



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HUMINOVÉ LÁTKY JAKO MODIFIKÁTORY TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE AKTIVNÍCH FARMACEUTICKÝCH INGREDIENCÍ

HUMIC SUBSTANCES AS MODIFIERS OF THE TRANSDERMAL ABSORPTION OF ACTIVE
PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petr Blahuš

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1839/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Petr Blahuš**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Huminové látky jako modifikátory transdermální absorpce aktivních farmaceutických ingrediencí

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. využití huminových látek jako aktivních a/nebo pomocných farmaceutických ingrediencí, ii. současné trendy v experimentálním studiu transdermální absorpce léčiv.
2. Na základě rešerše navrhnout, otestovat a optimalizovat metodologii experimentálního studia transdermální penetrace vybraných modelových aktivních farmaceutických látek (API) samostatně, resp. v kombinaci s huminovými látkami.
3. Shromáždit a vyhodnotit dostatečný soubor experimentálních dat za účelem posouzení vlivu přítomnosti huminových látek na rychlost transdermální absorpce testovaných API.
4. Vyhodnotit potenciál využití huminových látek jako pomocných farmaceutických přípravků ovlivňujících rychlost transdermální absorpce API, diskutovat vhodnou formu a zaměření jejich aplikace.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Petr Blahuš
student

doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT:

Tato diplomová práce se zabývá vlivem huminových látek na transdermální penetraci analgetického léčiva ibuprofenu. Analgetika ve formě perorálního podání mají zásadní vedlejší účinky. Díky topickým přípravkům by se působení vedlejších účinků mohlo snížit a také přinést řadu dalších benefitů. Problémem při vývoji transdermální formy léčiva je velmi účinná bariérová schopnost lidské kůže. Proto se řada výzkumů zaměřuje na hledání různých urychlovačů, které dokážou díky interakci s léčivem vylepšit jeho vlastnosti. Mezi takové látky by v budoucnu mohly patřit i huminové kyseliny, které mají dlouhou tradici použití v řadě terapeutických přístupů a v poslední době se stále častěji objevují příklady jejich využití v humánní medicíně. Výzkum byl zaměřen na difuzní transport ibuprofenu sodného a jeho kyselého protějšku. Pro simulaci reálného prostředí byly použity Franzovy difuzní cely a jako membrána byla použita kůže izolovaná z uší prasat. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie a HPLC byly vzorky analyzovány. Z naměřených dat bylo vypočítáno několik parametrů, např. efektivní difuzní koeficient, které byly následně porovnány a statisticky interpretovány. Výsledkem této práce jsou data, která ukazují pozitivní vliv huminových látek na transport léčiv přes kožní membránu.

ABSTRACT:

This thesis deals with the influence of humic substances on the transdermal penetration of the analgesic drug ibuprofen. Analgesics in the form of oral administration have major side effects. Thanks to topical preparations, side effects could be reduced and also bring a number of other benefits. The problem in the development of a transdermal form of the drug is the very effective barrier capacity of the human skin. Therefore, a lot of research is focused on the search for various accelerators that can improve its properties due to interaction with the drug. In the future, such substances could also include humic acids, which have a long tradition of use in a number of therapeutic approaches, and recently examples of their use in human medicine are increasingly appearing. The research was focused on the diffusive transport of sodium ibuprofen and its acidic counterpart. Franz diffusion cells were used to simulate the real environment, and skin isolated from pig ears was used as a membrane. Using UV-VIS spectrophotometry and HPLC, the samples were analyzed. Several values were calculated from the measured data, such as the effective diffusion coefficient, which were then compared and statistically checked. The result of this thesis is data that show the positive effect of humic substances on the transport of drugs through the skin membrane.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Analgetika, ibuprofen, ibuprofen sodný, huminové látky, lignohumát draselný, kůže, biologická membrána, prasečí uši, Franzovy difuzní cely, HPLC, UV-VIS, transdermální transport

KEYWORDS:

Analgesics, ibuprofen, sodium ibuprofen, humic substances, potassium lignohumate, skin, biological membrane, pig ears, Franz diffusion cells, HPLC, UV-VIS, transdermal transport

BLAHUŠ, Petr. *Huminové látky jako modifikátory transdermální absorpce aktivních farmaceutických ingrediencí*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148679>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Bc. Petr Blahuš

PODĚKOVÁNÍ

Velké díky patří mému vedoucímu doc. Ing. Petrovi Sedláčkovi Ph.D. za jeho trpělivost, dobré vedení a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům i prarodičům za finanční i psychickou podporu během celého mého studia. A v neposlední řadě děkuji své přítelkyni, spolužákům a kamarádům, kteří při mně po celou dobu stáli.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Kožní systém	9
3.1.1	Stavba lidské kůže.....	10
3.1.2	Problematika transdermálního transportu	13
3.2	Huminové látky	15
3.2.1	Obecný pohled na huminové látky	15
3.2.2	Složení a struktura.....	16
3.2.3	Vlastnosti	17
3.2.4	Izolace	17
3.2.5	Využití.....	18
3.3	Analgetika v boji proti bolesti	20
3.3.1	Opioidní analgetika.....	20
3.3.2	Neopioidní analgetika	21
4	KLÍČOVÉ METODY PRO EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	Difuzní experimenty pro transdermální aplikace	24
4.1.1	Difuzní komůrky.....	25
5	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
5.1	Vliv huminových látek na transport farmakologických aktivních látek	27
5.2	Analgetika ve formě transdermálního léčiva.....	29
5.3	Porovnání membrán pro zkoumání kožního transportu	32
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
6.1	Použité chemikálie.....	35
6.2	Použité přístroje	35
6.3	Další pomůcky a příslušenství.....	35
6.4	Příprava všech potřebných roztoků použitých při laboratorních experimentech 36	
6.4.1	Příprava kalibračních roztoků aktivních látek	36
6.4.2	Příprava zásobních roztoků lignohumátu draselného	36
6.4.3	Příprava roztoků aktivních látek pro následné difuzní experimenty	36
6.4.4	Příprava roztoků aktivních látek s přídavkem lignohumátu sodného.....	37
6.4.5	Příprava zásobního roztoku emulgátoru ve formě etanolu	37
6.5	Izolace membrán pro demonstraci transdermálního transportu léčivých látek 37	
6.5.1	Podrobný postup přípravy membrán z prasečích uší	37
6.6	Studium penetrace aktivních látek pomocí Franzových difuzních cel.....	41
6.6.1	Podrobný postup sestavení difuzní aparatury	41
6.6.2	Odběr vzorku	43
6.7	Přístrojová technika pro kontrolu, analytické stanovení obsahu a analýzu vlastností látek ve vzorcích	44
6.7.1	Kontrolní screening pomocí UV-VIS spektrofotometrie.....	44
6.7.2	Kvantitativní analýza pomocí HPLC	45
6.7.3	Měření zásaditosti roztoků lignohumátu draselného pomocí pH metru	46
7	OPTIMALIZACE POUŽITÉ METODIKY	47
7.1	Příprava membrán z prasečích uší.....	47

7.2	Difuzní experimenty	48
7.2.1	Optimalizace sestavení difuzní aparatury	48
7.2.2	Pilotní experimenty	49
8	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	54
8.1	Penetrace lignohumátu draselného přes kožní membránu	54
8.2	Tloušťka membrán jako důležitý faktor penetrace léčivých látek přes kožní membránu	55
8.3	Lignohumát draselný jako urychlovač transdermálního transportu	56
8.3.1	Vliv lignohumátu na penetraci ibuprofenu sodného	56
8.3.2	Vliv lignohumátu na penetraci kyselé formy ibuprofenu v nasyceném roztoku 58	
8.3.3	Vliv lignohumátu na penetraci kyselé formy ibuprofenu se solubilizačním čínidlem.....	61
8.3.4	Vliv pH na transdermální transport léčivých látek	64
8.3.5	Srovnání efektivních difuzních koeficientů D_{eff}	65
9	ZÁVĚR.....	67
10	ZDROJE	69
11	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77
12	SEZNAM PŘÍLOH	78
13	PŘÍLOHY	79

1 ÚVOD

Kůže každého z nás je velmi efektivní bariérou, schopnou ochránit tělo před mechanickým i chemickým poškozením. Jako největší lidský orgán má rozsáhlé množství vlastností a funkcí. Ochrana a selektivní propustnost látek přes tuto membránu je pro zdravého jedince nadměru důležitá. Z pohledu medicíny a výzkumu v oblasti penetrace léčiv přes kůži jde však o těžko překonatelnou bariéru. Velká část vědecké komunity se zaměřuje na tuto problematiku, a to z několika důvodů. Dermální podávání léků totiž přináší řadu benefitů, jako je lepší cílení léčivých látek, se kterým je spjatý menší dopad léčiva na organismu a snížení dávky aktivní látky, možnost dlouhodobého a konstantního dávkování pomocí speciálně upravených náplastí a větší komfort pro pacienty se špatnou snášenlivostí perorálního podávání. Tyto všechny výhody transdermální léčby motivují vědce vyvíjet nové přípravky na podporu penetrace látek přes kožní membránu, zkoumat různé formy nosičů a také nabízet v této oblasti nové pokrokové technologie.

Jednou z problematických skupin léčiv známých díky svým neblahým vedlejším účinkům jsou léky proti bolesti. Skupina těchto látek se nazývá analgetika a jejich využití v běžném životě člověka je mnohdy na týdenní, někdy i denní bázi. Provází nás od útlého věku až do posledních chvil našeho života, distribuce těchto léků je celosvětová a nachází využití jak v domácím prostředí, tak i v nemocničních zařízeních. Častým problémem těchto léčiv je pro tělo náročná odbouratelnost, žaludeční dráždivost a u některých přípravků dokonce vznik závislosti. Proto jsou analgetika ideálním adeptem na vývoj v transdermálních aplikacích. Topické aplikace nabízí cílenou léčbu bolesti bez nadbytečného zatížení organismu a samotná léčba je pro pacienty daleko snesitelnější. Co se ovšem týče účinnosti, tato forma podání znatelně zaostává. Z tohoto důvodu mnohé vědecké články cílí na problematiku penetrace analgetik přes kůži a snaží se najít nejvhodnější formu podání a způsob urychlení vstřebávání, např. pomocí tzv. transdermálních enhancerů.

Huminové látky jsou přírodní látky, jejichž výzkumu se lidstvo věnuje již několik století, a přesto jejich studium i v dnešní době přináší řadu nových poznatků a kontroverzí, ať už se týká jejich struktury, přírodní funkce, ale také možností jejich využití při vývoji moderních materiálů nebo technologií. Okruh možných využití se pro tyto biogenní látky každou novou publikací rozrůstá a své uplatnění objevují i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Tradičně se využívají (i když často nepřímo) v řadě kosmetických nebo jiných terapeutických praktikách (např. balneoterapie) a v poslední době se čím dál častěji skloňuje jejich přímé farmaceutické využití (jako API). Vedle toho ale jejich amfifilní charakter a schopnost tvořit micelární struktury vede k otázce, zda by se nedaly využít v kosmetice nebo farmacii i jako pomocné farmaceutické komponenty. Možnost ovlivnění rozpustnosti a transportu léčivých látek je díky amfifilnímu charakteru hlavní předností aplikací huminových látek. V předložené diplomové práci byly tyto látky využity pro zkoumání jejich vlivu na transdermální transport ibuprofenu přes kožní membránu izolovanou z kůže vepřového ucha.

2 CÍL PRÁCE

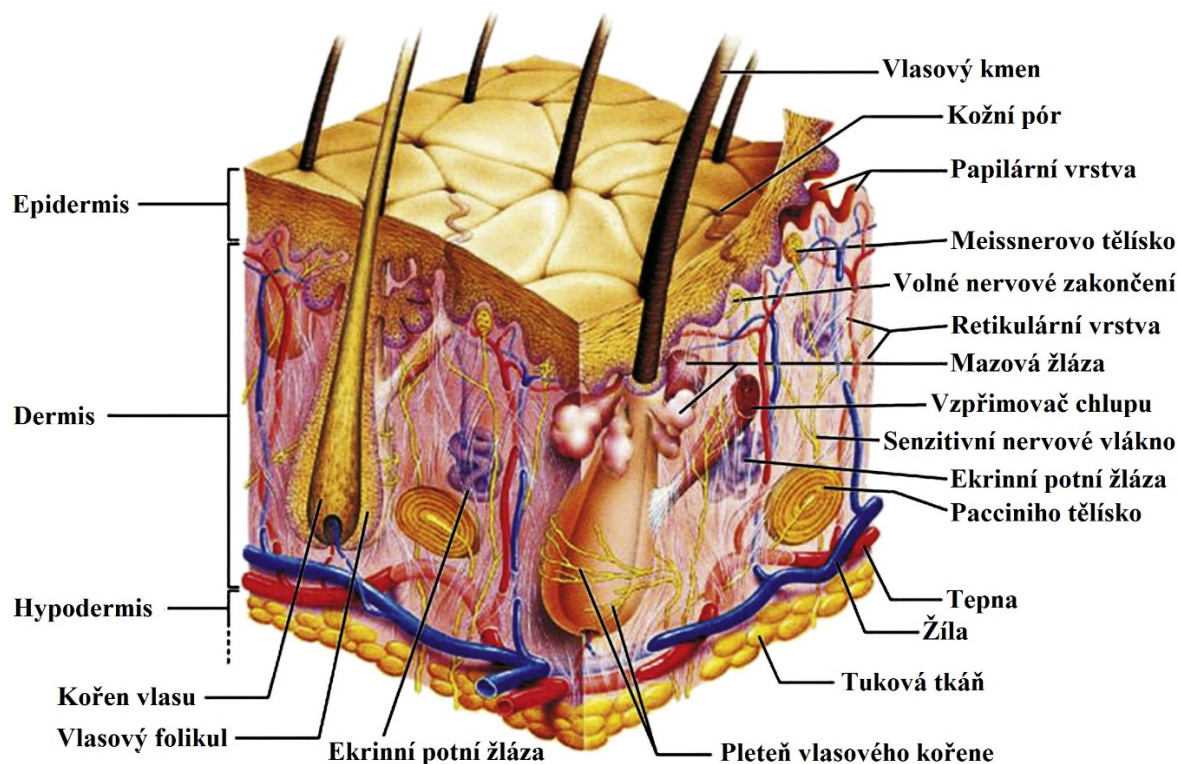
Vypracovat kvalitní teoretickou a literární rešerši na témata spojená s transdermálním transportem léčiv a huminových látek. Z literární rešerše následně navrhnout metodiku, která povede k odhalení vlivu huminových látek na penetraci léčiv přes kožní membránu. Dále tuto metodiku optimalizovat tak, aby byla kdykoliv reprodukovatelná a přinesla podklady pro další obdobné výzkumy. Následně vyhodnotit naměřená data, interpretovat je v kontextu vlivu huminových látek na transdermální absorpci použitého modelového analgetika a definovat hlavní závěr celého experimentu. V závěru navrhnout možné optimalizace a další návrhy na budoucí výzkum.

3 TEORETICKÁ ČÁST

Každá vědecká činnost se skládá z několika na sebe navazujících částí jako je, porozumění dané problematice a zhodnocení jejího současného stavu poznání, na které navazuje návrh a realizace vlastního experimentálního výzkumu, zpracování dat a jejich zhodnocení. V tomto duchu je koncipován i text předložené diplomové práce. Teoretická část práce se snaží osvětlit problematiku kůže a transdermálního transportu, následně poodhalit vznik a možná využití huminových látek a v poslední řadě charakterizovat druhy analgetických léčiv a popsat principy léčby bolesti.

3.1 Kožní systém

Bariérou mezi okolním světem a naším tělem je náš největší orgán – kůže. Ze všech lidských orgánů má největší hmotnostní podíl, který činí 7 % celkové tělesné hmotnosti (některé články uvádějí až 15 %). Díky své elasticitě chrání celé tělo před odřeninami a mechanickými silami. Ochranu před chemikáliemi, mikroorganismy a UV zářením zajišťují fyzikální vlastnosti kůže (pH, deskvamace), dále metabolické enzymy a melanocyty. Brání vstupu velkých (molekulová hmotnost nad 500 Da) a polárních molekul. Díky bohaté síti potních žláz a kožních kapilár dochází k regulaci tělesné teploty. Kůže funguje také jako odpadní systém, který z těla vylučuje hlavně vodu, sůl a močovinu. Pro transport látek přes kůži mohou být důležité i tzv. *kožní adnexe*, mezi které patří již zmíněné potní žlázy, mazové žlázy, nehty nebo vlasy a vlasové folikuly. Součástí kůže jsou i smyslové orgány, kterým se říká senzorycké receptory. Ty jsou propojené s nervovým zakončením, díky nimž jsme schopni vnímat tlak, dotyk, bolest a teplotu. V neposlední řadě je třeba zmínit schopnost regenerace a hojení ran [1–4].



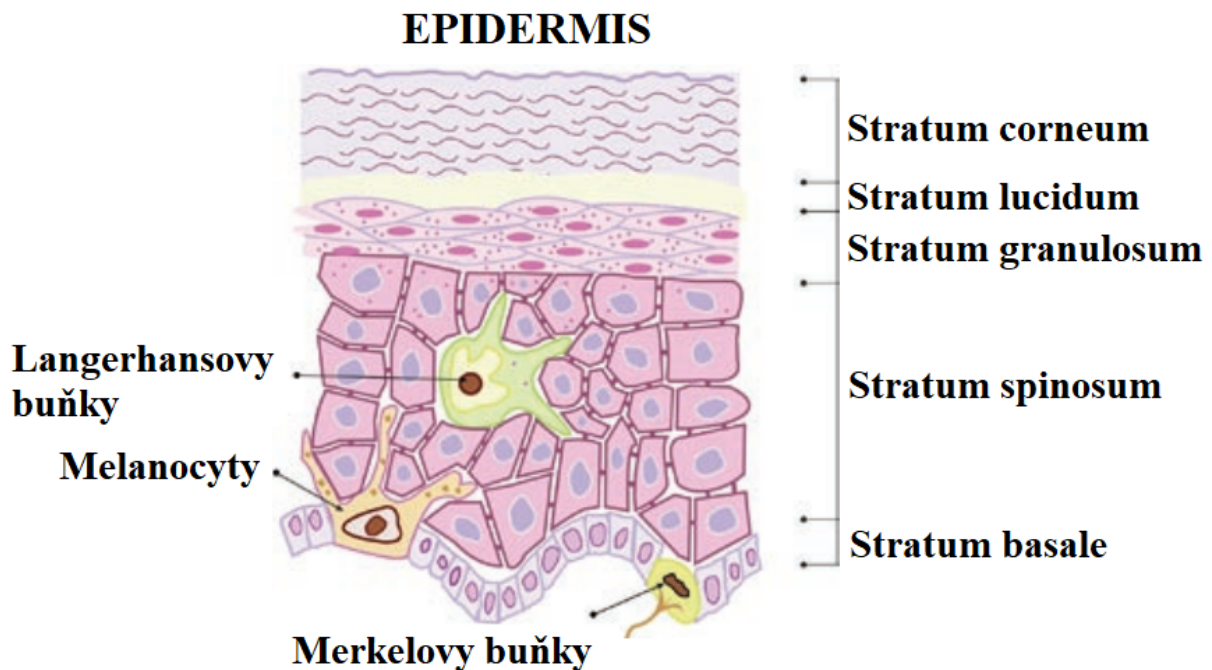
Obrázek 1: Trojrozměrný obraz kůže a níže uloženého podkoží [5]

3.1.1 Stavba lidské kůže

V principu je struktura kůže po celém těle identická, ovšem její tloušťka, elasticita a hustota vlasových folikul se liší podle věku, pohlaví a anatomického umístění. Například tloušťka kůže se pohybuje v rozmezí od 1,5 do 4 mm. Skládá se ze dvou typů tkání různé struktury a embryologického původu (viz Obrázek 1). Povrchová vrstva se nazývá epidermis (pokožka), je tvořena silným epitelem. Hlubší a větší vrstvou je dermis (škára), její šířka může být 1–4 mm. pod dermis se ještě nachází tuková tkáň, které se říká hypodermis (podkoží). Ta sice do kožního systému nepatří, ale je jeho důležitou součástí [1, 2].

Epidermis

Jedná se o vícevrstevný a rohovějící dlaždicový epitel složený z 95 % z *keratinocytů*, což jsou epidermální buňky spojené mezibuněčnými můstky (desmony), které vytvářejí pevný vláknitý protein keratin. Zbýlých 5 % připadá na melanocyty (dendrické buňky nacházející se v bazální vrstvě), Langerhansovy buňky (imunitní funkce) a Merkelovy buňky (mechanoreceptory reagující na dotyk). V závislosti na stavu diferenciaci keratinocytů je epidermis rozdělena do 5 základních vrstev (viz Obrázek 2) [1, 3, 4].



Obrázek 2: Grafické znázornění všech vrstev epidermis s dalšími epidermálními buňkami [6]

Bazální vrstva (*Stratum basale*) se skládá z jedné vrstvy zárodečných keratinocytů a nachází se na hranici s dermis. V této části dochází k rychlému dělení keratinocytů. Vyskytují se zde i Merkelovy buňky, které jsou spojeny se sensorickým nervem. Součástí bazální vrstvy jsou také melanocyty, které syntetizují tmavé kožní barvivo s názvem melanin. Ten se díky buněčným výběžkům transportuje do keratinocytů, kde chrání jádra těchto buněk před ultrafialovým zářením, které může způsobit rakovinu poškozením DNA [1, 4].

Ostnitá vrstva (*Stratum spinosum*) je oproti bazální složena z několika buněčných vrstev. Také zde dochází k menšímu množství buněčných dělení. Jednotlivé dceřiné buňky se zde spojují pomocí intracelulárních můstků (desmonů), které mají výběžky připomínající ostny. V této

vrstvě vedle keratinocytů najdeme též hvězdicovité Langerhansovy buňky. Jejich úkolem je chránit kůži před antigeny, které by mohly ohrozit naše tělo. Chovají se podobně jako makrofágy. Bílkovinný antigen pohlcují pomocí endocytózy, následně se přesunou do lymfatických uzlin, kde předají informaci o antigenu T-lymfocytům, které následně všechny tyto buňky napadají [1, 7].

Zrnitá vrstva (*Stratum granulosum*) je střední tenká vrstva epidermis. Obsahuje oploštělé keratinocyty seskládané do 3-5 řad. Liší se od zárodečných odolností a pevností, ale také tím, že obsahují lamelózní a keratohyaliové granuly. Jednoduše řečeno, keratohyalinové granuly napomáhají vytvářet keratin ve vyšších vrstvách pokožky. Funkce lamelózní granuly je zadržování vody v mezibuněčném prostoru pomocí glykolipidů, což pomáhá zadržet vodu v celém kožním systému. Zrnitá vrstva se nachází daleko od vyživujících vlásečnic a kožních kapilár umístěných v dermis, dochází proto k apoptóze, tzn. postupnému odumírání epidermálních buněk, kdy dochází k rozpadu jádra. Tyto buňky již nejsou schopny vykonávat metabolické processy [1, 7].

Jasná vrstva (*Stratum lucidum*) se nachází v oblastech, kde je kůže tlustá, např. dlaně a chodidla. Skládá se ze 3-5 vrstev plochých a odumřelých keratinocytů, jež jsou složeny z velkého množství keratinu a mají zesílenou membránu. Tato vrstva poskytuje pokožce určitý stupeň hydroizolace [1, 7].

Rohová vrstva (*Stratum corneum*) je poslední a nejsvrchnější vrstvou lidské kůže. Mrtvé a zploštělé keratinocyty se zde sjednocují do 25-30 vrstev. Jádro a orgány keratinocytů zanikly již při apoptóze a byly nahrazeny proteinem keratinem. Z tohoto důvodu se buňky označují korneocyty (též rohové buňky). Hlavní funkcí této vrstvy je ochrana před mechanickým poraněním, pronikáním cizorodých látek a mikroorganismů. Díky glykolipidům mezi buňkami je kůže hydrofobní. Spojení mezi buňkami se postupně ztrácí, a ty se uvolňují ve formě šupin [1, 3, 7].

Dermis

Tato ohebná a pevná pojivá tkáň je rozdělena na dvě části, na papilární a retikulární. Papilární vrstva je složena z řídké pojivé tkáně a interaguje s epidermis. Obsahuje vyživující krevní cévy a zakončení sensorických nervů. Tato vrstva vytváří prstovité výběžky zvané dermální papily (viz Obrázek 1). Na dlaních a na ploskách nohou jsou tyto kožní výběžky základem pro otisky prstů. Dermis je z 80 % tvořena retikulární vrstvou. Je to neuspořádaná pojivá tkáň tvořená tlustými kolagenovými svazky a elastickými vlákny. Co se týče buněčného složení, nachází se v pokožce fibroblasty, žírné, plazmatické a dermální buňky, makrofágy, lymfocyty a mnohé další [1, 3, 4, 7].

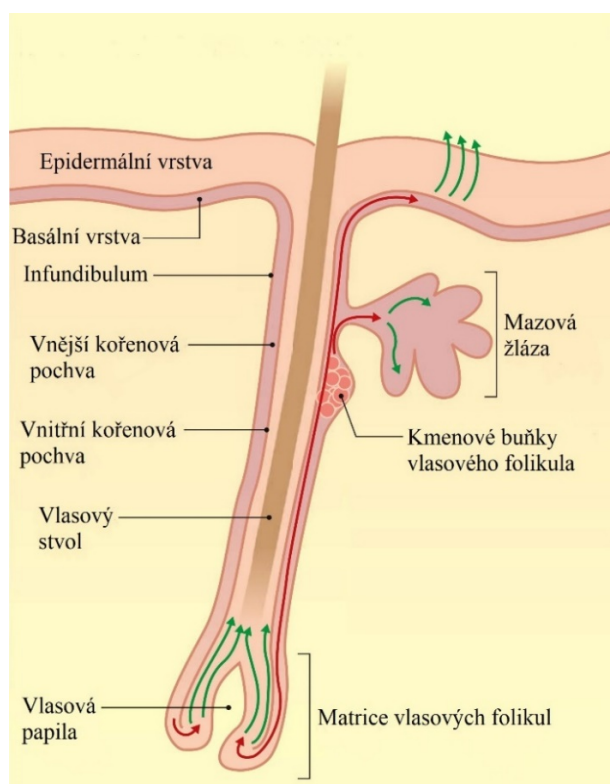
Hypodermis

Pod retikulární dermis se nachází několik milimetrů tlustá podkožní tuková tkáň neboli hypodermis. Je složena z lipocytů uspořádaných do tukových lalůček, oddělených vláknitými přepážkami z vláknitého kolagenu. Součástí hypodermis jsou také krevní a lymfatické cévy a nervy. Mezi funkce podkoží patří ukládání energie a tepelná izolace, také slouží ke spojení kůže se spodními strukturami, jakými jsou svaly a kosti [1, 4, 8].

Epidermální kožní adnexa

Vedle velkého množství keratinocytů, melanocytů, nervových zakončení a cév se v kůži nachází struktury, které jsou odvozené přímo z epidermis. Jedná se o tzv. kožní adnexa. Některá jsou na první pohled viditelná, jako vlasy a nehty. Dále se pod vrstvami kůže nacházejí potní žlázy ovlivňující tělní termoregulaci a vylučování odpadních látek a mazové žlázy, které mají na starost výživu a ochranu chloupků a vlasů po celém těle [1].

Funkce vlasů a ochlupení u člověka se liší od jiných skupin savců s bohatou srstí. Lidské ochlupení je daleko řidší, proto nedochází k tak efektivnímu udržování teploty, jako u zvířat. Hlavním důvodem, proč máme chloupky takřka po celém těle, je vnímavost na lehké dotyky. Dalšími funkcemi jsou například ochrana hlavy před slunečním zářením nebo ochrana očí a nosu před prachem a jinými částicemi. Vlas se skládá z kořene, který je ukotven v dermis a kmene, který vyčnívá z kůže do okolí. Kořen vlasu je obklopen vlasovým folikulem, jehož součástí je dermální papila, která je hojně zásobena cévami a stará se o výživu a růst (Obrázek 3) [1, 4, 7].



Obrázek 3: Struktura vlasu a související adnexální složky [4]

S tématem vlasů úzce souvisí mazové žlázy. Tyto žlázy produkují olejovitou látku zvanou maz, složenou z bílkovin, triglyceridů, organických solí a cholesterolu. Maz pokrývá povrch kůže, zabraňuje jejímu praskání, ničí bakterie a zabraňuje nadměrnému odpařování vody. Chloupky chrání před vysušením a lámavostí.

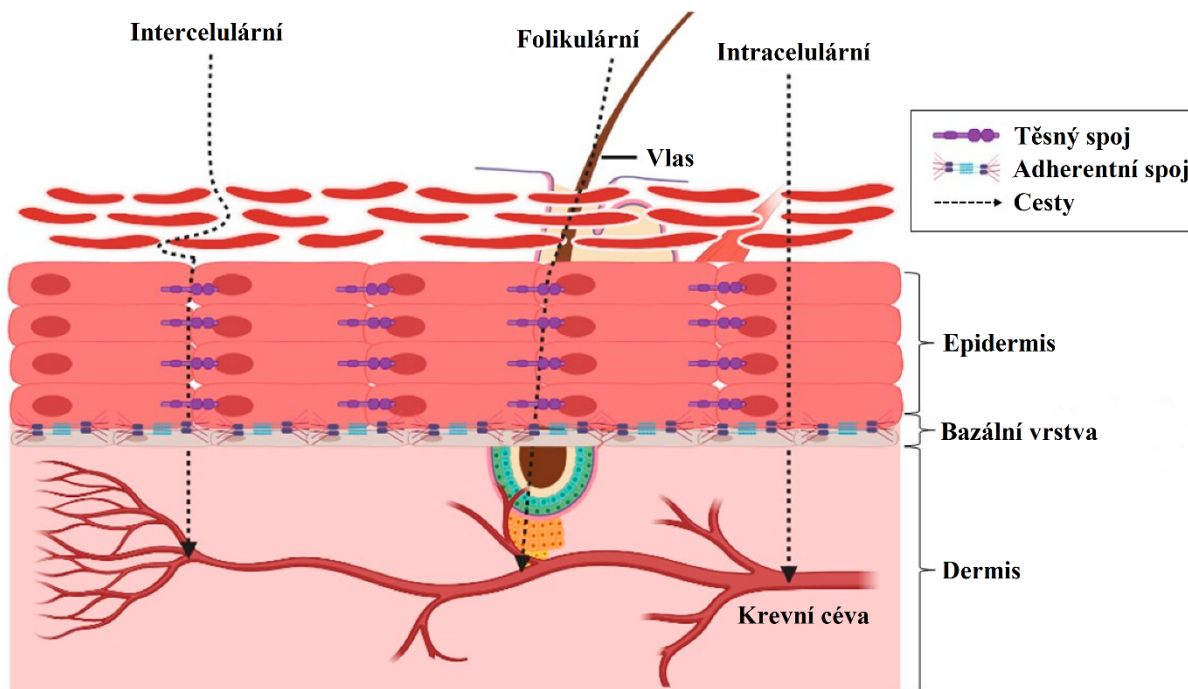
Člověk má nejvíce potních žláz z celé živočišné říše. Díky tomu je schopný vykonávat náročné aktivity i za vysokých venkovních teplot. Hlavním úkolem potních žláz je vylučovat pot na povrch kůže nebo do vlasových folikul a prostřednictvím jeho odpařování ochlazovat organismus. Žlázy se dělí na ekrinní, které se nachází hlavně na čele, dlaních a ploskách nohou.

Vytvářejí tzv. skutečný pot, který se skládá hlavně z vody, dále z iontů chloru a sodíku, močoviny, amoniaku, kyseliny močové, glukózy a kyseliny mléčné. Druhým typem jsou žlázy apokrinní. Tyto žlázy jsou aktivovány až v období puberty, nacházejí se hlavně v oblasti zevních pohlavních orgánů a v řitní oblasti. Samotný pot z těchto žláz je obohacený o bílkoviny a tukové látky, což z něj dělá viskózní, mnohdy žlutě zabarvenou látku. Při kontaktu s kůží dojde k rozkladným činnostem kožních bakterií, čímž vzniká specifický tělesný pach člověka [1, 7].

3.1.2 Problematika transdermálního transportu

Hned vedle ochrany našeho organismu před cizorodými látkami má kůže i další důležitou funkci, a tou je transport látek do různých vrstev epidermis a dermis nebo přímo do krevního oběhu. Tato skutečnost je základem pro vývoj léků schopných překonat bariéru z keratinocytů, polárních struktur v dermis apod. Fakt, že až jedna třetina léčiv podléhajících klinickému hodnocení jsou léčiva cílená na vstřebání do nebo skrze kůži, vypovídá o jejich důležitosti v medicínském odvětví [8]. Rychlost a míra vstřebávání léčiva je závislá na stáří, tloušťce a stavu kůže, lokalizaci podání, ale také na pH, rozpustnosti a velikosti molekuly léku [9].

Samotný transport přes rohovou vrstvu se dá rozdělit do tří kroků. Prvním je penetrace, což znamená vstup látky do konkrétní struktury nebo vrstvy, jako je například rohová vrstva kůže. Dalším je permeace, ta by se dala definovat jako průnik z jedné vrstvy do strukturně a funkčně odlišné druhé vrstvy. A posledním krokem je resorpce, což je příjem látky do cévního systému [10]. Co se týká mechanismu transportu přes kůži, jde o složitý proces. Existují tři možné způsoby (viz Obrázek 4). Jedná se o intercelulární cestu, kdy léčivo prochází přes lipidovou dvojvrstvu, dále transfolikulární transport, který využívá k prostupu vlasové folikuly nebo mazové žlázy a posledním typem permeace je intracelulární transport přes korneocyty [11].

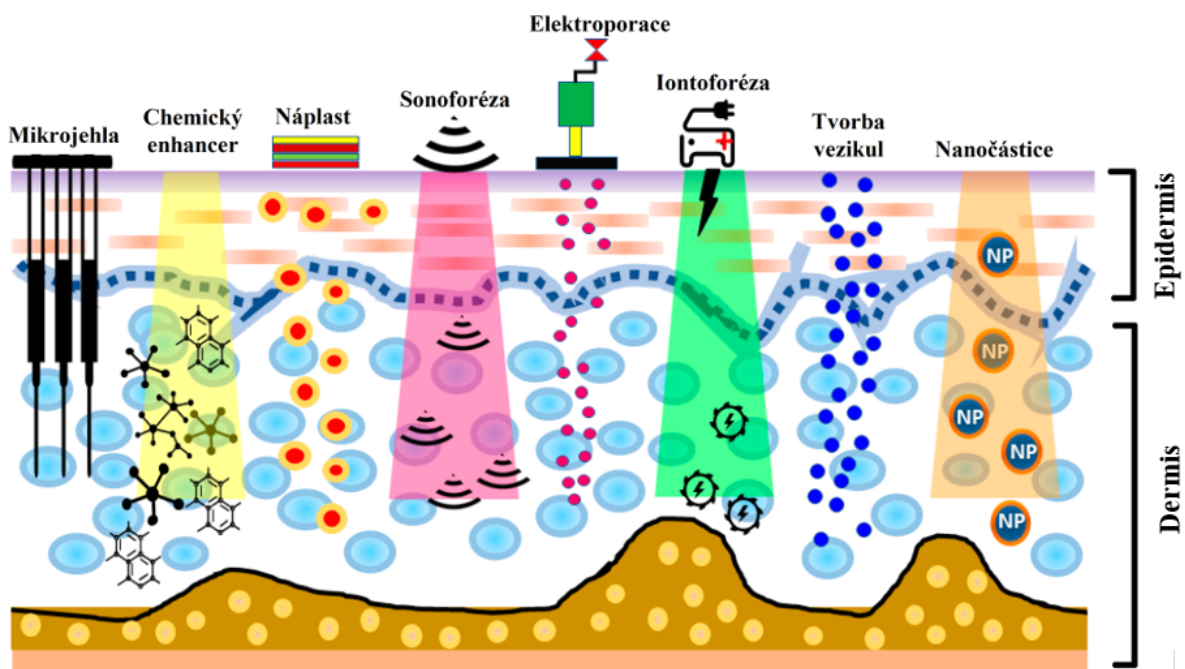


Obrázek 4: Grafické zobrazení tří možných cest pro transport látek přes kůži [11]

Výhody a omezení transportu léčiv

Důvodem vědeckého zájmu jsou velké výhody, které transdermální podání léčiva přináší. Aplikace je v porovnání s parenterálním podáním bezbolestná, nehrozí infekce a celkově je pro pacienty komfortnější [12]. Díky možnosti postupného, řízeného a dlouhodobého uvolňování léku nedochází ke kolísání koncentrace léčiva v krvi, což může snížit množství nežádoucích účinků a zamezit terapeutickému selhání, která se často spojuje s přerušovaným dávkováním. Léčiva podávaná transdermálně nemusí překonávat tzv. metabolismus prvního průchodu játry, kde dochází k značným ztrátám léku. Také nedochází ke gastrointestinálnímu podráždění, což je jeden z nežádoucích účinků perorálně podaných léčiv [5, 8, 9].

Vedle výhod se však transdermální transport potýká i s množstvím omezení, kvůli kterým je tento druh transportu stále málo využíván. Velmi účinná ochrana kůže je v tomto případě pro léčivo nevýhodou [12]. Vrstva *Stratum corneum* dokáže efektivně bránit průniku molekul větších než 500 kDa [9]. Pro většinu léčiv je právě tato vrstva určující pro rychlost vstřebání. Řešení tohoto problému se výzkumníci snažili najít v různých fyzikálních metodách, jako je například iontoforéza, sonoforéza, elektroporace, nebo v chemických metodách cílených na zesilovače permeace, jako jsou glycerol, lecitiny, cyklodextriny, a další. Mezi další možnosti zlepšení průchodu patří využití lipozomů, mikroemulzí nebo pevných lipidových částic. Ideální lék by pro přestup měl mít nízkou molekulovou hmotnost, lipofilní charakter na zdolání rohové vrstvy, ovšem pro průchod do hlubších vrstev kůže i dostatečnou hydrofilitu [2, 13].



Obrázek 5: Schematické znázornění různých strategií pro podávání léčiv transdermální cestou [14]

3.2 Huminové látky

3.2.1 Obecný pohled na huminové látky

Co jsou huminové látky, jak vypadají a jak vznikají, se vědci snaží zjistit již desítky let. Za tu dobu již bylo objeveno mnoho různých poznatků a napsána řada studií, i přesto jsou tyto látky neustálým vědeckým tématem díky své ne zcela objasněné struktuře a vlastnostem, které mají potenciál ovlivnit řadu různých oborů a průmyslových odvětví [15].

Jedná se o heterogenní, přirozeně se vyskytující biogenní organické látky schopné tvořit komplexní sloučeniny [16]. Podle některých studií huminové látky představují okolo 50 % organického uhlíku v oceánech a sladkovodních zdrojích a přibližně 25 % organického uhlíku na Zemi, což je řadí mezi nejrozšířenější organické materiály na naší planetě [17, 18]. Velké zastoupení mají v sedimentech, vodách a půdních systémech [15]. Při prvních pokusech o charakterizaci těchto sloučenin došlo k rozdělení huminových látek na základě jejich rozpustnosti v závislosti na pH. Nerozpustná frakce dostala název humin, část obsahující vysokomolekulární organické látky, které jsou rozpustné v alkalickém prostředí, částečně ve vodě a nerozpustné v kyselém prostředí s pH menším než 2, se nazývá huminové kyseliny a poslední frakcí jsou fulvokyseliny, což je frakce středněmolekulárních látek rozpustných při jakémkoli pH [15, 18]. Další základní charakteristické informace viz Obrázek 6.



Obrázek 6: Charakteristické údaje o huminových látkách [19]

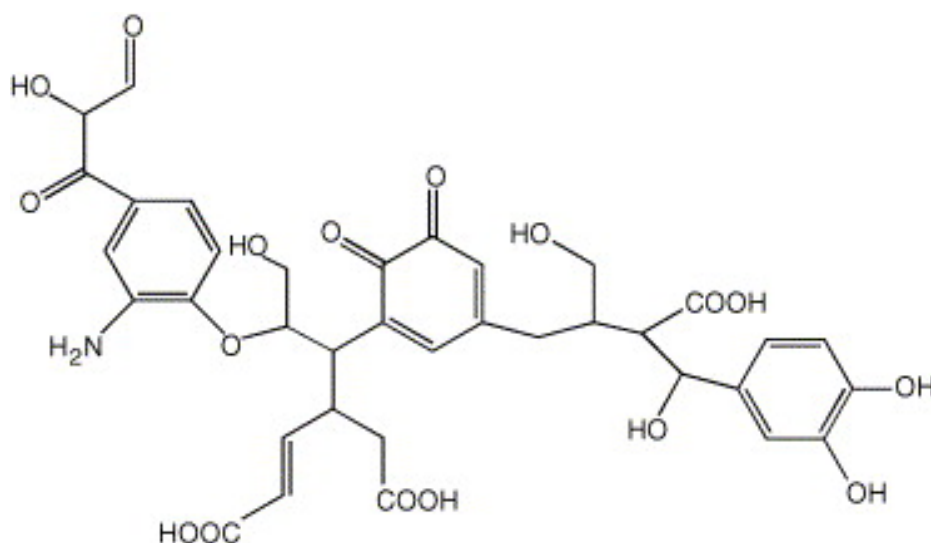
Proces vzniku huminových látek se nazývá humifikace. Jde o kombinaci syntetických a rozkladných chemických reakcí, kdy dochází k modifikaci organických zbytků zvířat, rostlin a mikrobiální biomasy. Tento proces ovlivňuje řada faktorů, jako třeba prostředí (vodní nebo suchozemské) nebo organismy, které se v těchto prostředích nacházejí. K reakcím dochází jak za aerobních podmínek, tak za anaerobních [16].

3.2.2 Složení a struktura

Chemická struktura huminových látek závisí na jejich původu a je velmi komplikovaná. Všeobecně se dá říct, že na elementární úrovni se všechny huminové látky skládají z prvků C, H, O, N, a S [20]. Co se týká zastoupení těchto prvků, obsah uhlíku může být 45-60 hm.% s tím, že stoupá od fulvových kyselin k nerozpustnému huminu, kyslíku 25-45 hm.%, kde je oproti uhlíku opačný trend, vodíku 4-7 hm.%, dusíku 2-5 hm.% a zbylých anorganických prvků 0,5-5 hm.% [16].

Další možnou charakterizací struktury huminových látek je pomocí funkčních skupin, které ovlivňují výsledné vlastnosti těchto sloučenin. Jak vlastnosti, tak procentuální zastoupení kyslíku je dané skupinami $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ a $-\text{C}=\text{O}$. Fulvové kyseliny jsou specifické tím, že obsahují větší množství funkčních skupin kyselé povahy, nejčastěji karboxylové nebo hydroxylové [16, 20]. Ve struktuře mohou být zastoupeny také fenoly, enoly, chinony, ethery, ale také peptidy nebo cukry.

Taková heterogenita způsobuje částečnou hydrofilitu díky OH skupinám, ale také částečnou hydrofobitu způsobenou aromatickými kruhy a alifatickými řetězci [21]. Různorodost a komplexita těchto sloučenin vědcům velmi ztěžuje odhalení přesné molekulové struktury huminových látek. Na základě dosavadních poznatků proto vzniklo několik hypotetických vzorců, které se v průběhu let různě mění.



Obrázek 7: Model monomeru huminové kyseliny podle Steelinka [22]

Pohled na skladbu struktury těchto látek se každou novou studií mění. Někdy jsou brány jako polymerní řetězce ve tvaru prstenců a shluků. Podle tohoto „polymerního modelu“ by tyto makromolekuly mohly mít velikost od 60–500 Å a průměrnou hmotnost od 20 000–50 000 Da [16, 23]. Avšak s rozvojem měkkých ionizačních technik, jako jsou mikroskopie a spektroskopie se od tohoto modelu upouští. Do popředí se dostává koncept supramolekulárních asociací, ve kterém jde o spojení několika malých a chemicky odlišných molekul pomocí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí. Výsledkem těchto interakcí je představa micelární struktury, která se ve vodném roztoku uspořádá tak, aby vnější hydrofilní oblasti chránili vnitřní hydrofobní před molekulami vody [23].

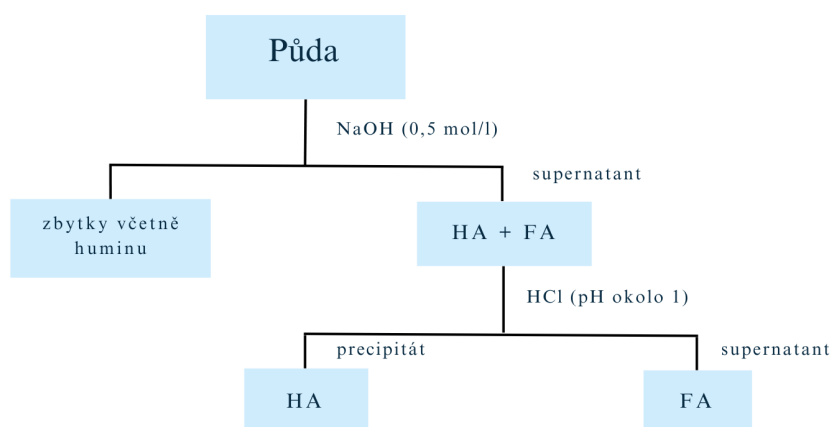
3.2.3 Vlastnosti

Některé základní vlastnosti již byly zmíněny, jako rozpustnost, která stoupá od huminu k fulvovým kyselinám, odhadovaná molekulová hmotnost nebo amfifilní charakter, díky kterému mohou huminové látky tvořit ve vodném micely nebo pseudomicely. Poslední zmíněná vlastnost úzce souvisí s povrchovou aktivitou, která huminovým kyselinám umožňuje silné spojení s anorganickými nebo organickými sloučeninami ve vodě i v půdě [23]. Ve vodném prostředí ovlivňují též solubilizaci různých nepolárních látek pomocí nekovalentních vazebných interakcí [21]. Tato schopnost je základem pro tuto diplomovou práci, protože umožňuje huminovým látkám ovlivnit transport látek, se kterými interaguje. Také patří k velmi dobrým ligandům pro kovové ionty v roztocích, kde vznikají silné komplexy kov-humát. Tyto interakce mají velký vliv na detergentní charakter huminových kyselin [23].

Mezi další vlastnosti, které se zkoumají v rámci lékařství, patří například antivirová aktivita, kdy dochází k inhibici replikace viru vazbou na virové receptory, které jsou nezbytné pro přichycení viru na povrch buňky. Huminové látky jsou také testovány v oblasti inhibice mutagenese uvnitř buněk, ale i v mimobuněčném prostředí, mají protizánětlivé účinky, zefektivňují hojení ran a dokáží absorbovat škodlivé UV záření [21]. V rámci této kapitoly je zřejmé, že vlastnosti huminových kyselin jsou velmi rozmanité a mají co nabídnout v mnoha různých odvětvích.

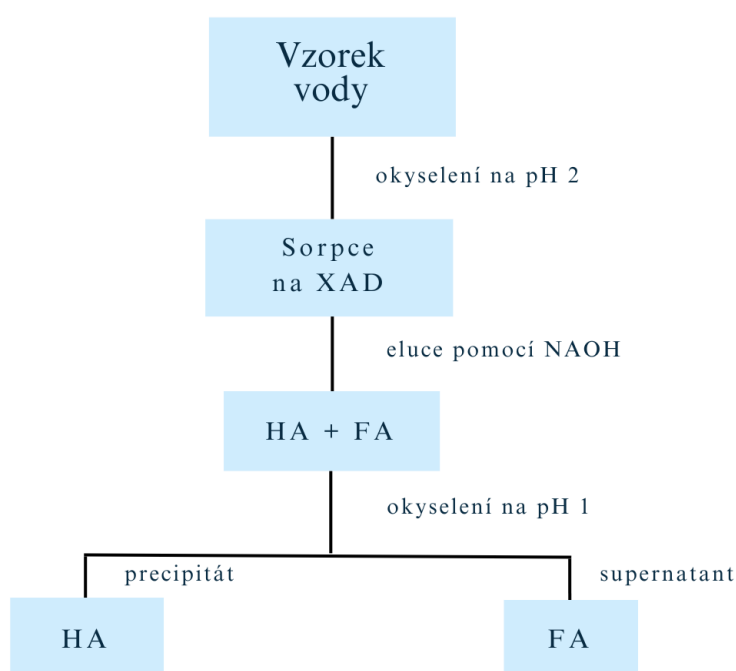
3.2.4 Izolace

Jak bylo již zmíněno na začátku této kapitoly, huminové látky se dělí do tří základních skupin podle rozpustnosti. Této vlastnosti se využívá při izolaci huminových kyselin. Samotný způsob izolace se liší podle toho, jestli je zdrojem těchto látek vodný roztok nebo různé pevné látky, jakou jsou rašeliny, uhlí nebo sedimenty [15]. Obrázek 8 znázorňuje extrakci z pevných vzorků, kde se v první fázi využívá silně alkalického extrakčního činidla, nejčastěji vodného roztoku 0,1 M NaOH. Organický materiál, který se v této reakci nerozpustí, je klasifikován jako humin. Následně je roztok okyselen na pH 2–1 za pomoci HCl. Vzniklá sraženina kyseliny huminové (HA) se odebere a v roztoku se nachází pouze kyselina fulvová (FA) [15, 24]. Možnou alternativou pro roztok NaOH je alkalický pyrofosfát nebo jeho směs s NaOH, tato varianta se ovšem nedoporučuje z důvodu obavy o změnu povahy huminových látek působením pyrofosfátu [15].



Obrázek 8: Schéma separace pro půdní huminové látky [15]

Izolace může probíhat také z vodného roztoku, a to extrakcí do nepolárních rozpouštědel nebo sorpcí na neiontové sorbenty. Tyto metody se využívají k stanovení celkového obsahu huminových látek ve vodách. Pro izolaci huminových kyselin z přírodních vod byl vytvořen standardizovaný postup s využitím sorbentu označovaného zkratkou XAD. Obrázek 9 popisuje zmíněný postup. XAD je neiontový makroporézní sorbent, který se vyrábí ze styren-divinylbenzeového nebo methylnmethakrylátového polymeru s různou úrovní hydrofobicity. Pokud je požadována jemná frakcionace huminových kyselin, využívá se gradientové eluce. Polymer je desorbován elučním činidlem, jehož pH se postupně zvyšuje. Při změně pH dochází k ionizaci a desorpci sloučenin na základě rozdílných hodnot pKa [15]. Metoda XAD byla využita i při zkoumání oxyhumolitu, společně s 0,5 M NaOH, nakonec byl vzorek filtrován přes skleněný filtr a stabilizován [25].



Obrázek 9: Schéma izolace huminových látek ze vzorků vody [15]

Díky rozdílné velikosti molekul huminových látek se dají rozdělit do několika frakcí pomocí ultrafiltrace. Frakce se liší jak na základě stupně agregace, tak i na úrovni primární struktury molekuly [15].

3.2.5 Využití

Z celé této kapitoly vyplývá, že huminové látky mohou svými specifickými vlastnostmi obohatit velké množství různých odvětví. V určitých oborech se využívají již dnes, avšak řada možných uplatnění čeká na vědecky podložené materiály o funkčnosti, bezpečnosti a optimalizaci jejich použití. I tato práce má za cíl obohatit dosavadní zkušenosti s těmito látkami v medicínských kruzích a naznačit další možná využití. Pro přehled budou jejich stávající aplikace rozděleny do krátkých odstavců.

Zemědělské aplikace

V současném zemědělství jsou jedním z hlavních doplňků rostlinných živin anorganická hnojiva. Jejich působením se produktivita plodin může mnohonásobně zvýšit, ovšem přímé a nepřímé nepříznivé účinky těchto hnojiv na zdravou půdu negativně ovlivňují celou budoucnost agroprůmyslu. Podpora přírodních látek, jako jsou huminové kyseliny, pomáhá k obnově kvality půdního systému, napomáhá přenosu mikroživin do rostlin a zlepšuje zadržování spodních vod [16, 26]. Jedním z důvodů, proč se využívají v zemědělství je jejich vliv na zlepšení fyzikálně-chemických vlastností půdy a zvýšení její úrodnosti [27]. Již několik let jsou součástí přísad do hnojiv, přispívají k větší dostupnosti uhlíku, zlepšují zásobování rostlin živinami, a také slouží jako zdroj energie pro půdní mikroby [26]. Mezi zástupce solí huminových látek, které mají potenciál v zemědělství, můžeme jmenovat humát vápenatý, který se využívá ke zvýšení úrodnosti, humát sodný pro jeho hojící účinky na listy rostlin, nebo humát amonný, u kterého byl zjištěn významný stimulační účinek na růst rostlin [20].

Průmyslové aplikace

Různé formy huminových látek mají velký přínos v řadě průmyslových odvětví. Ve stavebnictví se využívají jako aditivum do betonových směsí, kde mají vliv na rychlost tuhnutí. Pozitivně ovlivňují také stupeň hydratace a fyzikálně-mechanické vlastnosti betonu. Adsorpce těžkých kovů je jedna z vlastností huminových struktur, která se využívá při průmyslovém čištění odpadních vod nebo pro likvidaci znečišťujících látek, které vznikají při spalování [28]. Své místo našly také v kožedělném průmyslu, kde slouží hned v několika úrovních, například jako barvivo, prostředek k činění kůže a na konečnou úpravu. Dále se využívají v keramickém průmyslu na zlepšení mechanických a odlévacích vlastností keramiky [20]. Přidávky huminových látek při výrobě PVC zvyšuje tepelnou stabilitu [29]. Je nutno zmínit i četné aplikace v papírenském průmyslu a potravinářském průmyslu [16, 20].

Biomedicínské aplikace

Historicky jsou huminové látky využívány pro medicínské účely již od nepaměti. Nejstarší dochovanou zmínkou je čínská farmakologická příručka z 15 století [30]. Léčebnou metodou, která se zachovala dodnes, je balneoterapie. Jedná se o léčebnou proceduru pomocí rašelinových lázní, která se v Evropě objevila již na počátku 19. století. Tato léčebná kúra se využívala na pohybová, gynekologická i kožní onemocnění. Díky vysokoteplotní rašelinové lázni docházelo u pacientů ke zlepšení krevního oběhu a podpoře regeneračních procesů. Huminové látky mají prokázané antivirové účinky proti neobaleným i obaleným virům, jako jsou virus chřipky, herpes virus nebo HIV [31]. v rámci výzkumu byl popsán proces specifické inhibice v průběhu přichycení viru na napadenou buňku [32]. Protizánětlivé vlastnosti byly prokázány u humátu sodného, který významně zpomaluje rozvoj edémů. Huminové kyseliny také dokážou potlačit tvorbu fibrinových monomerů inhibicí koagulačního enzymu a tím zabránit vzniku trombózy v těle. Mezi další vlastnosti těchto kyselin patří antioxidační vlastnosti, podpora imunity, vyrovnaní hladiny minerálů v těle. Důležitou kapitolou je i systém dodávání léčiv, kde huminové látky fungují jako nosná činidla pro zvyšování biologické aktivity [30].

3.3 Analgetika v boji proti bolesti

Bolest je jedním z obranných mechanismů našeho těla. Jde o informaci centrálního nervového systému, která je předána motorickým neuronům, aby došlo k minimalizaci případného fyzického poškození [33]. Mezinárodní asociace pro studium bolesti definovala bolest jako „nepříjemnou smyslovou a emocionální zkušenost spojenou se skutečným nebo potenciálním poškozením tkáně nebo popsanou v termínech takového poškození“ [34]. Bolest se dá rozdělit na dva základní typy v závislosti na délce trvání.

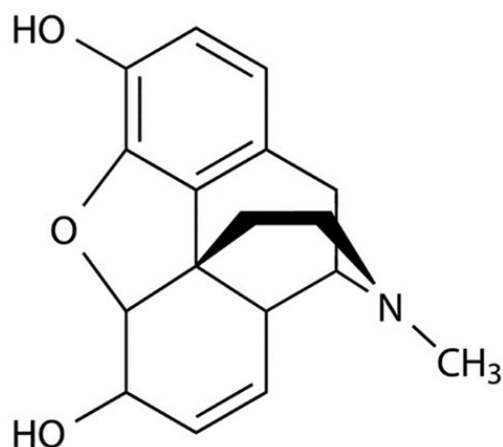
Akutní bolest – je reakce těla na probíhající poškození tkáně nebo onemocnění. Jde častěji o rychlý a intenzivní pocit, jehož příčina je ve většině případů snadno rozpoznatelná [33]. I přesto se může stát, že akutní bolest přetrvává i měsíce nebo se z ní může rychle vyvinout bolest chronická [35].

Chronická bolest – je obvykle definována jako bolest trvající déle než šest měsíců. V porovnání s akutní bolestí je její léčba obtížnější, a to ze dvou důvodů. Může vzniknout v důsledku selhání nebo neúčinnosti předchozí léčby akutní bolesti. Druhým důvodem je skutečnost, že dlouhodobá přetrvávající bolest způsobuje změny v chování pacienta. U chronické bolesti je léčba kombinací medikace s účinnou rehabilitací [34]. Dá se také dělit na konstantní a přerušovanou, nebo podle zdroje bolesti na kožní, somatickou, neuropatickou a viscerální [33].

Léčba a následné úspěšné odstranění bolesti lze docílit různými metodami, ovšem základem pro analgetickou léčbu je užívání analgetických léčiv [36]. Analgetická léčiva způsobují tzv. analgezii, což je odstranění bolestivého vjemu bez ztráty vědomí [33]. Obecně dochází k inhibicím enzymů nebo různých proteinových receptorů jak v centrálním nervovém systému, tak v celém lidském těle [37]. Jednou z možností rozdělení je na syntetické léky, které jsou uměle vytvořené v laboratoři, např. diklofenak, paracetamol nebo ibuprofen, a na analgetika získaná z přírodních zdrojů, což mohou být rostliny s analgetickými účinky (morfin) nebo látky tělu vlastní (endorfiny). Dále se dají analgetika rozdělit podle toho, jestli se váží na opioidní receptory.

3.3.1 Opioidní analgetika

Jak sám název napovídá, tyto látky jsou odvozené od opia, což je látka izolovaná z nezralých makovic máku setého [33]. Opioidy se řadí mezi silná analgetika, která se využívají při léčbě středně těžkých až těžkých bolestech rakovinového, ale i nerakovinového původu [38]. Jejich účinek závisí na obsazení opioidních receptorů, u lidí jsou známé tři druhy receptorů: μ , κ a δ [39]. Nejznámější zástupce této skupiny morfin, jehož chemickou strukturu zobrazuje Obrázek 10, cílí především na μ -opioidní receptory, které jsou dostupné po celém těle, tudíž má velmi širokou škálu indikací bolestí, které může ovlivnit [37]. Při interakci mezi opioidem a receptorem dochází ke vzniku různé silné vazby v závislosti na afinitě a vnitřní aktivitě, což má vliv na výsledný farmakodynamický efekt. O účinku také rozhoduje stupeň lipofility a ionizace analgetické sloučeniny.



Obrázek 10: Chemická struktura morfinu [40]

Tyto látky se dělí do několika skupin: opiové alkaloidy (morfin, kodein), polosyntetické opioidy (heroin, oxykodon), syntetické opioidy (fentanyl, petidin) a poslední endogenní opioidy, což jsou látky produkované tělem (enkefaliny, endomorfíny) [39]. Dále je můžeme rozdělit podle afinity a vnitřní aktivity. Zmíněné parametry jsou největší u agonistů, což znamená, že jsou na μ receptoru dominantní. Se zvyšující dávkou se zvyšuje i jejich analgetický účinek a to bez tzv. stropového efektu, proto se využívají při opravdu silných bolestech [39]. Parciální agonisté mají také vysokou afinitu k μ receptoru, avšak vnitřní aktivitu mají menší. Jejich výhodou jsou méně časté vedlejší účinky, ale jejich analgetický účinek je nižší [35]. Přechodnou skupinou jsou agonisté-antagonisté, kterým kvůli malé afinitě i vnitřní aktivitě dochází k interakcím pouze s receptory κ a δ . Poslední skupinou jsou opioidní antagonisté, jejichž afinita je pro všechny tři receptory bez vnitřní aktivity. Následkem toho se tato látka na receptor naváže, ale nevyvolá žádný účinek [39, 41].

Za zmínku stojí ještě vedlejší účinky opioidních analgetik, které mohou vyvolávat často strach a nedůvěru pacientů. Nadměrné dávkování může vyvolat respirační deprese, dále snížení peristaltiky střev a s tím spojené problémy s vylučováním stolice. U 30 % pacientů se na počátku léčby vyskytuje nauzea a zvracení. Při delší léčbě může dojít k toleranci účinku, což má za následek zvyšování dávky léčiva. Nejznámějším vedlejším účinkem je nepochybně možnost vzniku fyzické i psychické závislosti, kdy při vysazení může dojít k abstinenčním příznakům [37, 39, 41].

3.3.2 Neopoidní analgetika

Velké množství vedlejších účinků opioidních léčiv motivovalo vědeckou obec hledat i jiné alternativy pro léčbu bolesti. Cílem vědců není nahradit opioidní léčiva, ale vhodnou kombinací s neopoidními analgetiky zmenšit množství a intenzitu jejich vedlejších účinků a snížit dávku léčiv, kterou musí organismus zpracovávat [36]. Omezení množství užívaných opioidních látek by mohl mít pozitivní vliv na velké problémy se zneužíváním těchto léků a častým vznikem závislosti, který může skončit i nepřiměřeně velkou dávkou a smrtí [42]. Mezi neopoidní analgetika patří taková léčiva, která primárně neinteragují s opioidním receptorem, ale utlumí bolest prostřednictvím jiných reakčních mechanismů [43].

Nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID)

Jedná se o řadu široce využívaných a dostupných léků, které mají společný mechanismus působení a díky tomu i podobné využití. Léčiva z této skupiny spojují analgetické, antipyretické, protizánětlivé a antirevmatické vlastnosti [44]. NSAID v těle cílí na všudypřítomný enzym cyklooxygenázy COX. Tento enzym je v těle zodpovědný za zánětlivé bolesti a vznik horečky, což způsobuje pomocí syntézy hormonu prostaglandinu [37]. Rozlišujeme tři izoformy tohoto enzymu:

COX-1 se podílí na fyziologických funkcích, trvale se podílí na regulaci gastro a renální ochrany, produkci hlenu a agregaci krevních destiček. Tato izoforma je přítomná v buňkách ledvin, dýchacího traktu a střeva, kde mimo jiné syntetizuje prostaglandiny.

COX-2 je přítomen v zánětlivých buňkách a oblasti zánětu. Zprostředkovává bolest, horečku a zánětlivé reakce, je aktivní v místech poranění. Má taky regulační vlastnosti v oblasti ledvin a reprodukce.

COX-3 je zatím nejméně prozkoumaný enzym, který je spojován s analgetickými vlastnostmi paracetamolu [43, 45].

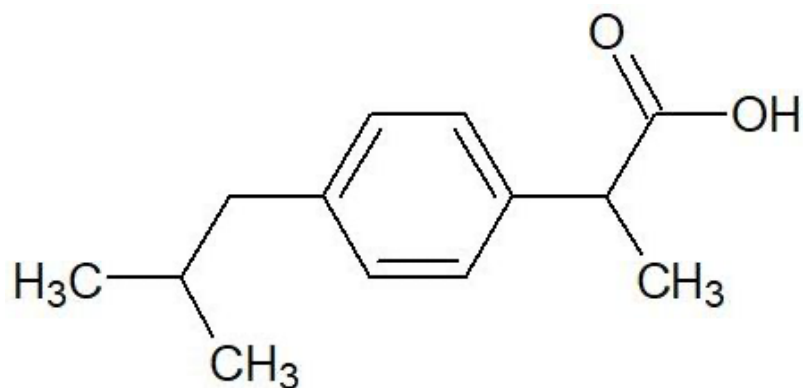
Jak pozitivní schopnosti, tak i nežádoucí vedlejší účinky jsou spojené s inhibicí právě těchto enzymů. Mezi negativní vlivy patří například podráždění žaludku, z kterého se může vyvinout gastrointestinální krvácení, problémy s regenerací poškozené tkáně, narušení autoregulace ledvin, což jsou všechno vedlejší účinky spojované s enzymem COX-1. Proto se výzkum zaměřil na NSAID selektivně inhibující enzym COX-2, což zpočátku přineslo benefity ve formě účinnosti a omezení vedlejších účinků spojených s žaludečními problémy, ovšem pozdější výzkumy prokázaly vysokou míru kardiovaskulárních komplikací [37, 43, 44]. Důležitým využitím NSAID je multimodální léčba bolesti společně s opioidními analgetiky, kde snižují skóre bolesti, dávky opioidních léčiv a tím i jejich vedlejší účinky [42, 46].

V tomto krátkém přehledu vystupují NSAID jako účinná analgetika, vhodná pro úlevu od akutní bolesti nebo pro kombinace s opioidními léčivy. Z důvodu významných vedlejších účinků se nedoporučují k dlouhodobé léčbě chronických bolestí [43].

Ibuprofen

Jedná se o první analgetické léčivo vyvinuté jako derivát kyseliny propionové, které následně rozpoutalo zájem o další vývoj těchto propionik. Jeho úspěch byl velký díky tomu, že se úspěšně vyrovnal svým terapeutickým účinkem již známým analgetikům, ovšem jeho vedlejší účinky byly do značné míry menší [47]. I přesto se mnohé vedlejší účinky související s inhibicí syntézy prostaglandinů objevují, nejčastějšími jsou podráždění gastrointestinální sliznice, což může vyvolat nevolnost, bolesti žaludku a mnohdy i zvracení, změny funkce krevních destiček nebo negativní vliv na bronchiální astma [48].

Ibuprofen je bezbarvý jehličkovitý krystalický prášek o molekulové hmotnosti 206 g/mol [49]. Jeho charakter je kyselý, ve vodě je téměř nerozpustný, vyrábí se nejčastěji ve formě tabletách o dávkování 200–800 mg na tabletu. Je ideální pro orální vstřebávání, z 99 % se váže na proteiny, tělo se léčivé látky zbaví pomocí metabolismu v játrech za 24 hodin od posledního podání formou moči.



Obrázek 11: Strukturní vzorec ibuprofenu

Využití nachází hlavně jako analgetikum, antipyretikum a jako protizánětlivý lék. Nízká dávka ibuprofenu se účinností vyrovná paracetamolu i aspirinu [48]. Racemický ibuprofen S(+)-enantiomer se využívá pro léčbu mírné až střední bolesti, oproti tomu je prokázáno, že jeho protějšek R(-)-enantiomer má daleko nižší farmakodynamickou účinnost. Jedná se o bolesti hlavy, migrény, pooperační bolesti, bolesti zubů a při léčbě revmatoidní artritidy. Princip jeho účinku je neselektivní inhibice cyklooxygenázy COX-1 a COX-2, což způsobí inhibici syntézy prostagladinů [50, 51].

4 KLÍČOVÉ METODY PRO EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K poznání různých chemických a fyzikálních mechanismů je nutné využít nejlepších a nejvhodnějších metod, které jsou k dispozici. Výběr a optimalizace experimentální metody je klíčem ke kvalitním a přesným výsledkům. Franzovy difuzní cely jsou často vyhledávanou aparaturou pro zkoumání transportu látek přes různé typy membrán. Spektrofotometrie a chromatografie v této problematice důležitými technologickými nástroji, jak pro velmi přesné určení koncentrace léčiva i přes množství dalších látek, tak jako rychlá a efektivní kontrola vzorků z difuzních experimentů.

4.1 Difuzní experimenty pro transdermální aplikace

Pro farmakologickou a biofarmaceutickou účinnost léčiv je naprosto klíčovou vlastností jejich pasivní transport. Ať už v různých médiích nebo přes lipidovou dvojvrstvu je difuze proces určující rychlost distribuce léčivých látek do těla [52]. V případě této práce jde o prostup přes vrstvu kůže, což je velmi složitý proces, ve kterém k aktivnímu transportu nedochází. Pro většinu látek bude lipofilní rohová vrstva rychlost omezující bariérou, avšak pokud by byla tato vrstva poškozena, nebo by léčivo vykazovalo silný lipofilní charakter, může být limitujícím faktorem hydrofilní epidermis [10].

Pro matematický popis absorpce léčiv přes kožní membránu se využívá první Fickův zákon s podmínkou nekonečné dávky,

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad (4.1.1)$$

kde J značí difuzní tok, což je rychlost přenosu na jednotku plochy ($\text{g}\cdot\text{cm}^2/\text{h}$), C je koncentrace difundující látky (g/cm^3), x popisuje lineární dráhu transportu (cm) a difuzní koeficient je označený písmenem D (cm^2/h). Záporné znaménko před difuzním koeficientem udává opačný směr přenosu molekul, než je koncentrační gradient.

Fickův zákon popisuje tzv. ustálený (stacionární) stav toku látky, v našem případě léčiva. K tomuto stavu dochází ve chvíli, kdy se rychlost difuze stane konstantní. V případě experimentů s Franzovými difuzními celami jde o situaci, kdy zkoumaná látka projde kožní membránou ve všech vrstvách. Pokud se z celé plochy membrány uvolňuje léčivo, jde o stacionární difuzi. Čas potřebný k dosažení tohoto stavu se označuje jako doba zpoždění τ (lag τ) a je funkcí tloušťky membrány a difuzivity vstřebaného léčiva do epidermální a dermální vrstvy. Tato hodnota se často počítá pomocí grafu závislosti koncentrace penetrované látky na čase, ze kterého se vyberou body odpovídající ustálenému stavu difuze. Tyto body se proloží přímkou a na základě rovnice přímky se vypočítá lag τ [10].

Difuzní koeficient může být vypočítán také z hodnot lag τ a rozměrů tloušťky membrány, a to za použití předpokladu, že v okamžiku prostupu léčiva membránou odpovídá tloušťka membrány střednímu posunu částic léčiva. Pro 1D difuzi se tento vztah vyjadřuje vzorcem pro střední kvadratický posuv:

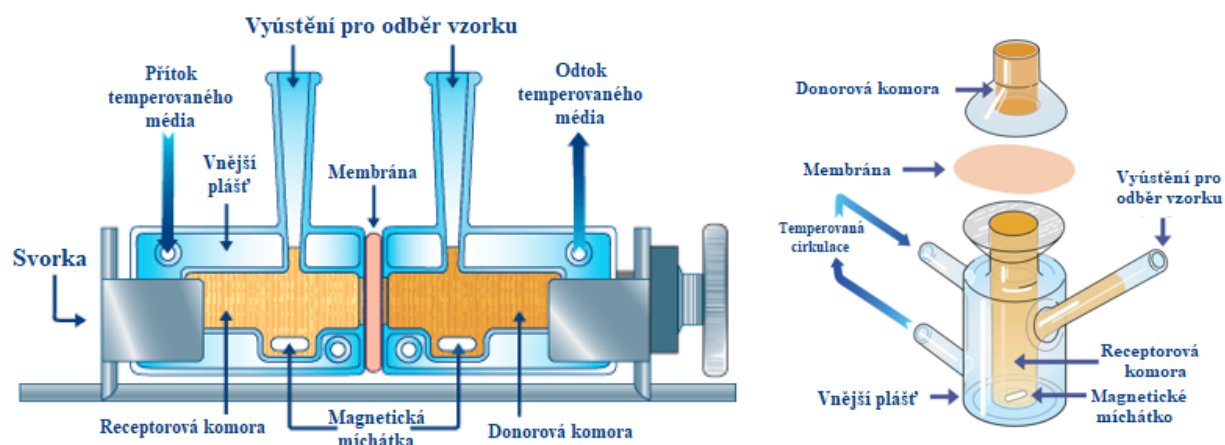
$$x^2 = 2D\tau \quad (4.1.2)$$

Kde l je tloušťka membrány, D je difuzní koeficient a τ značí dobu zpoždění. Všechny jednotky se dají upravit podle potřeb experimentu. Tento model je vhodný pro výzkum difuze léčiv [53–55].

4.1.1 Difuzní komůrky

Mezi hlavní metody zkoumající vztah mezi kůží, léčivem a nosičovým systémem léčiva patří *in vitro* modelování transdermálního transportu pomocí difuzních cel. Již desítky let tato metoda přináší různé informace, které se využívají pro návrh a vývoj nových léčebných přípravků, kontroly kvality nebo zkoumání vlastností přípravků, jako je např. toxicita [56].

Od sestavení první difuzní cely se vývoj v této oblasti posunul k několika různým variantám této aparatury, můžeme je rozdělit do několika kategorií. Základní rozdělení je na statické a průtokové difuzní cely [10]. Jak už název napovídá, u průtokových cel dochází k nepřetržité obnově čistého přijímacího média pomocí pumpy. Této varianty se využívá u špatně rozpustných léčivých látek nebo u léků s řízeným uvolňováním [57]. U statické dochází k odebírání vzorků v daných časových intervalech. Odebraný objem se musí doplnit čistým médiem. Dále můžeme statické difuzní cely rozdělit podle orientace membrány na vertikální a horizontální (viz Obrázek 12). Samotná cely by měla být vyrobena z inertního nedsorbujícího materiálu [10].



Obrázek 12: Dvě možná uspořádání difuzních cel. Vlevo je znázorněna horizontální difuzní cely, vpravo je znázorněna vertikální difuzní cely [58]

Franzova difuzní cely

Jednou z nejpoužívanějších aparatur pro hodnocení transdermálních lékových forem a studium kinetiky přenosu léčivých látek přes membránu je již zmíněná Franzova difuzní cely. Díky její popularitě již vzniklo velké množství různých typů, které se liší jak dávkováním vzorku, tak velikostí a objemem [59].

Aby byl difuzní experiment úspěšný, je třeba znát základní parametry difuzní cely. Mezi tyto důležité údaje patří například objem receptorové komory a velikost efektivní oblasti difuze, který se může lišit v závislosti na velikosti dané cely. Důležitou součástí aparatury je magnetické míchátko, které se stará o homogenizaci látek v donorové komoře a rovnoměrné rozložení teploty přijímacího média. Rychlost a efektivita míchaní musí být nastavena tak, aby

docházelo k co nejrychlejší homogenizaci v celém objemu přijímacího média, ovšem bez vzniku nežádoucího víru, který by mohl narušit vrstvu statické tekutiny přiléhající k membráně. Parametry míchání se dají ovlivnit buď změnou rychlostí míchání nebo typem míchadélka [56].

5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Před experimentální částí je důležité získat přehled o zkoumané problematice, proto je hlubší literární rešerše základem každé vědecké práce. Tato kapitola se bude věnovat třem různým okruhům, a to využitím huminových látek ve farmakologickém odvětví se zaměřením na topické podávání léčiv, porovnání účinnosti různých analgetik v rámci gelů a náplastí a možný výběr membrán simulujících kožní bariéru pro experimenty zaměřené na experimentální studium a modelování transdermálního transportu.

5.1 Vliv huminových látek na transport farmakologických aktivních látek

Spektrum možností, kde by mohli huminové látky pozitivně ovlivnit léčbu pacientů nebo posunout vývoj medicínu, je velmi rozsáhlé. Od léčby zánětů, přes zlepšení hojení ran po potenciální léčbu rakoviny jsou huminové látky zkoumány různými týmy vědců po celém světě [21]. Jejich amfifilní charakter a schopnost tvořit micelární útvary je jedním z hlavních důvodů k výzkumu jejich využití jako nosičových systémů pro různé druhy léčiv. Tato kapitola se bude zabývat posunem poznání v oblasti vlivu na léčiva různého charakteru, a to jak kyselin huminových, tak fulvových.

V první zde zmíněné práci byl zkoumán hydrogel vytvořený ze směsi několika látek, a to alginátu sodného, huminové kyseliny a konjakové gummy. Velká část experimentální náplně práce spočívala v charakterizaci hydrogelu samotného, v závěru studie byla ovšem zkoumána i schopnost enkapsulace kyseliny L-askorbové a její uvolňování z hydrogelu v závislosti na pH. K charakterizaci hydrogelu byla použita technika SEM a FTIR, následoval i experiment uvolňování léčiva in vitro, kde bylo využito UV spektrofotometru. Analýza SEM odhalila vnitřní síťovou strukturu gelu, kde je léčivo zachyceno ke stěně pórů. Ve chvíli nabobtnání gelu dochází k rozšíření vnitřních pórů a kyselina L-askorbová se postupně uvolňuje. Také bylo zjištěno, že adsorptivita a specifický povrch huminové kyseliny zlepšuje účinnost enkapsulace léčiva. Jak moc hydrogel dokáže navázat léčivo a následně jej uvolnit, bylo experimentálně zkoušeno ve fosfátovém pufru s pH = 1,4 a pH = 7,4. Při nízkém pH dochází k inhibici uvolnění léčiva, oproti tomu při pH 7,4 byla účinnost uvolňování vypočítána na cca 95% za 10 hodin. Výstupem z toho článku je, že hydrogel vyrobený ze směsi alginátu sodného, huminové kyseliny a konjakové gummy je vhodným kandidátem pro specifické dodávání léčiv [60].

Další článek [61] pojednává o problematice špatné rozpustnosti léčiv ve vodě a s tím související jejich malou biologickou dostupností. Jednou z technik, jak docílit lepší rozpustnosti léku je tvorba tzv. inkluzních komplexů. V této oblasti hrají huminové látky velkou roli, protože právě tyto komplexy HL tvoří, navíc jsou celosvětově dostupné a toxikologicky bezpečné. Pro experimentální část byl vybrán speciální doplněk stravy označený jako vodný roztok kyseliny fulvové a léčivo ketokonazol. Analýza se skládala ze studia fázové rozpustnosti, DSC, FTIR, rentgenové difrakce (XRD), HPLC i UV-VIS, dialyzační analýzy a také se studiem in vitro permeace střevního vaku krys. Autoři práce všechny výsledky porovnávali s již publikovanými články zabývající se podobnou problematikou. Z experimentů vzešlo několik výsledků a závěrů, jako například zjištění, že optimální koncentrace pro nejlepší rozpustnost léčiva je 4 % roztok kyseliny fulvové, což ale závisí na čistotě izolované kyseliny. Rozpustnost ketokonazolu v komplexu s fulvovou kyselinou se zvýšila o přibližně 621 %. Při studiu

uvolňování léčiva z komplexu se za 60 minut uvolnilo o 37 % více aktivní látky než z čistého léčiva. Co se týče permeability přes střevní vak krys, i tady došlo ke zvýšení oproti čistému léčivu ve vodné suspenzi. Čisté léčivo uvolnilo za 90 minut 68 % aktivní látky, komplexované léčivo 95 %. V závěru studie byla fulvová kyselina pocházející z rašeliny doporučena jako komplexotvorné činidlo zlepšující rozpustnost léčiv ve vodě. V budoucnu by se podle autorů měla vědecká činnost zaměřit na zvyšování čistoty fulvových kyselin, čímž by bylo možné zajistit menší aplikovanou dávku aktivní látky.

Obdobná skupina vědců vypracovala o dva roky později další studii s podobně zaměřenou prací. Špatně rozpustným léčivem zde byl karbamazepin, který se využívá při léčbě epileptických záchvatů. Komplexotvorným činidlem zde byla kyselina fulvová izolovaná z rašeliny. Pro experimentální analýzu byl použit XRD, FTIR a DSC. Opět byl proveden experiment se střevním vakem pro analýzu penetrace vybrané aktivní látky. Rozpustnost karbamazepinu se zvyšovala s koncentrací fulvové kyseliny. Maximální zvýšení bylo zaznamenáno pro 4% kyselinu fulvou, která se následně v této koncentraci používala pro další analýzu. Rozpustnost léčiva se díky komplexu zvýšila o cca 99 %, stejně tak u uvolnění karbamazepinu z komplexu došlo ke zvýšení z 39 % čisté látky na 79 % a nakonec i u permeace komplexu přes střevní vak vykazovalo přibližně 21 % zvýšení. V závěru autoři odkazují na studii, kde bylo pro stejnou aktivní látku využito huminových substancí ze shilajitu. Tento výzkum měl přinést důkaz o tom, že i fulvová kyselina z rašeliny, která má výrazně menší čistotu, dokáže významně ovlivnit rozpustnost léčiv, a proto je vhodnou, a hlavně levnější a dostupnější alternativou, než kyselina izolovaná z shilajitu [62].

Huminové látky by mohli nejen zlepšovat rozpustnost léčiv, mohli by také zvyšovat fotostabilitu některých kosmeticky nebo farmaceuticky aktivních látek. Na analýzu vlivu huminových látek na fotostabilitu a rozpustnost β -karotenu se zaměřila následující studie [63]. Karotenoidy jsou známe díky své antioxidační aktivitě a používají se jako prevence vůči několika degenerativním nemocem. Nevýhodou je jejich špatná rozpustnost ve vodném prostředí a fotolabilita, která snižuje jejich pozitivní účinek na organismus. Cílem této práce bylo syntetizovat komplexy β -karotenu s huminovou kyselinou v různých poměrech a analyzovat vlastnosti těchto komplexů. Stanovení a charakterizace komplexů bylo provedeno pomocí HPLC, FTIR a DSC, zatímco antioxidační aktivita byla stanovena metodou TEAC. V první fázi byla zakoupena sodná sůl huminové kyseliny, která byla následně čištěna a pomocí několika reakcí byla izolována kyselina huminová. Samotná syntéza komplexů byla provedena v atmosféře dusíku, a to v různých poměrech. Při kontrole komplexace bylo zjištěno, že obsah β -karotenu nesouvisí s efektivitou komplexace. Komplexy s huminovou kyselinou způsobily zvýšení fotostability a rozpustnosti ve vodě. Také došlo ke snížení oxidační degradace a poklesu antioxidačních vlastností β -karotenu. Autoři článku proto tyto komplexy doporučují pro zlepšení vlastností β -karotenu se zachováním jeho biologické aktivity.

Dalším možným využitím huminových kyselin může být v oblasti řízeného uvolňování léčiv. Autoři dalšího článku použili 3D tisk k tvorbě tablety huminové kyseliny-polyquaternium 10 s řízeným uvolňováním s fixní kombinací dávek. Aktivními látkami byla léčiva efavirenz, tenofovir disoproxil fumarát a emtricitabin, které slouží k léčbě HIV-1. Studie se zabývala chemickými interakcemi, mechanickou pevností a morfologií vytisknutých tablet. Následoval

výzkum uvolňování léčiv in vitro v biorelevantních médiích a na závěr proběhla srovnávací studie in vivo dostupného léku Atripla s vytvořenými tabletami na živých prasatech. Autoři se z velké části zaměřili na vývoj samotné tablety vyrobené pomocí 3D tisku. Uvolňování léčiva testovali pomocí simulované žaludeční tekutiny, vzorky z tohoto testu byly analyzovány pomocí UV spektrofotometrie. Studium in vivo bylo provedeno v několika standardních dávkách, prasatům byl ve stanovených časech odebrán vzorek krve, který byl následně analyzován ultravýkonnou kapalinovou chromatografií (UPLC). Autorům práce se podařilo vytvořit cílovou tabletu s kombinací všech tří zmíněných léčiv. In vivo analýza potvrdila funkčnost řízeného a cíleného uvolňování anti-HIV léčiv. Ve srovnání s konvenční tabletou si lépe vedla léčiva tenofovir a emtricitabin z hlediska maximální absorbované koncentrace. Léčivo efavirenz bylo v plazmě detekováno v menší míře než při použití konvenčního vzorku. Výroba léčiv pomocí 3D tisku má podle autorů velký potenciál, jen je potřeba ještě větší množství studií, než se dostane do běžné praxe [64].

Poslední vědecká práce této kapitoly se zabývá zvýšení rozpustnosti paclitaxelu (PTX), což je chemoterapeutický lék s protirakovinným účinkem. K tomuto cíli autoři článku využili jako komplexotvorné činidlo kyselinu huminovou, kterou získali ze shilajitu a syntetizovali komplexy PTX-HA v několika hmotnostních poměrech. Pro analýzu vytvořených komplexů využili DSC, XRD, SEM, FTIR, UV-VIS spektrofotometrii a in vitro rozpouštěcí experiment ve speciálním zařízení lopatkového typu. Výsledky experimentů prokázaly, že rozpustnost komplexu PTX-HA byla mnohonásobně zvýšená, nejvíce v hmotnostním poměru 2:1 (HA:PTX). Tento jev si vědci vysvětlují vzniklými inkluzivními komplexy, které vznikají díky amfifilnímu charakteru huminových kyselin. Pomocí DSC a FTIR analýzy bylo odhaleno možné spojení v komplex PTX-HA. Výsledky z XRD popisují částečnou ztrátu krystalinity PTX, což by mohlo mít vliv na zlepšení rozpustnosti tohoto léčiva. Studie uvolňování prokázala 100% uvolnění léčiva u všech hmotnostních poměrů, ovšem komplex 2:1 uvolnil léčivou látku nejrychleji. Také byla zkoumána penetrace přes střevní vak krys, kde komplex penetroval do střeva rychleji než čistý lék, a to až o 36 %. Komplexy tohoto léku s HA byly doporučeny pro další výzkum [65].

5.2 Analgetika ve formě transdermálního léčiva

Léčivé přípravky s obsahem různých analgetik jsou mnohými z nás používány takřka na pravidelné bázi. Důvodů, proč se tolik odborných prací zabývá transportem léčiv přes kůži je hned několik. Vzniklý zdravotní problém může být díky tomu řešený lokálně, což významně snižuje možné vedlejší účinky a celkový dopad na celý organismus. I snížení množství aktivní látky, které je pro úlevu od bolesti potřeba, jde ruku v ruce s cíleným použitím. Výhodou může být také komfortnější podání přípravku samotného, například formou náplastí nebo gelů, což je pacienty přijímáno lépe než perorální cestou. Pokud jde o transdermální formu léčby, výzkumy mají jasně vytyčené cíle. Hlavním tématem je najít léčivo s rychlým vstřebáním přes kožní bariéru, s vysokou účinností a se zanedbatelnými vedlejšími účinky. Mnohdy je však snazší využít již známého léku a využít zesilovače permeace, který mu v přestupu přes kůži pomůže. Tato a další témata budou rozebírána v této kapitole.

Autorům studie [66] chybělo srovnání komerčně dostupných topických NSAID přípravků z hlediska jejich schopnosti absorpce kůže a protizánětlivou aktivitou. Proto vybrali 6 komerčních přípravků na bázi diklofenaku a 6 přípravků na bázi ibuprofenu, které podrobili in vitro experimentům na lidské kůži za pomoci Franzových difuzních cel. Vzorke odebírali časech 2, 4, 8, 16, 24 hodin, k analýze vzorků využívali kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Jejich cílem bylo stanovit množství léčiva, které za určenou dobu dosáhne první vrstvy dermis a zároveň odhadnout protizánětlivou aktivitu vybraných NSAID. Výsledkem jejich studie bylo zjištění, že diklofenak vykazuje lepší protizánětlivou aktivitu v porovnání s ibuprofenem, ovšem rychlost penetrace ibuprofenu byla vyšší. Odlišnost v rychlosti penetrace si vysvětlovali rozdílným složením, koncentrací léčiva, výběrem pomocných látek nebo rozdílnou formou soli.

Autor publikace [67] si dal za cíl vyvinout transdermální gel na bázi ibuprofenu, jehož vlastnosti penetrace budou lepší než u komerčního produktu. Pomocí chitosanu vytvořil několik typů gelu se stejnou koncentrací ibuprofenu, ale s přidavkem různých enhancerů. Takto připravené gely podrobil několik in vitro testům z hlediska jejich pH, viskozity a schopnosti absorbovat dané léčivo a následně využil také in vivo testu na vyhodnocení protizánětlivé a analgetické aktivity. Jako zesilovače permeace byli vybráni mentol, glycerol, propylenglykol, propanol, kyselina olejová a polyethylenglykol. Pro analýzu vzorků použil viskozimetr, pH metr, Franzovy difuzní cely se syntetickou hydrofilní membránou a detekcí uvolněného ibuprofenu pomocí HPLC. Pokusy in vivo praktikoval na myších a králících. Výsledky ukázaly, že protizánětlivý efekt ibuprofenu nebyl ani u jednoho zkoumaného gelu prokázán, což si autor vysvětluje nízkou koncentrací ibuprofenu, který se dostane přes kožní bariéru. Co se týče rychlosti penetrace, vyšší analgetický účinek vykazoval gel s přidavkem mentolu a propylenglykolu. Mentol podle studie může urychlit vstřebávání díky narušení lipidové složky kůže, tvorbě eutektických směsí nebo uvolnění vazodilatačních peptidů. Propylenglykol má dle studie jiný mechanismus, díky hydrokopickému charakteru propylenglykolu dochází k navázání vody z buněk korneocyty a následné hydratace pokožky, která má za následek zvýšení penetrace léčiva.

Následující článek [68] přináší velmi zajímavé srovnání gelové a perorální analgetické formy léčiva. Porovnávanými formulacemi byly ibuprofen 5% gel a ibuprofen 400 mg tablety. Cílem experimentu bylo určit, do jaké míry má která forma vliv na úlevu od bolesti, způsobené akutním poraněním měkkých tkání, jako jsou například vymknutý kotník, koleno, rameno, nebo modřiny na různých částech těla. Pacienti užívali buď aktivní gel a placebo tablety nebo placebo gel a tablety s aktivní látkou po dobu minimálně 7 dnů. Gel byl aplikován jednou denně na postižené místo a tablety byly užívány třikrát denně perorálně. Experiment probíhal tak, že pacienti hned po zahájení léčby hodnotili na škále od 1 do 10 (10 = nejhorší možné) několik aspektů, jako intenzitu své bolesti v klidu, v pohybu, citlivost. Toto hodnocení prováděli na začátku léčby, po půl hodině a následně každý den po dobu minimálně 1 až 2 týdnů. Hodnotil se také otok v místě poranění a preference lékové formy. Výsledná data vykazovala srovnatelnou účinnost aktivní gelové formy s aktivní látkou ve formě tablet. Tento závěr ukazuje, že gelová formulace ibuprofenu se v této studii vyrovnala svým účinkem perorální, což by v budoucnu mohlo znamenat menší míru dopadu vedlejších účinků, které jsou ve spojení s perorálními NSAID obvyklé.

Další skupina látek, která je považována za možnou variantu zesilovačů penetrace, jsou esenciální oleje. Autor studie [69] srovnával 5 různých esenciálních olejů a zkoumal, které mají nejlepší vliv na zlepšení transdermálního podávání ibuprofenu v léčbě dysmenorey. Tato lékařská diagnóza je charakterizovaná křečovými bolestmi v oblasti podbříšku, a to hlavně před nebo během menstruace, což ovlivňuje kvalitu života mnohých žen. Dysmenoreou různé intenzity trpělo okolo 80 % dotazovaných respondentek, jedná se tedy o rozsáhlý trend. Mezi esenciální oleje byli zařazeni Hřebíčkový a Skořicový olej, Angelika olej, Azon, posledními jsou Chuanxiong a Cyperus olej. Ve zmíněné studii se zkoumal jak vliv olejů na penetraci aktivní látky, tak i jejich složení. Pro zkoumání transdermálního transportu se již tradičně použila aparatura Franzových difuzních cel s detekcí pomocí HPLC. Jako membrány se používala kůže z břišní oblasti myši, která byly následně analyzované pomocí infračervené spektroskopie ATR-FTIR. Z výsledků vyplývá, že nejlepší vliv na zlepšení kožní permeace má olej Chuanxiong, proto se doporučuje jako ideální zesilovač penetrace mezi esenciálními oleji.

Cílem následující studie [70] bylo zmapovat vliv pH na pronikání NSAID přes kůži a prozkoumat mechanismus tohoto účinku. Autoři vybrali pět zástupců analgetik ze skupiny NSAID a to diklofenak, ketoprofen, naproxen, ibuprofen a flurbiprofen. Jako aparaturu použili horizontální uspořádání difuzních cel s membránou z lidské kůže, kterou doplňovala celulósová membrána. Účelem celulózové membrány bylo zabránit poškození a vytvořit oporu pro kožní membránu. Následně uskutečnili dva typy experimentů, a to za asymetrických podmínek, kdy udělali řadu experimentů s různým pH v donorové části, a za symetrických podmínek, kdy udržovali stejné pH v donorové i receptorové části. Na začátku a na konci každého experimentu měřili autoři napětí kožní membrány. Hodnotu napětí přepočítali na odpor, podle kterého kontrolovali, že jsou membrány nepoškozené. Změřený odpor na konci experimentu využívali k odhadu koeficientu permeability. Pro další měření využili již klasické metody HPLC s UV-VIS detektorem. Výsledky odhalily, že podíl neionizovaných NSAID v dárcovském roztoku zvyšoval schopnost penetrace léků přes membránu, což značí, že hodnota pH roztoku v donorové části aparatury je hlavním faktorem průniku léčiv. Oproti tomu pH v přijímacím roztoku nemělo na penetraci žádný vliv. Jako hlavní permeační mechanismus pro NSAID byl označen průchod přes lipofilní dráhy rohové vrstvy kůže pomocí volných kyselin analgetických sloučenin [70].

Autoři dalšího článku zkoumali, jaký vliv má zvyšující se množství etanolu na různé vlastnosti ibuprofenu, jako rozpustnost, permeabilita, ionizace, a to v rámci dermálního transportu. Připravili několik vzorků nasyceného léčiva rozpuštěného ve vodě a etanolu v různých poměrech. Pro difuzní experimenty si vybrali aparaturu Franzových difuzních cel. Pro analýzu vzorků použili HPLC, UV-VIS a ATR-FTIR spektroskopii a jako membrány pro transdermální transport byly vybrány lidská kůže a silikonová membrána. Z výsledků bylo zřejmé, že u silikonové membrány docházelo k zvýšení průchodu ibuprofenu v závislosti na koncentraci etanolu. Oproti tomu u lidské kůže byl optimální poměr pro transport léčiva 50:50 nebo 75:25 etanol-voda. U čistého etanolu došlo ke snížení penetrace, což si autoři odůvodnili dehydratací pokožky způsobenou právě etanolem. Z výsledků z ATR-FTIR odhalili přítomnost jak monomeru, tak i dimeru, což může mít vliv na případný transport [71].

5.3 Porovnání membrán pro zkoumání kožního transportu

V rámci využití Franzových difuzních cel jako optimální aparatury pro zkoumání transdermálního transportu léčiv se nabízí hned několik různých typů membrán, od biologických, které se získávají z různých částí zvířat nebo lidí, po synteticky vyrobené z různě upravených polymerů. U membrán z lidské kůže by mělo dojít ke schválení etickou komisí. Obě možnosti v sobě skrývají různé výhody a nevýhody, proto se musí přihlídnout jak na opakovatelnost a reprodukovatelnost experimentu, což upřednostňuje spíše syntetické membrány díky přesným parametrům jejich výroby, tak na přiblížení se reálným aplikacím a opravdovému fungování lidského kožního systému, což je naopak devizou spíše biologických preparátů. Následující přehled prací by měl vyzdvihnout právě všechna pro i proti a přinést obecný přehled o dané problematice.

Jak již bylo naznačeno v úvodu, při výběru membrány pro výzkum penetrace léčiv je důležité se co nejvíce přiblížit strukturním vlastnostem kůže člověka. Pro každou studii s tímto zaměřením je srovnání různých typů membrán velmi důležité. Proto se autoři studie [72] rozhodli porovnat kožní membránu izolovanou z vepřové ucha s kůží lidského předloktí. Jako aktivní látky pro porovnání transdermálního transportu vybrali fluorescein sodný a kurkumin z komerčně dostupných hydrogelů a mikroemulzí amfifilních krémů. K samotnému experimentu využili in vitro techniku stripovací pásky, která je založena na účinku adhezivní fólie odstranit povrchové buňky korneocyty z rohové vrstvy. K analýze použili několik různých technik, jako třeba NIR-denzotometrii nebo fluorescenční a UV-VIS spektroskopii. U většiny přípravků byly výsledky velmi průchodu léčiva velmi podobné. Jediný přípravek, a to mikroemulze s fluoresceinem, byl zaznamenán určitý rozdíl mezi množstvím prošlého léčiva in vitro a in vivo. Autoři tento výsledek okomentovali s tím, že při experimentech in vivo docházelo k neustále fyziologické hydrataci kůže, oproti tomu u izolované tkáně prasečího ucha tento stupeň hydratace s časem klesal, což mohlo ovlivnit penetraci hydrofilních léčiv více než lipofilních. Ovšem jasným závěrem je zjištění, že biologická membrána z vepřového ucha je vhodným modelem pro experimenty podobného charakteru.

Další studie [73] si pro porovnání vybrala hned několik možností membrán, a to jak biologických, tak i ekvivalentu kultivované kůže nebo epidermis. Cílem autorů bylo zjistit, jestli by modely lidské kultivované kůže mohli být v budoucnosti alternativou pro různé permeační studie. Pro tento výzkum si vybrali následující modely kůže, a to lidskou, krysí, prasečí, ekvivalent pro lidskou kůži Graftskin a lidskou kultivovanou epidermis Skinethic. Aktivní látky, které nechali penetrovat přes zmíněné membrány, vybírali tak, aby se lišily hlavně svou polaritou čímž získali data pro větší spektrum léčiv. Z topických dermatologických léků tedy vybrali kyselinu salicylovou, terbinafin, klotrimazol a hydrokortison. Pro dermální transport si vybrali aparaturu Franzových difuzních cel, získané vzorky separovali a analyzovali pomocí HPLC a na konci experimentu pomocí průhledné lepící pásky odebrali vzorky rohové vrstvy z již použitých membrán. Díky chromatografii získali data o rychlosti permeace sloučenin do receptorové tekutiny a díky izolaci rohové vrstvy mohli zjistit koncentraci zkoumané sloučeniny v této vrstvě. Z výsledků vyplývá, že model kůže Graftskin je adekvátní alternativou lidské membrány jen pro kyselinu salicylovou, zatím co pro hydrofobnější vzorky byla tato membrána několikanásobně propustnější než lidská kůže. Autoři

tento výsledek okomentovali tak, že většina léčiv má spíše hydrofobní charakter, proto je tento výsledek pro velké spektrum léků neuspokojivý. U vzorku kultivované lidské epidermis Skinethic byla permeace u všech aktivních látek mnohonásobně vyšší. Jako nejlepší alternativou pro transdermální transport byla označena prasečí kůže.

V následující studii [74] byl zájem autorů zaměřen na transdermální transport aktivní látky tramadolu, a to jak v in vitro, tak v in vivo experimentech. Tentokrát byly jako membrány vybrány kůže prasete a kůže z oblasti břicha myši a morčat. Všechny pokusy byly spojeny s využitím anodické ionoforézy s použitím Ag/AgCl elektrod, a to z důvodu nedostačující intenzitě pasivní difuze tramadolu při transdermálních aplikacích. In vitro studie byla zaměřená na permeaci tramadolu v závislosti na proudu, ve studii in vivo cílené na průnik léčiva kůží živého morčete byla měřena koncentrace tramadolu v krevní plazmě. Průnik léčiva in vitro byl analyzován pomocí horizontálních difuzních cel, odebrané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC s detekcí UV. Při experimentech in vivo byla ionoforetická náplast s obsahem tramadolu a katodická náplast obsahující fyziologický roztok připevněna na oholenou kůži břišní části morčat. Morčata byla při vědomí a v určitých časových úsecích jim byl odebírán vzorek krve přes kanylu. Následně byl vzorek analyzován pomocí LC/MS/MS. Při zhodnocení výsledků došli autoři studie k závěru, že transport tramadolu se významně nelišil z pohledu mezidruhových rozdílů biologických membrán. Současně s tím porovnávali i rozdíly mezi čerstvě izolovanou kůží a zmrazenou kůží prasete, rozdíly ve výsledcích byly ovšem minimální. V článku je zmíněno několik studií, které při experimentech s indukovanou anodickou iontoforézou došly k podobným výsledkům, kdy propustnost látek při tomto typu experimentu není ovlivněna typem pokožky a podmínkami skladování. Transport aktivní látky se u všech typů membrán zvyšoval v závislosti na proudu, což znamená, že perkutánní podání tramadolu může být řízeno změnou síly proud.

Synteticky vyrobené membrány Strat-M jsou vyhledávanou alternativou pro lidské kožní membrány. Řada studií se zabývá jejich propustností pro různé aktivní látky v porovnání s konkurenčními membránami. V článku [75] autoři srovnávají Strat-M membránu s kůží potkana, člověka a kůží z prasečího ucha. Účinná látka v této studii, amfotericin B, je vysoceúčinně antimykotikum, které bylo podávané ve formě nanogelu. Studium penetrace bylo prováděno na Franzových difuzních celách, vzorky byly následně analyzovány na HPLC. Samotné membrány byly analyzovány pomocí rastrovací (SEM) a transmisní (TEM) elektronové mikroskopie, pomocí analyzátoru plochy povrchu a pórovitosti byla měřena velikost pórů. Pomocí matematického modelu byl vypočítán faktor podobnosti profilu uvolňování léčiva. Rychlost pronikání byla největší u kůže potkana, následovala kůže prasečího ucha, Strat-M membrána a nejmenší byla u lidské kůže. Velká rychlost transdermálního toku u kůže potkana byla vysvětlena rozdílnou tloušťkou a složení intracelulárních lipidů v rohové vrstvě. Výsledky elektronové mikroskopie popsaly Strat-M membránu jako hladkou a kompaktní, s povrchem podobným rohové vrstvě lidské kůže. Průřez membrány odhalil několik vrstev, ze kterých se membrána skládá, podobně jako lidská kůže. Na závěr je doporučení Strat-M membrány, jako účinnou alternativou pro studium propustnosti kůže.

Jedním z cílů dalšího článku [76] je obdobné porovnání Strat-M membrány s biologickými alternativami, jako je prasečí kůže, krysí a myši. Také léčivo cílí na plísňové infekce, obdobně

jako v předešlém článku. Zde je léčivo podáváno prostřednictvím lipidových nanonosičů ve formulaci elastického lipogelu a ethogelu. Experimenty penetrace látek přes různé membrány byly provedeny pomocí Franzových difuzních cel, vzorky odebrané z přijímacích cel byly následně měřeny na UV-VIS spektrofotometru. Dalšími metodami studie membrány byly SEM a konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM). Zkoumané parametry z hlediska prostupu léčiva byly koeficient propustnosti, množství usazeného léčiva, transdermální tok v ustáleném stavu, a další. Rychlost penetrace byla pozorována v pořadí od nejrychlejšího po nejpomalejší průnik: kůže z myši > kůže potkana > kůže prasete > lidská kůže > Strat-M. Díky mikroskopii SEM bylo dokázáno, že lipogel a ethogel podporují tvorbu pórů, což je základní mechanismus pro lepší penetraci léčiva. CLSM byla použita na analýzu hloubky prostupu kůží, vybraným modelem membrány byla kůže potkana, kde bylo zjištěno, že vybrané formulace léčiv oproti kontrolní skupině, vykazují zvýšení intenzity průniku aktivní látky. Autory byla Strat-M membrána hodnocena jako alternativa pro lidskou kůži, prasečí byla hned na druhém místě.

Posledním článkem, který uzavírá tuto krátkou kapitolu, je práce [77] v níž naposledy srovnáme syntetické membrány s alternativou prasečí pomocí Franzových difuzních cel. Pro transdermální experimenty byla vybrána aktivní látka rivastigmin, která se ve formě náplasti používá při léčbě mírné až středně těžké demence u Alzheimerovy choroby. Mezi syntetické membrány, které byly srovnávané, bylo zařazeno několik silikonových, celulózových a polyethersulfonových (Strat-M) membrán. Výsledné vzorky byly podrobeny analýze pomocí HPLC. Silikonová membrána s nejtlustší šířkou, a tím i dráhou penetrace, na začátku experimentu propouštěla v porovnání s ostatními významně menší množství léčiva, což se však v průběhu experimentu změnilo a následně se koncentrace prošlé aktivní látky tolik nelišila. Autoři si tento jev vysvětlují tím, že počáteční zdražení rychlosti prostupu zapříčinila tloušťka membrány, ovšem výsledek ukazuje její malý difuzní odpor. Obdobně byly hodnoceny i celulózové membrány. Oproti tomu syntetická Strat-M svými výsledky penetrace korelovala s výsledky membrány z prasečího ucha, což naznačuje podobnost ve funkci difuzní bariéry, což bylo zmíněno i v závěru celé práce.

Přestože syntetická Strat-M membrána je pro řadu studií nejlepší volbou pro celou řadu aktivních látek, v bakalářské práci [81], na kterou tato diplomová práce navazuje se ukázalo, že není vhodným kožním modelem pro všechny typy API. Z tohoto důvodu se experimentální část zaměřila na biologický model prasečí kůže jako druhou široce doporučovanou alternativu.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V následující části budou popsány všechny přípravy zásobních roztoků lignohumátu, roztoků s aktivními látkami, použité přístroje a aparatury. Podrobně budou popsány postupy sestavení Franzových difuzních cel a zpracování kůže vepřového ucha jako modelu pro transdermální experimenty i s fotodokumentací. Součástí této kapitoly je také seznam použitých chemikálií, přístrojů a dalších pomůcek nutných pro případnému zopakování daných experimentů. V závěru bude kapitola o práci s použitými laboratorními přístroji, jako jsou pH-metr, UV-VIS spektrofotometr a HPLC, které sloužili na závěrečnou analýzu vybraných vzorků.

6.1 Použité chemikálie

Lignohumát draselný	Amagro Humic Substances s.r.o.
Ibuprofen	Sigma-Aldrich; CAS: 15687-27-1
Ibuprofen sodný	Sigma-Aldrich; CAS: 31121-93-4
Lukosan M14-inertní silikónová pasta	Lučební závody a.s. Kolín
Destilovaná voda	

6.2 Použité přístroje

Lednice	LIEBHERR profi line
UV-VIS spektrometr	Hitachi U-3900H
Vícemístné magnetické míchadlo	CIMEREC I Poly; Thermo-Scientific
Digitální váhy	SCALTEC SPB 52
Analytické váhy	DENVER 224A
Kapalinový chromatograf	Agilent 1260 Infinity
pH metr	S20 SevenEasy
Mikrometr třmenový	kinex 7002

6.3 Další pomůcky a příslušenství

Franzova difuzní cela	SES GmbH-Analysesysteme
Automatická pipeta 1–10 ml	Eppendorf Research plus
Parafilm	Bemis
Jehly (0,8–120 mm)	B Braun Melsungen AG
Injekční stříkačky (10 ml)	Analytix Santiago
Filtry na injekční stříkačky (0,45 µm)	Chromservis
Vialky	Agilent Technologies
Reagenční láhev-Simax	Verkon
QS kyveta	Hellma Analytics
QS mikro kyveta	Hellma Analytics
Skalpel	Martor Skalpellklinge No. 11.50
Špičky na automatickou pipetu	
Kovové svorky	
Míchadélka	
Dřevěné prkénko	
Alobal	

6.4 Příprava všech potřebných roztoků použitých při laboratorních experimentech

6.4.1 Příprava kalibračních roztoků aktivních látek

Základem pro kvantitativní analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie je příprava kalibrační řady zkoumané látky v takové rozsahu, který přibližně odpovídá očekávaným budoucím výsledkům. Proto byly připraveny roztoky ibuprofenu sodného o koncentraci 15; 1,5; a 0,15 mg/l. Ibuprofen v kyselé formě byl namíchán jako nasycený roztok ve směsi ethanol-voda (v poměru 1:5). Pro tento poměr byla vytvořena kalibrace se 10; 100; 500; 1 000 a 5 000násobným zředěním. Pro experimenty s emulgátorem ve formě etanolu byl připraven ibuprofen o koncentraci 1 g/l, který byl pro kalibraci naředěn na koncentrace 0,1; 0,01 a 0,001 g/l. Všechny roztoky byly míchány v destilované vodě.

6.4.2 Příprava zásobních roztoků lignohumátu draselného

Lignohumát draselný byl jednou z hlavních složek celé diplomové práce. Tento tmavě hnědý prášek je velmi dobře rozpustný ve vodě, kterou výrazně zbarví. Před každou sadou experimentů byl na digitálních vahách navážen 1 g lignohumátu pro roztok o koncentraci 10 g/l a 5 g lignohumátu pro roztok o koncentraci 50 g/l. Takto navážený prášek byl pokaždé kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku a vždy velmi důkladně promíchán.

6.4.3 Příprava roztoků aktivních látek pro následné difuzní experimenty

Ibuprofen sodný je lépe rozpustný ve vodě než jeho kyselá forma. Proto se postup přípravy u obou léčiv lišil. Roztok ibuprofenu sodného byl připraven následovně: na analytických vahách bylo naváženo 0,003 g ibuprofenu sodného. Navážený prášek byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 20 ml a ta byla pomocí destilované vody doplněna po rysku. Takto byl připraven roztok o koncentraci 150 mg/l.

U kyselé formy ibuprofenu bylo nutné využít prostředí etanolu a destilované vody, aby se tato aktivní látka, velmi špatně rozpustná ve vodě, alespoň částečně rozpustila. Proto byl připraven jeden nasycený roztok a druhý roztok o koncentraci 1 g/l. Na analytických vahách bylo naváženo 0,05 g ibuprofenu, toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno etanolem po rysku. Po řádném promíchání byl celý objem převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn destilovanou vodou. Přídavek vody způsobil vznik sraženiny, která byla filtrována stříkačkovými filtry s póry o velikosti 0,45 μm . Filtraci bylo nutné provést ve třech opakováních, aby byl nasycený roztok zbaven všech sraženin. Takto připravený roztok ibuprofenu ve směsi ethanol-voda (poměru 1:5) byl převeden do lahve ependorf.

Dále bylo na analytických vahách naváženo 0,1 g ibuprofenu, následně bylo toto množství kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněno pomocí etanolu po rysku. Vzniklý roztok byl po promíchání převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. V tomto případě nedošlo ke vzniku sraženiny, což znamenalo, že byl ibuprofen zcela rozpuštěn. Takto připravený roztok ibuprofenu v poměru 1:1 o koncentraci 1 g/l byl převeden do lahve ependorf.

6.4.4 Příprava roztoků aktivních látek s přidavkem lignohumátu sodného

I zde se bude postup přípravy ibuprofenu sodného s jeho kyselou formou lišit. Obecně je postup stejný jako u čistých roztoků ibuprofenu, jen byly místo destilované použity roztoky lignohumátu draselné o různých koncentracích. Na analytických vahách bylo naváženo 0,003 g ibuprofenu sodného, který byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 20 ml. Odměrná baňka byla doplněna po rysku pomocí roztoku lignohumátu draselného, a to buď o koncentraci 10 g/l nebo 50 g/l. Roztok byl důkladně promíchán a převeden do lahve ependorf.

Pro ibuprofen v kyselé formě bylo na digitálních vahách naváženo 0,2 g lignohumátu draselného, který byl následně převeden do odměrné baňky o objemu 20 ml, doplněn po rysku již namíchaným roztokem ibuprofenu buď ve formě nasyceného roztoku nebo o koncentraci 1 g/l a důkladně promíchán. Vzniklé roztoky ibuprofenu s přidavkem lignohumátu o koncentraci 10 g/l byly převedeny do lahve ependorf.

Stejně tak byl na digitálních vahách navážen 1 g lignohumátu draselného. Toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 20 ml a doplněno roztokem ibuprofenu buď ve formě nasyceného roztoku nebo o koncentraci 1 g/l po rysku. Vzniklý roztok musel být velmi důkladně promíchán pomocí míchadélka a magnetického míchadla, neboť takové množství lignohumátu je hůře rozpustné a často ulpívá na dně odměrné baňky. Následně byly vzniklé roztoky ibuprofenu s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l převedeny do lahve ependorf.

6.4.5 Příprava zásobního roztoku emulgátoru ve formě etanolu

Byl připraven zásobní roztok emulgátoru pro závěrečné experimenty s kyselou formou ibuprofenu: do odměrné baňky o objemu 250 ml bylo pomocí nedělené pipety napipetováno 125 ml etanolu, tento objem byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravený zásobní roztok byl použit jako receptorová kapalina do Franzovy difuzní cely.

6.5 Izolace membrán pro demonstraci transdermálního transportu léčivých látek

Jak vyplývá z rešerše v kapitole 5.3, kůže z prasečích uší je v transdermálních difuzních experimentech častou a doporučovanou alternativou pro lidskou kůži, a to díky podobné tloušťce rohové a epidermální vrstvy, tvaru keratinocytů, folikulární struktury a hloubce folikul, jak vykazují některá studie [78–80]. Nabízí se i syntetické alternativy, jako je třeba membrána Strat-M, ta byla ovšem použita již v bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje [81]. Membrána z prasečího ucha byla vybrána jako vhodná varianta pro studium penetrace léčiv přes kožní membránu.

6.5.1 Podrobný postup přípravy membrán z prasečích uší

Základem pro práci s prasečímá ušima byl článek [80], kde skupina vědců standardizuje ideální postup pro přípravu těchto biologických membrán. Důležitým krokem je zajistit si zdroj biologického materiálu, v tomto případě prasečích uší. Článek popisuje jako ideální variantu zdroje jatka, která by měla být v dobré vzdálenosti od laboratoře a zaměstnanci by byli podrobně seznámeni se základními parametry uší pro vědeckou činnost. Prasečí uší by měly

být bez jakéhokoliv mechanického poškození a neměly by jevit žádné známky kožních nemocí. Hned po odejmutí uší by měly být zabaleny do pěnového boxu s ledovou tříští a přesunuty do předem stanoveného vědeckého pracoviště, kde by mělo dojít k jejich okamžitému použití. S cílem co nejvíce se přiblížit těmto doporučením bylo osloveno místní řeznictví Maso uzeniny – Jana Macháčková, kde byli ochotní čerstvé prasečí uši poskytnout. Na prodejně byly uši skladované v lednici, ze které byly odebrané pro přesun na pracoviště autora (Fakulta chemická VUT v Brně). Zde došlo k okamžitému zpracování na kožní membrány. Proces izolace byl však tak časově náročný, že by několikahodinový experiment s odběrem po jedné hodině nebyl na pracovišti možný. Proto byly vzniklé membrány zabaleny do alobalu a uloženy do mrazáku, kde byly skladovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Podle článku se takto skladované uši musejí využít do tří měsíců od uložení do mrazáku, ovšem pouze v případě, že jsou balené ve vzduchotěsném obalu.



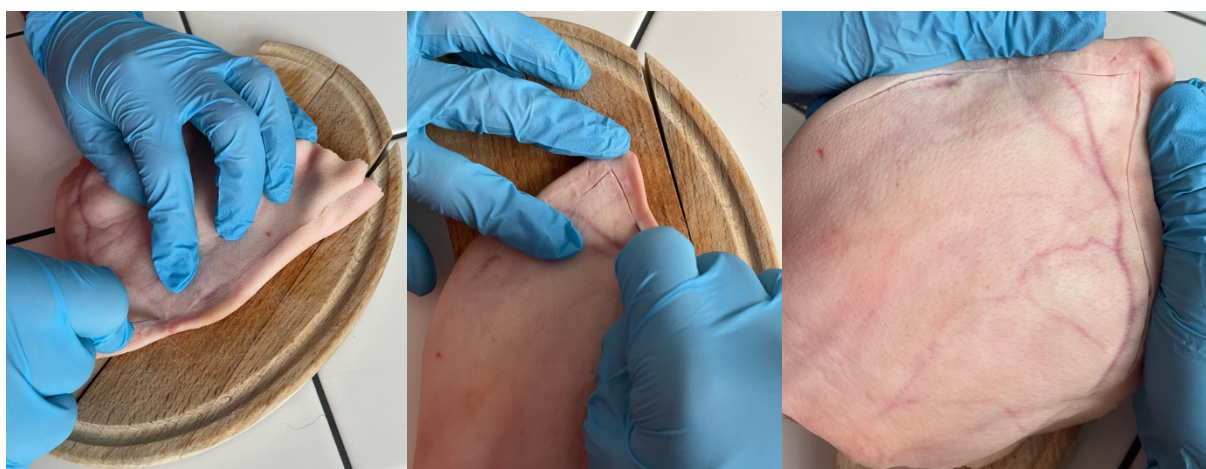
Obrázek 13: Uši čerstvě dovezené z řeznictví

Na samotné zpracování prasečích uší do podoby transdermálních membrán byl potřeba skalpel, dřevěné prkýnko a alobal na zabalení a uchování již vytvořených membrán. Hned na začátku byla nutná optická kontrola, zdali není kůže ucha mechanicky poškozená. Zkreslit výsledky experimentu by mohla i jizva nebo kožní onemocnění. Zkontrolované ucho bylo umyto pod teplou tekoucí vodou a lehce osušeno buničinou (viz Obrázek 14). Zbytek uší byl uložen do lednice, aby nedocházelo k případné degradaci tohoto biologického materiálu.



Obrázek 14: Čištění ucha proudem vody od nečistot (vlevo), usušení pomocí buničiny (vpravo)

Následně bylo ucho položeno na dřevěné prkénko, pomocí skalpelu byl proveden řez po levém i pravém okraji až do špice, přibližně 0,5 mm od okraje ucha. Řez do špice ucha (viz Obrázek 15 uprostřed), sloužil jako počáteční místo, které bylo následně lehce naříznuto skalpelem, aby byla kůže oddělena od ušní chrupavky a byla možnost ji zachytit prsty.



Obrázek 15: Podélný řez pomocí skalpelu (vlevo), vytvoření špice (uprostřed), ukázka výsledných řezů (vpravo)

Takto odchlíplou kůži bylo třeba mírně napnout směrem od chrupavky, aby ji bylo možné postupně odstraňovat pomocí skalpelu od zbytku struktury ucha. Při tomto úkonu bylo naprosto nezbytné manipulovat se skalpelem velmi opatrně, aby nedošlo k poškození membrány, což by mohlo zkreslit výsledky budoucího experimentu.



Obrázek 16: Počáteční izolace kůže od zbytku kožní struktury (vlevo), izolace kůže pod úhlem 45°(uprostřed), izolovaná kůže připravená na úpravu tvaru (vpravo)

Kůže odstraněná od chrupavky byla znova vizuálně zkontrolována, jestli nedošlo v nějakém místě k protržení. Při kontrole byla vybrána vhodná místa pro vyříznutí membrány, což jsou místa bez poškození v podobě trhlin a bez chrupavky, která lokálně zvětšuje tloušťku, a s co nejmenším množstvím cév a zbylé tukové tkáně. Pro vykrojení membrány o potřebném rozměru pro Franzovu difuzní celu byla použita horní donorová komora jako ukazatel minimálního průměru difuzní plochy a skalpel. Donorová komora byla přiložena na kůži a pomocí skalpelu byl vytvořen membrána ve tvaru kolečka s průměrem o 3–5 mm větším než vnitřní obvod donorové komory. Tímto způsobem bylo vykrojeno několik membrán a postup se opakoval z druhé strany ucha. Takto vyříznuté membrány byly změřeny pomocí mikrometru na pěti místech a data byla zaznamenána a zprůměrována. Tento krok byl nutný pro vyhodnocení výsledků dermální penetrace léčiv. Membrány byly zabaleny do alobalu, řádně označeny a uloženy do mrazáku, kde byly uchovány do nejbližšího difuzního experimentu, ale maximálně po dobu 3 týdnů. Před následným použitím bylo nutné membrány zkontrolovat, jestli nedošlo k degradaci a nechat rozmraznout minimálně 20 minut před experimentem při laboratorní teplotě.



Obrázek 17: Donorová část Franzovi difuzní cely použita jako předloha pro kožní membránu (vlevo), vyříznutá kožní membrána (uprostřed), měření tloušťky membrány pomocí mikrometru (vpravo)

6.6 Studium penetrace aktivních látek pomocí Franzových difuzních cel

V literární rešerši byla většina difuzních experimentů prováděna pomocí vertikálních difuzních cel, tedy Franzových difuzních cel. Schéma aparatury a princip je popsán v kapitole 4.1.1. Při práci s celami je důležitá pečlivost a opatrnost. Špatně sestavená difuzní cela může mít za následek zkreslení dat a neopatrné zacházení může velice jednoduše skončit rozbitím této křehké aparatury. Její přidaná hodnota je hlavně v možnosti temperace díky dvouplášťovému systému, relativní jednoduchosti sestavení, testovací vzorek může být jak kapalina, tak i gel a není potřeba takového množství vzorku jako u horizontálních difuzních cel.

6.6.1 Podrobný postup sestavení difuzní aparatury

Čisté a vysušené cely byly vloženy do pěnového podstavce, aby se při případné manipulaci předešlo případnému převržení a rozbití. Do receptorové části bylo vloženo magnetické míchadélko, rozměrově stejné pro každou celu a následně byla doplněna destilovanou vodou přibližně 1 cm pod okraj komory. Na styčné plochy donorové i receptorové části byla nanesena vrstva inertní silikonové pasty, která sloužila jako těsnící prostředek mezi oběma komorami. Rozmrzlé kožní membrány byly vloženy na připravenou aparaturu vnější rohovou vrstvou vzhůru. Na membránu byla přiložena donorová část tak, aby byl celý přijímací otvor zaplněn membránou.



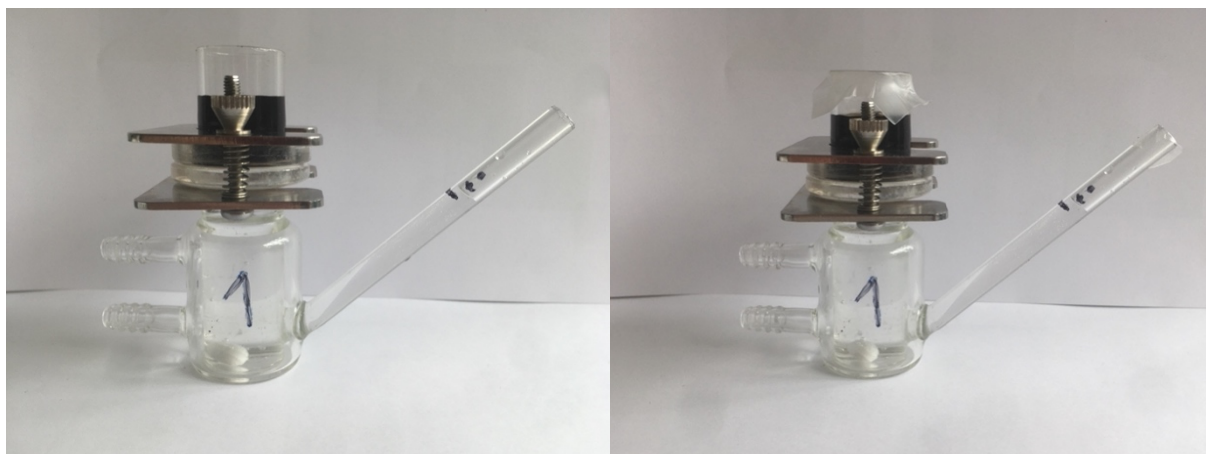
Obrázek 18: Vložení míchátko do receptorové komory (vlevo), receptorová komora naplněna přijímací tekutinou (uprostřed), Styčné plochy natřené silikonovou pastou na zábrusy (vpravo)

Pro lepší rozložení inertní silikonové pasty bylo donorovou částí několikrát zatočeno ve směru i v protisměru hodinových ručiček. Vzniklá mezera mezi oběma komorami byla zajištěna pomocí parafilmu a obě části k sobě byly připevněny kovovou svorkou.



Obrázek 19: Rozmrzlá membrána vložena na otvor receptorové komory (vlevo), mezera mezi donorovou a receptorovou komorou zajištěna parafilmem (uprostřed), obě komory zajištěné kovovou svorkou (vpravo)

Následně byla nachystána injekční stříkačka 10 ml s dlouhou jehlou, která sloužila k doplnění destilované vody do receptorové části. Cela byla obrácena dnem vzhůru tak, aby se bublina vzniklá mezi membránou a hladinou přijímací kapaliny přesunula k vyústění pro odběr vzorku. Následně byla stejným otvorem doplněna destilovaná voda pomocí injekční stříkačky s dlouhou jehlou do objemu 20 ml. Při položení cely dnem dolů byla provedena nutná kontrola možného protečení kožní membrány, neboť v tuto chvíli mohlo být odhaleno špatné těsnění cely. Do donorové části byl automatickou pipetou nadávkován vzorek o objem 5 ml.



Obrázek 20: Franzova cela na počátku experimentu (vlevo), vyústění pro odběr vzorku a donorová komora zadělaná pomocí parafilmu (vpravo)

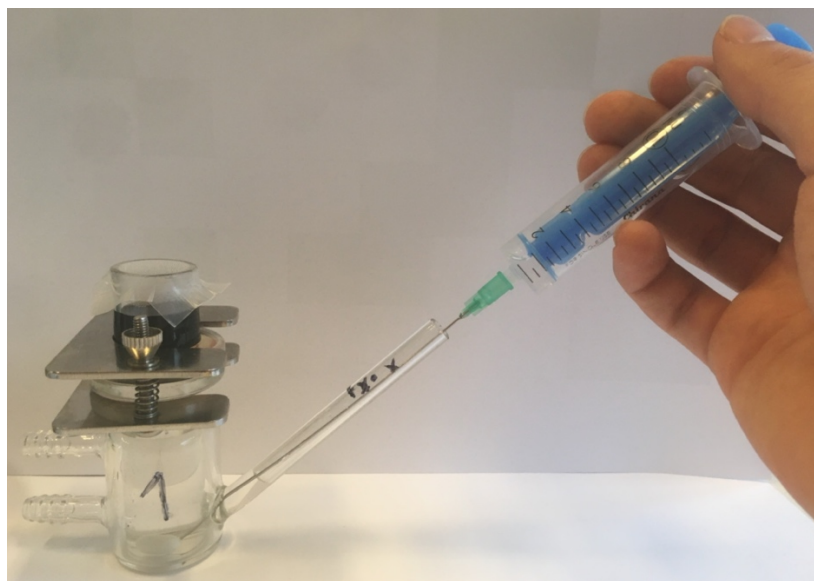
V tuto chvíli byl nastaven počáteční čas experimentu, vrchní část donorové komory a vyústění pro odběr vzorku bylo zaděláno pomocí parafilmu z důvodu odpařování jak vzorku, tak přijímací kapaliny. Takto nachystaná cela byla přenesena v pěnovém podstavci na vícemístné magnetické míchadlo, kde byla nastavena rychlost míchání 250 RPM.



Obrázek 21: Franzovy cely umístěné na vícemístném magnetickém míchadle

6.6.2 Odběr vzorku

Vzorky byly odebírány v intervalech po jedné hodině v časovém úseku 5–6 hodin. Odběr byl proveden pomocí injekční stříkačky o objemu 10 ml a dlouhé jehly. Každá cela měla vlastní označenou injekční stříkačku, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků. Z vyústění pro odběr vzorků byl odejmut parafilm, jehla injekční stříkačky byla zavedena do středu receptorové části v oblasti míchadélka, kde se předpokládala nejlepší homogenizace roztoku, a byl odebrán 1 ml vzorku.



Obrázek 22: Názorná ukázka odběru vzorku. Jehla je umístěna doprostřed receptorové komory, kde dochází k nejlepší homogenizaci roztoku

Vzorek byl převeden do popsané vialky, úbytek v receptorové komoře byl doplněn 1 ml destilované vody. V případě, že při odběru došlo k vyprázdnění celého vyústění, což mělo za následek vnik bubliny, která se nejčastěji usadila ze spodní části membrány, bylo nutné celou Franzovu celu otočit dnem vzhůru, tím bublinu přesunout k vyústění a doplnit objem destilovanou vodou. Při takovém manévru bylo důsledně dbáno na to, aby vzorek z donorové komory nevytekl ven. Celý proces odstranění bubliny je důležitý proto, že bubliny mohou narušit difuzní přechod látek přes membránu a kvůli nim dochází ke změně efektivního povrchu, přes nějž difuze probíhá. Nakonec bylo vyústění znova zajištěno parafilmem a vzorky byly umístěny do lednice, kde setrvaly do analýzy pomocí UV-VIS a HPLC.

6.7 Přístrojová technika pro kontrolu, analytické stanovení obsahu a analýzu vlastností látek ve vzorcích

6.7.1 Kontrolní screening pomocí UV-VIS spektrofotometrie

Metoda spektrofotometrie může sloužit jak pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu různých druhů vzorků. V této práci se ovšem využívala hlavně jako kontrolní aparát pro případ, že by kapalina v donorové části protékala mimo membránu do receptorové tekutiny anebo pro sledování penetrace lignohumátu přes biologickou membránu. Přímé stanovení ibuprofenu touto technikou nebylo možné ze dvou důvodů. Jednak při experimentech s lignohumátem docházelo k interferenci spektrálních signálů obou látek, a také při ostatních experimentech ho nebylo možné analyzovat z důvodu hemoglobinu, který se uvolňoval do přijímacího roztoku z prasečí kůže.

Měření vzorků bylo prováděno na spektrofotometru Hitachi U-3900H, který je dostupný na naší fakultě. Přístroj je nutné zapnout minimálně 30 minut před vlastním měřením z důvodu nahřátí lamp (především deuteriové lampy pro UV oblast). Následně byl zapnut počítač a software na ovládání spektrofotometru. Rozsah vlnové délky byl nastaven od 200 do 500 nm. Pro vzorky z difuzních experimentů byla použita QS mikro kyveta z důvodu malého objemu

a pro referenční vzorek byla použita klasická QS kyveta. Nejdříve bylo nutné změřit základní linii, a to tak, že obě kyvety byly naplněny receptorovou kapalinou, která byla použita při přípravě difuzních cel (v našem případě se jednalo o destilovanou vodu). Následně byla mikrokyveta vymyta, vysušena a naplněna analyzovaným vzorkem. Před vložením kyvety do přístroje bylo nutné zkontrolovat, jestli se analyzovaná oblast čistá a jestli se v ní nenachází bublina, která by mohla zkreslit výsledky. Změřený vzorek byl převeden zpátky do vialky a dále uchováván v lednici, soubor s daty byl uložen a proces měření nového vzorku se opakoval. Na konci experimentu byla data uložena a zpracována v programu Microsoft Excel.



Obrázek 23: UV-VIS spektrofotometr Hitachi U-3900H

6.7.2 Kvantitativní analýza pomocí HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla vybrána v rámci řešení jako kvantitativní metoda pro určení množství transportovaných látek přes biologickou membránu, a to z důvodu velké citlivosti, dobré schopnosti separace a možnosti analyzovat větší množství vzorků v krátkém čase.

Vzorky z lednice byly převedeny do označených reagenčních lahvíček pro HPLC analýzu. Z výsledných chromatogramů byla odečtena hodnota plochy pod píkem vzorku, který svým retenčním časem odpovídal hledané léčivé látce. Takto získaná data byla zpracována v programu MS Excel, kde byl nejdříve vytvořen kalibrační graf závislosti plochy pod křivkou na koncentraci. Z této kalibrační řady analgetika byla následně vygenerována rovnice přímky s nulovým počátečním bodem pro plochu pod křivkou. Rovnice přímky byla následně využita k výpočtu koncentrace jednotlivých vzorků.

Kvantitativní analýza separovaných léčivých látek z přijímacího roztoku byla realizována pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Agilent 1260 Infinity metodou isokratické eluce na koloně Kinetex C8 (velikost částic 2,6 μm , rozměry 150×4,6 mm). Jako

mobilní fáze byla použita směs 10mM H₃PO₄ a acetonitrilu (objemový poměr 1:1). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, analýza probíhala za konstantní teploty 30°C. K detekci byl využit DAD detektor při vlnové délce 222 nm.

6.7.3 Měření zásaditosti roztoků lignohumátu draselného pomocí pH metru

Rozdíl mezi roztokem čisté aktivní látky a roztokem té samé látky s přidavkem lignohumátu draselného je mimo jiné v pH těchto roztoků. Všeobecně je velmi důležité prozkoumat vlastnosti použitých látek, hlavně pokud by mohly ovlivnit experimentální výsledky. Proto bylo změřeno pH oběma roztokům lignohumátu, aby se dal posoudit vliv změny pH na transdermální transport použitých léčiv.

Po zapnutí pH metru byla zkontrolována kalibrace pomocí tří pufrů o pH 4,01; 7,01 a 9,21. Nejdříve byla sejmuta ochranná krytka s elektrolytem, následně byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a ponořena do pufru o přesně definovaném pH. Po ustálení hodnoty na displeji přístroje byla elektroda znova očištěna destilovanou vodou a následně ponořena do vybraného roztoku lignohumátu. Hodnota pH byla zapsána a proces měření se třikrát opakoval pro obě namíchané koncentrace, z výsledků byl následně udělán průměr.



Obrázek 24: pH metr S20 SevenEasy

7 OPTIMALIZACE POUŽITÉ METODIKY

Před hlavní experimentální částí bylo nutné udělat řadu pilotních experimentů, které pomohou k optimalizaci a návrhu metodologie transportu vybraných léčivých látek přes biologické kožní membrány a následně i transport s přídatkem lignohumátu sodného. Kapitola popisuje všechny kroky, které vedly k definování finální metodiky difuzních experimentů, od zpracování prasečích uší, až po úpravu času experimentu a zavedení měření tloušťky membrán.

7.1 Příprava membrán z prasečích uší

Jak vyplývá z rešerše, kůže z prasečích uší je jednou z nejpoužívanějších alternativ ke zkoumání transdermální penetrace různých aktivních látek. Další velmi používanou a doporučovanou simulací kožní membrány jsou syntetické Strat-M membrány, která byla použita již v bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje [81]. Rychlost prostupu aktivních látek však v této práci byla spíše zpomalována přídatkem lignohumátu, což bylo vysvětleno špatnou propustností samotného lignohumátu před hydrofobní membránu Strat-M. Proto byla pro následující experimenty vybraná forma prasečí biologické membrány, což přineslo srovnání mezi výsledky se zmíněnou bakalářskou a touto diplomovou prací.

Množství membrán, které se dají izolovat z prasečího ucha, se liší podle různých parametrů daného ucha, jako je množství poškození a jizev, různá velikost samotných uší, přítomnost chrupavek, či díry pro označení prasat. Určit přibližné množství membrán bylo důležité z důvodu uchování kůže, aby nedošlo k degradaci, což by mohlo způsobit zkreslení výsledků. V průběhu experimentů byl vytvořen odhad, že jedno prasečí ucho vystačí přibližně na 4–6 membrán.

Uši byly uchovávány v mrazáku při teplotě okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu tří týdnů. I přesto po dvou týdnech došlo u jednoho ucha k degradaci tkáně (viz Obrázek 25). Na povrchu a okrajích kůže se objevily deformace, které mohly ovlivnit výsledný transport aktivních látek, proto byla tato kůže vyřazena z následujícího experimentu a nahrazena jinou.



Obrázek 25: Degradace kůže vepřového ucha způsobena skladováním v mrazničce

7.2 Difuzní experimenty

Optimalizace přípravy Franzových difúzních cel na transdermální experimenty byla popsána již ve zmíněné bakalářské práci, avšak i přes to se naskytlo několik nových situací, které bylo potřeba vyřešit. V případě této práce bylo například nutné zjistit takovou optimální délku trvání experimentu, aby došlo k penetraci léčiv přes celou tloušťku membrány, díky čemuž se mohl následně sledovat jev ustálené difuze. Proto bylo provedeno několik experimentů, které přinesly důležitá data pro následnou optimalizaci.

7.2.1 Optimalizace sestavení difuzní aparatury

Dobře sestavená aparatura je klíčem pro správné a přesné výsledky difuzních experimentů. Jak už bylo zmíněno, Franzova difuzní cela vyžaduje opatrné zacházení, neboť je vyrobena z tenkého skla, které je velmi náchylné na náraz. V případě, že při umývání nebo sestavování dojde k vyklouznutí nebo převrnutí aparatury, je velká pravděpodobnost, že se cela nevratně poškodí, což znemožní její následné využití.

Kritická část postupu, kde při špatném provedení může dojít k protečení roztoku z donorové části do receptorové nebo k zmenšení plochy pro difuzní transport je nanášení inertní silikonové pasty na zábrusy na styčné plochy donorové a receptorové komory. Je nutné nanést takové množství pasty, aby došlo k zacpání všech případných skulin mezi styčnými plochami a použitou membránou. Na druhou stranu nesmí dojít k neopatrnému nanesení pasty na plochu membrány, kde probíhá penetrace aktivní látky. Tato chyba může vést k nežádoucímu zkreslení výsledků transportu.

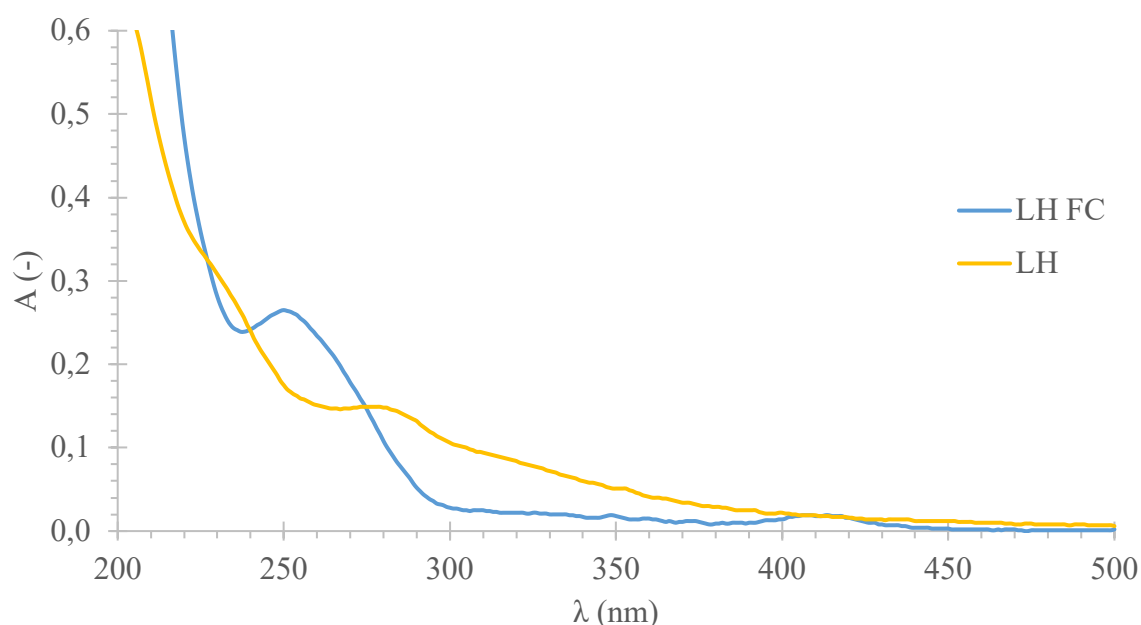
V případě, že nebyla dobře zajištěná donorová a receptorová komora nebo byla kožní membrána poškozena skalpelem při izolaci z prasečího ucha, mohlo dojít k protečení vzorku do receptorové komory. Aby se předešlo této nežádoucí situaci, byla membrána a celá donorová komora velmi důkladně kontrolována při sestavování celé aparatury. Nejdůležitější část kontroly probíhala během doplňování přijímací kapaliny do receptorové komory, jak je popsáno v kapitole 6.6.1. V tu chvíli byla cela obrácena dnem vzhůru a receptorová kapalina mohla protéct do donorové části. Pokud se tak stalo, došlo k rozebrání cely a k lepšímu nanesení inertní silikonové pasty. V případě, že receptorová kapalina protékla znova, došlo k výměně biologické membrány.

V průběhu experimentu často docházelo k tvorbě bublin v receptorové komoře, což způsobilo změnu objemu přijímací kapaliny a omezení plochy membrány dostupné pro penetraci léčiva. Vznik bublin mohl být zapříčiněn rozdílnou teplotou mezi receptorovou kapalinou a okolním prostředím nebo nedokonalým vyčištěním Franzových difuzních cel. Takto vzniklé bubliny byly odstraněny obrácením difuzní cely dnem vzhůru. Vzniklá bublina byla přesunuta k vyústění pro odběr vzorku a tam došlo k samovolnému nebo manuálnímu prasknutí pomocí injekční stříkačky s dlouhou jehlou. Aby při převrácení nevytekl vzorek mimo donorovou komoru, byla tato část důkladně zajištěna parafilmem.

7.2.2 Pilotní experimenty

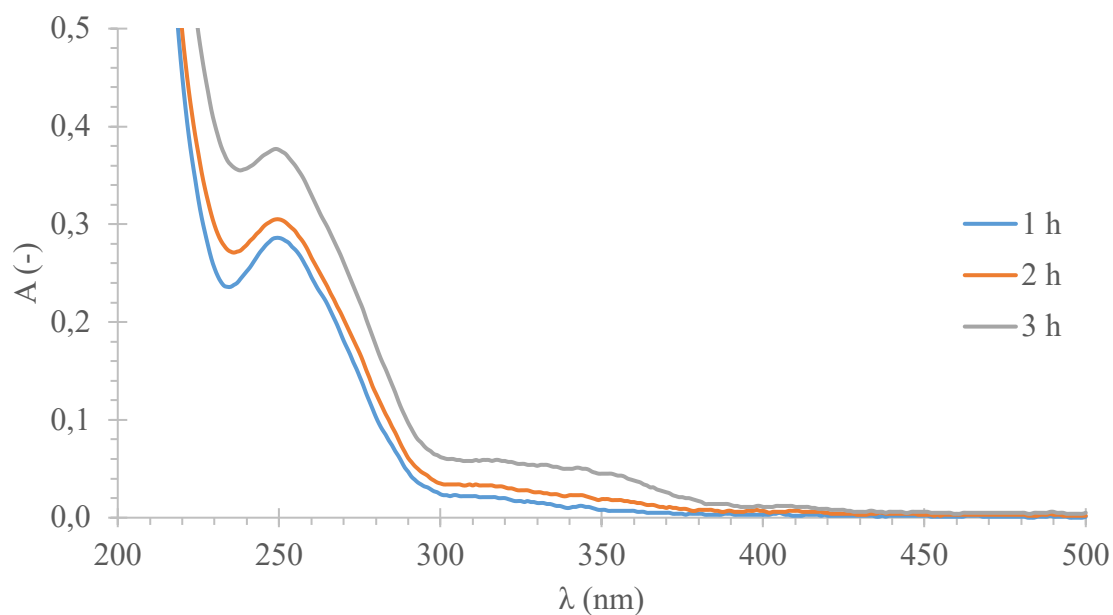
Transdermální transport lignohumátu draselného

Penetrace lignohumátu sodného přes prasečí kožní membránu byla klíčovým aspektem pro zkoumání vlivu budoucích interakcí s aktivními látkami. Ovšem kvantifikovat prošlý lignohumát pomocí vyhodnocení dat z UV-VIS nebylo možné. Při experimentu s biologickou membránou dochází k uvolnění některých molekulárních komponent kůže, které absorbují ve stejných vlnových délkách jako lignohumát, což znemožňuje vyhodnocení. Membrána také funguje jako semipermeabilní vrstva, která může některým složkám natolik složité heterogenní matrice, jako jsou huminové látky zcela bránit v jejich transportu. Obrázek 26 znázorňuje spektrum čistě namíchaného roztok lignohumátu draselného v porovnání se vzorkem prošlým přes prasečí kožní membránu při experimentu s Francovými difuzními celami. Spektra mají v určitých vlnových délkách shodný tvar, ovšem u lignohumátu prošlého přes membránu se nachází několik spektrálních rysů, které souvisí s biologickou membránou.

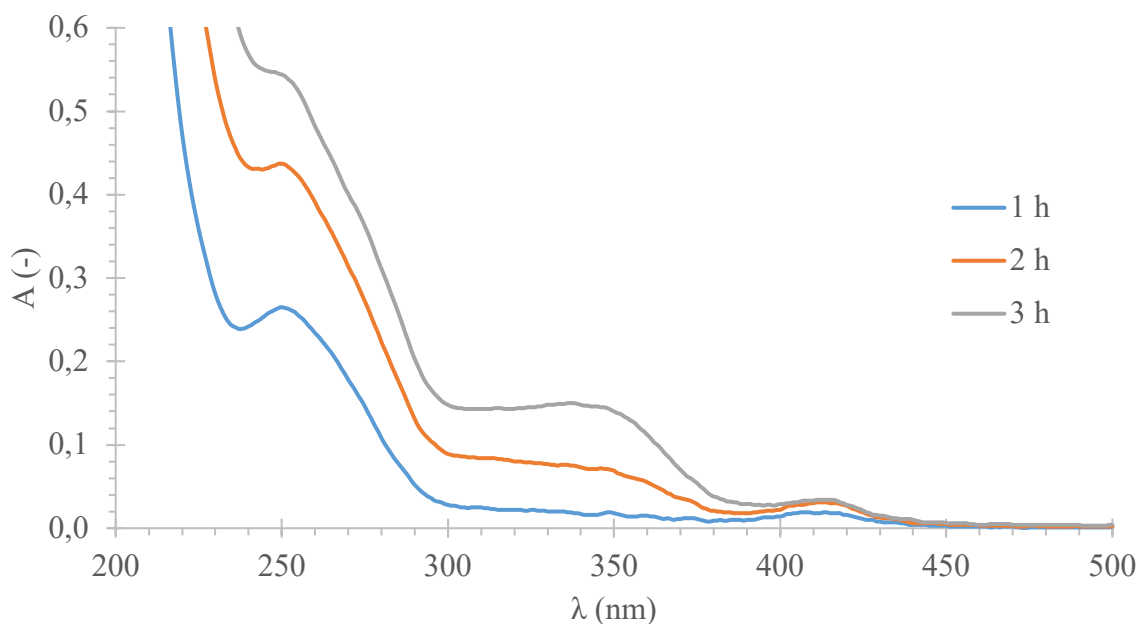


Obrázek 26: Porovnání absorpčních spekter čistého lignohumátu a vzorku odebraného při difuzním experimentu s Francovými celami

Na základě výsledků z bakalářské práce byla vybrána koncentrace lignohumátu 10 g/l, která vykazovala nejlepší schopnost penetrace přes membránu Strat-M. Pro zjištění, jestli je transport závislý na koncentraci, byly provedeny experimenty i s vyšší koncentrací lignohumátu, a to 50 g/l. Oba experimenty byly triplikovány, aby se předešlo znehodnocení výsledků z důvodu případného protečení. Z výsledných UV-VIS spekter obou koncentrací jasně vyplývá, že lignohumát o vyšší koncentraci procházel přes membránu ve větší míře (viz Obrázek 27 a Obrázek 28). U ostatních spekter byl rozdíl menší, ale u všech se projevila závislost koncentrace na rychlosti penetrace (viz Příloha 1, Příloha 2, Příloha 3 a Příloha 4). Pro další experimenty byly použity obě koncentrace lignohumátu, aby byl vyzkoušen vliv koncentrace na penetraci aktivní látky.



Obrázek 27: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l, odběry po hodinových intervalech



Obrázek 28: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 50 g/l, odběry po hodinových intervalech

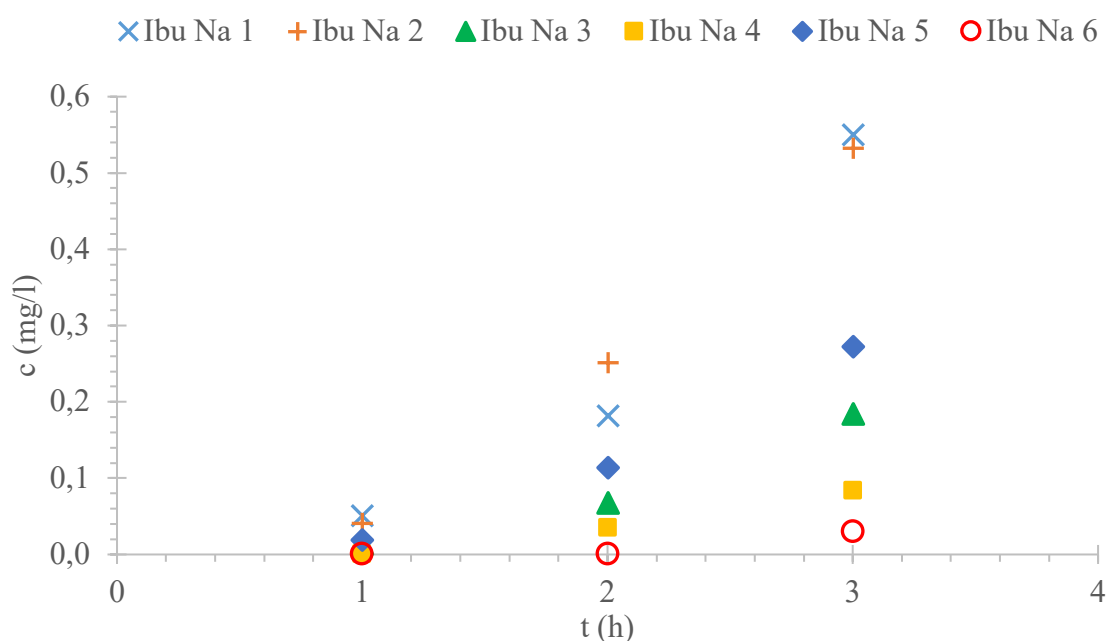
Kalibrační řady ibuprofenu sodného a ibuprofenu v kyselé formě

UV-VIS analýza v následujících experimentech sloužila jen jako kontrolní screening. Hlavní analytickou metodou se stala HPLC díky tomu, že látky uvolňující se do receptorové komory nesdílely stejné retenční časy, takže se daly rozlišit a kvantifikovat. Pro výpočet koncentrace prošlých aktivních látek bylo nutné vytvořit kalibrační řadu těchto látek. Kalibrační řada byla vytvořena pomocí desítkové ředění, a to z důvodu čtyřnásobně většího objemu přijímací

kapaliny, než byl objem vzorku v donorové části, což znamenalo, že i kdyby prošlo celé množství aktivní látky přes membránu, koncentrace v receptorové komoře bude nižší.

Transport ibuprofenu sodného

Ibuprofen sodný byl pro pilotní experimenty vybrán díky své dobré rozpustnosti v destilované vodě a komerční dostupnosti tohoto léčiva. Stejně jako u lignohumátu bylo nejprve vyzkoušeno, v jakém množství proniká přes biologickou membránu, aby se následně mohla navrhnout vhodná délka trvání difuzního experimentu. Vlnová délka absorpčního maxima ibuprofenu je 265 nm [82], což znamená, že analýza pomocí UV-VIS spektrofotometru není možná, neboť huminové látky absorbují v celém UV-VIS spektru a z biologických membrán se uvolňují látky, které absorbují v blízkých vlnových délkách, takže překrývají absorbanci ibuprofenu. Proto byla jako kvantitativní analytická metoda použita HPLC chromatografie. Koncentrace 150 mg/l, která byla využívána i v bakalářské práci je detekovatelná i po jedné hodině (viz Obrázek 29). Příloha 5 znázorňuje vzorový záznam z chromatografu. Tento pilotní experiment prokázal, že zmíněná koncentrace je vhodná i pro další experimenty, ovšem velmi rozdílné hodnoty koncentrací mezi jednotlivými experimenty znemožňují určení přesné koncentrace, která prochází přes membránu. Experiment byl proto zopakován a všechny výsledky byly porovnány (viz Obrázek 29).

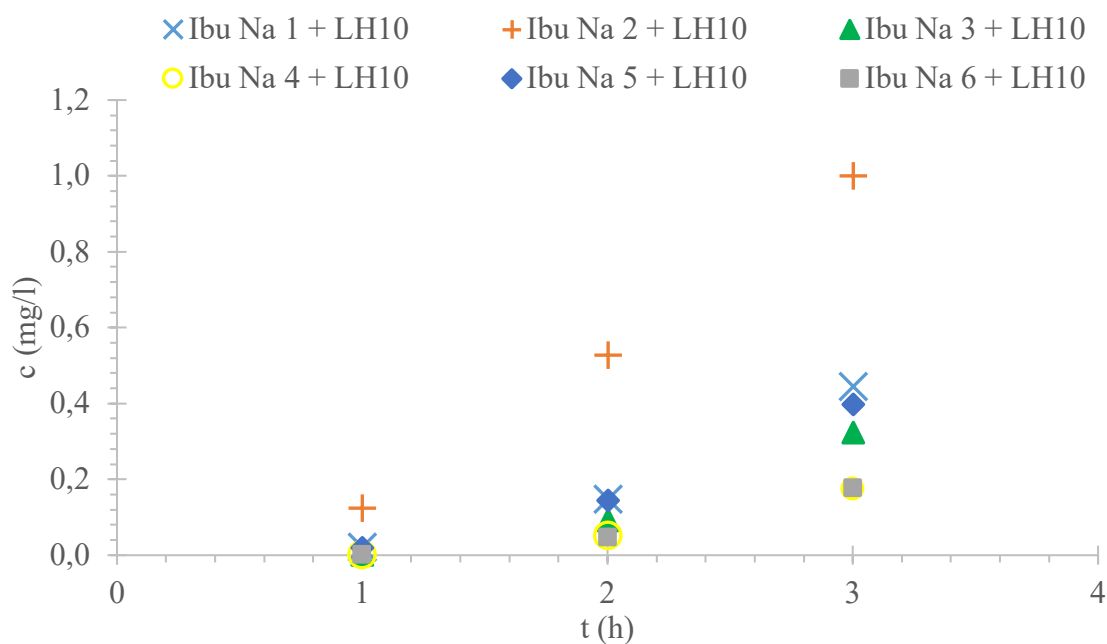


Obrázek 29: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného na čase, pilotní experiment

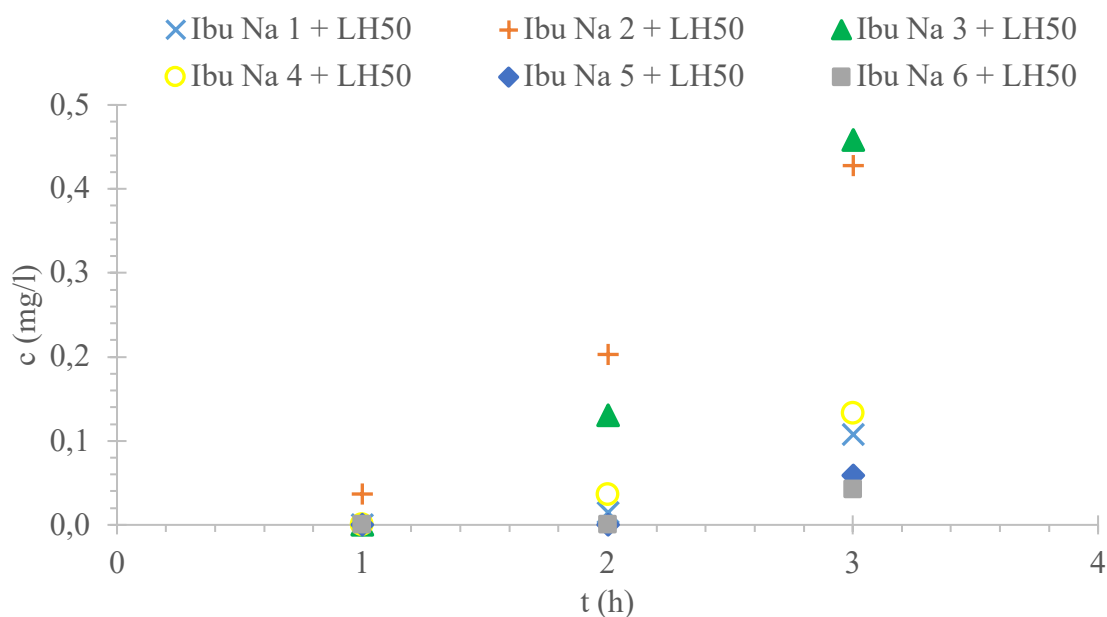
Transport ibuprofenu sodného s přidavkem lignohumátu draselného

Tato sada pilotních experimentů měla přinést první srovnání koncentrací prošlého ibuprofenu sodného, a to jak pro ibuprofen rozpuštěný pouze v destilované vodě, tak s přidavkem lignohumátu o koncentracích 10 g/l a 50 g/l. Výsledné koncentrace prošlého léčiva se ovšem velmi lišily i v jednotlivých sadách mezi sebou, což znemožnilo interpretaci výsledků. Rozdílné koncentrace pro všechny vzorky s čistým i obohaceným ibuprofenem sodným viz Obrázek 29, Obrázek 30 a Obrázek 31. Důvodem takových výsledků mohla být rozdílná tloušťka použitých

membrán, která ovlivňovala především čas nezbytný k penetraci analyzovaného analgetika skrz membránu. Proto byl u dalších experimentů využíván mikrometr pro měření tloušťky kožních membrán. Membrána byla změřena vždy na pěti náhodných místech a výsledky byly zprůměrovány. Také byla prodloužena délka experimentu na 5 hodin s hodinovými intervaly odběru vzorků, neboť po tříhodinovém intervalu nedošlo k penetraci aktivní látky do všech vrstev membrány, tudíž nebyla pozorována stacionární difuze. Aby se zamezilo možnému nežádanému průniku léčiva přes membránu, které by mohlo zkreslit výsledky experimentu, každý následný experiment byl proveden v pěti opakováních.



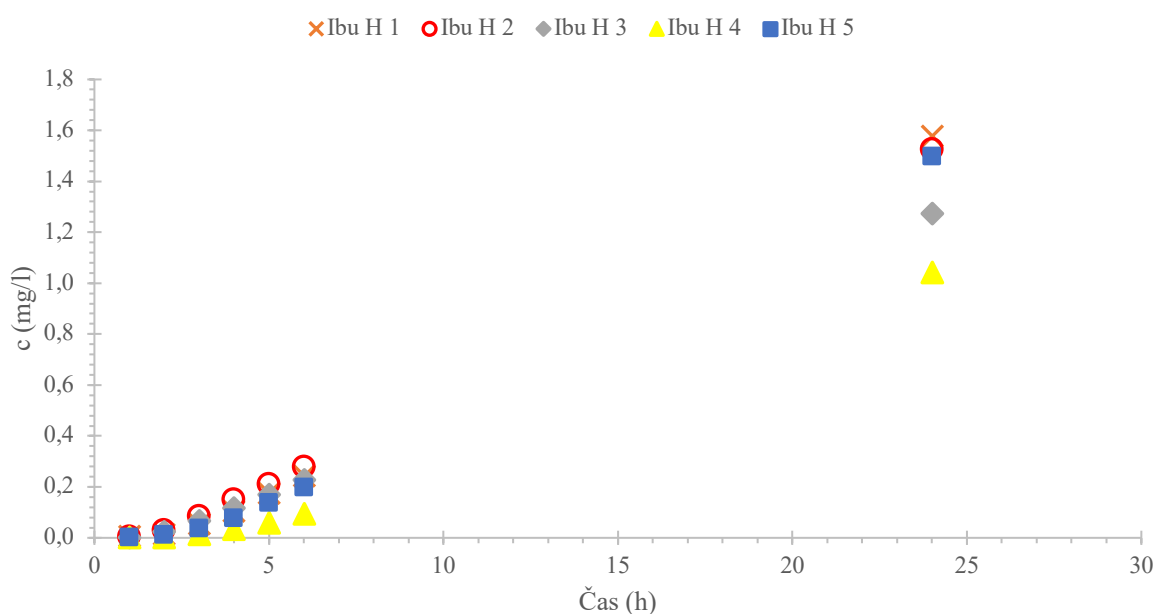
Obrázek 30: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného na čase s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l, pilotní experiment



Obrázek 31: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného na čase s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l, pilotní experiment

Transport kyselého ibuprofenu

Ibuprofen není dobře rozpustný ve vodě. Proto byl v rámci postupu rozpuštěn v určitém množství etanolu a pak až přidán do destilované vody, kde vznikl nasycený roztok s množstvím sraženin. Při prvním experimentu byl poměr etanolu a destilované vody 1:5, což se ve výsledcích (viz Obrázek 32)jevilo jako velmi nízká koncentrace rozpuštěného ibuprofenu, která mnohdy nebyla detekovatelná ani po 2 hodinách experimentu. Již po zkušenostech z experimentů s ibuprofenem sodným byl experiment prodloužen na 6 hodin s hodinovými intervaly odběru vzorků a po uplynulých 6 hodinách následoval poslední odběr po 24 hodinách. I přes to byly koncentrace prošlého ibuprofenu velmi nízké, proto se další experiment upravil změnou poměru rozpouštědel na 1:1 a to nejen v donorové, ale i v receptorové kapalině, kde byl etanol použit jako solubilizátor aktivních látek. Tato změna poměru vychází z článku v rešeršní části, kde byla penetrace léčiv zkoumána za různých poměrů mezi vodou a etanolem. Roztok 1:1 byl v článku označen jako vhodný pro zkoumání průchodu léčiv špatně rozpustných ve vodě [71].



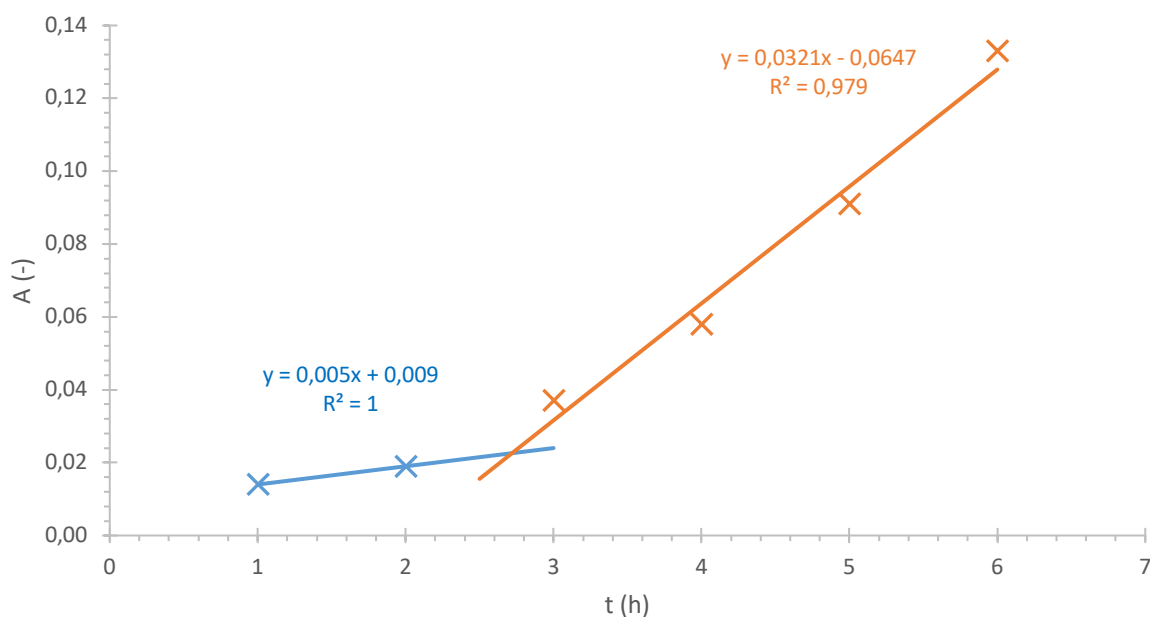
Obrázek 32: Závislost koncentrace kyselého ibuprofenu na čase. Odběry 1. až 24. hodinu experimentu, pilotní experiment

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této kapitoly je shrnout veškerá naměřená a zpracovaná data, která měla za úkol podhalit vliv huminových látek na transdermální transport ibuprofenu jako modelového analgetického léčiva. Bude zde rozebrán efekt lignohumátu draselného na penetraci dvou testovaných forem analgetika v závislosti na jeho koncentraci, dále vliv tloušťky biologických membrán a bude diskutován možný vliv pH roztoků lignohumátu o rozdílných koncentracích. Také bude zmíněno ovlivnění transportu kyselé formy ibuprofenu s přidavkem solubilizačního činidla ve formě etanolu. Veškeré informace budou shrnuty v závěru spolu s přínosem této studie v oblasti využití huminových látek a doporučením pro budoucí výzkumné práce.

8.1 Penetrace lignohumátu draselného přes kožní membránu

Při optimalizačním experimentu bylo zjištěno, že prostup lignohumátu přes biologickou membránu se nedá kvantifikovat pomocí UV-VIS, neboť membrána uvolňuje látky, které absorbují v podobných vlnových délkách. Pro přibližnou detekci lag τ bylo využito absorpčních spekter lignohumátu draselného o koncentracích 10 a 50 g/l. Ve vybrané vlnové délce, kde nebylo pozorováno uvolnění látek z membrány prasečího ucha, což bylo určeno porovnáním s absorpčním spektrem čistého lignohumátu, byly vyhledány hodnoty absorbancí, ze kterých byl vytvořen graf závislosti absorbance na čase (viz Obrázek 33).



Obrázek 33: Závislost absorbance lignohumátu o koncentraci 50 g/l na čase během penetrace přes biologickou membránu při vlnové délce 350 nm

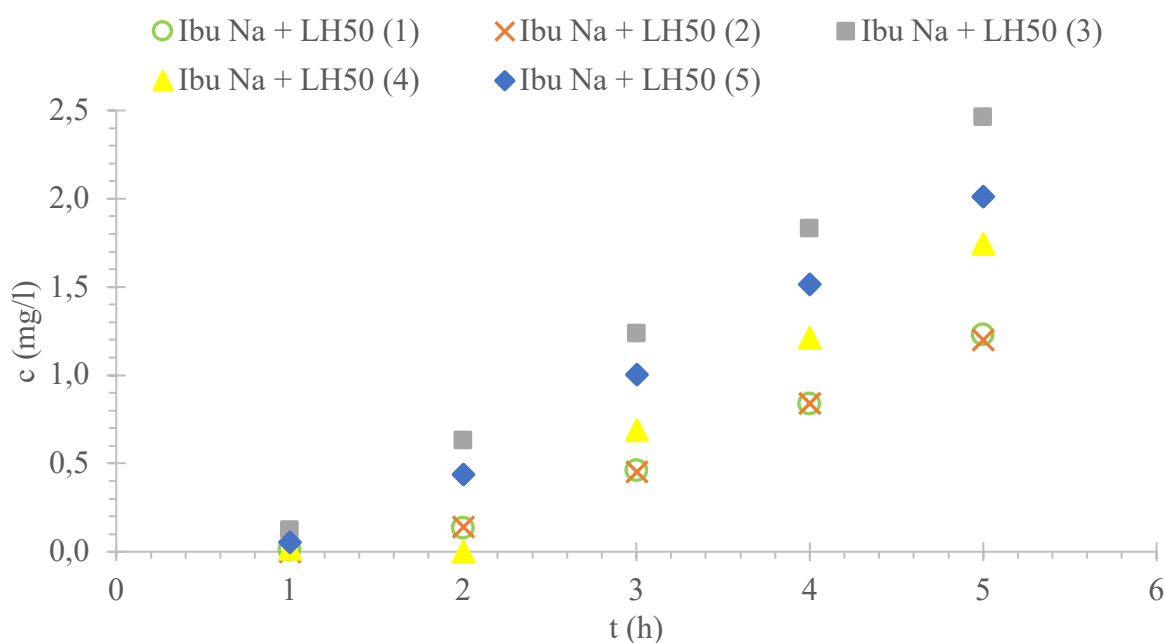
Porovnáním rovnic přímků byla získána rovnice, ze které se dala vypočítat hodnota x pro průsečík těchto dvou přímků. Tato hodnota je přibližný čas průchodu lignohumátu přes membránu do počátku stacionární difuze. Všechny hodnoty byly vypracovány a následně zprůměrovány (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Přibližné hodnoty pro lag t lignohumátu o koncentraci 10 a 50 g/l při šestihodinovém experimentu

Cela	Lag τ (h)	
	LH10	LH50
1	2,63	2,66
2	3,70	2,78
3	2,33	2,72
4	2,25	2,98
5	2,60	2,28
Smodch:	0,52	0,23
Průměr:	2,70	2,68

8.2 Tloušťka membrán jako důležitý faktor penetrace léčivých látek přes kožní membránu

Jak bylo zmíněno již v kapitole 7.2.2, vliv tloušťky membrány hraje při transportu látek zásadní roli. Po zkušenostech z pilotních experimentů byla tloušťka měřena pomocí mikrometru hned při tvorbě membrán. Následně byly hodnoty zaznamenány (viz Tabulka 2) a pro každou membránu byl vypočítán průměr. Již při výpočtu prošlé koncentrace látek byla zaznamenána souvislost tloušťky membrány s koncentrací prošlého léčiva. Obrázek 34 znázorňuje rozdílnost koncentrací pro pět stejně připravených a testovaných vzorků ibuprofenu sodného s přidavkem huminové látky. Pokud tento graf porovnáme s tabulkou 2, můžeme si všimnout, že u membrány s největší průměrnou tloušťkou dochází k nejmenšímu průchodu aktivní látky. Oproti tomu nejtenčí membránou prochází největší množství ibuprofenu sodného. Z těchto dat se dá usoudit, že vliv tloušťky membrány je pro penetraci látek zásadní.



Obrázek 34: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l na čase pro pětihodinový experiment

Tabulka 2: Naměřené a zprůměrované tloušťky použitých membrán při experimentu s ibuprofenem sodným s přídatkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l

	d [mm]				
	1	2	3	4	5
	1,746	1,803	1,054	1,634	1,344
	1,895	1,763	1,118	1,735	1,245
	1,874	1,791	1,049	1,664	1,351
	1,857	1,758	1,264	1,532	1,370
	1,649	1,703	1,609	1,465	1,352
Smodch:	0,093	0,035	0,210	0,096	0,045
Průměr:	1,804	1,764	1,219	1,606	1,332

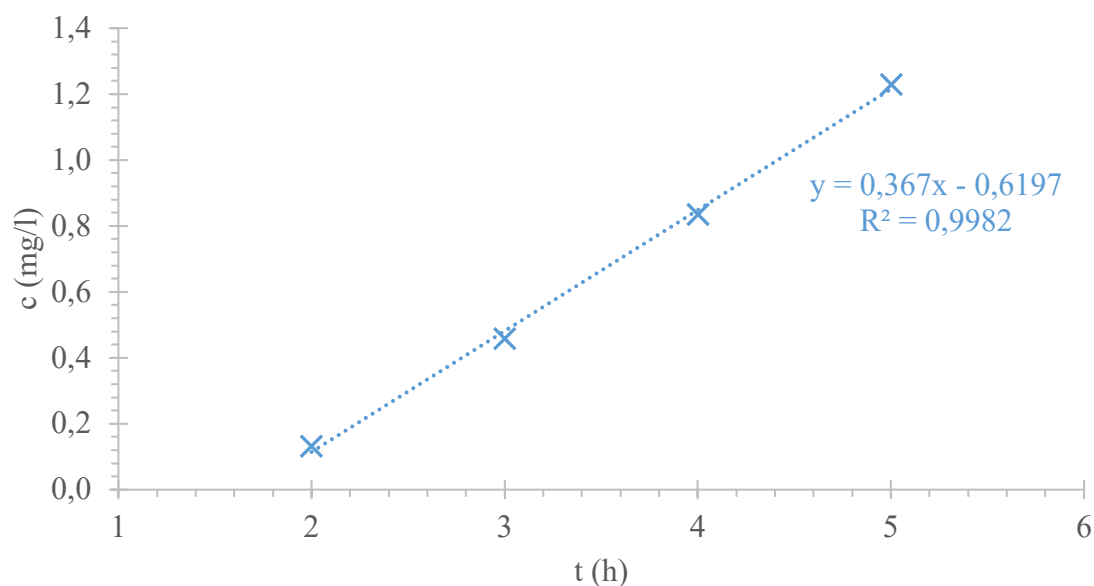
8.3 Lignohumát draselný jako urychlovač transdermálního transportu

Důležitá informace, která určila směr celého výzkumu, byla získána již při optimalizaci a ovlivnila všechny následující experimenty. Přechod lignohumátu přes membránu, popsany v kapitole 7.2.2, a následné zjištění vlivu koncentrace na rychlost tohoto transportu jsou důležitými poznatky, neboť otevírají řadu možností a využití. Látky, které interagují s funkčními skupinami huminových látek mohou být díky této vlastnosti transportovány přes kožní bariéru, což urychlí jejich účinek v těle. Následující výsledky popisují vliv lignohumátu na ibuprofen a sodnou sůl ibuprofenu. Výsledné hodnoty byly podrobeny statickým testům Dean-Dixon (určení odlehých hodnot) a t-testem statistické významnosti ($\alpha = 0,05$).

8.3.1 Vliv lignohumátu na penetraci ibuprofenu sodného

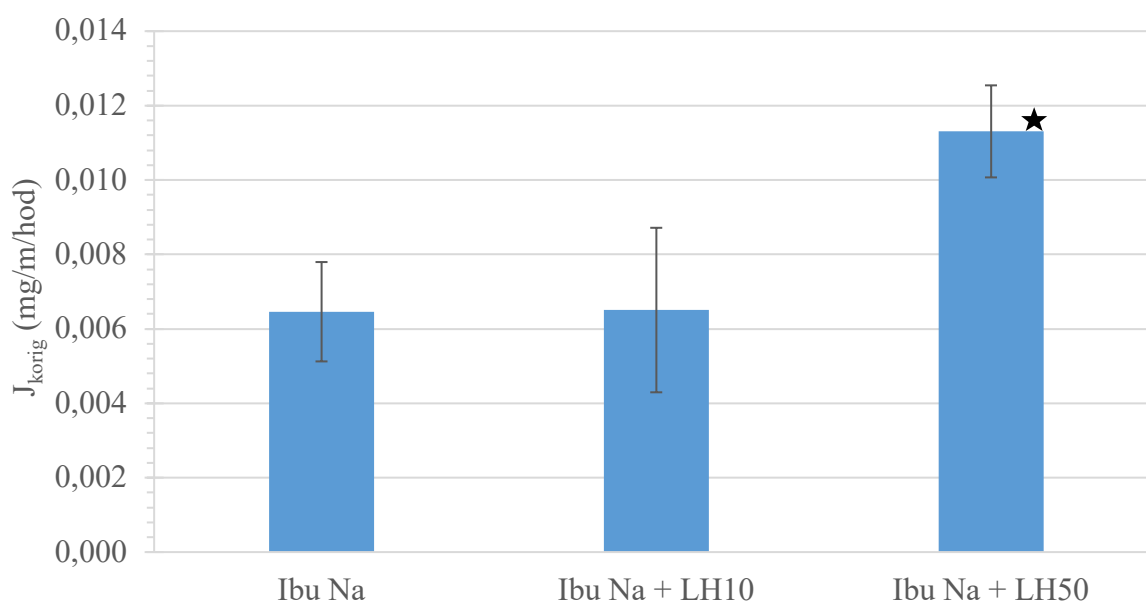
Experiment s ibuprofenem sodným byl po optimalizaci prodloužen ze tří hodin na pět s odběry po jedné hodině. Tento časový úsek stačil pro to, aby aktivní látka prošla přes membránu v celé její šířce a mohla tak probíhat stacionární difuze. Při izolaci membrán byl změřen průměr všech použitých membrán, který byl následně použit pro korekci lag τ , který je teoreticky závislý na druhé mocnině průměru membrány (viz rovnice 4.1.2). Tato závislost byla klíčovou hodnotou pro porovnávání transportu látek přes membránu s přídatkem lignohumátu a bez. Jak je popsáno v kapitole 4.1, lag τ je čas, ve kterém dojde k průchodu aktivních látek v celé ploše a objemu membrány, což se dá považovat jako počátek stacionární difuze. Následně se z hodnoty lag τ a tloušťky membrány vypočítá efektivní difuzní koeficient (D_{eff}), ve kterém je zahrnutý vliv chemických reakcí pro dané léčivo. K výslednému difuznímu koeficientu se může dojít i druhou možnou cestou, a to pomocí Fickova prvního zákona popisujícího následnou fázi stacionární difuze.

Z výsledků HPLC byly sestaveny grafy závislosti koncentrace na čase (viz Obrázek 34). Body, odpovídající fázi ustálené difuze byly proloženy lineární regresí (viz Obrázek 35), kde je zobrazena rovnice přímky pro první celou z experimentu ibuprofenu sodného s přídatkem lignohumátu o koncentraci 50 g/l.



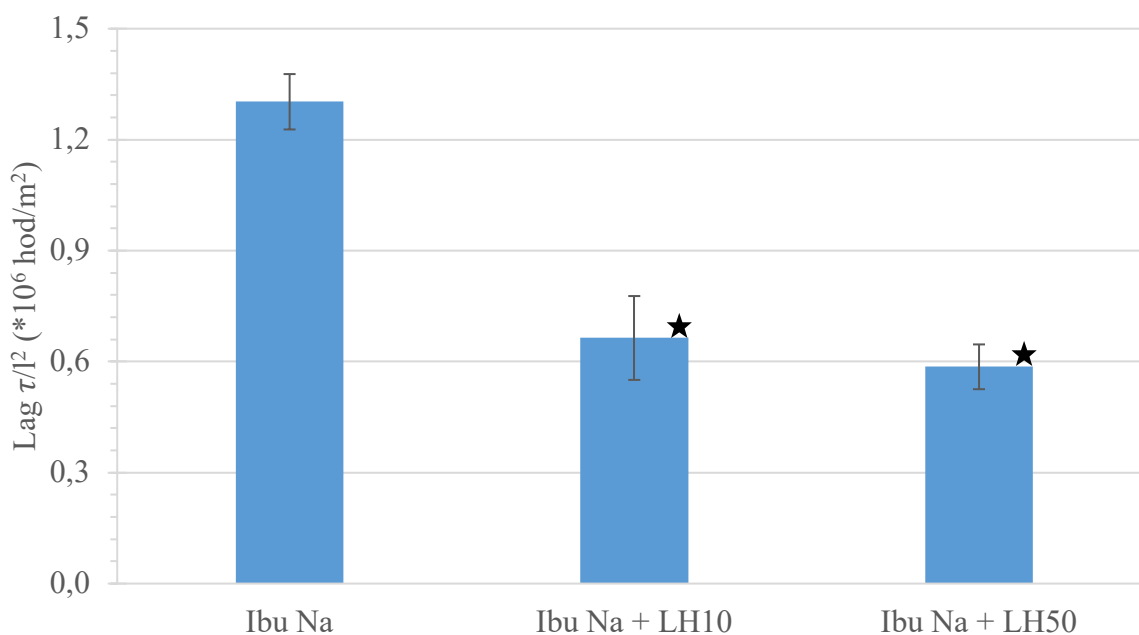
Obrázek 35: Data znázorňující stacionární difuzi pro experiment ibuprofenu sodného s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l

Následně byl z výsledných dat vypočítán difuzní tok v jednotkách hmotnosti v mg na jednotku plochy za daný čas, který byl zkorigován vynásobením tloušťkou dané membrány (koncentrační gradient na membrány klesá přímo úměrně s její tloušťkou dle rovnice 4.1.2). Hodnoty takto korigovaného difuzního toku byly zprůměrovány a vyneseny do grafu (viz Obrázek 36), kde můžeme jasně vidět stoupající tendenci toku s přidavky lignohumátu, a to jak v rámci srovnání s čistou aktivní látkou, tak i mezi různými koncentracemi přidané huminové látky. Tyto hodnoty naznačují, že lignohumát může mít pozitivní efekt na rychlost penetrace ibuprofenu sodného přes kožní membránu.



Obrázek 36: Srovnání korigovaného difuzního toku pro ibuprofen sodný s přidavkem a bez přidavku lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l a 50 g/l. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole Ibu Na bez lignohumátu

V případě, že by lignohumát urychlil průchod látek do receptorové kapaliny, došlo by také ke zvýšení rychlosti penetrace přes kožní membránu, který dokážeme popsat pomocí lag τ . Obě tyto hodnoty jsou ovlivněné difuzním koeficientem dané látky, difuzní tok přímo úměrou, zatím co lag τ nepřímo. Lag τ byl také získán ze směrnice přímky pro body odpovídající stacionární difuzi, tato hodnota odpovídá průsečíku přímky s osou x, která představuje časovou osu. Výsledné hodnoty byly poděleny druhou mocninou tloušťky membrány, což vychází z definice středního kvadratického posunu (viz rovnice 4.1.2). Obrázek 37 přináší grafické zobrazení výsledků, které potvrzují možný vliv lignohumátu na zvýšení rychlosti vstřebání přes membránu. Nejvyšší hodnota pro sodnou sůl ibuprofenu značí, že léčivo bez přídavku lignohumátu procházelo membránu nejdelší časový úsek. S přídavkem huminové látky dochází ke snížení lag τ , což značí pozitivní vliv na urychlení prostupu látek přes membránu.

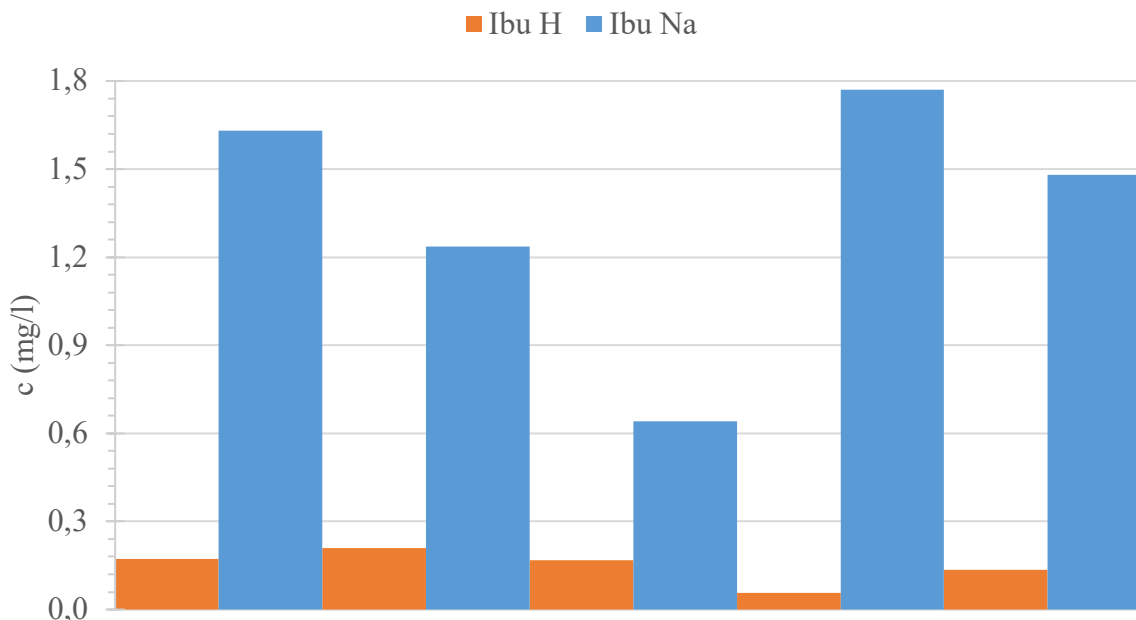


Obrázek 37: Srovnání průměrné korigované doby zpoždění (korekce byla provedena podělením lag τ druhou mocninou odpovídající průměrné tloušťky membrán) pro ibuprofen sodný s přídavkem a bez přídavku lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l a 50 g/l. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (Ibu Na bez lignohumátu)

8.3.2 Vliv lignohumátu na penetraci kyselé formy ibuprofenu v nasyceném roztoku

Při pilotních experimentech s ibuprofenem sodným se ukázalo, že pětihodinová délka experimentu je pro některé vzorky hraniční k získání dostatečného počtu koncentračních bodů ve stavu stacionární difuze. Proto byla délka experimentu s kyselou formou ibuprofenu prodloužena na 6 hodin s odběrem po jedné hodině a poslední odběr byl proveden po 24 hodinách s cílem ověřit maximální množství prošlého ibuprofenu. Obrázek 38 porovnává výsledky HPLC pro průchod léčiv bez přídavku lignohumátu. Při výpočtu koncentrace kyselé formy ibuprofenu se vycházelo z maximální rozpustnosti toho léčiva ve vodě, což je 21 mg/l [83]. Z grafů je zřejmé, že koncentrace prošlého ibuprofenu sodného byla takřka desetkrát vyšší než u jeho kyselé formy. Přírozeným vysvětlením je špatná rozpustnost kyselé formy ibuprofenu ve vodě, kdy nasycený roztok v poměru 1:5 etanol ve vodě má malou koncentraci,

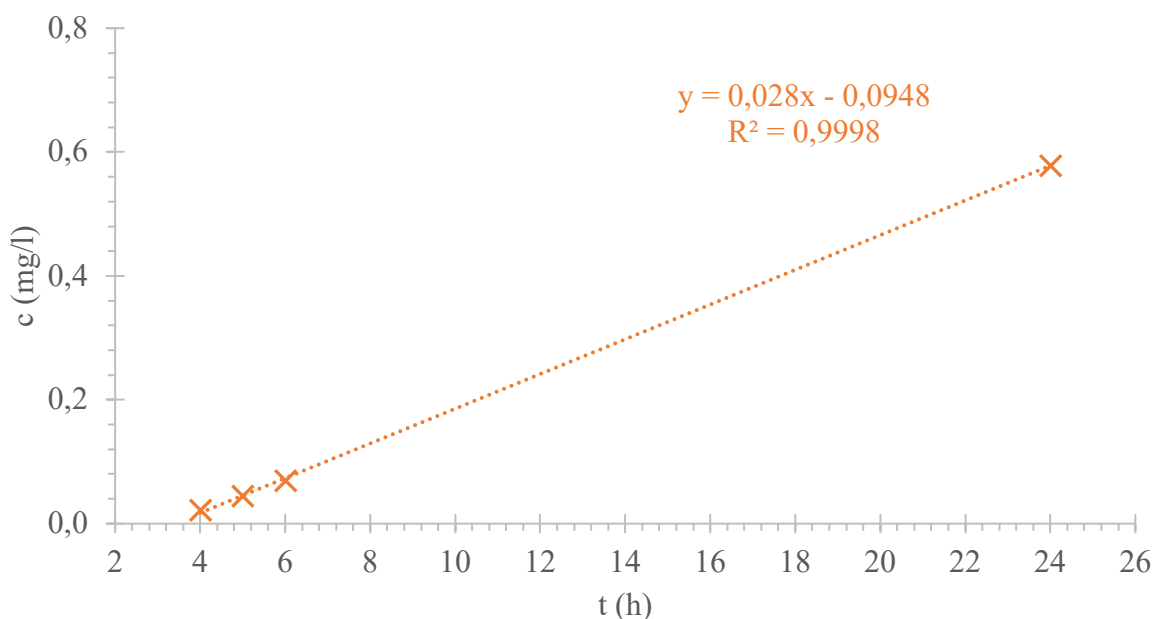
jejíž důsledkem je penetrace přes membránu pomalejší. Tato informace byla jedním z důvodů, proč se při dalším experimentu koncentrace ibuprofenu zvýšila změnou poměru etanolu ve vodě na 1:1 a do receptorové cely byl přidán solubilizátor ve formě roztoku etanolu ve stejném poměru.



Obrázek 38: Srovnání koncentrací kyselé formy ibuprofenu a sodné soli ibuprofenu v 5. hodině experimentu

Koncentrační gradient v systému je přibližně konstantní po dobu, kdy lineárně narůstá koncentrace léčiva v receptorové komoře (viz Obrázek 39 – spojnice trendu). Pokud dojde ke změně koncentračního gradientu mezi komorami, dochází k zaoblení přímky a koncentrace mezi donorovou a receptorovou kapalinou se vyrovnávají. I přes prodloužení experimentu s posledním odběrem po 24 hodinách se nepodařilo dosáhnout této změny v linearitě stoupající koncentrace. Obrázek 39 znázorňuje závislost koncentrace léčivé látky na čase ve stavu stacionární difuze. Hodnota koncentrace pro odběr po 24 hodinách stoupla lineárně, což značí, že ještě nedošlo k vyrovnávání koncentrací mezi donorovou a receptorovou kapalinou a stále trvá stacionární difuze.

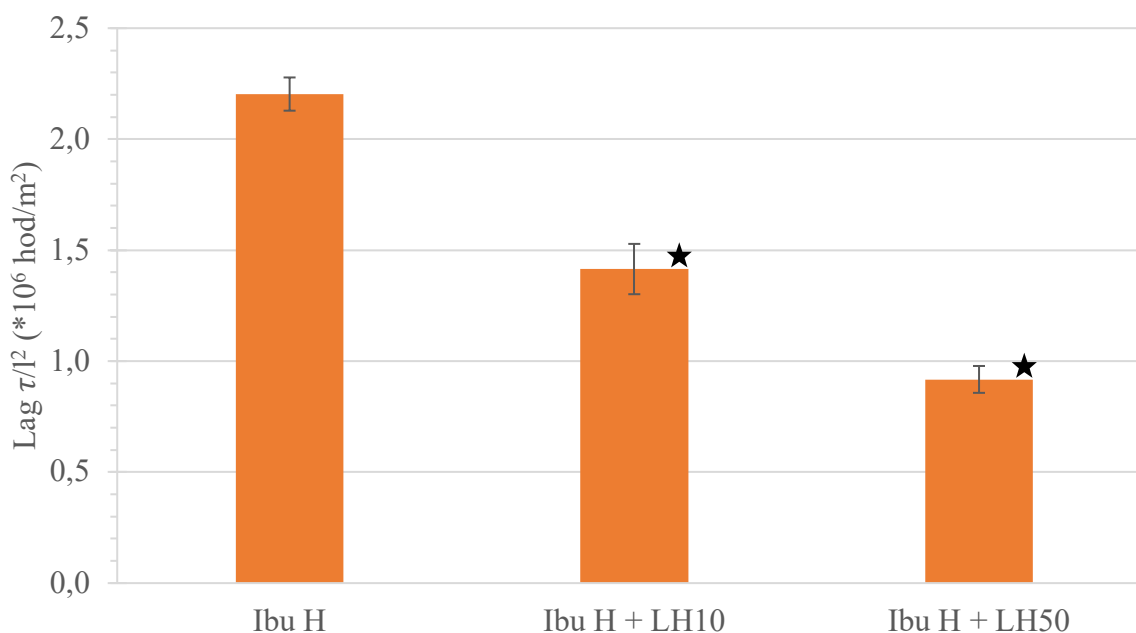
Při vyhodnocení výsledků z HPLC bylo bráno v potaz, že koncentrace, která je odhadována pro maximální rozpustnost ibuprofenu ve vodě není přesná z důvodu procesu přípravy (došlo k vysrážení části nerozpuštěného Ibuprofenu a koncentrace roztoku byla odhadnuta dle publikované koncentrace při nasycení). Nízká koncentrace ve zdrojové cele znemožnila korektně vyhodnotit korigovaný difuzní tok (lineární regrese měla velkou chybu), který kvůli malým koncentracím prošlého léčiva obsahoval velkou odchylku přesahující velikost samotného difuzního toku. Směrodatná odchylka zasahovala do záporných hodnot, což by přineslo zkreslený pohled na rychlost průniku léčiv. Důvodem může být obtížnější určení okamžiku, kdy dochází ke stacionární difuzi. Pro porovnání tohoto experimentu s ostatními byla použita pouze průměrná hodnota lag τ , která neobsahuje tak zásadní rozptyl hodnot.



Obrázek 39: Data znázorňující stacionární difuzi pro experiment ibuprofenu s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l

Z takto vybraných bodů byl vypočítán pro každou celu lag τ a následně byla tato hodnota korigována stejně jako v předchozím případě a vynesena do grafu (viz Obrázek 40). Pokud bychom srovnali lag τ ibuprofenu a jeho sodné soli (viz Obrázek 37), sodná sůl ibuprofenu penetrovala přes kožní membránu ve všech provedených experimentech s menší dobou zpoždění. Hodnota lag τ znázorňuje, s jakou rychlostí je při experimentu dosaženo stacionární difuze a může se brát jako ukazatel rychlosti přestupu látek přes membrány. Ze zmíněných výsledků se dá usoudit, že rychlost penetrace zásadité formy ibuprofenu byla vyšší než u jeho kyselého protějšku. Tento jev může být opět vysvětlen lepší rozpustností sodné formy ve vodě, která byla použita jako hlavní rozpouštědlo u obou experimentů. S větším množstvím léčivé látky dochází k většímu počtu interakcí mezi analgetikem a lignohumátem, což může být vysvětlení těchto rozdílů v penetraci.

Společným trendem obou forem ibuprofenu je klesající trend lag τ (po korekci tloušťkou membrány) v závislosti na koncentraci přidaného lignohumátu. I v tomto experimentu se ukazuje, že lignohumát měl pozitivní vliv na penetraci analgetického léčiva přes kožní membránu.



Obrázek 40: Srovnání průměrné korigované doby zpoždění (korekce byla provedena podělením lag τ druhou mocninou odpovídající průměrné tloušťky membrán) pro ibuprofen v kyselé formě s přidavkem a bez přidavku lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l a 50 g/l. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (Ibu H bez lignohumátu)

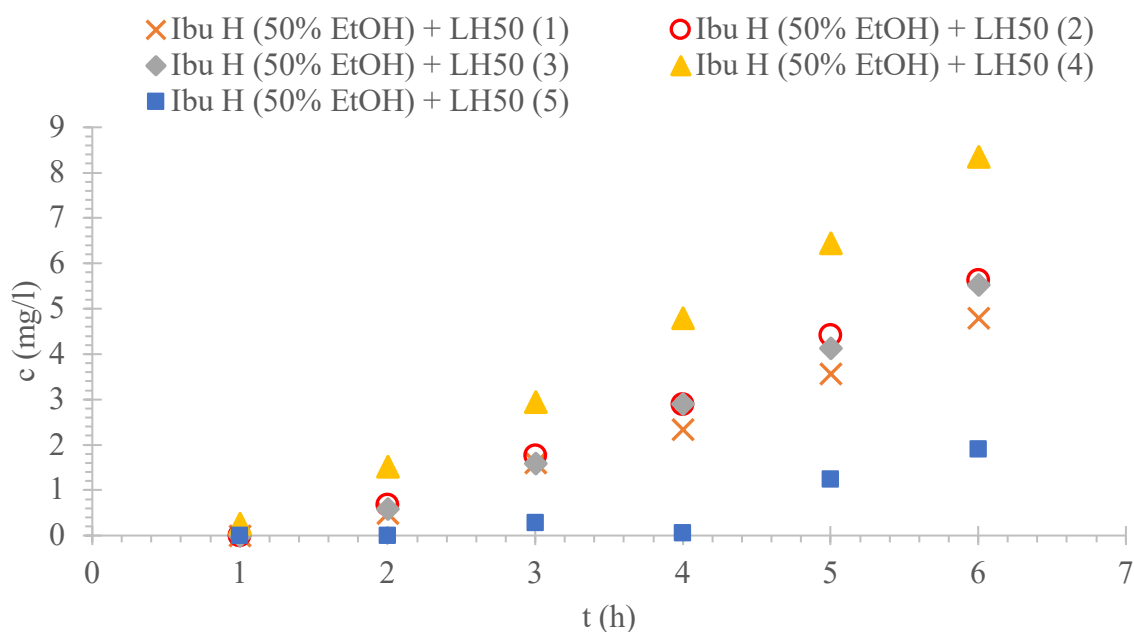
8.3.3 Vliv lignohumátu na penetraci kyselé formy ibuprofenu se solubilizačním činidlem

Experiment s nasyceným roztokem ibuprofenu přinesl informaci o tom, že malé koncentrace aktivní látky mohou mít negativní vliv na přesné určení velikosti difuzního toku. Tento růst koncentrace léčiva v receptorové části cely souvisí i s délkou experimentu, který se nastavuje podle rychlosti penetrace látek přes membránu tak, aby byla aktivní látka detekována vysokoúčinnou chromatografií a aby došlo co nejdříve ke stacionární difuzi. Tyto závěry byly motivací pro další experiment, kde bylo cílem zvýšit strmost nárůstu koncentrace analgetika v přijímací cele pomocí zvýšení koncentrace ve zdrojovém roztoku a přidavkem solubilizačního činidla do přijímacího roztoku. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.2, ibuprofen je velmi špatně rozpustný ve vodě, ovšem dobře rozpustný v etanolu. Pro možnost větší koncentrace léčiva byl poměr etanolu ve vodě zvýšen na 1:1, což umožnilo vznik roztoku ibuprofenu o koncentraci 1 g/l. Dále byly využity podklady z literární rešerše o solubilizačních schopnostech etanolu při experimentech transdermální transportu léčiv přes membránu. Využil se tedy poměr doporučený ve zmíněném článku [71], který byl 1:1 etanol ve vodě a ten se použil pro roztok v receptorové komoře difuzní cely.

Postup sestavení aparatury, měření a vyhodnocování výsledků byl stejný jako u předešlých experimentů. Během difuzního experimentu však docházelo ke vzniku velkého množství malých bublin v celém objemu receptorové komory, což mohlo mít důsledek na následné výsledky experimentu.

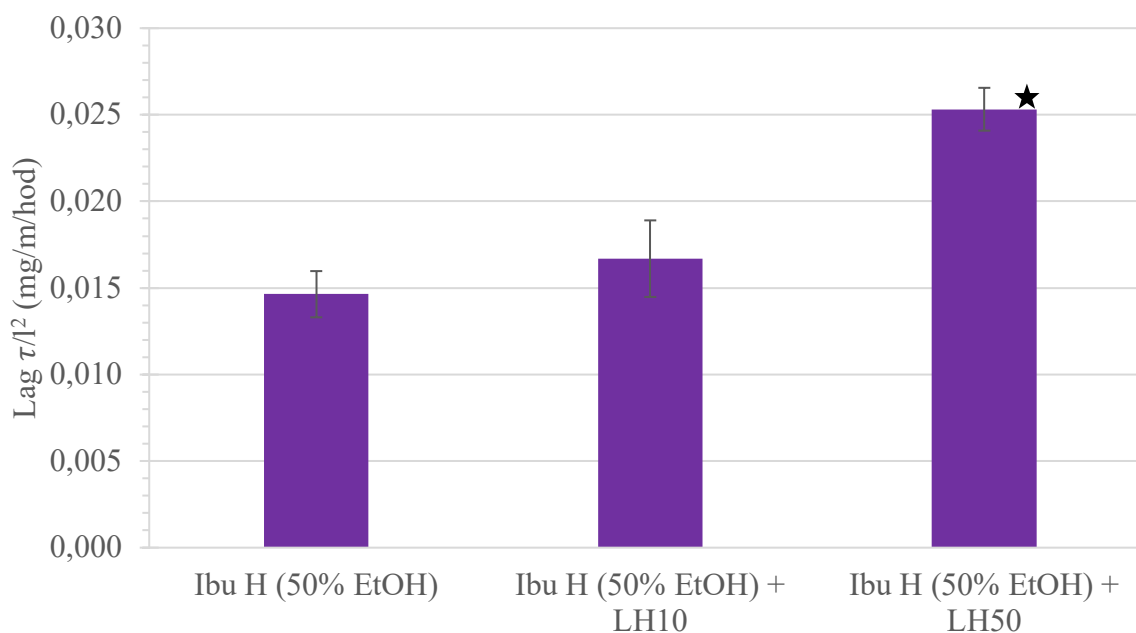
Již vyhodnocení koncentrace analgetika v receptorovém roztoku (viz Obrázek 41) naznačilo patrné zvýšení množství prošlé látky. V porovnání s grafem (viz Obrázek 34) jsou hodnoty

koncentrací ibuprofenu se solubilizačním činidlem znatelně vyšší. Také tyto výsledky odhalily, že v cele číslo 5 došlo k významnému zamezení prostupu léčiva oproti ostatním celám a ke snížení koncentrace ve 4. hodině experimentu. U žádné jiné cely během všech zde zmíněných experimentů k takovému snížení nedošlo, proto byly výsledky z této cely zanedbány. Důvodem poklesu koncentrace mohl být vznik velkého množství bublin na povrchu membrány, což mohlo zamezit difuznímu transportu ibuprofenu.



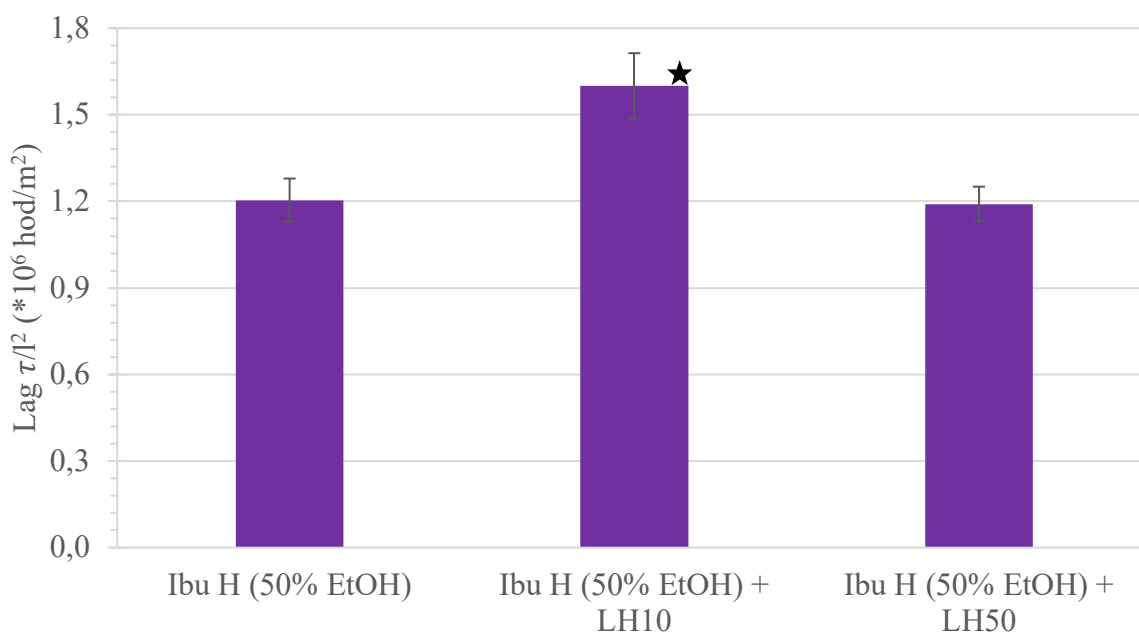
Obrázek 41: Závislost koncentrace ibuprofenu s přidavkem lignohumátu draselného o koncentraci 50 g/l na čase pro šestihodinový experiment se solubilizačním činidlem

Stejně jako u předešlých vyhodnocení byly vybrány body odpovídající stacionární difuzi a z rovnic přímek byl vypočten korigovaný lag τ a hodnoty pro korigovaný difuzní tok. Porovnáním difuzního toku (viz Obrázek 42) a té samé veličinu u sodné soli ibuprofenu (viz Obrázek 36) můžeme dojít k závěru, že zvýšení koncentrace ibuprofenu v kyselé formě a přidavek solubilizátoru významně ovlivnil hodnotu difuzního toku. Tok byl u lignohumátu o koncentraci 50 g/l dvakrát větší pro kyselou formu oproti kontrole, což značí pozitivní vliv na penetraci látek přes membránu. V rámci jednotlivých sad experimentů můžeme pozorovat podobný trend v růstu toku se zvyšující se koncentrací huminové látky. Také podobnosti statistického vyhodnocení významnosti rozdílu mezi jednotlivými přidavky lignohumátu o různé koncentraci proti vzorkům bez přidavku jsou pro tyto dvě sady podobné. U obou sad je statisticky významný rozdíl pouze u lignohumátu o koncentraci 50 g/l, což značí, že je tato koncentrace vhodnější pro výzkum vlivu huminových látek na transdermální transport analgetických léčiv.



Obrázek 42: Srovnání korigovaného difuzního toku pro ibuprofen s přidavkem a bez přidavku lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l a 50 g/l pro experimenty se solubilizačním činidlem. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (Ibu H (50% EtOH) bez lignohumátu)

Následně byl z hodnot lag τ a průměrné tloušťky membrán vytvořen graf (viz Obrázek 43). Výsledné srovnání jsou překvapivě odlišná od trendu ostatních experimentů. Zatím co u sodné soli ibuprofenu klesal lag τ v závislosti na stoupajícím korigovaném difuzním toku, pro tento experiment k takové závislosti nedošlo. U experimentu se solubilizátorem došlo takřka ke dvojnásobnému snížení lag τ v porovnání s experimentem nasyceného ibuprofenu o nižší koncentraci (viz Obrázek 40 a Obrázek 43). Právě tento rozdíl přináší možné vysvětlení odlišného trendu. Zvýšením poměru etanolu ve vodě na 1:1 mohla vysoká koncentrace etanolu způsobit poškození *Stratum corneum*, což by mohlo mít za následek urychlení prostupu ibuprofenu bez přidavku lignohumátu. V systému s přidavkem LH mohla hrát roli komplexace ibuprofenu huminovou komponentou látek, což ovlivňuje gradient koncentrací pro volné a vázané molekuly léčiva a rychlost prostupu těchto forem léčiva.



Obrázek 43: Srovnání průměrné korigované doby zpoždění (korekce byla provedena podělením lag τ druhou mocninou odpovídající průměrné tloušťky membrán) s přídatkem a bez přídatku lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l a 50 g/l pro experimenty se solubilizačním činidlem. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (Ibu H (50% EtOH) bez lignohumátu)

8.3.4 Vliv pH na transdermální transport léčivých látek

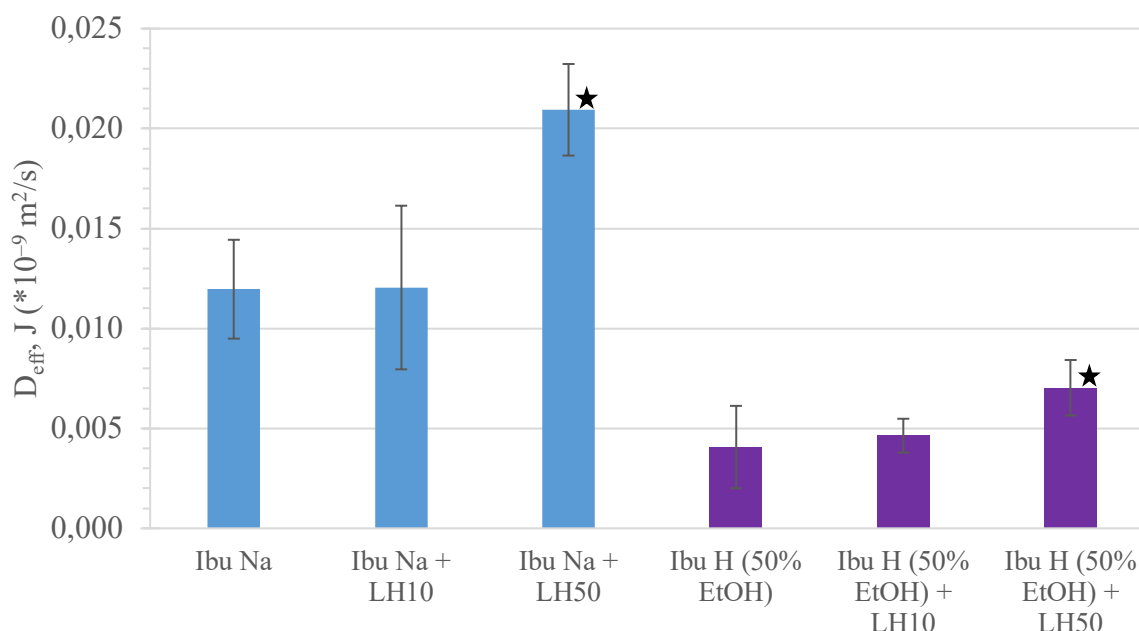
Pozitivní vliv lignohumátu draselného na zkrácení lag τ je vysvětlován vznikem nekovalentních interakcí mezi ibuprofenem a funkčními skupinami této huminové látky. Je ovšem nutné vyloučit i ostatní vlastnosti, které huminové kyseliny mají a které by tento transport mohly ovlivnit. Jedno z dalších možných vysvětlení pro zvýšení rychlosti prostupu může být i poškození kožní bariéry díky změně pH. Huminové látky při rozpuštění v roztoku zvyšují pH. Proto bylo pH jednotlivých koncentrací změřeno pomocí pH metru a výsledky porovnány s již vyhodnocenými experimenty vlivu lignohumátu na penetraci ibuprofenu a jeho sodné soli. Tabulka 3 ukazuje hodnoty pH pro obě používané koncentrace lignohumátu. Přípravené roztoky byly měřeny ve třech opakováních a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Z výsledků je patrné, že zvýšením koncentrace lignohumátu nedochází k dalšímu zvýšení jeho zásaditosti roztoku. Pokud by hodnota pH byla klíčovým parametrem, který stojí za rozdílem rychlosti prostupu léčivé látky bez, resp. s přítomností lignohumátu, musel by lignohumát o koncentraci 10 g/l vykazovat lepší schopnosti zkrácení lag τ nebo zvýšení koncentrační křivky než koncentrovanější roztok. U žádného z experimentů ovšem tato tendence nebyla vyzorována, z toho je možné usuzovat, že pH lignohumátu nemá zásadní vliv na transdermální absorpci léčiv přes biologickou membránu.

Tabulka 3: Hodnoty pH pro roztoky lignohumátu draselného o koncentracích 10 a 50 g/l

	pH	
	LH10	LH50
	9,610	9,450
	9,590	9,450
	9,610	9,480
Smodch:	0,009	0,014
Průměr:	9,603	9,460

8.3.5 Srovnání efektivních difuzních koeficientů D_{eff}

Posledním krokem, kterým byla uzavřena celá interpretační část diplomová práce, byl výpočet efektivních difuzních koeficientů pro všechny řady experimentů, aby bylo možné srovnání vlivu lignohumátu draselného na tuto veličinu. Výpočet byl proveden dvěma různými směry, aby došlo ke srovnání obou přístupů, které byly během celé práce srovnávány. Prvním směrem byl výpočet pomocí rovnice prvního Fickova zákona (viz rovnice 4.1.1) nahorekterý vycházel z korigovaného difuzního toku, ten byl následně podělen počáteční koncentrací aktivní látky ve zdrojové cele, a poté byl výsledek upraven na vhodné jednotky. Bohužel tento přístup nebyl vhodný pro experiment s nasyceným roztokem kyselé formy ibuprofenu, jelikož pro tento roztok nebyla změřena přesná koncentrace léčiva v roztoku. Z toho důvodu byl porovnáván jen experiment se sodnou solí ibuprofenu a kyselou formou ibuprofenu s přidavkem solubilizačního činidla.



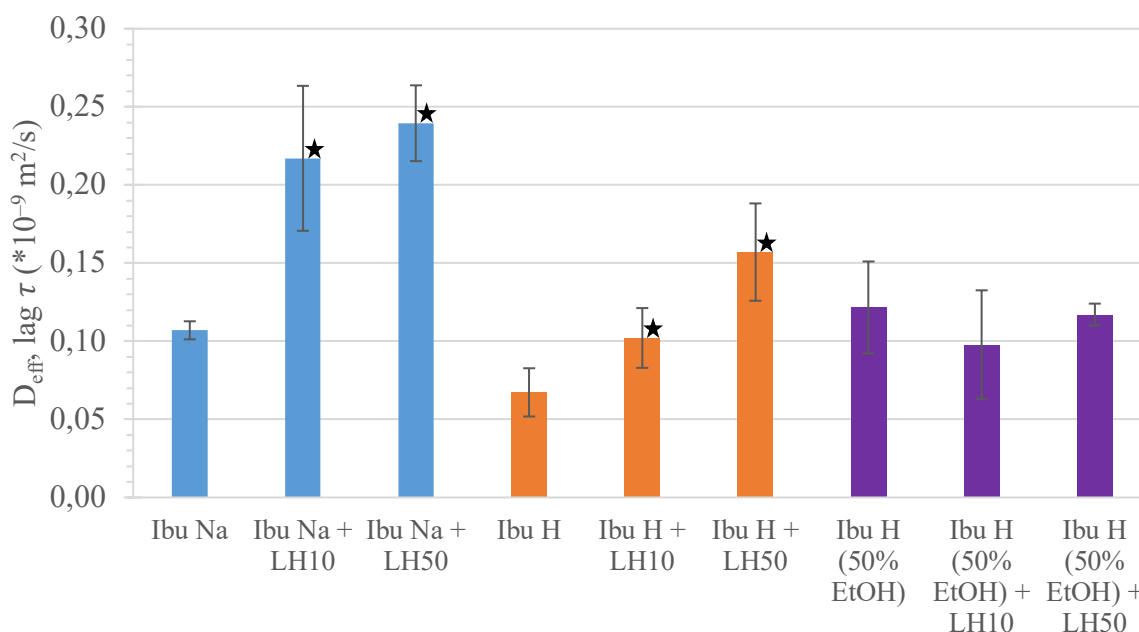
Obrázek 44: Srovnání efektivních difuzních koeficientů vypočtených z prvního Fickova zákona. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (léčivo bez LH)

I přes zvýšení koncentrace kyselé formy a využití solubilizátoru byl efektivní difuzní koeficient sodné soli větší, a to i v případě léčiva bez přidavku huminové látky (viz Obrázek 44). Ovšem trend pro oba tyto experimenty je obdobný, proto se dá usoudit, že přidavek lignohumátu

draselného pozitivně ovlivnil růst efektivního difuzního koeficientu a tento vliv je závislý na koncentraci tohoto zdroje huminových kyselin.

Druhý způsob výpočtu byl postaven na metodě středního kvadratického posunu. Získané hodnoty lag τ byly dosazeny do vzorce (viz rovnice 4.1.2) i s příslušnou tloušťkou použité membrány. Tím byly získány efektivní difuzní koeficienty pro všechny sady vzorků (viz Obrázek 45). I zde je jasně znát vysoká hodnota difuzního koeficientu pro experimenty se sodnou solí ibuprofenu. Jak u sodné soli, tak u kyselé formy v nasyceném roztoku můžeme sledovat zvýšení koeficientu v závislosti na koncentraci přidaného lignohumátu draselného. Tento trend by mohl znova potvrdit teorii o pozitivním účinku lignohumátu na difuzní koeficient ibuprofenu.

Poslední experiment z tohoto trendu ovšem vybočuje, a to hlavně podstatným zvýšením koeficientu v porovnání s méně koncentrovanou kyselou formou. Zde mohla ovlivnit výsledky vysoká koncentrace etanolu, díky které došlo ke zvýšení rozpustnosti ibuprofenu. Zdrojový roztok vody s etanolem v poměru 1.1 mohl poškodit povrchovou vrstvu kožní membrány, která pak propouštěla větší množství analgetického léčiva. Stejná úvaha se nabízí i pro experimenty spojené s lignohumátem, kde došlo spíše ke snížení difuzního koeficientu. Zde můžeme najít vysvětlení v možném ovlivnění koncentračního gradientu léčivých látek.



Obrázek 45: Srovnání efektivních difuzních koeficientů vypočtených metodou středního posunu čtverců. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (léčivo bez LH)

Pokud porovnáme oba výpočty efektivního difuzního koeficientu, výpočet za pomoci metody středního posunu čtverců má hodnotu desetinásobně větší než koeficient vypočtený z Fickova zákona, což by znamenalo, že difuze skrz membránu je rychlejší než následný nárůst koncentrace v receptorové komoře. Tento rozdíl může být vysvětlen tím, že přes membránu difundují různé formy látek, například velké i malé komplexy lignohumátu s ibuprofenem, ale také volné formy ibuprofenu. V počáteční fázi procházejí nejrychlejší variace těchto forem, což způsobí rychlý průchod přes membránu a s tím související nízkou hodnotu lag τ .

9 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo popsat vliv huminových látek na transdermální penetraci vybraných aktivních látek. Rešeršní část dala směr laboratorním experimentům, které bylo nutné průběžně optimalizovat, aby byly výsledky práce přesnější, kvalitnější a publikovatelné. Každý krok přípravy roztoků, Franzových difuzních cel a membrán prasečích uší je podrobně popsán v experimentální části, což umožňuje všechny experimenty zopakovat reprodukovatelným způsobem nebo práci využít jako podklad pro další bádání v těchto oblastech.

Práce s prasečíma ušima má řadu výhod i nevýhod. Samotná izolace si žádá velké množství času, pečlivosti a trpělivosti. Pro další experimenty by bylo vhodné zjednodušit přípravu pomocí nástrojů, které by vytvořily membránu o předem stanovené délce a tím by se mohlo přeskočit zdoluhavé odřezávání kůže od chrupavky a měření každé jednotlivé membrány pomocí mikrometru. Dále je doporučeno zajistit razidlo, které by vykrojilo přesný rozměr membrány potřebný na následný difuzní experiment. V porovnání s membránami Strat-M, které byly použity v bakalářské práci, na kterou tato práce navazuje, byla prasečí membrána vhodnou alternativou pro difuzní experimenty. I přes nebezpečí prořiznutí membrány skalpelem se takřka nestávalo, že by membrány protekly nebo špatně těsnily při sestavování difuzní aparatury. V tomto ohledu byla práce s membránami Strat-M komplikovanější a docházelo k častému protečení donorové kapaliny do receptorové.

Díky lepší propustnosti biologické membrány mohl být experiment oproti bakalářské práci proveden v řádu hodin, což bylo žádoucí i kvůli možné degradaci této živočišné tkáně. Podstatnou nevýhodou ovšem bylo uvolňování nežádoucích látek do receptorové kapaliny, které následně překrývaly absorpční spektra zkoumaných analgetických látek a znemožňovaly kvantitativní analýzu prošlého lignohumátu draselného.

Penetrace samotného lignohumátu draselného byla zkoumána prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie již při prvních pilotních experimentech, neboť tato informace byla zásadní pro plánování dalších experimentů. Již při srovnání absorpčních spekter obou používaných koncentrací bylo patrné, že lignohumát o koncentraci 50 g/l bude vhodným kandidátem pro další experimenty. Koncentrace 10 g/l byla použita hlavně z důvodu zkoumání vlivu koncentrace této huminové látky na vybraná léčiva.

Po ověření, že tloušťka membrán má zásadní roli na transport látek skrz kožní bariéru následovaly tři sady experimentů, které srovnávali data z HPLC analýzy o vliv huminových kyselin na ibuprofen ve dvou různých formách. Všechny výsledky byly podrobeny statickým testem Dean-Dixon, který sloužil na vyřazení odlehlých hodnot zkreslující výsledky a t-testem statistické významnosti, který označil významné rozdíly mezi výsledky a posunul tak úroveň diskusní části této práce.

Jak korigované výsledky, tak výpočty efektivních difuzních koeficientů popisují vliv huminových látek na transdermální transport analgetik. Sodná sůl ibuprofenu je označena jako vhodný adept na další testování těchto transportních vlivů, neboť příprava roztoků této látky probíhala bez problémů s rozpustností a výsledné hodnoty penetrace jsou dobrým základem pro další rozšíření výzkumu. V porovnání s ostatními výsledky dosahovala tato forma ibuprofenu

největších efektivních difuzních koeficientů, a to i pro případ, kdy koncentrace kyselé formy ibuprofenu s etanolem coby solubilizátorem byla víc než 6,5krát větší.

Pro kyselou formu ibuprofenu byl postup čerpán z bakalářské práce, kde byla tato forma použita jako nasycený roztok o nepřesně definované koncentraci. Tento experiment bylo nutné upravit pro roztok o vyšší koncentraci, která bude jasně určena, neboť výsledné hodnoty korigovaného difuzního toku pro nasycený roztok byly nepublikovatelné. I přesto tento experiment svými výsledky o vlivu huminových látek na lag τ obohatil tuto diplomovou práci. Také byly výsledky těchto experimentů využity pro srovnání posledního difuzního experimentu s použitým solubilizátorem ve formě etanolu. Díky solubilizačnímu činidlu a odpovídajícímu zvýšení koncentrace ibuprofenu v donorové části bylo možné detekovat léčivo v dostatečných koncentracích, aby bylo možné vypočítat efektivní difuzní koeficienty z rovnice Fickova prvního zákona. Ve srovnání se sodnou solí byly však hodnoty difuzních koeficientů dvakrát až třikrát menší, což značí, že sodná sůl i přes svůj náboj, který jí může v transportu skrz kožní membránu omezovat, je při penetraci výrazně rychlejší. Kyselá forma také odhalila možný vliv etanolu na bariérovou funkci *Stratum corneum*, neboť podle výsledků se její efektivní difuzní koeficient při poslední sadě experimentů zvýšil, a to takřka dvojnásobně.

Při porovnání efektivních difuzních koeficientů byly hodnoty vypočtené metodou středního posunu čtverců, které vychází v hodnoty lag τ , o řád vyšší než hodnoty vypočtené z rovnice prvního Fickova zákona. Tato odchylka je vysvětlena vlivem lignohumátu draselného, který svou přítomností koncentrační gradienty volné a vázané formy ibuprofenu. Následně má každá tato forma jiná difuzní potenciál a difuze přes membránu probíhá rychleji než nárůst koncentrace léčiva v receptorové kapalině.

Posledním experimentem bylo měření pH lignohumátu obou koncentrací. Vysoké pH by mohlo být důvodem rychlé penetrace přes prasečí kůži, difuzní koeficient by však musel stoupat přímo úměrnou s hodnotou pH, což nebylo prokázáno.

Je jisté, že tato práce otevírá řadu dalších příležitostí pro výzkum vlivu huminových látek na transdermální transport léčiv. Další experimenty by se mohly zaměřit na hledání alternativního solubilizátoru, který by zvýšil rozpustnosti kyselé formy ibuprofenu a zároveň nepoškozoval vnější vrstvu kůže. Výzkum by také mohl rozšířit paletu léčiv o další komerčně dostupná analgetika, jako jsou například ketoprofen nebo diklofenak. A v neposlední řadě je důležité přiblížit experimenty běžným lékovým formám, které se pro tato léčiva využívají, jako jsou hydrogely, emulze a krémy.

10 ZDROJE

- [1] MARIEB, Elaine Nicpon a Jon MALLATT. *Anatomie lidského těla*. Vyd. 1. Brno: CP Books, 2005. ISBN 978-80-251-0066-0.
- [2] SALA, M., R. DIAB, A. ELAISSARI a H. FESSI. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **535**(1–2), 1–17. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.10.046
- [3] ABD, Eman, Shereen YOUSUF, Michael PASTORE, Krishna TELAPROLU, Yousuf MOHAMMED, Sarika NAMJOSHI, Jeffrey GRICE a Michael ROBERTS. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* [online]. 2016, **8**, 163–176. ISSN 1179-1438. Dostupné z: doi:10.2147/CPAA.S64788
- [4] LAI-CHEONG, Joey E. a John A. MCGRATH. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* [online]. 2013, **41**(6), 317–320. ISSN 13573039. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017
- [5] ALEXANDER, Amit, Shubhangi DWIVEDI, AJAZUDDIN, Tapan K. GIRI, Swarnlata SARAF, Shailendra SARAF a Dulal Krishna TRIPATHI. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **164**(1), 26–40. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.09.017
- [6] ZAIDI, Zohra a Sean W. LANIGAN. Skin: Structure and Function. In: S.W LANIGAN a Zohra ZAIDI *Dermatology in Clinical Practice* [online]. London: Springer London, 2010 [vid. 2023-02-22], s. 1–15. ISBN 978-1-84882-861-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-84882-862-9_1
- [7] MCLAFFERTY, Ella, Charles HENDRY a Alistair FARLEY. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard (through 2013)*. 2012, **27**(3), 35–42. ISSN 00296570.
- [8] JEPPS, Owen G., Yuri DANCIK, Yuri G. ANISSIMOV a Michael S. ROBERTS. Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, **65**(2), 152–168. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.04.003
- [9] SHINGADE, Ganesh Maruti. Review on: Recent trend on transdermal drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2012, **2**(1) [vid. 2023-03-13]. ISSN 2250-1177. Dostupné z: doi:10.22270/jddt.v2i1.74
- [10] BARTOSOVA, L. a J. BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **19**(27), 4671–4677. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986712803306358
- [11] SUGUMAR, Vaisnevee, Maan HAYYAN, Priya MADHAVAN, Won Fen WONG a Chung Yeng LOOI. Current Development of Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Insulin Delivery. *Biomedicines* [online]. 2023, **11**(3), 664. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines11030664
- [12] JOSHI, Amit a Jaideep RAJE. Sonicated transdermal drug transport. *Journal of Controlled Release* [online]. 2002, **83**(1), 13–22. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(02)00200-6

- [13] KALIA, Y. Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, **48**(2–3), 159–172. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00113-2
- [14] AHAD, Abdul, Mohammad RAISH, Yousef A. BIN JARDAN, Abdullah M. AL-MOHIZEA a Fahad I. AL-JENOABI. Delivery of Insulin via Skin Route for the Management of Diabetes Mellitus: Approaches for Breaching the Obstacles. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **13**(1), 100. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13010100
- [15] JANOŠ, Pavel. Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **983**(1), 1–18. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)01687-4
- [16] RUPIASIH, Ni Nyoman a Pandit VIDYASAGAR. A Review: Compositions, Structures, Properties and Applications of Humic Substances. *J. Adv. Sci. and Tech.* 2005, **8**, 16–25.
- [17] HERTKORN, N., H. CLAUS, Ph. SCHMITT-KOPPLIN, E. M. PERDUE a Z. FILIP. Utilization and Transformation of Aquatic Humic Substances by Autochthonous Microorganisms. *Environmental Science & Technology* [online]. 2002, **36**(20), 4334–4345. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es010336o
- [18] SUTTON, Rebecca a Garrison SPOSITO. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environmental Science & Technology* [online]. 2005, **39**(23), 9009–9015. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es050778q
- [19] *Health Solution* [online]. [vid. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://www.health-solution.eu/what-are-humic-substances/>
- [20] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL a Jiří PATOČKA. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2005, **3**(1), 13–24. ISSN 1214021X, 12140287. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2005.002
- [21] DE MELO, Bruna Alice Gomes, Fernanda Lopes MOTTA a Maria Helena Andrade SANTANA. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **62**, 967–974. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.12.001
- [22] VON WANDRUSZKA, Ray. Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochemical Transactions* [online]. 2000, **1**(1), 10. ISSN 1467-4866. Dostupné z: doi:10.1186/1467-4866-1-10
- [23] MUSCOLO, A., M. SIDARI a S. NARDI. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration* [online]. 2013, **129**, Molecular Aspects of Humic Substances and Biological Functionality in Soil Ecosystems, 57–63. ISSN 0375-6742. Dostupné z: doi:10.1016/j.gexplo.2012.10.012
- [24] ISLAM, Md. Aminul, David W. MORTON, Bruce B. JOHNSON a Michael J. ANGOVE. Adsorption of humic and fulvic acids onto a range of adsorbents in aqueous systems, and their effect on the adsorption of other species: A review. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, **247**, 116949. ISSN 1383-5866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2020.116949

- [25] POERSCHMANN, Juergen, Ulf TROMMLER, Petra NYPLOVA, Peter MORGENSTERN a Tadeusz GÓRECKI. Complexation–flocculation of organic contaminants by the application of oxyhumolite-based humic organic matter. *Chemosphere* [online]. 2008, **70**(7), 1228–1237. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.004
- [26] TIWARI, Jaya, AL RAMANATHAN, Kuldeep BAUDDH a John KORSTAD. Humic substances: structure, function and benefits for agro-ecosystem: A review. *Pedosphere* [online]. 2022 [vid. 2023-03-28]. ISSN 1002-0160. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedsph.2022.07.008
- [27] ZHANG, Yuanqin, Yanhong LI, Liping CHANG, Changyu ZI, Guangbing LIANG, Dengfeng ZHANG a Yi SU. A comparative study on the structural features of humic acids extracted from lignites using comprehensive spectral analyses. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(37), 22002–22009. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA03166F
- [28] SUN, Zhiguo, Bo TANG a Hongyong XIE. Treatment of Waste Gases by Humic Acid. *Energy & Fuels* [online]. 2015, **29**(3), 1269–1278. ISSN 0887-0624. Dostupné z: doi:10.1021/ef502299k
- [29] ADAM, Georgius A., A. Abdul RAZAQ a A. Abdul ZAHRAH. Humic substances as new stabilisers for polyvinylchloride. *Thermochimica Acta* [online]. 1986, **99**, 217–222. ISSN 0040-6031. Dostupné z: doi:10.1016/0040-6031(86)85284-4
- [30] JACOB, Kala K, Prashob Peter KJ a Chandramohanakumar N. Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system - a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics* [online]. 2019, 1–4. ISSN 0975-7058. Dostupné z: doi:10.22159/ijap.2019v11i3.31421
- [31] KLÖCKING, Renate a Björn HELBIG. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. In: Alexander STEINBÜCHEL, ed. *Biopolymers Online* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2001 [vid. 2023-03-29]. ISBN 978-3-527-30290-1. Dostupné z: doi:10.1002/3527600035.bpol1013
- [32] NEYTS, J., R. SNOECK, P. WUTZLER, M. CUSHMAN, R. KLÖCKING, B. HELBIG, P. WANG a E. DE CLERCQ. Poly(Hydroxy)Carboxylates as Selective Inhibitors of Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Replication. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* [online]. 1992, **3**(4), 215–222. ISSN 0956-3202. Dostupné z: doi:10.1177/095632029200300404
- [33] KUMAR, Manish, Abhilasha SHETE a Zafar AKBAR. A Review on Analgesic: From Natural Sources. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2010, **1**, 95–100.
- [34] RUSSO, Cathy M. a William G. BROSE. Chronic Pain. *Annual Review of Medicine* [online]. 1998, **49**(1), 123–133. ISSN 0066-4219, 1545-326X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.med.49.1.123
- [35] CARR, Daniel B a Leonidas C GOUDAS. Acute pain. *The Lancet* [online]. 1999, **353**(9169), 2051–2058. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(99)03313-9

- [36] ORTIZ, Mario I., María Asunción Romero MOLINA, Young-Chang P. ARAI a Carlo Luca ROMANÒ. Analgesic Drugs Combinations in the Treatment of Different Types of Pain. *Pain Research and Treatment* [online]. 2012, **2012**, 1–2. ISSN 2090-1542, 2090-1550. Dostupné z: doi:10.1155/2012/612519
- [37] HIJMA, Hemme J. a Geert Jan GROENEVELD. Analgesic drug development: proof-of-mechanism and proof-of-concept in early phase clinical studies. *Medicine in Drug Discovery* [online]. 2021, **10**, 100083. ISSN 2590-0986. Dostupné z: doi:10.1016/j.medidd.2021.100083
- [38] LABIANCA, Roberto, Piercarlo SARZI-PUTTINI, Stefano Maria ZUCCARO, Paolo CHERUBINO, Renato VELLUCCI a Diego FORNASARI. Adverse Effects Associated with Non-opioid and Opioid Treatment in Patients with Chronic Pain: *Clinical Drug Investigation* [online]. 2012, **32**, 53–63. ISSN 1173-2563. Dostupné z: doi:10.2165/11630080-000000000-00000
- [39] LEJČKO, MUDr Jan. Přehled opioidních analgetik. *Praktické lékařství*. 2009, **5(4)**, 172–175.
- [40] BROOK, Karolina, Jessica BENNETT a Sukumar P. DESAI. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *Journal of Anesthesia History* [online]. 2017, **3(2)**, 50–55. ISSN 2352-4529. Dostupné z: doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
- [41] DUTHIE, David a Walter NIMMO. Adverse effects of opioid analgesic drugs. *British journal of anaesthesia* [online]. 1987, **59**, 61–77. Dostupné z: doi:10.1093/bja/59.1.61
- [42] WHITE, Paul F. What are the advantages of non-opioid analgesic techniques in the management of acute and chronic pain? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. 2017, **18(4)**, 329–333. ISSN 1465-6566. Dostupné z: doi:10.1080/14656566.2017.1289176
- [43] SETH, Bharti. Non-opioid analgesics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2019, **20(8)**, 456–459. ISSN 1472-0299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2019.06.001
- [44] HEBBES, Christopher a David LAMBERT. Non-opioid analgesics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2011, **12(2)**, Pain / Pharmacology, 69–72. ISSN 1472-0299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2010.10.022
- [45] HEBBES, Christopher a David LAMBERT. Non-opioid analgesic drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2008, **9(2)**, Pain, 79–83. ISSN 1472-0299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2007.11.012
- [46] DUNN, Lauren K., Marcel E. DURIEUX a Edward C. NEMERGUT. Non-opioid analgesics: Novel approaches to perioperative analgesia for major spine surgery. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* [online]. 2016, **30(1)**, Perioperative Management for Major Spine Surgery, 79–89. ISSN 1521-6896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpa.2015.11.002
- [47] BUSSON, Mervyn. Update on Ibuprofen: Review Article. *Journal of International Medical Research* [online]. 1986, **14(2)**, 53–62. ISSN 0300-0605, 1473-2300. Dostupné z: doi:10.1177/030006058601400201
- [48] BUSHRA, Rabia a Nousheen ASLAM. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal* [online]. 2010, **25(3)**, 155–166. ISSN 1999-768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2010.49

- [49] KRUPA, Anna, Dorota MAJDA, Renata JACHOWICZ a Włodzimierz MOZGAWA. Solid-state interaction of ibuprofen and Neusilin US2. *Thermochimica Acta* [online]. 2010, **509**(1), 12–17. ISSN 0040-6031. Dostupné z: doi:10.1016/j.tca.2010.05.009
- [50] POTTHAST, H., J.B. DRESSMAN, H.E. JUNGINGER, K.K. MIDHA, H. OESER, V.P. SHAH, H. VOGELPOEL a D.M. BAREND. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ibuprofen**This paper reflects the scientific opinion of the authors and not the policies of regulating agencies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2005, **94**(10), 2121–2131. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.20444
- [51] MODI, C M, S K MODY, H B PATEL, G B DUDHATRA, Avinash KUMAR a Madhavi AVALE. Toxicopathological overview of analgesic and anti-inflammatory drugs in animals. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012, **2**(1), 149–157. ISSN 2231-3354.
- [52] PERLOVICH, German a Annette BAUER-BRANDL. Solvation of Drugs as a Key for Understanding Partitioning and Passive Transport Exemplified by NSAIDs. *Current Drug Delivery* [online]. 2004, **1**(3), 213–226. ISSN 15672018. Dostupné z: doi:10.2174/1567201043334786
- [53] FRASCH, H. Frederick a Ana M. BARBERO. Application of numerical methods for diffusion-based modeling of skin permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, **65**(2), 208–220. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.01.001
- [54] MANTILLA, Alexander B. C. a Nathan J. KUWADA. A Flexible Laboratory Exercise Introducing Practical Aspects of Mean Squared Displacement. *The Biophysicist* [online]. 2021, **2**(1), 126–136. ISSN 2578-6970. Dostupné z: doi:10.35459/tbp.2020.000157
- [55] XIA, Hongmei, Yinxiang XU, Zhiqing CHENG a Yongfeng CHENG. Tetramethylpyrazine-Loaded Hydrogels: Preparation, Penetration Through a Subcutaneous-Mucous-Membrane Model, and a Molecular Dynamics Simulation. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2017, **18**(5), 1720–1727. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-016-0645-5
- [56] NG, Shiow-Fern, Jennifer J. ROUSE, Francis D. SANDERSON, Victor MEIDAN a Gillian M. ECCLESTON. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2010, **11**(3), 1432–1441. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-010-9522-9
- [57] JIRÁSKOVÁ, Johana, Pavel ONDREJČEK, Tomáš WOLASCHKA, Milan ŘEHULA a Miloslava RABIŠKOVÁ. Aplikační možnosti disoluční metody s průtokovou celou. *Chemické listy*. 2015, **109**(1), 34–40. ISSN 1213-7103.
- [58] PermeGear. *PermeGear* [online]. [vid. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://permegear.com/>
- [59] KUMAR, Pradeep, P. SANGHVI a Charles C. COLLINS. Comparison of Diffusion Studies of Hydrocortisone Between the Franz Cell and the Enhancer Cell. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 1993, **19**(13), 1573–1585. ISSN 0363-9045, 1520-5762. Dostupné z: doi:10.3109/03639049309069327
- [60] NIU, Yuhua, Tong YANG, Ruyuan KE a Chen WANG. Preparation and characterization of pH-responsive sodium alginate/humic acid/konjac hydrogel for L-ascorbic acid controlled release. *Materials Express* [online]. 2019, **9**(6), 563–569. ISSN 2158-5849. Dostupné z: doi:10.1166/mex.2019.1537

- [61] KHAN, Rahmuddin, Pooja JAIN, Mohd. AQIL, Suraj P. AGARWAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL. Pharmacokinetic evaluation of fulvic acid-ketoconazole complexes: A validation and line extension study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2020, **55**, 101469. ISSN 1773-2247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2019.101469
- [62] KHAN, Rahmuddin, Pooja JAIN, Foziyah ZAKIR, Mohd AQIL, Sameer ALSHEHRI, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL. Quality and In Vivo Assessment of a Fulvic Acid Complex: A Validation Study. *Scientia Pharmaceutica* [online]. 2022, **90**(2), 33. ISSN 2218-0532. Dostupné z: doi:10.3390/scipharm90020033
- [63] MARTINI, Silvia, Claudia D'ADDARIO, Claudia BONECHI, Gemma LEONE, Antonio TOGNAZZI, Marco CONSUMI, Agnese MAGNANI a Claudio ROSSI. Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: Synthesis and characterization of β -carotene–humic acid complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2010, **101**(3), 355–361. ISSN 1011-1344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.08.008
- [64] SIYAWAMWAYA, Margaret, Lisa C. DU TOIT, Pradeep KUMAR, Yahya E. CHOONARA, Pierre P. P. D. KONDIAH a Viness PILLAY. 3D printed, controlled release, tritherapeutic tablet matrix for advanced anti-HIV-1 drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2019, **138**, The Inspiration, Emerging Trends, and Future Challenges of Nano-Biotechnology in HIV/AIDS Prophylaxis and Treatment, 99–110. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2018.04.007
- [65] D. REDE, Sachin a Rupal K. JANI. Solubility Enhancement of Paclitaxel by Using Biomaterial. *Research Journal of Pharmacy and Technology* [online]. 2022, 5089–5093. ISSN 0974-360X, 0974-3618. Dostupné z: doi:10.52711/0974-360X.2022.00855
- [66] PRADAL, Julie. Comparison of Skin Permeation and Putative Anti-Inflammatory Activity of Commercially Available Topical Products Containing Ibuprofen and Diclofenac. *Journal of Pain Research* [online]. 2020, **13**, 2805–2814. ISSN null. Dostupné z: doi:10.2147/JPR.S262390
- [67] RASOOL, Bka, E ABU-GHARBIEH, S FAHMY, H SAAD a S KHAN. Development and evaluation of ibuprofen transdermal gel formulations. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2010, **9**(4) [vid. 2023-04-06]. ISSN 1596-9827, 1596-5996. Dostupné z: doi:10.4314/tjpr.v9i4.58928
- [68] WHITEFIELD, M., C. J. A. O'KANE a S. ANDERSON. Comparative efficacy of a proprietary topical ibuprofen gel and oral ibuprofen in acute soft tissue injuries: a randomized, double-blind study*. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* [online]. 2002, **27**(6), 409–417. ISSN 0269-4727, 1365-2710. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2710.2002.00439.x
- [69] CHEN, Jun, Qiu-Dong JIANG, Ye-Ming WU, Pei LIU, Jun-Hong YAO, Qing LU, Hui ZHANG a Jin-Ao DUAN. Potential of Essential Oils as Penetration Enhancers for Transdermal Administration of Ibuprofen to Treat Dysmenorrhoea. *Molecules* [online]. 2015, **20**(10), 18219–18236. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules201018219

- [70] CHANTASART, Doungdaw, Siriwan CHOOTANASOONTORN, Jiraphong SUKSIRIWORAPONG a S. KEVIN LI. Investigation of pH Influence on Skin Permeation Behavior of Weak Acids Using Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **104**(10), 3459–3470. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24556
- [71] WATKINSON, R.M., C. HERKENNE, R.H. GUY, J. HADGRAFT, G. OLIVEIRA a M.E. LANE. Influence of Ethanol on the Solubility, Ionization and Permeation Characteristics of Ibuprofen in Silicone and Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2009, **22**(1), 15–21. ISSN 1660-5527, 1660-5535. Dostupné z: doi:10.1159/000183922
- [72] KLANG, Victoria, Julia C. SCHWARZ, Barbara LENOBEL, Martina NADJ, Josef AUBÖCK, Michael WOLZT a Claudia VALENTA. In vitro vs. in vivo tape stripping: Validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2012, **80**(3), 604–614. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2011.11.009
- [73] SCHMOOK, Fritz P., Josef G. MEINGASSNER a Andreas BILLICH. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **215**(1), 51–56. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(00)00665-7
- [74] TAKASUGA, Shinri, Rie YAMAMOTO, Shoichi MAFUNE, Chiyo SUTOH, Katsuya KOMINAMI, Yoshimasa YOSHIDA, Masao ITO a Mine KINOSHITA. In-vitro and in-vivo transdermal iontophoretic delivery of tramadol, a centrally acting analgesic. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2011, **63**(11), 1437–1445. ISSN 0022-3573. Dostupné z: doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01355.x
- [75] KAUR, Lakhvir, Kanwaldeep SINGH, Surinder PAUL, Sukhprit SINGH, Shashank SINGH a Subheet Kumar JAIN. A Mechanistic Study to Determine the Structural Similarities Between Artificial Membrane Strat-MTM and Biological Membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2018, **19**(4), 1606–1624. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-018-0959-6
- [76] KAUR, Manjot, Kanwardeep SINGH a Subheet Kumar JAIN. Luliconazole vesicular based gel formulations for its enhanced topical delivery. *Journal of Liposome Research* [online]. 2020, **30**(4), 388–406. ISSN 0898-2104, 1532-2394. Dostupné z: doi:10.1080/08982104.2019.1682602
- [77] SIMON, Alice, Maria Inês AMARO, Anne Marie HEALY, Lucio Mendes CABRAL a Valeria Pereira DE SOUSA. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **512**(1), 234–241. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.052
- [78] KHIAO IN, Maneenooch, Kenneth C. RICHARDSON, Anna LOEWA, Sarah HEDTRICH, Sabine KAESSMEYER a Johanna PLENDL. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia, Histologia, Embryologia* [online]. 2019, **48**(3), 207–217. ISSN 1439-0264. Dostupné z: doi:10.1111/ah.12425

- [79] JACOBI, Ute, Marco KAISER, Rani TOLL, Susanne MANGELSDORF, Heike AUDRING, Nina OTBERG, Wolfram STERRY a Juergen LADEMANN. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* [online]. 2007, **13**(1), 19–24. ISSN 1600-0846. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x
- [80] SILVA, Izabela R., Flávia A. LIMA, Eduardo C. O. REIS, Lucas A. M. FERREIRA a Gisele A. C. GOULART. Stepwise Protocols for Preparation and Use of Porcine Ear Skin for in Vitro Skin Permeation Studies Using Franz Diffusion Cells. *Current Protocols* [online]. 2022, **2**(3) [vid. 2023-04-13]. ISSN 2691-1299, 2691-1299. Dostupné z: doi:10.1002/cpz1.391
- [81] BLAHUŠ, Petr. *Huminové látky jako aktivní nebo pomocné farmaceutické ingredience*. [online]. Brno, 2021. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131148>
- [82] SUSILO, S P, S H PERTIWI a A AINUROFIQ. Development and validation of analytical methods for multicomponent crystals of ibuprofen with malic and tartaric acid using spectrophotometry. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2022, **2190**(1), 012033. ISSN 1742-6588, 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/2190/1/012033
- [83] AKAY, Sema, Serpil ÖZTÜRK, Dimitrios KALDERIS a Berkant KAYAN. Degradation, solubility and chromatographic studies of Ibuprofen under high temperature water conditions. *Chemosphere* [online]. 2021, **277**, 130307. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130307

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATR	Zeslabené totální reflektance
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
COX	Enzym cyklooxygenázy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
EtOH	Etanol
FA	Kyselina fulvová
FC	Francova difuzní cela
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HA	Kyselina huminová
HIV	Virus lidské imunodeficiency
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ibu H	Ibuprofen v kyselé formě
Ibu Na	Ibuprofen sodný
LC/MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
LH	Lignohumát draselný
NIR	Infračervená spektroskopie v blízké oblasti
NSAID	Nesteroidní protizánětlivá léčiva
PTX	Paclitaxel
PVC	Polyvinylchlorid
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
TEAC	Z angl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
UPLC	Ultravýkonná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření
XAD	Neiontový makroporézní sorbent
XRD	Rentgenová difrakce

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l, odběry po hodinových intervalech (2)

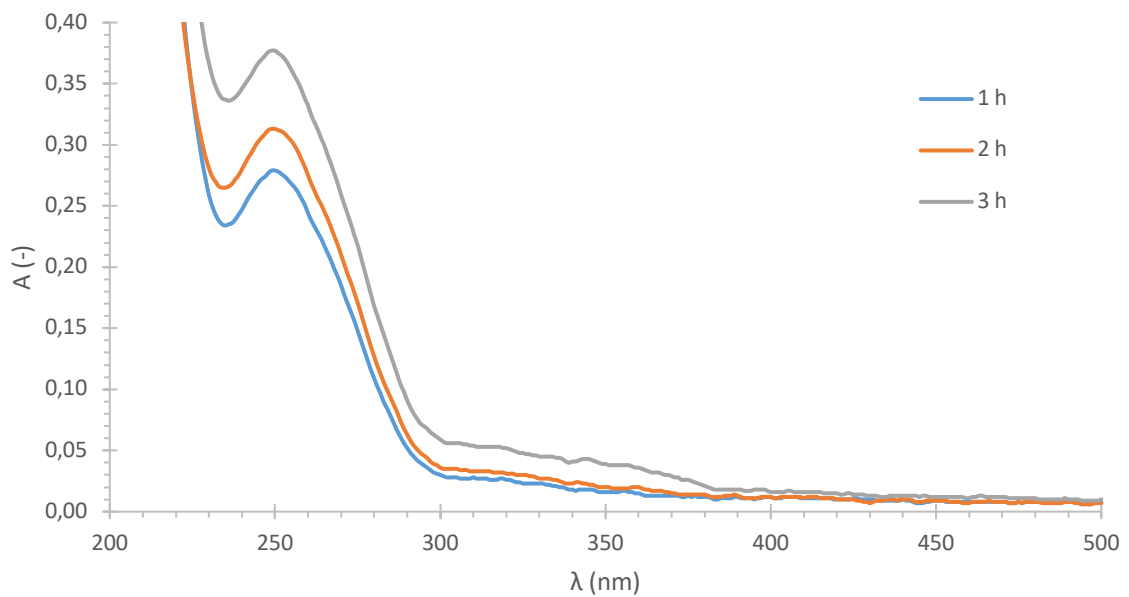
Příloha 2: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l, odběry po hodinových intervalech (3)

Příloha 3: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 50 g/l, odběry po hodinových intervalech (2)

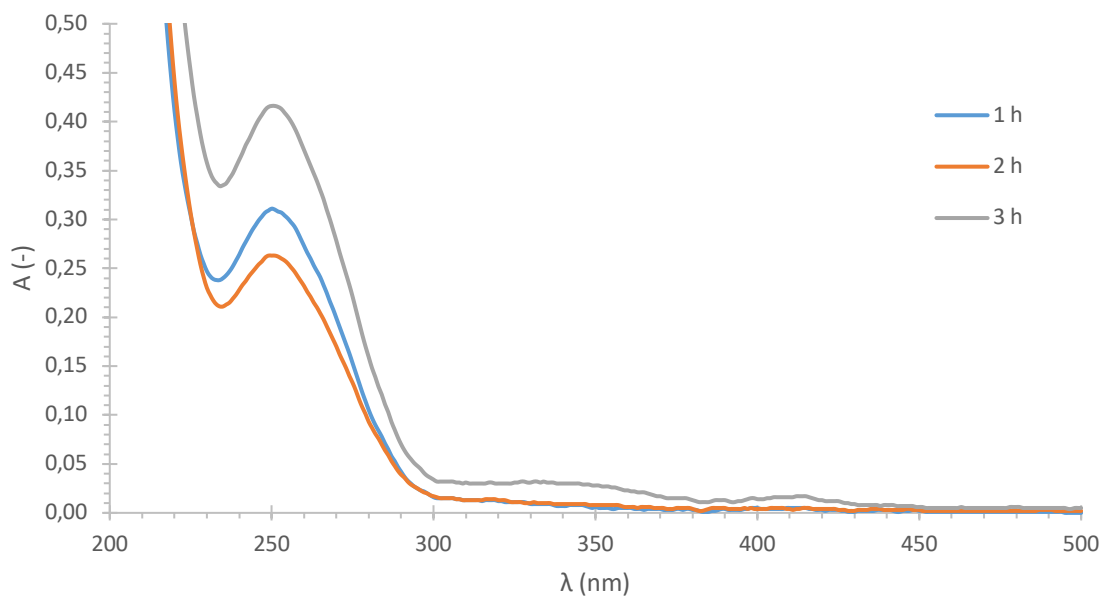
Příloha 4: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 50 g/l, odběry po hodinových intervalech (3)

Příloha 5: Chromatogram, záznam ibuprofenu sodného s přidavkem lignohumátu o koncentraci 50 g/l po první hodině experimentu, retenční čas 4,962 minut

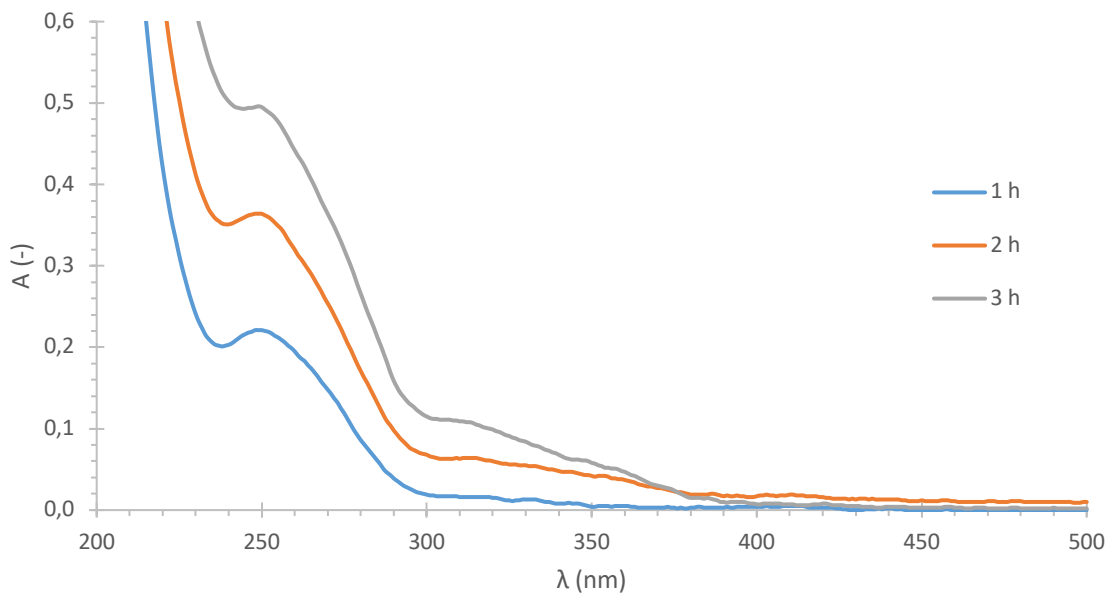
13 PŘÍLOHY



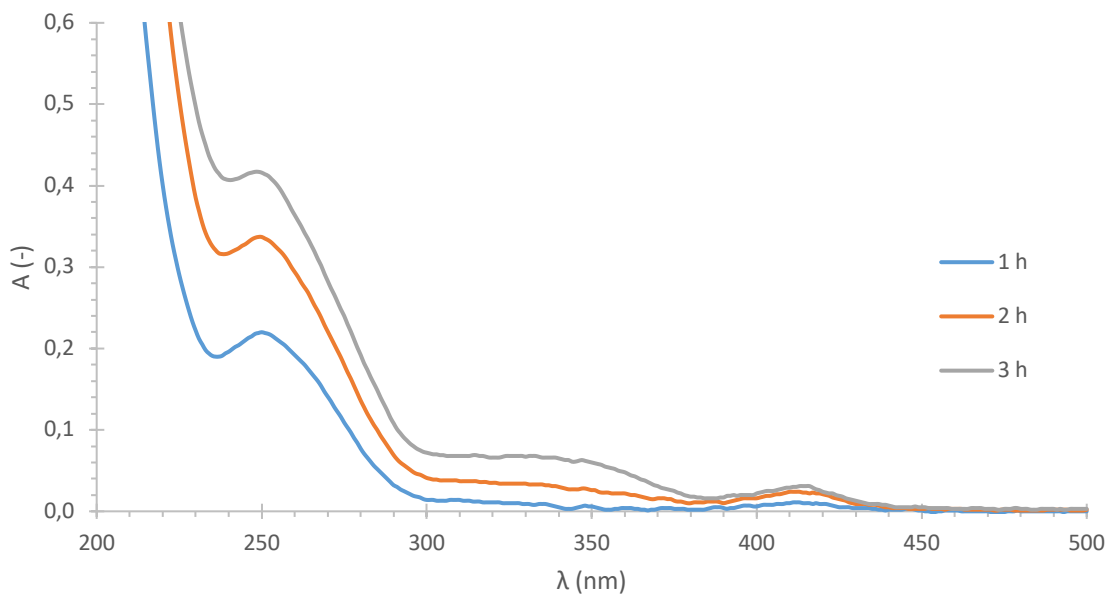
Příloha 1: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l, odběry po hodinových intervalech (2)



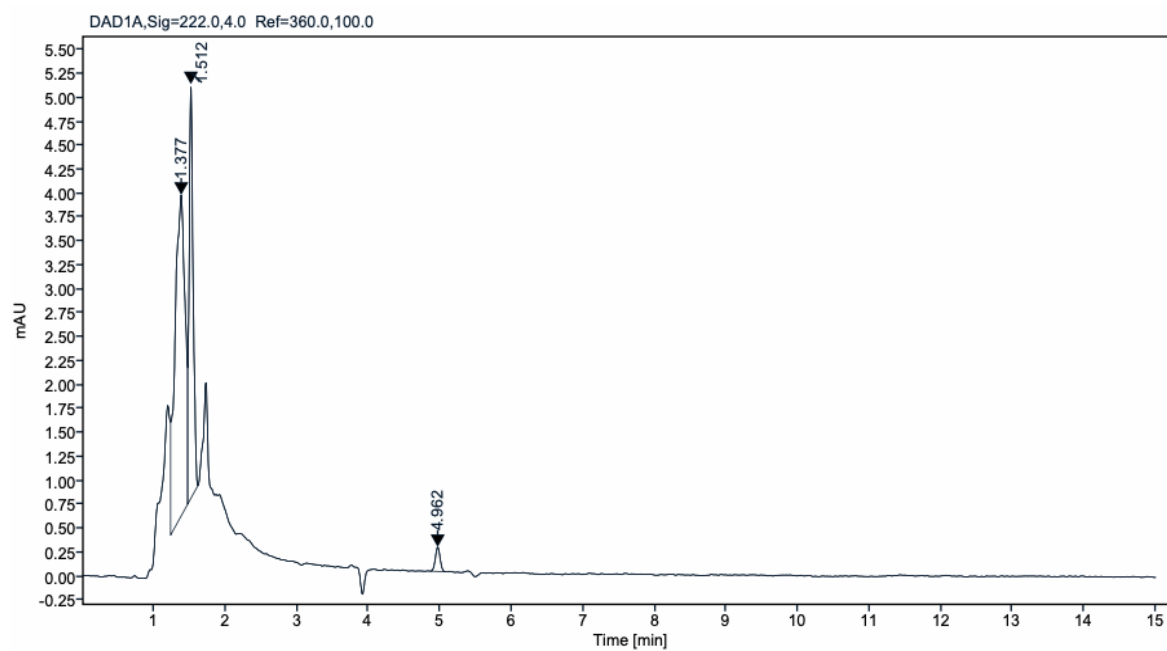
Příloha 2: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l, odběry po hodinových intervalech (3)



Příloha 3: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 50 g/l, odběry po hodinových intervalech (2)



Příloha 4: Závislost absorbance na vlnové délce pro lignohumát draselný o koncentraci 50 g/l, odběry po hodinových intervalech (3)



Příloha 5: Chromatogram, záznam ibuprofenu sodného s přidavkem lignohumátu o koncentraci 50 g/l po první hodině experimentu, retenční čas 4,962 minut