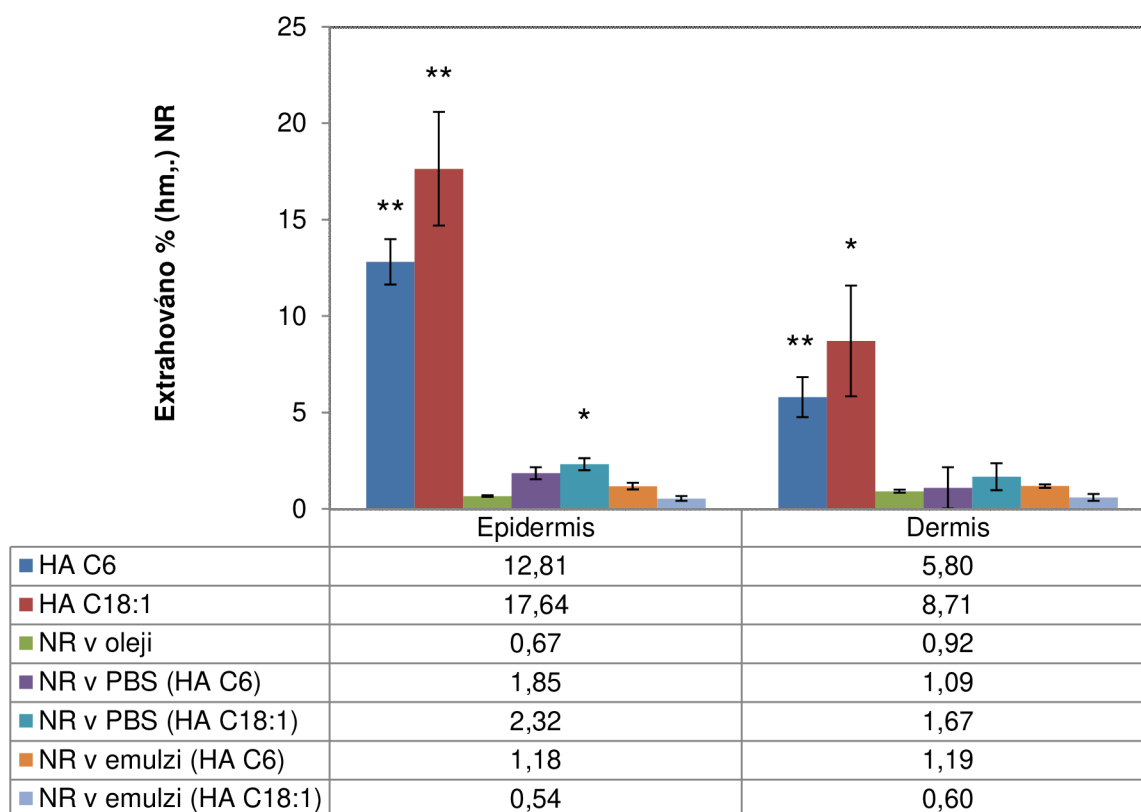
Tabulka 8: Výsledky kvantifikace množství NR v epidermis a dermis v časech penetrace 5 a 20 hodin.

	Epidermis, 5 hodin	Epidermis, 20 hodin	Dermis, 5 hodin	Dermis, 20 hodin
■ HA C6	12,81	14,70	5,80	22,93
■ HA C18:1	17,64	17,36	8,71	25,00
■ NR v oleji	0,67	0,93	0,92	0,93
■ NR v PBS (HA C6)	1,85	3,86	1,09	3,28
■ NR v PBS (HA C18:1)	2,32	6,00	1,67	6,21
■ NR v emulzi (HA C6)	1,18	0,74	1,19	1,48
■ NR v emulzi (HA C18:1)	0,54	0,66	0,60	0,82

Z celkových výsledků srovnání všech penetrovaných systémů a množství NR kvantifikované v epidermis a dermis v časech penetrace 5 a 20 hodin (Tabulka 8) vyplývá, že nejlepší penetrační vlastnosti vykazoval systém HA C18:1. Z epidermis i dermis bylo v obou časech extrahováno největší množství NR ze všech penetrovaných systémů.

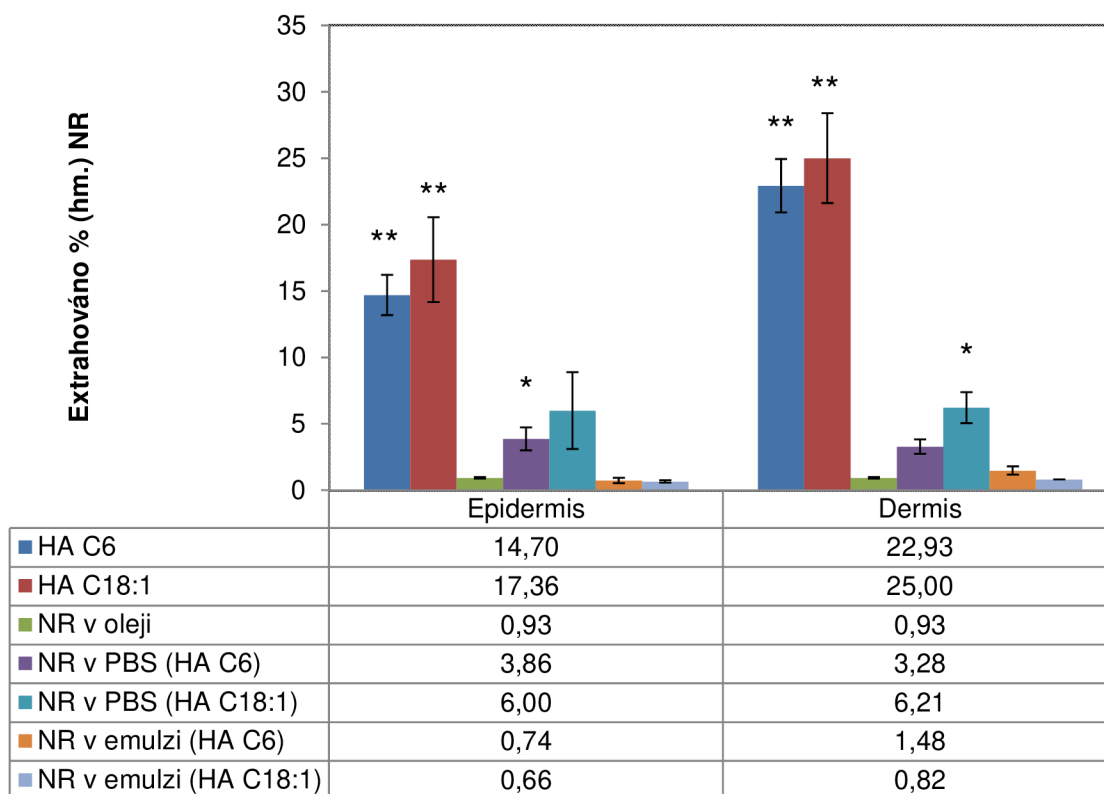
Dalším bodem, který by se dal diskutovat je samotné kvantitativní vyhodnocení. Místo fluorescenční spektroskopie a stanovení množství NR na fluorescenčním readeru by se dalo uvažovat o použití stejného způsobu jako použili v článku *Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity* [25]. V jejich případě extrahovali NR ze SC v acetonitrilu (pomocí adhezivních pásek). Extrakt po minimálně 12 hodinovém třepání filtrovali přes 0,45 µm filtr do HPLC vialek. Mobilní fáze byla 80:20 v/v acetonitril a voda. NR byla měřena pomocí metody HPLC s fluorescenčním detektorem. Excitace byla nastavena na 559 nm a emise byla snímána při 630 nm. V tomto článku udávali, že detekční limit touto metodou byl 0,34 ng/ml. Pomocí kalibračních křivek při měření na fluorescenčním readeru jsme zjistili, že detekční limit NR touto metodou byl cca. 5 ng/ml. Metoda HPLC tedy dokáže detekovat mnohem menší množství NR. Z těchto údajů tedy vyplývá, že detekce na HPLC by byla pravděpodobně přesnější. Museli bychom ale zavést novou metodu na stanovení NR tímto způsobem. Výhodou kvantifikace množství NR na fluorescenčním readeru byla především rychlost analýzy.

6.5 Statistické zpracování výsledků



Obr. 40: Statistické srovnání navázaného množství NR v epidermis a NR v dermis pro čas penetrace 5 hodin ($n = 6$), * pro $p \leq 0,05$ zkoumaný systém vs. kontrola (NR v oleji), ** pro $p \leq 0,01$ zkoumaný systém vs. kontrola (NR v oleji).

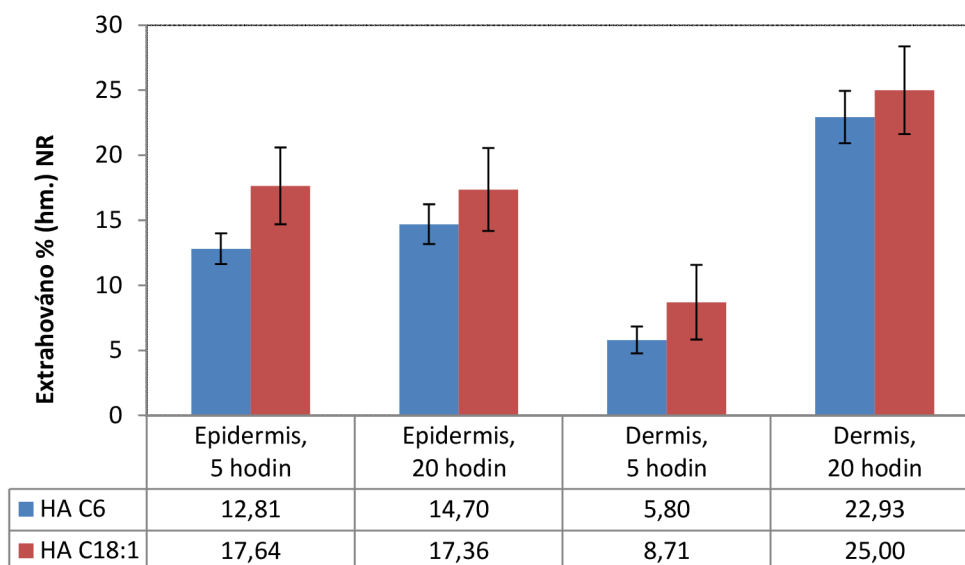
Výsledky na Obr. 40 ukazují statisticky významné rozdíly mezi kvantifikovaným množstvím NR v epidermis a dermis u penetrovaných systémů a NR v oleji v čase penetrace 5 hodin. Z výsledků jasně vyplývá, že signifikantní vůči kontrole (NR v oleji) byly v epidermis oba nosičové systémy s navázanou NR, a dále pak NR v PBS, při koncentraci NR stejné jako byla u penetrovaného systému HA C18:1. V dermis vykazovaly signifikantní výsledky oba nosičové systémy (HA C6 a HA C18:1) s navázanou NR vůči kontrole (NR v oleji).



Obr. 41: Statistické srovnání navázaného množství NR v epidermis a NR v dermis pro čas penetrace 20 hodin (n = 6), * pro $p \leq 0,05$ zkoumaný systém vs. kontrola (NR v oleji), ** pro $p \leq 0,01$ zkoumaný systém vs. kontrola (NR v oleji).

Výsledky na Obr. 41 ukazují signifikantní rozdíly u kvantifikovaného množství NR v epidermis a dermis mezi penetrovanými systémy a NR v oleji v čase penetrace 20 hodin. Z výsledků vyplývá, že signifikantní vůči kontrole (NR v oleji) byly v epidermis oba nosičové systémy s navázanou NR a dále pak NR v PBS, při koncentraci NR stejné jako byla v penetrovaném systému HA C6. V dermis vykazovaly signifikantní výsledky vůči kontrole (NR v oleji) oba nosičové systémy (HA C6 a HA C18:1) s navázanou NR a také NR v PBS o koncentraci NR stejné, jako byla v nosičovém systému HA C18:1.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že oba nosičové systémy s navázanou nilskou červení vykazovaly výborné penetrační vlastnosti. Dále se ukázalo, že i systém NR v PBS penetroval do kůže. Ovšem u tohoto systému bylo detekované množství NR v epidermis a dermis mnohem menší než u obou systémů NR v nosičích.



Obr. 42: Statistické srovnání navázaného množství NR v epidermis (vč. SC) a dermis u systémů HA C6 a HA C18:1 mezi sebou v penetrovaných časech 5 a 20 hodin (n = 6). * pro $p \leq 0,05$ nosičový systém HA C6 vs. nosičový systém HA C18:1.

Ze statistického srovnání nosičových systémů HA C6 a HA C18:1 mezi sebou nevyplývá žádný statisticky významný rozdíl. Toto srovnání můžeme vidět na Obr. 42.

Díky tomuto statistickému srovnání obou nosičových systémů s navázanou NR můžeme vyvrátit to, že systém HA C18:1 je lepším penetračním systémem než systém HA C6, jak nám naznačily předchozí výsledky.

7 ZÁVĚR

Byly shromážděny literární poznatky o nosičových systémech s důrazem na polymerní micely. Na základě těchto literárních poznatků byly navrženy postupy a metody pro penetrační experimenty.

Byly provedeny penetrační experimenty se dvěma typy polymerních micel (HA C6 a HA C18:1) s využitím nilské červeně jako nesené látky. Množství NR navázané v kůži bylo následně kvantifikováno a vzorky kůže byly nafoceny pod fluorescenčním mikroskopem.

Z vyhodnocení těchto penetračních experimentů vyplynulo, že polymerní micely na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové byly vhodné pro topické použití. Tyto micely byly schopny penetrovat kůži, a to až do dermis, přičemž do akceptoru se nilská červeň nedostala. Tento výsledek byl velmi pozitivní, dá se z něj totiž předpokládat, že tyto nosičové systémy a látky, které jsou v nich navázány, pravděpodobně nebudou prostupovat do krevního řečiště. Čas penetrace 20 hodin byl zvolen jako kontrola rizikosti průchodu polymerních micel do krevního řečiště. Ze statistického srovnání systémů HA C6 a HA C18:1 nevypluly žádné statisticky významné rozdíly.

Byla provedena základní charakterizace polymerních micel s využitím CoQ10 jako nesené látky, pro potenciální kosmetickou aplikaci.

V této diplomové práci bylo dosaženo všech předepsaných cílů.

Během řešení této DP vyvstala otázka, zda do kůže prochází pouze samotná NR a nosič se rozbije ve SC, nebo prochází NR spolu s nosičovým systémem. Na tuto otázku ještě dlouho nebudeme znát odpověď. Tato nejasnost by mohla být impulzem k dalšímu bádání v této oblasti.

Další věcí, nad kterou by bylo vhodné se do budoucna zamyslet, je volba fluorescenční sondy. Nilská červeň, jakožto fluorescenční sonda, citlivá na polaritu svého okolí se zdá být problematickou při kvantitativním vyhodnocování NR. Navíc bylo zjištěno, že se intenzita fluorescence NR měnila v čase. Za zvážení by stála změna fluorescenční sondy, nebo použití jiné metody pro kvantifikaci množství NR v kůži.

Byla provedena základní charakterizace polymerních micel na bázi hydrofobizované kyseliny hyaluronové. Tato charakterizace byla provedena u obou polymerních micel (HA C6 a HA C18:1) s navázaným CoQ10 a NR. Z této základní charakterizace bylo zjištěno, že výsledná velikost polymerních micel se pohybovala pod hranicí 100 nm.

Na základě provedených penetračních experimentů nosičových systémů s navázanou NR bych navrhovala provedení dalších penetračních experimentů, případně také *in vivo* testů těchto nosičových systémů. Tentokrát však s navázaným CoQ10 pro potvrzení či vyvrácení předpokladu, že by tyto systémy měly prokazovat velmi dobré penetrační vlastnosti, a být tak kůži velmi prospěšné.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MAGDASSI, Shlomo. Delivery systems in cosmetics. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1997, 123-124, s. 671-679 [cit. 2014-02-25]. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7757\(97\)03792-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7757(97)03792-8). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775797037928>.
- [2] HALLIWELL, B. a J.M.C. GUTTERIDGE, *Free Rad. Biol. Med.*, 1985, č. 8, 279.
- [3] BECK, Ruy, Silvia GUTERRES a Adriana POHLMANN. *Nanocosmetics and Nanomedicines New Approaches for Skin Care*. 1., st Edition. Berlin: Springer Berlin, 2011. ISBN 978-364-2197-918; doi 10.1007/978-3-642-19792-5.
- [4] PARRAMÓN, José María. *Atlas anatomie*. České vyd. 1. Praha: Svojtka a Vašut, 1996, 96 s. ISBN 80-718-0092-9.
- [5] TOBIN, Desmond J. Biochemistry of Human Skin — Our Brain on the Outside. *ChemInform*. 2006, vol. 37, issue 17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chin.200617272>.
- [6] HADGRAFT, Jonathan, Majella E. LANE a AD SCHWOPE. Skin permeation: The years of enlightenment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, vol. 305, 1-2, s. 221-221-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1520/stp17317s>.
- [7] HÄGGSTRÖM, Mikael. Wikipedia: The free Encyklopedia. [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Epidermal_layers.png
- [8] MENON, Gopinathan K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, vol. 54, S3-S17. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00121-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00121-7).
- [9] Dermatology Glossary: define your skin. [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://missinglink.ucsf.edu/lm/dermatologyglossary/dermis.html>
- [10] VÁVROVÁ, Kateřina a Alexandr HRABÁLEK. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. *Praktické lékárenství: Lze překonat kožní bariéru?*. Olomouc: Solen, s. r. o., 2005, č. 1. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2005/01/02.pdf>
- [11] CROSERÀ, Matteo, Massimo BOVENZI, Giovanni MAINA, Gianpiero ADAMI, Caterina ZANETTE, Chiara FLORIO, Francesca Filon LARESE, Kenneth WALTERS, Keith BRAIN, Angèle SORIA, Annika VOGT, Adnan NASIR, Béhazine COMBADIÈRE a Ronald WESTER. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2009, vol. 82, issue 9, s. 129-143. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/9780203020821.fmatt>.
- [12] JIRÁSKOVÁ, Milena. *Dermatovenerologie: pro stomatology : učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Praha: Professional Publishing, 2001, 268, 16 s. ISBN 80-864-1907-X.
- [13] PUGH, William John. Relationship between H-bonding of penetrants to stratum corneum lipids and diffusion1. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2001, vol. 20, 2-3, s. 303-317. DOI: <http://dx.doi.org/10.1081/cus-120001862>.

- [14] GALEY, William R., H. K. LONSDALE a Sergio NACHT. THE IN VITRO PERMEABILITY OF SKIN AND BUCCAL MUCOSA TO SELECTED DRUGS AND TRITIATED WATER. *Journal of Investigative Dermatology*. 1976, vol. 67, issue 6, s. 713-717. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12598596>.
- [15] SCHEUPLEIN, Robert J. PERMEABILITY OF THE SKIN: A REVIEW OF MAJOR CONCEPTS AND SOME NEW DEVELOPMENTS. *Journal of Investigative Dermatology*. 1976, vol. 67, 5p2, s. 672-676. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12544513>.
- [16] KREBS, ALEŠ, ALEXANDR HRABÁLEK, PAVEL DOLEŽAL, ZDENKA ŠKLUBALOVÁ a OLDŘICH FARSA. AKCELERANTY TRANSDERMALNI PENETRACE. *Chemické listy*. 1999, s. 107-119. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_107-119.pdf.
- [17] MEYER, K., J. W. PALMER. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 1934, č. 107, s. 629–634.
- [18] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, č. 8, 397–411.
- [19] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [20] SEIDLITZ, H.K., H. SCHNECKENBURGER a K. STETTMAIER. Time-resolved polarization measurements of porphyrin fluorescence in solution and in single cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1990, vol. 5, 3-4, s. 391-400. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85053-y](http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(90)85053-y).
- [21] ŠÍMA, Jan. *Využití tenzidů v analytické chemii* [online]. Dostupné z: http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/tenzidy_anal.html.
- [22] PETŘÍK, Milan. Éter a evoluční teorie 3 - fyzikální model evoluce. In: *Lidovky.cz* [online]. 16. listopad 2009 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: <http://petrik.bigblogger.lidovky.cz/c/110946/Eter-a-evolucni-teorie-3-fyzikalni-model-evoluce.html>.
- [23] KUNUGI, Shigeru a Tetsuji YAMAOKA. *Polymers in nanomedicine*. New York: Springer Verlag, c2012, xi, 281 p. Advances in polymer science, 247. ISBN 36-422-7856-6.
- [24] LETCHFORD, Kevin, Helen BURT, T. LIU, L.-Z. LIU a B. CHU. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, vol. 65, issue 3, s. 115-149. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-044482441-7/50007-4>.
- [25] WU, Xiao, Bruno BIATRY, Colette CAZENEUVE a Richard H. GUY. Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity. *Pharmaceutical Research* [online]. 2009, vol. 26, issue 8, s. 1995-2001 [cit. 2014-02-25]. DOI: 10.1007/s11095-009-9915-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11095-009-9915-1>.

- [26] PROW, Tarl W., Jeffrey E. GRICE, Lynlee L. LIN, Rokhaya FAYE, Margaret BUTLER, Wolfgang BECKER, Elisabeth M.T. WURM, Corinne YOONG, Thomas A. ROBERTSON, H. Peter SOYER a Michael S. ROBERTS. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, vol. 63, issue 6, s. 470-491 [cit. 2014-02-25]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000160>.
- [27] PATEL, Avnish, Michael BELL, Clare O'CONNOR, Andrew INCHLEY, Judata WIBAWA a Majella E. LANE. Delivery of ibuprofen to the skin. *International journal of pharmaceutics* [online]. 2013, roč. 457, č. 1, s. 9-13 [cit. 2014-02-25]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.019>. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313008545>.
- [28] KATAOKA, Kazunori, Atsushi HARADA a Yukio NAGASAKI. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*[online]. 2001, roč. 47, č. 1 [cit. 2014-02-25]. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X00001241>.
- [29] KOTINGOVÁ, Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE CHEMICKÝCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy* [online]. s. 533-539 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf.
- [30] KWON, Glen S. a Teruo OKANO. Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1996, vol. 21, issue 2, s. 107-116 [cit. 2014-02-25]. DOI: <http://dx.doi.org/10.1201/9781420021677.ch9>. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X96004012>.
- [31] JONES, Marie-Christine a Jean-Christophe LEROUX. Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 1999, vol. 48, issue 2, s. 101-111 [cit. 2014-02-25]. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(99\)00039-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(99)00039-9). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641199000399>.
- [32] Malvern: Dynamic Light Scattering (DLS) [online]. 2013, [cit. 2013-02-27]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm>.
- [33] Malvern Instruments Ltd.: Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Worcestershire, 2007, 8 s.
- [34] WEINER, B. B., W. W. TSCHARNUTER a D. FAIRHURST. Zeta Potential: A New Approach. At Canadian Mineral Analysts Meeting 1993, Winnipeg, 8. – 12. of September.
- [35] Colloidal dynamics Ltd: The Zeta Potential [online]. 1999, [cit. 26. 2. 2013]. Dostupné z: <<http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDEITut1.pdf>>.
- [36] NANOCOMPOSIX. *Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis*. SAN DIEGO.

- [37] METHOD, Section 4: Health Effects Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. S.l.: OECD Pub, 2004. ISBN 9789264071087.
- [38] Equipment that measures permeability: Diffusion Cells / Franz Diffusion Cells / Franz Cells. SES GMBH - ANALYTICAL SYSTEMS. [online]. Bechenheim / Germany [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: http://www.ses-analysesysteme.de/SES-Franz_Cell_inline_uk.htm.
- [39] Fluorescenční mikroskopie. VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. [online]. [cit. 2014-02-19]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/homepage/partneri/pristroje/mikroskop>.
- [40] SCORDATO, Anna a Stanley SCHWARTZ. Nikon MicroscopyU: Fluorescence Filter Combinations. NIKON INSTRUMENTS. [online]. New York [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/triple/dapifitc/tritc/dapifitcindex.html>.
- [41] Leica: Biosystems. LEICA BIOSYSTEMS. [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.leicabiosystems.com/specimen-preparation/sectioning/cryosectioning/details/product/leica-cm1850/>.
- [42] Nikon Instruments Europe B.V.: Products. [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Products/Microscope-Systems/Inverted-Microscopes/Eclipse-Ti.
- [43] MILLAR, David P. Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*. 1996, vol. 6, issue 3, s. 322-326. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-440x\(96\)80050-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-440x(96)80050-9).
- [44] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [45] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH. [online]. 2009 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- [46] GREENSPAN, P. a S.D. FOWLER. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of lipid research* [online]. 1985 [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.jlr.org/content/26/7/781.abstract>>.
- [47] GREENSPAN, P., E. P. MAYER a S. D. FOWLER. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. [online]. 1985, březen [cit. 2011-04-07]. Dostupné z WWW: <http://jcb.rupress.org/content/100/3/965.long>.
- [48] GREENSPAN, P. a S.D. FOWLER. *Lipid Res*. 26. 1985. s. 781.
- [49] Infinite 200 PRO - Tecan. [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1812&ID=1916&Menu=1&Item=21.2.10.1>
- [50] *Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care*. 1st ed. New York: Springer, 2011, p. cm. ISBN 978-364-2197-918.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

KP	kosmetický prostředek
SC	Stratum corneum
HA C6	Kaproylhyaluronát sodný
HA C18:1	Oleylhyaluronát sodný
CoQ10	Coenzym Q – 10
CMC	kritická micelární koncentrace
PAL	povrchově aktivní látka
DLS	Dynamický rozptyl světla
PdI	index polydisperzity
TRITC	Fluorescenční filtr tetramethylrhodamin isothiokyanát
NR	Nile Red, Nilská červeň.
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscopy
CAPA	Poly-(ϵ -caprolactone)
CAB	cellulose acetate butyrate
PS	polystyrene
IBU	ibuprofen
Da	Dalton (1 Da = $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DS	stupeň substituce
MW	molekulová hmotnost
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , fosfátový pufr - pufovaný fyziologický roztok.
ACN	acetonitril
SEM	Standard Error of Mean (střední chyba průměru)