



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

**EXPERIMENTÁLNÍ STUDIUM A TEORETICKÉ
MODELOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍHO TRANSPORTU
AKTIVNÍCH LÁTEK Z GELOVÝCH MATRIC**

EXPERIMENTAL STUDY AND MODELLING OF THE TRANSDERMAL PENETRATION OF ACTIVE SPECIES
FROM GELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Palanová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0961/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Veronika Palanová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Experimentální studium a teoretické modelování transdermálního transportu aktivních látek z gelových matric

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma metod studia transdermálního transportu léčiv a dalších aktivních látek.
2. Na základě literární rešerše navrhnout a realizovat sérii experimentů s vybranými gelovými matricemi.
3. Analyzovat experimentální data na základě vhodného fyzikálně-chemického modelu.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Veronika Palanová
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Predložená diplomová práca sa zaoberá návrhom a experimentálnym štúdiom transdermálneho transportu farmaceuticky pôsobiacich aktívnych látok z gélových matric s obsahom humínovej látky. Modelom kožnej absorpčnej membrány bola koža z ušnice prasťa. Štúdium uvoľňovania aktívnych látok a Lignohumátu bolo realizované prostredníctvom vertikálnych difúzných cel. Uvoľnené množstvo humínovej látky bolo charakterizované metódou UV-VIS spektrofotometrie a koncentrácia uvoľnených aktívnych látok z gélových matric bola stanovená pomocou metódy HPLC-DAD. Hlavným zistením tejto diplomovej práce bolo, že Lignohumát je enhancer transdermálneho transportu aktívnych látok a podporuje ich uvoľňovanie z gélov do príslušného prostredia.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with design and experimental study of transdermal transport of pharmaceutically active agents from gel matrices, which contain humic substance in its structure. A model absorption membrane was represented by the skin of pig's earlobes. The study of the release of active substances and Lignohumate was performed due to the vertical diffusion cells. The amount of released humic substance was characterized by UV-VIS method and the amount of released active agent from gel matrix was determined by HPLC-DAD. The most interesting finding of this diploma thesis was that Lignohumate enhances transdermal transport of active agents and supports their release from gel samples to the particular environment.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

uvoľňovanie aktívnych látok, kožná membrána, gélové matrice, humínové látky, Franzova cela, UV-VIS, HPLC-DAD

KEYWORDS

active agent release, skin barrier, gel matrix, humic substances, Franz's cell, UV-VIS, HPLC-DAD

PALANOVÁ, V. *Experimentální studium a teoretické modelování transdermálního transportu aktivních látek z gelových matric*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 95 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Veľmi rada by som na tomto mieste poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, PhD. za jeho čas, cenné rady a odborné vedenie pri riešení a spracovaní diplomovej práce. Zároveň by som veľmi rada poďakovala Ing. Jaromírovi Pořízkovi, PhD. za pomoc pri realizácii vybraných meraní. V neposlednej rade by som sa veľmi rada poďakovala celej mojej rodine, predovšetkým mamine, priateľovi a starým rodičom, za podporu počas môjho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CIELE PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
	3.1 Gélové matrice.....	9
	3.1.1 Štruktúra hydrogéllov	9
	3.1.2 Tvorba gélu.....	10
	3.1.3 Klasifikácia hydrogéllov [13]	12
	3.2 Transportné procesy v géloch	12
	3.2.1 Riadené uvoľňovanie liečiv	14
	3.2.2 Vertikálna difúzna aparátúra.....	17
	3.3 Humínové látky	18
	3.3.1 Štruktúra a zloženie humínových látok.....	19
	3.3.2 Humínové látky a ich využitie	20
	3.4 Koža.....	20
	3.4.1 Pokožka – epidermis	21
	3.4.2 Zamša – dermis	22
	3.4.3 Podkožné väzivo – hypodermis	22
4	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	23
	4.1 Topické polotuhé prípravky	23
	4.2 Transport aktívnej látky cez kožu	23
	4.2.1 Transportné dráhy	24
	4.2.2 Akceleranty transdermálnej penetrácie (permeácie).....	24
	4.2.3 Techniky pre uľahčenie transdermálneho transportu.....	25
	4.3 Absorpčná membrána – testovanie in vivo, in vitro	26
	4.3.1 Druhy tkanív	27
	4.3.2 Príprava kože pre in vitro permeačné štúdie.....	28
	4.3.3 Uvoľňovacie experimenty a metódy charakterizácie aktívnych substancií	30
	4.3.4 Humínové látky vo farmácii a kozmetike	34
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	35
	5.1 Použité chemikálie.....	35
	5.2 Použité prístroje	35
	5.3 Ďalšie pomôcky a príslušenstvo	35
	5.4 Príprava zásobných roztokov Lignohumátu	36
	5.5 Príprava neutralizačného činidla.....	36

5.6	Príprava hydrogélův	36
5.6.1	Gélový základ	36
5.6.2	Príprava gélov s aktívnymi látkami	36
5.6.3	Príprava gélov bez aktívnych látok.....	37
5.7	Príprava kožných membrán.....	37
5.8	Príprava zásobného roztoku chloridu sodného	38
5.9	Difúzne experimenty	38
5.9.1	Odbery vzoriek pre spektrofotometrickú analýzu.....	39
5.9.2	Odbery vzoriek pre chromatografickú analýzu.....	39
5.10	Metódy charakterizácie kožných membrán a aktívnych látok	39
5.10.1	Charakterizácia kožných membrán.....	39
5.10.2	Metódy štúdia uvoľňovania Lignohumátu draselného	40
5.10.3	Metódy štúdia uvoľňovania aktívnych látok	40
6	DISKUSIA A VÝSLEDKY	42
6.1	Difúzne experimenty	42
6.1.1	Optimalizácia metódy	42
6.2	Kožná membrána	43
6.3	Metódy charakterizácie kožných membrán, uvoľňovania aktívnych látok a Lignohumátu	44
6.3.1	Charakterizácia kožných membrán.....	44
6.3.2	UV-VIS spektrofotometria – optimalizácia metódy	49
6.3.3	Metódy štúdia uvoľňovania Lignohumátu draselného	51
6.3.4	Metódy štúdia uvoľňovania aktívnych látok	61
6.3.5	Charakterizácia aktívnych látok s využitím HPLC metódy	64
7	ZÁVER	74
8	LITERATÚRA.....	75
9	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	83
9.1	Použité skratky	83
9.2	Použité symboly	84
10	ZOZNAM PRÍLOH	85

1 ÚVOD

Rozsiahle polymérne siete, ktoré majú schopnosť zadržiavať veľké množstvá vody v ich štruktúre, nazývané hydrogély, disponujú takými vlastnosťami, ktoré priťahujú záujem rôznych výskumných skupín. Tieto materiály majú, okrem vysokého obsahu vody, aj schopnosť niesť rôzne špecializované aktívne látky a uvoľňovať ich do príslušného prostredia. Vďaka svojim unikátnym vlastnostiam majú široký aplikačný potenciál, a to nielen v medicíne, ale aj v kozmetickom priemysle.

Humínové látky sú zložité biopolymérne zlúčeniny, ktoré tvoria hlavnú zložku prírodnej organickej hmoty. Tieto prírodné biopolyméry majú antioxidačné, antikoagulačné, antibakteriálne a mnoho ďalších vlastností, ktoré prispievajú k ich potenciálnemu využitiu v medicíne a kozmetických produktoch. Zmes humínových látok, Lignohumát, ktorý je úplne rozpustný vo vode, bol vybraný ako obohacujúca látka študovaných gélových matric. Humínové hydrogély sa javia ako elegantné spojenie dvoch systémov, ktoré sú vhodným materiálom pre štúdium transportných dejov na molekulárnej úrovni.

Látky s farmakologickým účinkom, diklofenak sodný, ketoprofen a kyselina salicylová, sú súčasťou bežne komerčne dostupných liekových foriem. Tieto látky sú charakteristické svojimi protizápalovými a dermatoterapeutickými účinkami. Bývajú zložkami gélov, ktoré sú určené pre liečbu kožných ochorení a na starostlivosť o pokožku. Použitie spomínaných aktívnych látok v humínových gélových matriciach sa javí ako vhodná voľba pre dotvorenie komplexnej kompozície gélových vzoriek, ktoré by mohli potencionálne nájsť svoje uplatnenie vo farmaceutickom alebo kozmetickom priemysle.

Pre štúdium transdermálnej absorpcie sa bežne využívajú kožné absorpčné membrány. Anatomicky ekvivalentným modelom ľudskej kože je koža prasat'a. Prasacie ušnice sú, okrem morfolologickej podobnosti s kožou človeka, relatívne ľahko dostupné a lacné, a preto sa javia ako vhodný materiál pre štúdium transdermálneho transportu. Najbežnejším spôsobom uvoľnenia aktívnej látky z gélovej vzorky je difúzia. Experimentálne uvoľňovanie účinných látok sa realizuje prostredníctvom vertikálnych difúzných cel, ktoré sú vhodným zariadením pre simuláciu a štúdium transdermálneho transportu.

Predložená diplomová práca má za cieľ navrhnúť, realizovať a optimalizovať metódu štúdia transdermálneho transportu farmaceuticky pôsobiacich aktívnych látok z humínových hydrogélových matric. Jedným z ďalších cieľov je charakterizovať kožné membrány a uvoľnené množstvo Lignohumátu a aktívnych látok, pomocou vhodne zvolených inštrumentálnych metód. Ťažisková časť práce je venovaná spracovaniu experimentálnych dát a diskusií získaných výsledkov.

2 CIELE PRÁCE

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce je navrhnúť metódu experimentálneho štúdia transdermálneho transportu aktívnych látok. Ďalej, na základe poznatkov z literárnej rešerše, vybrať vhodný model biologickej membrány a realizovať sériu experimentov s gélovými matricami s obsahom Lignohumátu a troch farmaceuticky pôsobiacich aktívnych látok, pomocou difúzných procesov. Jedným z cieľov je charakterizácia kožných tkanív a charakterizácia uvoľnených účinných látok pomocou vhodných inštrumentálnych metód. Na záver, analyzovať dáta prostredníctvom vhodného fyzikálno-chemického modelu a overiť a diskutovať vplyv rôznych faktorov na uvoľňovanie Lignohumátu draselného a aktívnych látok z gélových matric.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Gélové matrice

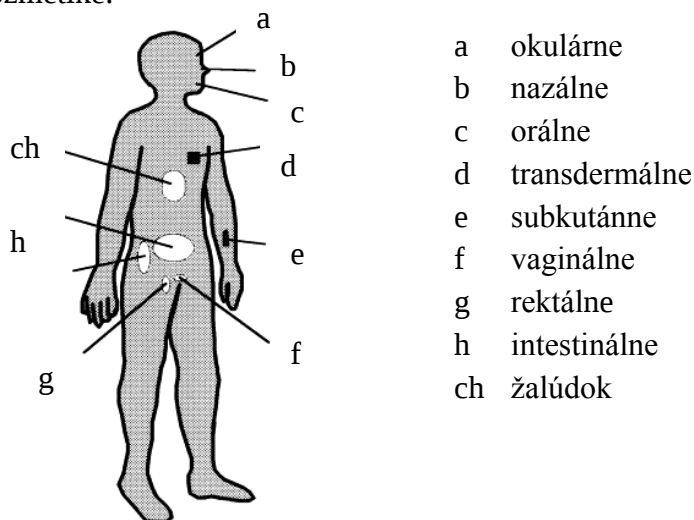
Hydrogély sú rozsiahle polymérne siete, ktoré vznikajú reakciou jedného alebo viacerých monomérov a sú schopné boptnať vo vode. Schopnosť hydrogélův zadržiavať veľké množstvá vody v ich trojdimenzionálnej štruktúre im dáva unikátne vlastnosti, ktoré bývajú často predmetom priemyslových a ekologických aplikácií.

3.1.1 Štruktúra hydrogélův

V polymérnej štruktúre hydrogélů sa vyskytujú hydrofilné skupiny, ako napríklad amino; hydroxylové alebo karboxylové skupiny, ktoré zvyšujú kapacitu hydrogélův zadržiavať vodu. Všeobecne platí, že schopnosť gélovej matrice zadržiavať vodu je daná počtom hydrofilných skupín v jej štruktúre a hustotou sieťovania. Čím je počet hydrofilných skupín vyšší, tým je hydrogél schopný zachytávať väčšie množstvá vody. Naopak, ak hustota sieťovania v polymérnej matici príliš stúpa, dochádza k poklesu rozťažnosti daného hydrogélů [1].

Uzlové spoje, ktoré sú prítomné v štruktúre hydrogélův majú chemický alebo fyzikálny charakter. Chemické alebo permanentné spoje sú charakteristické pevnými kovalentnými väzbami. Hydrogély, ktoré obsahujú uzlové spoje vytvorené fyzikálnou cestou (iónové interakcie alebo vodíkové väzby), sa nazývajú gély fyzikálne. Takéto fyzikálne sformované spoje predstavujú silné alebo slabšie kryštalické regióny v polymérnych reťazcoch.

Dôležité biochemické vlastnosti hydrogélův, ktoré zahŕňajú hydrofilnosť, nábojovú kapacitu a bioaktivitu, sú primárne odvodené od chemickej kompozície daného hydrogélů. Tieto chemické prekursor sú súčasťou nekovalentných intramolekulových interakcií polymérneho reťazca ale aj intermolekulových interakcií, ktoré sú medzi polymérnym reťazcom a poprepájanou sieťou a medzi touto sieťou a príslušným rozpúšťadlom. Postranné reťazce, ktoré sú pripojené k hlavnému polymérnemu reťazcu môžu taktiež ovplyvňovať špecifické vlastnosti hydrogélův. Najvýznamnejší predpoklad pre využitie hydrogélův v biochémií, medicínskych aplikáciách a zdravotnej starostlivosti, je možnosť modifikovať ich chemické a fyzikálne vlastnosti (pH, teplota, náboj) [2]. Vďaka pomerne vysokému obsahu vody sa hydrogély považujú za biokompatibilný materiál, ktorý nachádza široké uplatnenie v medicíne ale aj v kozmetike.



Obrázok 1 Využitie hydrogélův v zdravotnej starostlivosti; upravené podľa [3]

3.1.2 Tvorba gélu

Proces tvorby gélu sa nazýva gelácia. Gelácia začína väzbou makromolekulárnych reťazcov, ktoré spoločne iniciujú tvorbu veľkých rozvetvených rozpustných polymérnych komplexov. Formácia týchto polymérov je závislá na štruktúre a konformácii počiatočného materiálu [4]. Polydisperzný rozpustný polymér, ktorý sa vetví, sa potom nazýva sol. Ak proces tvorby väzieb stále pokračuje, dochádza k postupnému nárastu veľkosti vetveného polyméru. Tento nárast veľkosti úzko súvisí s poklesom rozpustnosti, dôsledkom čoho vzniká gél. Počas procesu gelácie dochádza k prelínaniu nekonečne neobmedzeného polyméru s obmedzenými vetvenými polymermi (sol), teda ku 'sol-gél' prechodu. Významným krokom gelácie je tvorba komplexu, ktorý sa označuje ako 'sol-gél' systém alebo len jednoducho gél. V rámci procesu tvorby gélu sa rozlišuje charakter väzbových mechanizmov a pôvodne viskózný materiál sa mení na pevnú elastickú hmotu. Hydrogély, ktorých pôvod vzniku je chemický, sú charakterizované polymérnymi reťazcami, ktoré sú navzájom pospájané kovalentnými väzbami. Fyzikálne hydrogély si držia svoju štruktúru najmä vďaka molekulárnym interakciám ako sú iónové väzby, vodíkové väzby alebo van der Waalsove interakcie [5].

Konvenčné gélové prísady

Pre tvorbu polymérnych sietí sa využívajú rôzne materiály, ktorých použitie závisí na účele využitia samotného hydrogélu. V nasledujúcich riadkoch sú predstavené bežne a často využívané substancie pre tvorbu gélových matric.

Poly(2-hydroxyetyl)metakrylát, PHEMA, je najviac využívaným polymérom v aplikáciách, ktoré využívajú systémy pre dodávanie liečiv (z angl. 'drug delivery') [6]. Jedná sa o hydrofilný derivát kyseliny akrylovej, ktorý je veľmi stabilný. Permeabilita PHEMA membrán je určená stupňom sieťovania, ktorý je možné kontrolovať. Štúdiá na uvoľňovanie aktívnej látky, hydrokortizonu, zo štruktúry, ktorá bola vytvorená pomocou PHEMA, preukázala, že uvoľňovanie liečivej látky z tohto polyméru podlieha princípom tzv. ne-Fickovského procesu uvoľňovania aktívnych substancií [7].

Poly(vinylalkohol), PVA, je taktiež hydrofilný polymér, ktorý sa bežne využíva v biomedicínskych aplikáciách. Tento polymér je netoxický, je charakteristický svojimi výbornými mukoadhezívnymi vlastnosťami, a preto je vhodným biologickým systémom pre dodávanie liečiv [6]. Kopolyméry PHEMA (Hydron[®]) a PVA boli študované ako nástroje pre doručovanie polypeptidových liečiv a na základe výsledkov pozorovaní boli navrhnuté ako vhodný materiál pre doručovanie aktívnych látok [6, 8].

Poly(etylénglykol), PEG, je veľmi často využívaný v biologických aplikáciách pre doručovanie liečiv, pretože je proteín rezistentný [6]. Štúdiá, ktorá popisuje difúzne správanie cytochrómu c a hemoglobínu, poskytla nové informácie o závislosti hustoty sieťovania a difúzneho koeficientu proteínu na počiatočnej molekulovej hmotnosti PEGu [6, 9].

Štúdium materiálov, s ohľadom na ich biomedicínske využitie, sa často zaoberá posudzovaním a využitím polymérov, ktoré sú schopné reagovať napríklad na zmeny pH.

Medzi takéto polyméry patrí polyakrylamid; kyselina polyakrylová; kyselina polymetakrylová alebo poly(dietylaminooethylmetakrylát) [6].

Ďalšou skupinou polymérov, ktoré sa využívajú pri tvorbe hydrogéllov, sú teplotne citlivé polyméry. Do tejto skupiny materiálov patrí napríklad PNIPAAm (poly-N-isopropylakrylamid) [6].

Prírodné polyméry, nazývané aj biopolyméry, sú veľmi významnou skupinou materiálov, ktoré sa využívajú v biologických, biomedicínskych a farmaceutických aplikáciách. Biopolyméry sú produkované živými organizmami a medzi hlavných zástupcov patrí fibrín; kyselina hyaluronová; dextrán; metylcelulóza; alginát; chitosan [10].

Tabuľka 1 *Využitie hydrogéllov a zoznam používaných polymérov; upravené podľa [4]*

Využitie	Polyméry
Starostlivosť o rany a poranenia	polyuretán, poly(etylénglykol), poly(propylénglykol), poly(vinylpyrrolidon), agar, xanthan, metylcelulóza, karboxymetylcelulóza, alginát, hyaluronan a ďalšie hydrokoloidy
Farmaceutické, doručovanie liečiv	poly(vinylpyrrolidon), škrob, kyselina polyakrylová, karboxymetylcelulóza, hydroxypropylmetylcelulóza, polyvinylalkohol, kyselina akrylová, kyselina metakrylová, chitosan
Tkanivové inžinierstvo, implantáty	polyvinylalkohol, kyselina polyakrylová, hyaluronan, kolagén
Ďalšie (agrikultúra, odpadové hospodárstvo, atď.)	škrob, xanthan, polyvinylalkohol, poly(vinylmetyléter), poly(N-isopropylakrylamid)

Okrem samotných materiálov, ktoré sa využívajú pri tvorbe gélových matric, je nutné pridať aj také látky, ktoré udržia novovzniknutý hydrogél stabilný, čistý a bez prítomnosti mikroorganizmov. Takéto látky, konzervanty, sú neodmysliteľnou súčasťou farmaceutických a kozmetických prípravkov. Zoznam chemikálií, ktoré plnia úlohu konzervantov, a ktoré sa využívajú v kozmetických a farmaceutických produktoch je veľmi rozsiahly: kyselina benzoová; amonumbenzoát; kalcium disalicylát; chlórbutanol; etylbenzoát; formaldehyd; glutaral; fenybenzoát; benzoát draselný; benzylalkohol [11] a aj parabeny; fenoxietanol; organické kyseliny a halogenované zlúčeniny [12]. Do ďalšej skupiny konzervačných látok patrí sorbát draselný; EDTA; kaprylylglykol. Táto posledná skupina konzervantov sa vyznačuje tým, že sa pridáva k surovým materiálom, z ktorých sa vytvára gél, v podobe práškov alebo v kvapalnom skupenstve [11].

3.1.3 Klasifikácia hydrogélů [13]

Klasifikácia založená na pôvode zdroja

Hydrogély sa môžu podľa tejto klasifikácie deliť na dve skupiny: prírodné alebo syntetické.

Klasifikácia podľa polymérneho zloženia

Spôsob prípravy polymérnych sietí úzko súvisí s charakteristickými skupinami hydrogélů. Na základe zvolenej metódy prípravy je možné daný hydrogél klasifikovať do jednej z nasledujúcich skupín:

- Homopolyméry
Sú to polymérne siete, ktoré vznikli z jedného špecifického monoméru, ktorý tvorí základnú stavebnú jednotku danej štruktúry. Vlastnosti homopolyméru sú závislé na pôvode monoméru a na technike polymerizácie.
- Kopolyméry
Kopolymérne hydrogély sú tvorené dvomi alebo viacerými monomérnymi jednotkami rozličného charakteru. Minimálne jeden z týchto monomérov by mal obsahovať hydrofilnú komponentu.
- Mulipolyméry
Táto významná skupina hydrogélů je charakteristická dvomi nezávislými sieťovanými syntetickými a/alebo prírodnými polymérmi, ktoré sú usporiadané do polymérnej siete.

Klasifikácia založená na konfigurácii

Táto klasifikácia súvisí s chemickou kompozíciou a fyzikálnou štruktúrou hydrogélů. Rozdelenie hydrogélů:

- Amorfné (ne-kryštalické)
- Semikryštalické
- Kryštalické

Klasifikácia podľa typu sieťovania

Hydrogély delíme na fyzikálne alebo chemicky sieťované.

Klasifikácia podľa elektrického náboja siete

Hydrogély sa delia do štyroch hlavných skupín, podľa prítomnosti alebo neprítomnosti elektrického náboja na polymérnych reťazcoch:

- Neutrálne
- Iónové (aniónové alebo katiónové)
- Amfolytické (obsahujú aj kyslé aj zásadité skupiny)
- Zwitterionové (opakujúce sa jednotky obsahujú aj aniónové aj katiónové skupiny)

3.2 Transportné procesy v géloch

Nutnou podmienkou pre to, aby bolo možné rozhodnúť či je hydrogél vhodný pre biologické a biomedicínske aplikácie, je posúdenie jeho narastajúceho objemu, priepustnosti a potenciálne bariérových vlastností gélu. Narastajúci objem hydrogélů je možné určiť z rovnice percentuálneho vyjadrenia boptnania hydrogélů [1]:

$$\%S = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad (1)$$

kde %S znamená percento naboptnania; W_s hmotnosť naboptnateľného gélu; W_d hmotnosť suchého gélu.

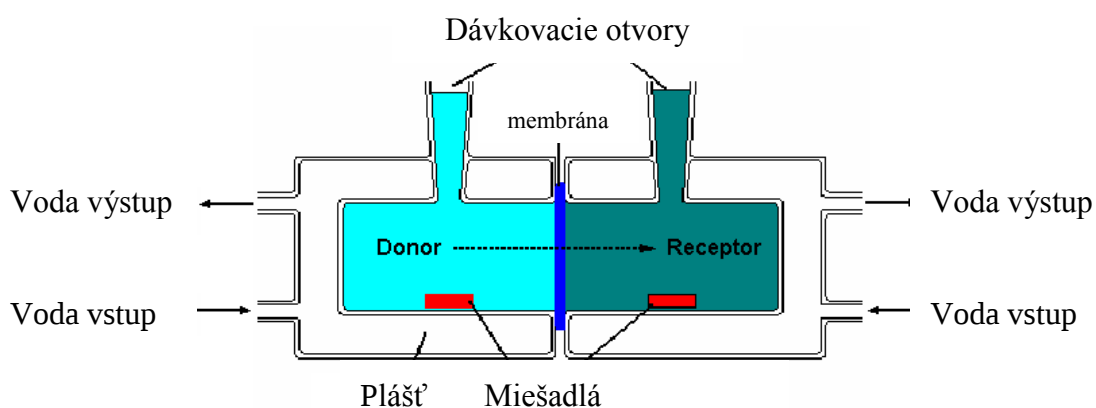
Bariérové vlastnosti porézneho materiálu (napr. hydrogél) sa posudzujú podľa riešenia Fickových zákonov, ktoré charakterizujú priebeh difúzných procesov v rámci daného materiálu. Difúzne vlastnosti systému sú kvantitatívne popísané pomocou difúzných koeficientov roztokov. Tieto difúzne koeficienty sa dajú získať realizovaním difúzných experimentov v príslušných difúzných aparátúrach (vertikálnych alebo horizontálnych). V prípade experimentov, pri ktorých je sledovaný transport skrz študované prostredie medzi dvoma roztokmi (Obrázok 2), sa pri riešení Fickových rovníc aplikuje predpoklad ustálenej difúzie a difúzny koeficient D príslušného hydrogél je možné vypočítať v akomkoľvek čase experimentu na základe nasledujúcich rovníc [1]:

$$D = \frac{1}{\beta \cdot t} \cdot \ln \frac{C_D(t) - C_R(t)}{C_D(0) - C_R(0)}, \quad (2)$$

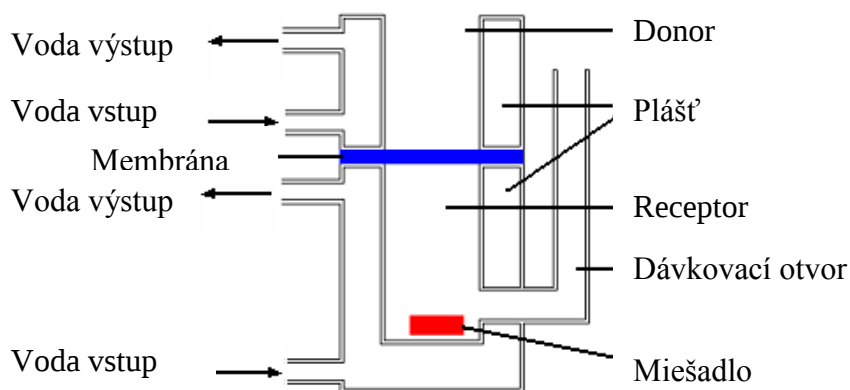
kde

$$\beta = \frac{A_H}{W_H} \cdot \left[\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right] \quad (3)$$

kde $C_D(0)$ je počiatočná koncentrácia aktívnej substancie v donore; $C_R(0)$ počiatočná koncentrácia aktívnej substancie v receptore; $C_D(t)$ koncentrácia aktívnej substancie v donore v čase t ; $C_R(t)$ koncentrácia aktívnej substancie v receptore v čase t ; A_H efektívny prierez difúzie vo vzorke hydrogél; W_H šírka vzorky hydrogél; V_D objem roztoku aktívnej látky v donore ; V_R je objem receptorovej tekutiny a β je konštanta aparátúry.



Obrázok 2 Schematické znázornenie horizontálnej difúznej cely; upravené podľa [1]



Obrázok 3 Schematické znázornenie vertikálnej difúznej cely; upravené podľa [1]

Difúzny koeficient rozpustenej látky môže byť ovplyvnený rôznymi faktormi, napríklad špecifickými interakciami medzi rozpustenou látkou a vzorkou hydrogél, ktorá prešla skrz difúzny priestor. Koeficient difúzie rozpustenej látky môže byť ovplyvnený aj prechodom rozpustenej látky z darovacej do prijímacej komory difúznej aparatury, a to aj v priebehu difúzie. Difúzia môže byť závislá aj na veľkosti pórov hydrogél a štruktúre polyméru, z ktorého je gél vytvorený.

Difúzne mechanizmy môžu byť ovplyvnené aj pôvodom sieťujúcich látok. Difúzia prebieha ľahšie ak je molekulová veľkosť sieťujúcich látok menšia. Difúzia nízkomolekulárnych látok v géle, ktorá hrá kľúčovú úlohu napríklad pri uvoľňovaní aktívnej substancie z hydrogél, súvisí s iónovými a fyzikálnymi interakciami molekúl a častíc rozpustenej látky a s polymérnymi reťazcami hydrogél. Vo všeobecnosti platí, že zvyšovanie hustoty sieťovania znižuje kapacitu daného hydrogél zadržiavať vodu vo svojej štruktúre, a to zároveň zapríčiňuje pokles difúzie uvoľnenej aktívnej substancie. Rozpustnosť polyméru, molekulová hmotnosť polyméru a molekulová hmotnosť uvoľnenej látky môžu výrazne ovplyvňovať difúzne procesy.

3.2.1 Riadené uvoľňovanie liečiv

S uvoľňovaním aktívnej látky z gélovej matrice sa spájajú mechanizmy zodpovedné za doručovanie liečiv. Kontrolované uvoľňovanie aktívnych látok a ich doprava tvoria základ aktuálnych biologických a medicínskych výskumných smerov. Najbežnejší spôsob uvoľnenia aktívnej látky z hydrogél je difúzia. Aktívna substancia, v tomto kontexte, predstavuje súhrnný názov pre liečivú látku alebo pre kozmeticky aktívnu látku bez farmakologického účinku.

Ak sa dostane hydrogél, nesúci aktívnu substanciu vo svojej štruktúre, do kontaktu s príslušným vodným roztokom, voda prenikne do systému hydrogél – aktívna látka a iniciuje uvoľňovanie aktívnej látky. Uvoľnené liečivo je následne dopravené do vodného média. Tento transport je realizovaný na základe princípov difúzných mechanizmov. Difúzia liečiva z hydrogél je závislá na chemii príslušného hydrogél. Transportné alebo dopravné systémy liečiv sú zodpovedné za umiestnenie liečiva do vhodného prostredia, kde môže byť následne toto liečivo uvoľnené. Empirický vzťah, ktorý popisuje transport aktívnej substancie, je použiteľný pre väčšinu systémov s riadeným uvoľňovaním liečiv, ktoré prebiehajú podľa princípov difúzie [14]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (4)$$

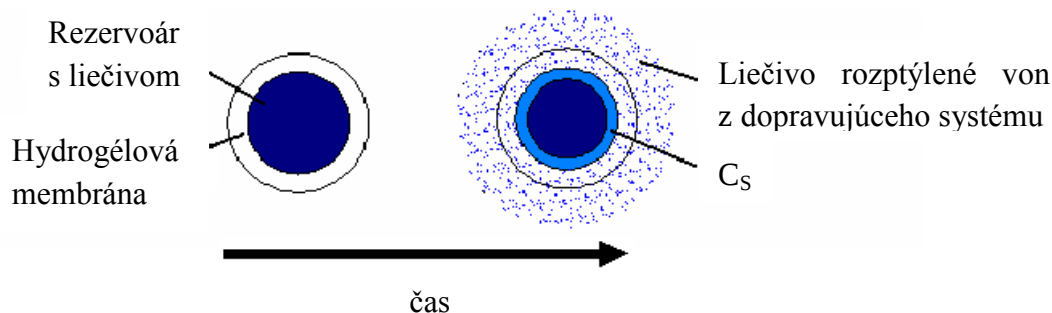
kde M_t je množstvo liečiva uvoľneného v čase t ; M_∞ množstvo liečiva uvoľneného v nekonečnom čase; k a n sú konštanty.

Difúzny exponent, n , je závislý na geometrii príslušného zariadenia a na fyzikálnych mechanizmoch uvoľňovania.

Systémy s riadenou dopravou s využitím difúznych mechanizmov

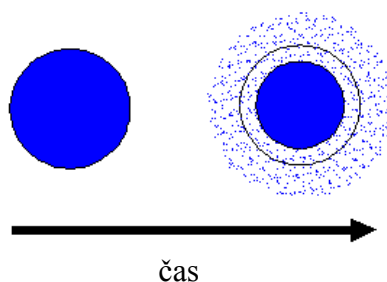
Systémy s kontrolovanou dopravou s využitím difúznych mechanizmov sa delia na dve skupiny, zásobníkové a matricové systémy.

Jadro, v ktorom je uložené liečivo, je enkapsulované do hydrogélovej polymérnej membrány, ktorá je pred experimentom v suchom stave. Pri kontakte takto sformovaného systému s vodou, dochádza ku prieniku vody do sústavy, systém bobtná, liečivá látka sa postupne uvoľňuje a koncentrácia roztoku je v ideálnom prípade ekvivalentná koncentráciou nasýteného roztoku liečiva (C_s). Následne je liečivá látka transportovaná skrz polymérnu membránu, podľa princípov difúzie, a koncentrácia systému klesá pod hodnotu C_s . Avšak časť liečivej látky ostáva v jadre v pevnom skupenstve. Táto časť sa taktiež postupne uvoľňuje, je schopná kompenzovať koncentračné straty a vracia koncentráciu späť na pôvodnú hodnotu C_s . Vďaka tomu, že je liečivá látka uložená v jadre v pevnom skupenstve, sú uvoľňovacie mechanizmy závislé na množstve liečivej látky v pevnom skupenstve. Uvoľňovacie procesy sú permanentné a sústavy sa riadia princípmi kinetiky prvého rádu. Tento typ riadenej dopravy sa nazýva zásobníkový a využíva sa najmä k doprave aktívnych substancií cestou orálnou, očnou alebo transdermálnou [1].



Obrázok 4 Zásobníkový systém a doprava liečiv; upravené podľa [1]

Matricové systémy sú založené na vytvorení gélovej matrice s rovnomerne rozprestretou aktívnou látkou v tuhom skupenstve. Aktívna látka je potom homogénne dispergovaná do média s kontrolovanou reakčnou rýchlosťou. Systém dopravy a uvoľňovania je závislý na štruktúre a vlastnostiach hydrogélovej matrice. V momente, keď suchá gélová matrica príde do styku s vodou, dochádza ku prieniku vody do systému, identicky ako u zásobníkových systémov. Voda difunduje na povrch matrice, potom postupne prechádza aj do jej jadra a nakoniec dochádza k uvoľneniu aktívnej látky. Uvoľnenie aktívnej látky je závislé na difúzii vody v matrici ale aj na difúzii rozpustenej aktívnej látky z matrice. Pri príprave matricových systémov je dôležité pracovať s inertnými alebo biodegradabilnými polymérmi [1].



Obrázok 5 Matricový systém a doprava liečiv; upravené podľa [1]

Systémy s riadenou dopravou s využitím bopťnacích mechanizmov

Popri systémoch s riadenou dopravou s využitím difúzných mechanizmov existujú aj systémy, ktoré využívajú bopťnacie mechanizmy. Princípom systémov s riadenou dopravou s využitím bopťnacích mechanizmov je, že sa uplatňujú práve vtedy, keď je difúzia aktívnej substancie rýchlejšia ako bopťnanie hydrogélu [10]. Základným predpokladom pre prevedenie hydrogélu zo skleného štádia (kedy sú zachytené molekuly a častice nepohyblivé) do štádia elastického (kedy sú molekuly schopné difundovať) je bopťnaním riadený fázový prechod hydrogélu. Rýchlosť uvoľnenie aktívnej substancie z gélovej matrice je závislá na rýchlosti bopťnania polymérnych sietí. Empirický vzťah, ktorý popisuje kontrolované uvoľňovanie aktívnej látky riadené bopťnaním, vychádza z rovnice kontrolovaného uvoľňovania aktívnej substancie riadeného difúziou. Tento empirický vzťah je avšak rozšírený o difúziu aktívnej látky a o relaxáciu daného polyméru [14]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}, \quad (5)$$

kde k_1 ; k_2 a m sú konštanty.

Dopravné systémy s využitím bopťnacích mechanizmov sa dajú aplikovať napríklad pri popise produktov z hydroxypropylmetylcelulózy (HPMC). Pred kontaktom HPMC tabliet s vodou sa táto sústava nachádza v sklenom štádiu. Po tom ako voda prestúpi do systému, vplyvom fázového prechodu dochádza ku zmene skleného štádia HPMC tabliet a matrice prechádzajú do stavu elastického. Rýchlosť uvoľnenia aktívnej substancie je potom ovplyvnená hrúbkou vrstvy gélu [14].

Systémy s chemicky riadenou dopravou

Treťou skupinou systémov s kontrolovanou dopravou sú systémy riadené chemicky. Existujú dve skupiny týchto systémov: systémy s výhradne kineticky riadeným uvoľňovaním a systémy s riadeným uvoľňovaním s využitím mechanizmov reakcia – difúzia [14].

Systémy s kineticky riadeným uvoľňovaním sa delia na reťazové sústavy s tzv. prívieskami a na povrchovo rozrušené sústavy.

Základnou charakteristikou reťazových systémov je kovalentná väzba liečivej látky k polymérnej sieti prostredníctvom vložených úsekov, ktoré sa dajú rozštiepiť. Rýchlosť uvoľnenia liečivej látky závisí na rýchlosti rozštiepenia daného spojovacieho úseku. Zväčša sú väzby v týchto systémoch hydrolyticky degradabilné a riadia sa princípmi kinetiky prvého

rádu. Zámerom aktuálnych výskumov je využívať také štiepatel'né väzbové úseky, ktoré sú vytvorené enzymaticky a vedú ku komplexnejšej kinetike uvoľňovania. Reťazové systémy uvoľňovania sa využívajú v prípadoch, kedy je potrebné zvýšiť aktivitu liečivej látky.

Druhou skupinou systémov, s kineticky riadeným uvoľňovaním, sú povrchovo rozrušené sústavy. Pre tieto systémy je charakteristický vzťah, ktorý je medzi uvoľnením liečivej látky a povrchovou eróziou danej polymérnej matrice. Dominantnou reakciou, ktorá sa v povrchovo rozrušených sústavách objavuje, je hydrolýza. Aktivita polymérov s eróziou povrchu je preto závislá na polyméroch, ktoré sú hydrolyticky degradovateľné. Polyméry s eróziou povrchu sú v biomedicínskych aplikáciách považované za vhodné prostriedky pre dopravu liečiv, a to najmä pre to, lebo sú schopné formovať také systémy na dopravu aktívnych substancií, ktoré majú vhodnú geometriu.

Systémy s riadeným uvoľňovaním s využitím mechanizmov reakcia – difúzia sú druhou skupinou systémov s chemicky riadenou dopravou. Tieto systémy popisujú uvoľňovanie aktívnej látky ako kombinovanú reakciu, ktorá sa skladá z degradácie masy a molekulovej difúzie. Molekulová difúzia je ovplyvnená mechanickými vlastnosťami hydrogélu a jeho bopťnacími charakteristikami. Afinityné systémy uvoľňovania aktívnych substancií sú schopné ovplyvniť správanie hydrogélu natoľko, že hydrogél je schopný znížiť rýchlosť uvoľňovania cieľového terapeutika [14].

Okrem systémov s chemicky riadenou dopravou existujú aj dopravné systémy, ktoré sú založené na báze polymérnych kompozitov. Tieto systémy sú využívané pri doprave proteínových terapeutík, ktoré sa aplikujú pri tvorbe ciev, remodelácii kostí alebo pri regenerácii nervov [14]. Doposiaľ preskúmané dopravné systémy na báze polymérnych kompozitov sú systémy viacvrstvové a viacfázové.

3.2.2 Vertikálna difúzna aparátúra

Zariadenie, pomocou ktorého je možné experimentálne realizovať uvoľňovanie aktívnej substancie, odporúčané organizáciami FDA a OECD, sa nazýva Franzova difúzna cela [15]. Táto vertikálna difúzna cela sa skladá z dvoch častí – darovacej a prijímacej komory, pričom sú tieto komory oddelené membránou. Darovacia komora nesie príslušnú liekovú formu a súčasťou prijímacej časti je vhodné prijímacie médium. Pre štúdium uvoľňovacích experimentov sa zväčša využívajú syntetické membrány, ktoré fyzicky oddeľujú darovaciu a prijímaciu komoru. Membrána by mala umožniť ľahkú difúziu aktívnej substancie z liekovej formy do prijímacieho prostredia. Prijímací roztok by mal byť premiešavaný, aby bola zachovaná rovnomernosť difúzie a koncentračná homogenita. Pri vykonávaní experimentu sa vzorky prijímacieho média odvádzajú cez vzorkovací otvor manuálne a analyzujú sa vhodne zvolenou metódou.

Na Obrázku 6 sú zobrazené rôzne druhy Franzových cel s odlišnými hodnotami priemerov sférických kľbov, ktoré sú dostupné na trhu. Postupne, v smere zľava doprava a potom dole, je zobrazená: Franzova cela z číreho skla s plášťom (11,28 mm); Franzova cela z číreho skla bez plášťa (5 mm); Franzova cela z číreho skla s plášťom, bez oddelenia manuálneho dávkovacieho otvoru (15 mm); Franzova cela z číreho skla s plášťom a s dvoma prietokovými otvormi v darovacej komore, ktoré slúžia na prísun alebo odčerpávanie plynov

(20 mm); Franzova cela z tmavého skla, s plášťom (18 mm); Franzova cela z tmavého skla, bez plášťa (5 mm).



Obrázok 6 Rôzne druhy Franzových cel; upravené podľa [67]

3.3 Humínové látky

Produkty biologického rozkladu odumretej biomasy. Fenolické zlúčeniny, ktoré podliehajú syntetickej oxidácii. Polyméry, ktoré vznikajú v priebehu praženia. Toto všetko je možné označiť súhrnným názvom, *humínové látky*. Tieto prírodné organické zlúčeniny sa vyskytujú na rôznych miestach, napríklad v pôdach a vo vode. Bývajú taktiež súčasťou rašeliny a uhlia.

Humínové látky sa delia na tri frakcie: humínové kyseliny, fulvínové kyseliny a humín [16]. Toto rozdelenie je odvodené na základe acidobázických efektov humínových látok a na základe správania sa humínových látok v kyslom alebo zásaditom prostredí. Humínové kyseliny sú rozpustné v alkalických roztokoch, ale sú nerozpustné vo vodných roztokoch, ktorých pH je nižšie ako dva. Všeobecne platí, že rozpustnosť humínových kyselín klesá s klesajúcou hodnotou pH. Fulvínové kyseliny sú rozpustné aj v kyslých, aj v zásaditých roztokoch, ich rozpustnosť nie je ovplyvnená hodnotou pH daného roztoku. Poslednou frakciou je humín, ktorý nie je rozpustný ani vo vode, ani v alkalických roztokoch.

Tieto organické frakcie sa odlišujú nielen svojou rozpustnosťou, ale aj sfarbením. Rozdielna pigmentácia je dôsledok rôznych molekulových hmotností polymérov, rôzneho počtu funkčných skupín v každej kategórii a rôzneho stupňa polymerizácie. Fulvínové kyseliny sú obyčajne žlté až žltohnedé, humínové kyseliny sú tmavohnedé až čierne a humín je čierny [16].

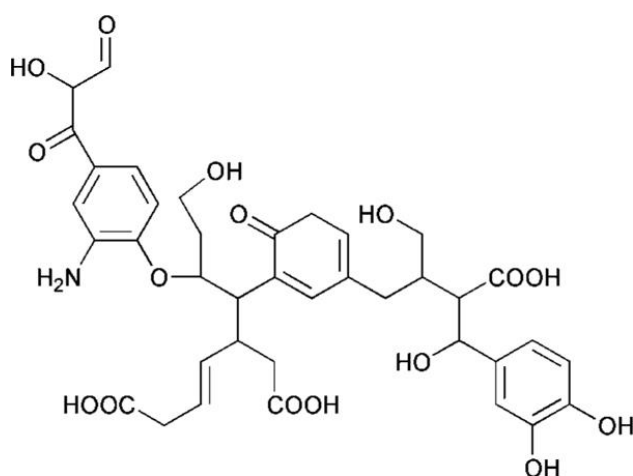
Tabuľka 2 *Chemické vlastnosti humínových látok; upravené podľa* [16]

	Humínové látky			
	Fulvínová kyselina	Humínová kyselina	Humín	
Intenzita sfarbenia	→	→	→	→
Stupeň polymerizácie	→	→	→	→
Molekulová hmotnosť	→	→	→	→
Obsah uhlíku	→	→	→	→
Obsah kyslíku	←	←	←	←
Kyslosť	←	←	←	←
Rozpustnosť	←	←	←	←

3.3.1 Štruktúra a zloženie humínových látok

Hlavné stavebné prvky, ktoré tvoria základ humínových látok sú C, H, O, N a S. Tieto prvky sa vyskytujú v štruktúre humínových látok vždy, bez ohľadu na ich pôvod a región, z ktorého pochádzajú [17]. Okrem prvkového zastúpenia sú taktiež dôležité aj funkčné skupiny, ktoré sú súčasťou štruktúry humínových látok. Funkčné skupiny poskytujú informácie o chemických a štruktúrnych vlastnostiach týchto organických zlúčenín. Humínové kyseliny obsahujú menej funkčných skupín kyslého charakteru ($-\text{COOH}$; $-\text{OH}$) ako fulvínové kyseliny. Súčasťou štruktúry býva aj kyslík, ktorý je začlenený do jadra a je viazaný pomocou esterových a éterových väzieb [18].

Na procese tvorby humínových látok, humifikácií, sa podieľajú rôzne zlúčeniny – aminokyseliny, pektíny, lignín ale aj uhľovodíky. Jednotlivé komponenty sú pevne viazané pomocou rôznych intermolekulových síl; napríklad pomocou donor-akceptorných väzieb, hydrofilných, hydrofóbných a iónových interakcií [17]. Súčasťou humifikácie je veľké množstvo biochemických reakcií. Teórie, ktoré popisujú vznik humínových látok sa líšia, najmä v type počiatočného substrátu a v mechanizmoch jeho premeny. Jedna z teórií popisuje proces tvorby humínových látok ako depolymerizáciu biopolymérov, ďalšia ako polymerizáciu malých molekúl, ktoré vznikli ako produkty depolymerizácie biopolymérov [18].



Obrázok 7 *Steelinkov model monoméru humínovej kyseliny* [19]

3.3.2 Humínové látky a ich využitie

Hovorí sa, že humínové látky sú prítomné všade okolo nás. Práve z tohto dôvodu sú materiálom, ktorý je využiteľný v rôznych aplikačných oblastiach, napríklad aj v priemysle alebo aj v nevýrobných odvetviach.

Humínové látky sa bežne využívajú v agrikultúre, kde sú súčasťou pôdnych substrátov. Ovpływujú fyzikálne vlastnosti pôd, pôdnu produkciu a kvalitu pôd. Tieto organické zlúčeniny ovpływujú úrodnosť pôd a efekty, ktoré podporujú rast.

V priemyslových aplikáciách sa humínové látky využívajú ako aditíva pre riadenie rýchlosti tuhnutia betónu. Humínové látky nájdu svoje uplatnenie pri výrobe plastov, v papierenskom priemysle, ako zdroje syntetických uhlíkovodíkov alebo aj pri spracovaní potravín [17].

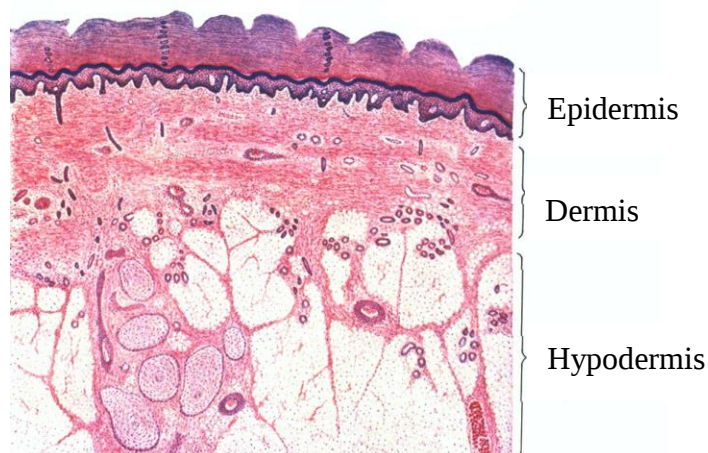
Humínové látky sú využiteľné aj v biomedicínskych aplikáciách, a to najmä pre svoje antibakteriálne, antioxidačné, protizápalové, analgetické a protirakovinné účinky. Majú taktiež vplyv na zrážanie krvi, aktivitu estrogénu a na prirodzenú nešpecifickú obranyschopnosť [20].

3.4 Koža

Koža, latinsky *Integumentum commune*, je jeden veľký dynamický a komplexný model pozostávajúci z rôznych typov buniek, ktoré udržujú vnútorné prostredie chránené pred prostredím vonkajším. Tento najväčší ľudský orgán vykonáva funkciu ochrannej bariéry a zabraňuje stratám vody. Je zároveň schopný regenerácie, termoregulácie, poskytuje imunitné odpovede, zabezpečuje odvod odpadných látok z tela von a je najväčším senzorickým orgánom ľudského tela [21].

Koža tvorí približne 15 % z celkovej hmotnosti dospelého človeka, čo je v priemere 18–20 kg, s váhovým podielom podkožného tkaniva. Zaujíma plochu 1,5–2 m² a jej hrúbka sa, v závislosti od topografie, pohybuje v rozmedzí od 0,5–4,0 mm [22].

Tento orgán sa skladá z troch základných vrstiev: epidermis (pokožka), dermis (zamša), hypodermis (podkožné väzivo). Tieto vrstvy majú pôvod v dvoch rozličných bunkových líniiach, ektoderm (epidermis) a mezenchým (dermis).

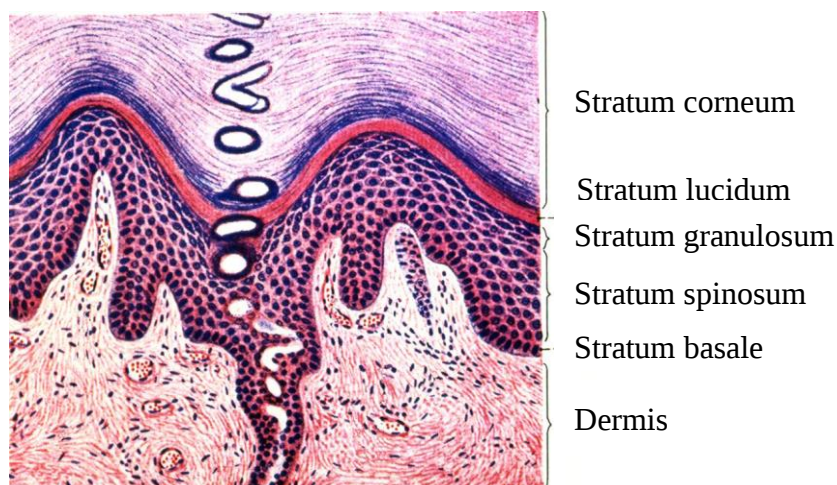


Obrázok 8 Stavba kože; upravené podľa [23]

3.4.1 Pokožka – epidermis

Epidermis je tvorená rohovatejúcim dlaždicovitým epitelom, ktorý je usporiadaný do jednotlivých úrovní – vrstiev. Pokožka obsahuje taktiež nie príliš často vyskytujúce sa kompartmenty, ako sú Langerhansove bunky (makrofágy schopné viazať antigény), Merkelove bunky (súvisia s nervovými zakončeniami) a melanocyty (syntéza melanínu). Jej hrúbka je závislá na veľkosti buniek a na počte bunkových vrstiev. Koža tenkého typu dosahuje hrúbky od 0,06–0,150 mm a je prítomná napríklad na očných viečkach. Hrúbka kože hrubého typu, ktorá sa vyskytuje napríklad na dlaniach či chodidlách, sa pohybuje okolo 0,8 mm. Ľudská pokožka sa obnovuje za 15 až 30 dní. Táto doba je závislá na rôznych faktoroch ako sú vek, krajina, z ktorej jedinec pochádza a ďalšie [24] [25].

Pokožka je zložená z 5 vrstiev z rohovatejúcich buniek, ktoré vytvárajú keratín. V smere od zamše ku pokožke to sú: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum a Stratum corneum [25].



Obrázok 9 Detail prierezu epidermis; upravené podľa [23]

- *Stratum basale*
Vytvára rozhranie medzi dermis a epidermis, ktoré je tvorené vrstvou bazofilných cylindrických alebo kubických elementov. Táto najspodnejšia vrstva, taktiež nazývaná *Stratum germinativum*, sa vyznačuje pomerne vysokou mitotickou aktivitou. Spoločne s priliehajúcimi vrstvami je zodpovedná za neustálu výmenu epidermálnych buniek.
- *Stratum spinosum*
Túto vrstvu tvoria kubické, polygonálne alebo ľahko sploštené bunky s centrálnym uloženým jadrom a cytoplazmou. Bunky obsiahnuté v tejto vrstve sú k sebe pripútané výbežkami cytoplazmy, narúšajú jednotu bunkového povrchu a vytvárajú tzv. ostne. Zväzky filamentov v oblasti *Stratum spinosum* hrajú úlohu pri zachovávaní súdržnosti buniek a odolnosti voči tlaku, odretiu a treniu.
- *Stratum granulosum*
V tejto vrstve je prítomných 3–5 vrstiev sploštených polygonálnych buniek. Vrstva obsahuje špecializované granule, ktoré majú funkciu biologického intracelulárneho tmelu, ktorý zabraňuje prenikaniu cudzorodých látok do jej vnútra.

- *Stratum lucidum*

Jedná sa o tenkú priesvitnú vrstvu, ktorá je tvorená veľmi sploštenými eosinofilnými elementmi. Jednotlivé súčasti buniek, ako sú organely či jadrá, už nie sú zreteľné.

- *Stratum corneum*

Taktiež nazývaná rohová vrstva, je tvorená 15–20 vrstvami sploštených zrohovatených buniek bez jadra. Cytoplazma týchto buniek obsahuje známy skleroproteín – keratín. Po dovŕšení procesu zvaného keratinizácia sú bunky tvorené z fibrilárnych bielkovín, amorfných bielkovín a zosilnených plazmatických membrán. Pre prestup chemických látok transdermálnou formou je prítomnosť a znalosť tejto vrstvy jednou z najdôležitejších.

3.4.2 Zamša – dermis

Dermis je vrstvou, ktorá sa nachádza medzi epidermis a hypodermis. Pre túto vrstvu je charakteristické, že je zložená z väzivového tkaniva, ktoré je tvorené väzivovými bunkami (fibroblasty), vláknami a medzibunkovou hmotou. V zamši sú prítomné nervy a nervové zakončenia, krvné cievy a lymfatické cievy, cibulky vlasových folikul, bunky imunitného systému, sekréčne časti mazových a potných žliaz. Základné anatomické rozdelenie tejto vrstvy je: časť papilárna, subpapilárna a retikulárna [22].

3.4.3 Podkožné väzivo – hypodermis

Táto vrstva je tvorená riedkym väzivom a obsahuje hlavne tukové bunky a ich množstvo je závislé opäť od toho, o ktorej časti ľudského tela hovoríme. Veľkosť tukových buniek súvisí so stavom výživy daného jedinca. Okrem tukových buniek sa v tejto vrstve nachádzajú aj cievy a nervové zakončenia. Medzi podkožným väzivom a zamšou nie je príliš ostrá hranica a z hľadiska prestupu aktívnej látky, táto vrstva nehrá temer žiadnu úlohu [22] [24].

4 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

4.1 Topické polotuhé prípravky

Medzi súčasné neinvazívne formy podávania aktívnych látok patrí transport takéhoto reagentu cez kožu. Prenos aktívnej substancie transdermálnou formou je uskutočňovaný pomocou tzv. topických polotuhých prípravkov, ktoré sú určené k aplikáciám na kožu a slizničné povrchy [26]. Funkcia týchto systémov je penetrovať aktívnu látku kožou. Taktiež môžu vykazovať hydratačné, zmäkčujúce a ochranné účinky, ktoré sú základnou podstatou kozmetických a farmaceutických produktov.

Topické polotuhé prípravky sú charakteristické najmä svojim účinkom v mieste aplikácie prípravku na koži alebo potom svojimi liečivými účinkami priamo v koži. Ich zloženie, homogenita a schopnosť uvoľňovať aktívnu látku či aktívne látky závisí na type polotuhého prípravku a na súčastiach, ktoré tvoria jeho základ (prírodné látky, syntetické látky, pomocné látky ako emulgátory, antioxidanty, antimikrobiálne látky, stabilizátory, promotéry a retardéry penetrácie). Základ môže mať charakter jednofázového alebo viacfázového systému a podľa povahy základu prípravku sa rozlišuje jeho hydrofóbnosť alebo hydrofilnosť.

Prípravky určené k aplikáciám na kožu sa delia na [26]:

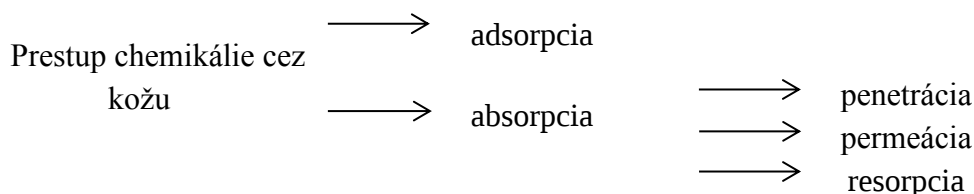
- **maste**, ktoré sú tvorené jednofázovým základom, v ktorom sú dispergované kvapalné alebo tuhé látky,
- **gély** sú tvorené tekutinami a gélotvornými látkami,
- **krémy** sú viacfázové prípravky, ktoré sú zložené aj z hydrofilnej (=vodnej) aj z hydrofóbnnej (=lipofilnej) fáze,
- **pasty** sú definované ako polotuhé prípravky s vysokým podielom tuhej fáze,
- **kataplasmaty** obsahujú hydrofilný základ, ktorý je schopný zadržiavať teplo,
- **náplasti s liečivami** zaisťujú priamy kontakt s kožou a tým napomáhajú absorpcii aktívnej látky kožou, majú aj ochranný charakter.

4.2 Transport aktívnej látky cez kožu

Prestup liečiva alebo inej aktívnej látky cez kožu je podmienený prekonaním najvyššej vrstvy pokožky – *Stratum corneum*. *Stratum corneum* je označovaná ako hlavná permečná bariéra, ktorá je zvyčajne 10–15 µm tenká, a ktorej voľné medzipriestory sú vyplnené viacerými lipidovými dvojvrstvami [27]. Zloženie a štruktúra tejto vrstvy je často prirovnávaná k tehle a k malte, ktoré vytvárajú akúsi pevnú stenu.

Zo záverov štúdií vyplýva, že chemické látky môžu prenikať do kože podľa princípov *adsorpcie* alebo *absorpcie* [22]. Pri adsorpcii dochádza k naviazaniu aktívnej látky v rohovej vrstve (= *Stratum corneum*). Táto látka sa nedostáva do ďalších vrstiev epidermis a ani sa nedostáva do systémového obehu tela. Spolu s odlupujúcimi sa bunkami rohovej vrstvy je odstránená. Naopak absorpcia umožňuje prestup aktívnej látky aj do hlbších vrstiev epidermis a do zamše. Aktívna látka sa dostáva ďalej do organizmu vďaka kontaktu medzibunkového tkanivového moku a ciev. Chemikálie teda prestupujú cez kožu až do krvných či lymfatických ciev. Absorpcia je potom systematicky rozdelená na tri fázy, a to na penetráciu (prestup chemikálie cez kožu do *Stratum corneum* v epidermis); permeáciu (prestup chemikálie do ďalších vrstiev epidermis a do zamše) a resorpciu (prestup chemikálie do krvných alebo lymfatických ciev).

Tabuľka 3 *Mechanizmy prestupu chemikálií cez kožu*



4.2.1 Transportné dráhy

Chemické látky môžu, z povrchu kože, prestúpiť do hlbších kožných tkanív cez tri charakteristické smery, ktoré boli experimentálne overené v štúdiách [25] [27]:

Transcelulárna dráha

Absorpcia aktívnej látky pomocou tejto cesty zahŕňa pomerne energeticky náročný, a teda nie moc termodynamicky a kineticky výhodný proces. Chemikália musí prejsť cez nepriepustný bunkový obal, aby dosiahla vnútro bunky. Putuje skrz keratín v bunke, potom z bunky vystupuje a prekonáva opäť bunkovú stenu. Táto cesta nie je teda významnou z hľadiska transportu aktívnej látky cez kožu.

Intercelulárna dráha

Prestup látky je uskutočňovaný pomocou princípov difúzie cez lipidové dvojvrstvy v medzibunkových priestoroch. Táto cesta je považovaná za najhlavnejšiu permeačnú cestu a transport aktívnej látky sa vo väčšine prípadoch uskutočňuje podľa jej princípov, ktoré sú stále záujmom rôznych vedeckých skupín [25].

Doplnkové dráhy

Liečivo alebo iná aktívna látka sú transportované cez vlasové folikuly, potné žľazy a mazové žľazy. Chemikálie sa pomocou týchto dráh dostávajú priamo do epidermis. Táto cesta umožňuje prestup veľkým polárnym molekulám alebo iónom. K celkovej dermálnej absorpcii prispievajú len nepatrne, a preto nie sú považované za významné transportné dráhy.

Intercelulárna dráha je považovaná za najvýznamnejšiu transportnú dráhu chemikálií cez kožu. Tomuto vyjadreniu predchádzalo štúdium molekulárnej podstaty lipidov v *Stratum corneum* [28]. Znalosť lipidov v tejto vrstve dovoľila vyvinúť špecifické látky, ktoré cielene pôsobia na tieto súčasti v *Stratum corneum*. Akceleranty transdermálnej permeácie sú látky vyvinuté za účelom uľahčiť transport aktívnej látky cez kožu, umožňujú prestup chemikálie cez kožu a v koži a sú schopné tento proces dokonca aj urýchliť.

4.2.2 Akceleranty transdermálnej penetrácie (permeácie)

Taktiež sú často označované aj ako urýchľovače prestupu chemikálie do kože a v koži. Jedná sa o také zlúčeniny alebo látky, ktoré interagujú s lipidovými súčasťami *Stratum corneum*. Úlohou tejto skupiny látok je reverzibilne znížiť bariérové vlastnosti kože a umožniť prienik aktívnej látky cez kožu [29]. Akceleranty špecificky ovplyvňujú 'pevnú stenu', ktorá tvorí intercelulárny priestor medzi korneocyty. Toto ovplyvnenie by malo byť dočasné, nástup účinku takejto látky čo najrýchlejší a po odstránení liečiva alebo inej aktívnej látky by malo dôjsť k plnej obnove bariérových vlastností kože. Použitím akceleraantu je možné zmeniť korneocyty ich hydratáciou alebo je možné denaturovať prítomný keratín, čím sa sprístupní

vrstva *Stratum corneum* pre prienik aktívnej látky. Táto skupina látok musí spĺňať podobné požiadavky ako pomocné látky vo farmácii. Akceleranty musia byť nedráždivé, nealergizujúce, netoxické, nesmú mať vlastnú farmakologickú aktivitu a mali by byť kozmeticky prijateľné. V posledných rokoch sa čoraz častejšie objavuje aj otázka biodegradability akceleratorov, ktoré existujú už viac ako 25 rokov [28] [29].

Látok, ktoré sú svojimi chemickými vlastnosťami natoľko špecifické a spĺňajú predpoklady byť akceleratormi transdermálnej penetrácie, je veľké množstvo. Do tejto skupiny látok môžeme zahrnúť: vodu, sulfooxidy a ich analógy, uhl'ovodíky, močovinu a jej deriváty, mastné kyseliny, estery, alkoholy, azóny a deriváty azónov, amidy, esenciálne oleje, epidermálne enzýmy, aminokyseliny a ich deriváty, terpény, iónové surfaktanty, pyrrolidíny, polyméry a biodegradabilné urýchľovače [30].

Jedným z prvých a dodnes významne využívaných akceleratorov je *N*-dodecyl- ϵ -kaprolaktam, taktiež nazývaný Azon. Bol patentovaný v roku 1976 v USA, jeho akceleračné účinky boli publikované až v roku 1986 [28] [29]. Priaznivo pôsobí na látky hydrofilného aj lipofilného charakteru, jeho akceleračné účinky sa prejavujú len v smere z polárneho prostredia.

Deriváty ω -aminokyselín sa javia ako veľmi sľubné a perspektívne urýchľovače prestupu aktívnej látky cez kožu. Estery lysinu patria medzi prvé akceleranty odvodené od ω -aminokyselín. Vykazujú vysokú akceleračnú aktivitu, nielen pri prestupe látky cez kožu, ale aj pri prestupe látky cez sliznice. Ďalšie deriváty, aminoestery, vykazujú vyššiu akceleračnú aktivitu so zväčšujúcou sa dĺžkou alkylových reťazcov na dusíku, bez toho, aby sa zvyšovala dráždivosť či toxicita. Alkoholy tvoria významnú súčasť topických liekových foriem, a to najmä vďaka ich schopnosti liečivo či inú aktívnu látku rozpustiť, a tým umožniť jej ľahšie vstrebanie sa do kože. Významným zástupcom z tejto skupiny je etanol, ktorý v mieste účinku delipidizuje kožu, prítomné bielkoviny sa denaturujú a koža sa stáva akosi poréznu membránou, cez ktorú aktívna látka ľahšie prestupuje. [29]

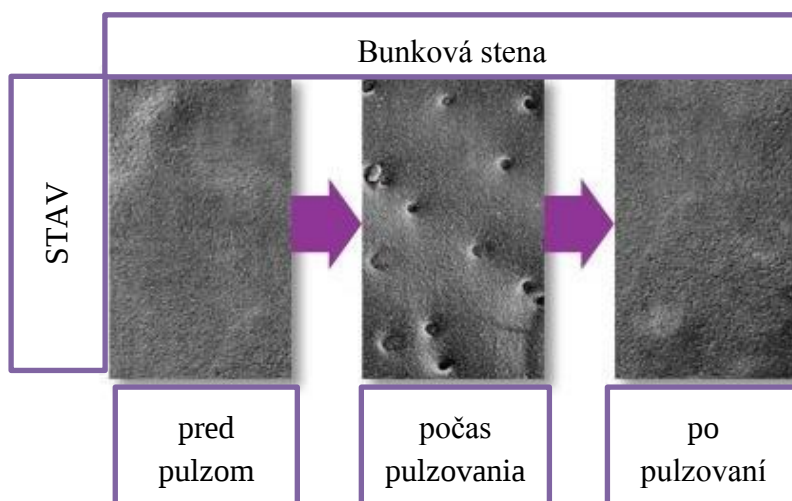
4.2.3 Techniky pre uľahčenie transdermálneho transportu

Popri penetračných a permeačných akceleratoroch existuje celá rada prídavných techník, ktoré uľahčujú transdermálny transport.

Veľmi významnou skupinou nosičov pre dermálny a transdermálny transport sú, v dnešnej dobe, **lipozómy**. Do vnútra týchto štruktúr je možné inkorporovať aktívnu látku, ktorá nie je vo svojom prirodzenom stave kožou samovoľne absorbovateľná. Treba však podotknúť, že lipozómy ako také, disponujú vo svojej štruktúre surfaktantami, ktorými bývajú vo väčšine prípadov urýchľovače transdermálnej penetrácie [27].

Stratum corneum je možné prekonať pomocou **mikroihlového zoskupenia**, ktoré je zložené z približne 400 mikroihiel [30]. Aktívna látka je na ihly zo silikónu nabalená, naopak v prípade použitia dutých kovových ihiel je roztok aktívnej látky vpravený do ich voľných priestorov. Ihly vpravujú liečivo alebo inú aktívnu látku hneď pod rohovú vrstvu kože, bez jej porušenia. Pocity pri aplikácii sú prirovnávané k oblíznutiu mačacím jazykom. Medzi energeticky podporované metódy sa zaraďuje technika, ktorá používa **ultrazvuk**. Pri nízkych frekvenciách je ultrazvuková energia schopná rozrušiť lipidové usporiadanie v *Stratum corneum*. Pôsobením ultrazvukových vĺn, dochádza k vytvoreniu voľných objemových priestorov v kožnej vrstve, a tým je zabezpečený urýchlený prestup aktívnej látky do kože.

Medzi techniky využívajúce ultrazvuk sa zaraďuje fonoforéza a sonoforéza. Sonoforéza využíva ultrazvuk na transport kozmeticky alebo farmaceuticky pôsobiacich aktívnych látok do hlbších vrstiev kože a fonoforéza využíva terapeutické ladičky na stimuláciu aktívnych bodov ľudského tela. **Elektroporácia**, inak nazývaná elektropermeabilizácia kože, vytvára prechodné vodné póry v lipidických dvojvrstvách kože. Póry sú vytvárané po pôsobení vysokých ale krátkych elektrických pulzov ($100\text{--}1000\text{ V.cm}^{-1}$) [30]. Prechod aktívnej látky priamo do rohovej vrstvy epidermis je umožnený práve vďaka vytvoreniu týchto priechodných pórov. Technika, ktorá vytvára elektromotívnu silu, ktorá poháňa prestup nabitých molekúl cez *Stratum corneum*, je **iónoforéza**. Pri tejto technike dochádza k predaniu malého jednosmerného prúdu pri kontakte elektródy ($0,5\text{ mA.cm}^{-2}$), ktorá obsahuje aktívnu látku, s kožou. Iónoforéza spolu s elektroporáciou, sú vhodnými technikami pre transport nových druhov aktívnych látok, pre transport peptidov, malých proteínov alebo oligonukleotidov. [30]



Obrázok 10 Mikroskopický pohľad na terapiu elektroporáciou; upravené podľa [31]

4.3 Absorpčná membrána – testovanie in vivo, in vitro

Vykonávať experimentálnu činnosť na testovanie transdermálnej absorpcie v spolupráci s dobrovoľnými pacientmi, je záležitosť veľmi limitovaná a strážená. Súčasné metódy, ktoré sa využívajú pre testovanie dermálnej absorpcie in vivo sú: monitorovanie metabolických a chemických biologických materiálov (napr. moč, vydychovaný vzduch, krv); mikrodialýza a stripovanie (z anglického 'tape stripping') [25].

Biologickým monitorovaním chemických zlúčenín alebo ich metabolických foriem v krvnej plazme, v moči alebo vo vydychovanom vzduchu, sa stanovuje efektivita prestupu rozpúšťadiel, liečiv alebo iných chemikálií do kože. Metódami monitorovania sa získavajú údaje o dermálnej absorpcii, ktorá potom prispieva k celkovej absorpcii [25].

Mikrodialýza je metóda, pomocou ktorej sa meria dermálne aplikovaná aktívna látka v extracelulárnom priestore, pod úrovňou miesta na koži, kde bola nanosená. Nevýhodou tejto metódy je, že je možné dialyzovať len vodné roztoky. Preto aktívne látky nerozpustné vo vode, nie je možné analyzovať pomocou tejto metódy. Táto technika je vhodná pre štúdium metabolických procesov kože ale aj pre overenie biologickej dostupnosti účinných látok v koži, o čom svedčia experimenty [32, 33].

Ďalšou metódou in vivo testovania je tzv. stripovanie. Je založené na stanovení množstva chemikálie vo vrstvách *Stratum corneum*. Na vopred určené miesto na koži, na určitý časový úsek, je aplikovaná daná aktívna látka. Po ukončení expozitúry, je na kožu umiestnená priľnavá páska. *Stratum corneum* daného miesta na koži je potom pomocou tejto pásky odstránené. Množstvo aktívnej látky, ktorou je páska pokrytá, je ďalej determinované vhodnými analytickými metódami, ktoré sú súčasťou dermafarmakokinetických experimentov [25, 34].

Ako bolo objasnené v predchádzajúcich odstavcoch, pre testovanie transdermálnej absorpcie je vhodné použiť ako absorpčnú membránu kožu. Výber vhodného typu kože je pre ďalšiu experimentálnu činnosť dôležitým krokom. Tento výber úzko súvisí s hlavným účelom testovania a s dostupnosťou kožných vzoriek. Z hľadiska efektívnosti testovania prestupu chemikálií, je ľudská koža najlepšou absorpčnou membránou. Ziskava sa pri chirurgických operáciách, obyčajne z hrudníku, z brucha alebo z chrbta. Medzi aspekty, ktoré ovplyvňujú prestup aktívnej látky cez takúto kožnú membránu patrí vek a pohlavie darcu, hydratácia kože, prekrvenie kože, ale taktiež aj miesto odberu kože či prostredie, v ktorom je experiment vykonávaný [26]. Použitie vzoriek ľudskej kože pre akékoľvek testovanie a iné účely musí byť riadne medzinárodne aj národne eticky posúdené [35].

Anatomicky a fyziologicky veľmi zhodným modelom ku koži ľudskej je koža prasacia. Výsledky štúdie [36] dokazujú, že prasacia koža je, či už z kvalitatívneho alebo kvantitatívneho hľadiska, veľmi podobná ľudskej koži a môže ju plne nahradiť. Najčastejšie je odoberaná z bokov alebo z brucha prasat'a, a v neposlednej rade sa využíva aj koža z ušnice, ktorá je anatomicky podobná ľudskej koži [26].

4.3.1 Druhy tkanív

Podľa posledných ustanovení OECD je možné kožu, či už ľudskú alebo prasaciu, pripraviť pre experimentálne testovanie in vitro štyrmi spôsobmi [35].

Plná hrúbka kože (500–1000 µm)

Koža obsahuje všetky svoje vrstvy, ako rohovú vrstvu, tak aj ostatné vrstvy epidermis a zamšu. Takto upravená koža sa využíva skôr na mechanicky náročné experimenty. V štúdií [37] skúmali toxikokinetické parametre pesticídov na koži z prasacích uší v jej plnej hrúbke.

Dermatomovaná koža (200–500 µm)

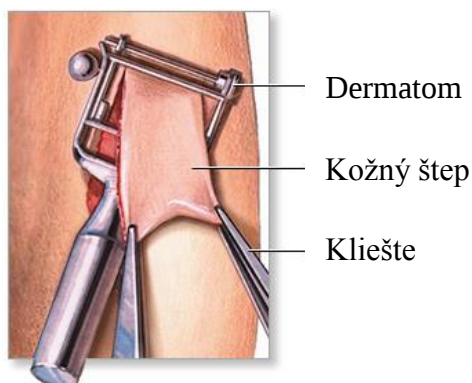
Koža obsahuje rohovú vrstvu, ostatné vrstvy epidermis a najvrchnejšiu časť zamše. Spodná časť zamše je odstránená. Pre zjednotenie tvaru a hrúbky kože sa vykonáva tzv. dermatomovanie. Vykonáva sa pomocou špeciálneho chirurgického nástroja – dermatomu. Pre overenie jednotnej hrúbky kože by mala byť správne overená, napríklad pomocou mikrometrického meradla. Takto pripravené dermatomované vzorky kože môžu byť využité napríklad pri experimentoch [38], kde sa autori zaoberali difúziou látok s rôznymi molekulovými hmotnosťami.

Len pokožka

Oddelenie epidermis od dermis a hypodermis je možné uskutočniť tepelne (vhodné pre kožu bez ochlpenia), chemicky alebo enzymaticky [35].

Len Stratum corneum

Táto kožná vzorka je enzymaticky pripravovaná z epidermálnych membrán pomocou trypsínu [35]. Vzorky *Stratum corneum* sa využívajú na mechanicky náročné experimenty.



ADAM

Obrázok 11 *Dermatom – chirurgický nástroj; upravené podľa* [39]

Ak budeme hovoriť výlučne o prasacej koži, čerstvá koža, odobratá do dvoch dní, je pre testovanie transdermálnej absorpcie ideálna. Táto koža má vo väčšej miere aktívny enzymatický dermálny aparát (k čiastočnej autolýze dochádza pri samotnom odbere kože [26]), a je preto vhodná aj pre metabolické testy. Metabolická aktivita čerstvej kože klesá so zvyšujúcou sa dobou skladovania.

Iný variant je zamrazená prasacia koža. Koža, ktorá bude zamrazená musí spĺňať určité parametre. Nesmie byť viditeľne poškodená, nesmie byť tetovaná, môže byť povrchovo ošetrovaná len vodou a mydlom (dezinfekčné prostriedky nie) a nesmie byť nijako tepelne opracovaná. Musí byť ďalej zbavená všetkých viditeľných chlpcov a je nutné odstrániť podkožné väzivo (ostáva len vrstva epidermis a zamše). Takto ošetrované vzorky kože sa jednotlivo zabalia do hliníkovej fólie, zamrazia sa na -18 až -20°C , a takto vydržia po dobu približne jedného roku [26]. Metabolické testovanie zamrzenej kože nie je možné, nakoľko dochádza k inaktivácii enzymatického dermálneho aparátu. Je preto vhodná len pre testovanie transdermálnej absorpcie. Zamrazená koža vykazuje vyšší ustálený tok testovanej aktívnej látky ako koža čerstvá a čas do začiatku prenikania aktívnej látky do prijímacej tekutiny je kratší [26]. Pred vlastným experimentom je nutné vizuálne overiť stav kože a jej integritu, či nie je poškodená alebo inak narušená jej štruktúra. Rozmrazenú kožu je vhodné použiť v difúzných experimentoch čo najskôr od doby jej rozmrazenia.

4.3.2 Príprava kože pre in vitro permeačné štúdie

Autori v práci [40] popisujú prípravu nových topických lidokainovo-hydrochloridových gélov a ich následné *in vitro* testovanie. V tejto práci bola použitá zamrazená prasacia koža z oblasti uší, ktorá bola pripravená na zamrazenie do jednej hodiny od utratenia zvieraťa. Chlpy na vrchnej vrstve kože boli odstránené. Ďalej bola pomocou chirurgického skalpela odstránená tuková vrstva, ktorá priliehala k dermis. Takto vyrezaná koža bola dôkladne opláchnutá destilovanou vodou a bola zabalená do hliníkových fólií. Bola uchovávaná pri teplote -20°C a bola použitá do jedného týždňa od zamrazenia. Vyrezaná prasacia koža bola po rozmrazení umiestnená medzi donorovú a receptorovú komoru Franzovej cely tak, aby *Stratum corneum*

smerovala k donorovej časti cely. Fosfátový pufor (pH=7,4) bol použitý ako prijímací roztok. Azid sodný bol použitý pre minimalizáciu mikrobiálnej aktivity. V celej difúznej aparatúre bola udržiavaná teplota $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pre uľahčenie permeácie aktívnej látky cez kožu, bola kožná membrána vystavená pôsobeniu receptorového média po dobu približne dvoch hodín. Na takto hydratovanú kožu bola potom aplikovaná vzorka gélu. Dermálna permeácia nebola prerušovaná a celý proces bol udržiavaný po dobu 7 hodín.

V štúdií [41] bola pre *in vitro* testovanie transdermálnej absorpcie Nonivamidu použitá dermatomovaná koža z prasacieho ucha. Čerstvé prasacie uchá boli dôkladne opláchnuté izotonickým roztokom. Vyrezané časti uší boli očistené od krvi pomocou izotonického roztoku a vatových tampónov, boli vysušené, zabalené do hliníkovej fólie a zamrazené na teplotu -30°C . Pred samotným experimentom boli kožné vzorky rozmrazené na izbovú teplotu a boli narezané na približne 3 cm dlhé prúžky. Prúžky boli zafixované na polystyrénovej kocke pomocou kolíkov. Koža bola dermatomovaná na hrúbku 1 mm. Pre difúzne experimenty boli použité Franzove cely a receptorový roztok, fosfátový pufor. Do Franzovej cely bolo nadávkované odplynené a predhriate receptorové médium na 32°C (teplota bola udržiavaná počas celého experimentu). Doba trvania celého experimentu bola 28 hodín. Po odobratí vzorky z receptorovej komory, bol objem receptorovej komory doplnený čerstvým predhriatym receptorovým médium.

Permeabilita kafeínu z mikroemulzií cez zvieraciu kožu bola náplňou práce [42]. Časť prasacej kože v celej svojej hrúbke bola vyrezaná okamžite po utratení zvieraťa. Podkožný tuk bol odstránený pomocou chirurgického skalpela. Koža bola použitá čerstvá, do 5 hodín od vyrezania, alebo bola uchovaná v chlade, v -20°C a použitá do jedného týždňa. Kožná membrána bola umiestnená medzi dve komory difúznej Franzovej cely (temperovaná na teplotu 37°C), tak aby *Stratum corneum* smerovala nahor. Potom bola na takto pripravený systém umiestnená donorová komora. Koža, ktorej bol na okrajoch difúznej aparatúry prebytok, bola odstránená. Prijímacia komora bola naplnená fosfátovým pufrom (pH=7,4). Po 15 minútach premývania kože, bol fosfátový pufor z komôr odstránený a bol nahradený čerstvým pufrom. Doba trvania prestupu aktívnej látky bola približne 24 hodín. Potom bola kožná membrána rozstrihaná na menšie kusy a tieto boli vložené do 2ml vialiek. Kúsky kože boli zaliate 1 ml etylalkoholu a boli uchované pre ďalšiu analýzu.

Aj napriek tomu, že jedným z cieľov tejto rešerše je orientovať sa na prípravu kožného tkaniva z prasacích koží (konkrétne z ušných boltcov), nie je úplne zanedbateľná ani príprava kožných tkanív z myši či potkanov, nakoľko je podobná.

V štúdií [43] sa autori venujú hydrogélom na báze klobetasol propionátu a testovaním transdermálnej permeácie a kožnej iritácie. Po utratení potkanov boli chlpy z ich brušných oblastí oholené pomocou elektrického holiaceho strojčeka, bez poškodenia povrchu kože, za účelom zachovania jej integrity. Koža z brucha bola vyrezaná vo svojej plnej hrúbke. Podkožné tukové tkanivá boli chirurgicky odstránené. Takto pripravené kožné tkanivá boli tri až štyrikrát pretreté pomocou vatových tampónov s isopropylalkoholom. Špecifické množstvo kože bolo odrezané a opláchnuté destilovanou vodou. Zvieracia koža bola umiestnená medzi

receptorovú a donorovú komoru difúznej Franzovej cely tak, aby *Stratum corneum* smerovalo k donorovej časti cely. Prijímacia komora bola naplnená fyziologickým roztokom (pH=5,5). Receptorová komora bola temperovaná na $37\pm 1^\circ\text{C}$ a v daných časových intervaloch z nej boli odoberané vzorky pre ďalšiu analýzu.

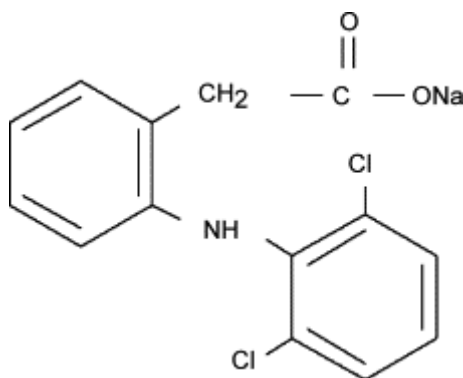
Autori sa v práci [44] venujú štúdiu karbopolového gélu, ktorý obsahuje chitosanovo-albuminové nanočastice na báze aceklofenaku a ich prestupu cez zvieraciu kožu. Permeácia aceklofenaku z karbopolového gélu bola experimentálne overená pomocou kožných tkanív z myši. Po utratení zvieraťa bola ich srst z brušných partií odstránená pomocou holiaceho strojčeka. Koža bola vo svojej plnej hrúbke vyrezaná a tukové tkanivá, priliehajúce k dermis, boli odstránené pomocou chirurgického skalpela. Koža bola opláchnutá fosfátovým pufrom (pH=7,4), bola zabalená do hliníkových fólií a bola uchovaná v chlade, v -20°C . Koža bola použitá do 24 hodín od zamrazenia. Ďalší postup bol totožný s postupom v práci [40].

4.3.3 Uvoľňovacie experimenty a metódy charakterizácie aktívnych substancií

Podľa charakteru experimentu je možné analyzovať, v akej intenzite a efektívite prestúpila aktívna látka povrch absorpčnej membrány (= kože), do *Stratum corneum* a ostatných vrstiev kože, a taktiež do prijímacieho roztoku vo Franzovej cele. K najčastejšie využívaným analytickým metódam patrí metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) a UV-VIS spektrofotometria.

Diklofenak sodný

Diklofenak sodný je nesteroidné liečivo, ktoré pôsobí protizápalovo a využíva sa pri liečbe reumatologických ochorení. Jedná sa o soľ slabej kyseliny 2-[(2, 6-dichlorofenyl)amino]benzén octovej, ktorej pKa je 4. V štruktúre tejto sodnej soli sa nachádzajú heteroatómy ako N, O, Cl a Ca, ktoré spôsobujú vysokú polarizovateľnosť molekuly, a tým pádom tvoria špecifické interakcie s rozpúšťadlami. Prítomnosť NH skupiny ovplyvňuje acidobázický charakter tejto liečivej látky, nakoľko NH skupina sa môže správať voči rozpúšťadlám buď ako donor protónov alebo ako akceptor protónov. [45]



Obrázok 12 Molekulárna štruktúra diklofenaku sodného [45]

In vitro transdermálna uvoľňovacia štúdia [46] experimentálne overila uvoľňovanie diklofenaku sodného z polymérneho hydrogél z karboxymetylcelulózy. Pri práci autori použili Franzove difúzne cely a membrány z acetátcelulózy, ktoré simulovali ľudskú kožu.

Gél bol navrstvený do darovacej komory aparatury a do prijímacej komory bol nadávkovaný fosfátový pufr (pH 5,4–6,9). Roztok v prijímacej komore bol miešaný a jeho teplota bola udržiavaná tak, aby odpovedala normálnej teplote kože človeka. V určitých časových intervaloch boli odoberané vzorky z prijímacej komory Franzovej cely a prijímacia komora bola doplnená čerstvým pufrom na pôvodný objem. Podiel diklofenaku sodného vo vzorkách bol analyzovaný spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 276 nm. [46]

Pri uvoľňovaní diklofenaku sodného z gélov pre očné aplikácie, ktoré boli pripravené in situ [47], sa odobrané vzorky taktiež analyzovali spektrofotometricky. V tomto experimente bol stanovený jednotný obsah uvoľneného liečiva pri vlnovej dĺžke opäť 276 nm.

V experimentálnej štúdií [48] bol diklofenak sodný riadene uvoľňovaný z akrylamidových mikrosfér. Toto uvoľňovanie bolo vykonávané v umelej žalúdočnej tekutine, ktorá mala hodnotu pH 1,2. Vzorky boli odoberané v pravidelných časových intervaloch a boli analyzované opäť spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 276 nm. Prijímacie médium bolo udržiavané tak, aby bol jeho objem po celú dobu experimentu zachovaný.

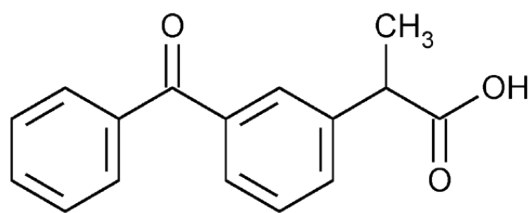
Štúdie [49, 50] sa taktiež zaoberajú uvoľňovaním tejto liečivej látky a jej charakterizáciou. Diklofenak bol v oboch prípadoch rozpustený vo fosfátovom puffre (pH 7,4) a jeho množstvo v odobraných vzorkách bolo stanovené spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 276 nm.

Popri spektrofotometrickom stanovení diklofenaku sodného, je možné túto aktívnu látku charakterizovať aj pomocou chromatografických metód. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia bola využitá pri popise uvoľňovacieho charakteru diklofenaku sodného z nanokompozitných hydrogélů [51]. Fosfátový pufr bol použitý ako uvoľňovacie médium. V stanovených časových intervaloch boli odoberané vzorky (1 ml) a množstvo uvoľnenej liečivej látky bolo detegované pomocou HPLC. Po odobraní každej vzorky bol objem prijímacieho média doplnený čerstvým fosfátovým pufrom. Uvoľnený diklofenak sodný bol analyzovaný na kolóne C18 s reverznou fázou pri laboratórnej teplote (4,6×150 mm; 5 mm, ZORBAX Eclipse XDB-C18). Mobilná fáza bola vytvorená z acetonitrilu a 0,1% trietylamin/fosfátového puffru (65/35). Takto pripravená mobilná fáza bola filtrovaná skrz filtre Milipore s veľkosťou pórov 0,22 μm a následne bola odplynená. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml/min a eluát bol detegovaný pomocou DAD detektoru pri vlnovej dĺžke 276 nm. [51]

Pre kvantifikáciu diklofenaku sodného bola v štúdií [52] využitá vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s reverznou fázou. Analýza bola realizovaná pri izokratickom móde pri laboratórnej teplote, s využitím kolóny C18 (4,6×250 mm; 5 mm). Mobilná fáza bola vytvorená z acetonitrilu a metanolu (70:30). Prietok mobilnej fázy bol 1 ml/min, objem nastrekovaného vzorku bol 20 μl a eluát bol detegovaný pomocou UV detektoru pri vlnovej dĺžke 276 nm.

Ketoprofen

Ketoprofen, s chemickým názvom kyselina 2-(3-benzoylfenyl)-propionová, je hydrofóbne, nesteroidné, protizápalové liečivo, ktoré inhibuje funkciu prostaglandinsyntázy, a teda ovplyvňuje vývoj zápalových reakcií. Táto liečivá látka sa aplikuje pri liečbe reumatickej artritídy, osteoartritídy a vo všeobecnosti sa používa ako liečivo na úľavu od bolesti. [53]



Obrázok 13 Molekulárna štruktúra ketoprofenu [53]

Transportné experimenty ketoprofenu boli v štúdií [54] realizované prostredníctvom difúzných ciel. V týchto experimentoch bola použitá ľudská koža od darcov z miestnej nemocnice a tieto kožné vzorky boli následne použité ako membrány. Darovacia komora obsahovala danú liekovú formu ketoprofenu a súčasťou prijímacej komory bol fosfátový pufr (pH 7,4). Vzorky boli odoberané po dobu 24 hodín každú hodinu a jednotlivé série boli opakované aspoň šesťkrát. Koncentrácia ketoprofenu v prijímacej časti difúznej cely bola stanovená pomocou RP-HPLC. Objem nastrekovaného vzorku bol 200 μ l a bol vedený na kolónu ProntoCil Eurobond C18 (4,0 $\times$ 125 mm; 5 mm). Mobilná fáza bola vytvorená z acetonitrilu a z 10mM dihydrogénfosforečnanového pufru (50:50). Eluát bol detegovaný pomocou UV detektoru pri vlnovej dĺžke 260 nm. [54]

V ďalšej štúdií [55] bol obsah ketoprofenu v rôznych polymérnych matriciach stanovený taktiež pomocou chromatografickej metódy RP-HPLC. 0,1M roztok HCl bol použitý ako uvoľňovacie médium. V určených časových intervaloch boli odoberané vzorky a objem média bol kontinuálne dopĺňaný. Pre chromatografickú analýzu bola použitá kolóna C18 (4,6 $\times$ 150 mm) a ako mobilná fáza bola pripravená zmes acetonitrilu s fosfátovým pufr (45:55). Objem nastreknutého vzorku bol 100 μ l a eluát bol detegovaný pomocou UV-VIS detektoru pri vlnovej dĺžke 260 nm. Celý experiment, uvoľnenie liečivej látky a jej následná detekcia, bol opakovaný vždy aspoň trikrát. [55]

Pre stanovenie množstva ketoprofenu v bežne dostupných farmaceutických géloch vyvinula výskumná skupina [56] novú HPLC metódu. Chromatografická analýza bola realizovaná na kolóne SUPELCO Discovery C18 (4 $\times$ 125 mm) s predkolónou (4 $\times$ 20 mm). Pre separáciu ketoprofenu bola použitá mobilná fáza, ktorá bola zmesou acetonitrilu, vody a fosfátového pufru, v pomere 40:58:2. Nastrekovaný objem vzorku bol 10 μ l a mobilná fáza bola pumpovaná v izokratickom móde. Prietok mobilnej fázy bol 1 ml/min a eluát bol detegovaný pomocou UV-VIS detektoru pri vlnovej dĺžke 260 nm, tak ako to bolo v predchádzajúcich prípadoch. [56]

Uvoľnený ketoprofen je možné charakterizovať aj spektrofotometricky, obdobným spôsobom ako pri stanovení diklofenaku sodného.

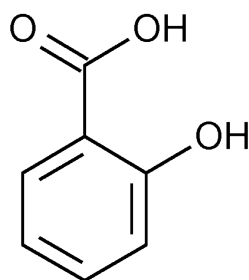
In vitro uvoľňovacia štúdia ketoprofenu z vláknových chitosanových membrán [57] bola vykonávaná vo fosfátovom pufr (pH 7,2) po dobu 30 hodín. V presne stanovených časových intervaloch boli odoberané určité množstvá vzoriek, ktoré boli analyzované spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm. Po odobraní každej vzorky bol objem uvoľňovacieho roztoku doplnený čerstvým fosfátovým pufr (pH 7,2). [57]

Riadené uvoľňovanie ketoprofenu z hydrogél z polyetylén glykolu bolo náplňou práce [53]. Pre simuláciu žalúdočnej tekutiny bol použitý 0,1M roztok kyseliny chlorovodíkovej.

Každá gélová vzorka obsahujúca ketoprofen bola ponorená do umelej žalúdočnej tekutiny. V stanovených časových intervaloch bolo odoberaných 20 µl vzorky, ktoré boli analyzované spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 260 nm.

Kyselina salicylová

Kyselina salicylová je látka s dermatoterapeutickými účinkami, ktorá je často využívaná pri liečbe kožných ochorení [59]. Toto keratolytické činidlo priamo rozpúšťa *Stratum corneum* rozpustením medzibunkového cementu a znižuje rýchlosť proliferácie keratinocytov. Mechanizmus účinku kyseliny salicylovej spočíva v odlupovaní korneocytov z pokožky. Kyselina salicylová má okrem iného bakterostatické, keratolytické a fotoprotektívne vlastnosti, a preto je vo veľkej miere súčasťou rôznych farmaceutických a kozmetických produktov. [58, 59]



Obrázok 14 Molekulárna štruktúra kyseliny salicylovej [58]

Pri charakterizácii kyseliny salicylovej v kozmetických produktoch využili autori v práci [60] vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu s izokratickou elúciou. Chromatografická separácia bola realizovaná na kolóne typu ODS-80TM (4,6×150 mm; 5µm). Mobilnou fázou bola zmes vody a metanolu (65:35), s prídavkom 2,5mM roztoku tetra-*n*-butylamonium hydroxidu a kyseliny fosforečnej. Nastrekovaný objem vzorku bol 10 µl a eluát bol charakterizovaný pomocou UV-VIS detektoru pri vlnovej dĺžke 235 nm. [60]

Perkutánnu absorpciu kyseliny salicylovej z rôznych gélových matric bola náplňou in vitro štúdie [61]. Pre štúdium gélov s obsahom kyseliny salicylovej autori využili Franzove difúzne cely a ako membránu použili kožu z prasacieho ucha. Kolóna Shiseido Capcell C18 (4,6×150 mm; 5 µm) a mobilná fáza v zložení metanol, voda a kyselina trifluorooctová (30:70:0,1) boli využité pri chromatografickej analýze. Nastrekovaný objem vzorku bol 10 µl a rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 1,2 ml/min. Eluát bol analyzovaný pomocou DAD detektoru. [61]

Uvoľňovanie kyseliny salicylovej z pevných liekových foriem bolo charakterizované pomocou RP-HPLC v experimente [62]. Mobilná fáza bola vytvorená tak, že sa zmiešalo 400 ml fosfátového pufru so 600 ml acetonitrilu. V tomto experimente bola použitá kolóna Waters symmetry C18 (4,6×250 mm; veľkosť častíc 5 µm). Rýchlosť mobilnej fázy bola nastavená na 1 ml/min a objem nastrekovaného vzorku bol 10 µl. Eluát bol detegovaný pomocou DAD detektoru pri vlnovej dĺžke 235 nm. [62]

Obsah kyseliny salicylovej v rôznych farmaceutických a kozmetických produktoch je možné stanoviť nielen pomocou chromatografických metód, ale aj pomocou metód spektrofotometrických.

Štúdia [63] pojednáva o spektrofotometrickom stanovení kyseliny salicylovej, ktorá bola obsiahnutá v hydroxypropylmetylcelulóзовých hydrogélach. Hydrogély boli vložené do umelej žalúdočnej tekutiny (pH 1,2) a do umelej črevnej tekutiny (pH 7,4). V stanovených časových intervaloch boli realizované odbery vzoriek, ktoré boli spektrofotometricky analyzované pri vlnovej dĺžke 297 nm.

Riadené uvoľňovanie kyseliny salicylovej zo supramolekulárnych hydrogélach a jej následná spektrofotometrická analýza boli súčasťou experimentu [64]. Vzorky boli kontinuálne odoberané v stanovených časových intervaloch a následne bolo uvoľňovacie médium doplnené čerstvým fosfátovým pufrom na pôvodný objem. Koncentrácia uvoľnenej kyseliny salicylovej bola stanovená z hodnôt absorpcie pri vlnovej dĺžke 297 nm. Všetky experimenty boli vykonané v troch opakovaníach.

4.3.4 Humínové látky vo farmácii a kozmetike

Aj napriek tomu, že množstvo štúdií o využití humínových látok v kozmetickom a farmaceutickom priemysle nie je príliš veľké, výsledky hovoria o ich pozoruhodnom potenciáli a prípadnom využití pri liečbe rôznych typov ochorení.

Humínové látky môžu byť použité vo výrobkoch proti slnečnému žiareniu, proti starnutiu a vo všeobecnosti v produktoch pre starostlivosť o pleť, nakoľko sú schopné absorbovať v UV–viditeľnej oblasti. Tieto organické makromolekuly môžu byť aj súčasťou rúžov na pery, kde humínové látky zabránia aktivácii vírusu herpes simplex vplyvom ultrafialového žiarenia. Humínové látky môžu byť obsiahnuté aj v pleťových masiek, ktoré by sa mohli použiť ako prevencia proti vírusovej reaktivácii po chemickom ošetrovaní tváre. Fenolové skupiny v štruktúre humínových kyselín majú funkciu elektrón-donorovú, a preto môžu odstraňovať voľné radikály a zabráňovať iniciácii reťazovej reakcie. Antioxidačné vlastnosti humínových látok by mohli byť prínosom pre produkty v kozmetike a farmácii. Humínové látky by mohli slúžiť aj ako solubilizačné činidlá, ktoré by niesli farmaceuticky alebo kozmeticky aktívnu látku, v štruktúrach podobných micelám, za účelom zlepšenia ich rozpustnosti vo vode. Z toho vyplýva, že humínové látky sa javia ako nádejné prostriedky pre začlenenie bioaktívnych zložiek do rôznych nano- a mikroštruktúr. [65]

Ďalšie vlastnosti a využitie humínových látok v medicíne a kozmetickom priemysle je detailne popísané v [69] a bolo taktiež súčasťou literárnej rešerše bakalárskej práce [70].

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť diplomovej práce zahŕňa: prípravu humínových hydrogélů s obsahom terapeuticky a kozmeticky pôsobiacich aktívnych účinných látok; prípravu kožných membránových preparátov a zostavenie vertikálnych difúzných aparátů. Ďalej je cieľom charakterizovať pripravené kožné membrány a uvoľnené účinné látky a humínové látky pomocou vhodných inštrumentálnych metód.

5.1 Použité chemikálie

Lignohumát draselný	Amagro Humic Substances s.r.o.
Karbomer 941 – Polygel CB	3V SIGMA s.p.a.
Xanthan gum from <i>Xanthomonas campestris</i>	Sigma-Aldrich; CAS: 11138-66-2
Hydroxid sodný, mikroperly	LACH-NER s.r.o.; CAS: 1310-73-2; p.a. ≥ 98%
Chlorid sodný	LACH-NER s.r.o.; CAS: 7647-14-5; p.a. ≥ 99,5%
Ethanol absolute	BDH Prolabo-VWR International; p.a. 100,0 %
Diklofenak sodný	Sigma-Aldrich; CAS: 15307-79-6
Ketoprofen	Sigma-Aldrich; CAS: 22071-15-4; ≥ 98% (TLC)
Kyselina salicylová	Sigma-Aldrich; CAS: 69-72-7; p.a. ≥ 99,0% (T)
Kyselina orthofosforečná	Sigma-Aldrich; CAS: 7664-38-2; 85–90% (T)
Acetonitril	Sigma-Aldrich, CAS: 75-05-8
Lukosan M14-inertná silikónová pasta	Lučební závody a.s. Kolín
Deionizovaná voda	

5.2 Použité prístroje

UV-VIS spektrometer	Hitachi U-3900H
kvapalinový chromatograf	Agilent 1260; DAD detekcia
skenovací elektrónový mikroskop	ZEISS EVO LS 10
optický mikroskop	LaboMed LX 500
rotačný mixér	RW 16 basic; IKA-WERKE
viacmiestne magnetické miešadlo	Variomag POLY; Thermo-Scientific
digitálne váhy	ScalTec SPB 42
analytické váhy	SBC 31 SCALTEC
chladnička	Gorenje
pH meter	SevenEasy; METTLER TOLEDO

5.3 Ďalšie pomôcky a príslušenstvo

Franzova cela (25 mm)	SES GmbH-Analysesysteme
membránové filtre (50 mm; 0,23 µm)	Pragopor 8; Pragochema spol.s.r.o.
kremenné kvety	Quartz Suprasil; Hellma Analytics
ihly (0,8×120 mm)	Santiago
čepele	SURGEON
vialky (2 ml)	Agilent Technologies
septá	Agilent Technologies
filtre (0,45 µm)	CHROMSERVIS
kolóna (4,6×50 mm; 2,7 µm)	Poroshell 120 EC-C18

5.4 Príprava zásobných roztokov Lignohumátu

Zásobné roztoky Lignohumátu boli pripravené rozpustením práškoveho Lignohumátu v deionizovanej vode. 1% (hm.) roztok Lignohumátu bol vytvorený rozpustením 10 gramov prášku v jednom litri deionizovanej vody a 5% (hm.) roztok Lignohumátu bol vytvorený rozpustením 50 gramov taktiež v jednom litri deionizovanej vody. 1% roztok Lignohumátu mal pH=8,08 a 5% zásobný roztok mal pH=8,24. Takto pripravené zásobné roztoky boli použité pre prípravu gélových vzoriek.

5.5 Príprava neutralizačného činidla

Pre potreby regulácie pH hydrogélových vzoriek bol pripravený vodný roztok hydroxidu sodného o koncentracii 20 % (hm.) tak, že bolo rozpustených 12,5 gramov v 50 ml deionizovanej vody. Táto anorganická zásada bola použitá pre úpravu pH gélových vzoriek na hodnoty v rozmedzí 6,5–8,5.

5.6 Príprava hydrogélů

5.6.1 Gélový základ

Pre prípravu gélových vzoriek boli použité dva druhy zahusťujúcich látok, karbomér Polygel CB a prírodný polysacharid Xanthan. Jednotlivé vzorky gélov boli vždy vytvorené rozpustením príslušnej zahusťujúcej látky v 40 ml disperzného prostredia. Disperzné prostredie pri tvorbe gélov bola buď voda, 1% roztok Lignohumátu alebo 5% roztok Lignohumátu. Na základe stanovenia použiteľnosti jednotlivých gélových vzoriek z práce [66] boli pre experimenty v tejto práci vytvorené 2%, 4% a 5% gélové vzorky (hm. %). Na 2% gélové vzorky bolo potrebné navážiť 1 gram zahusťujúcej látky, ktorá bola rozmiešaná v rozpúšťadle ručne pomocou tyčinky a následne mechanicky pomocou rotačného mixéra. 4% vzorky boli pripravené rozmiešaním približne 2 gramov v danom rozpúšťadle a 5% gélové vzorky boli pripravené rozmiešaním 2,6 gramov v príslušnom rozpúšťadle. Takto pripraveným sadám hydrogélových vzoriek bolo zmerané pH a bolo podľa potreby upravené neutralizačným roztokom tak, aby sa pohybovalo v rozmedzí hodnôt 6,0–8,5. Vybrané modelové sady vzoriek boli: 2% (hm.) Polygel CB, 4% (hm.) Polygel CB a 5% (hm.) Xanthan, pripravené vždy s vodou, 1% roztokom Lignohumátu a 5% roztokom Lignohumátu.

5.6.2 Príprava gélov s aktívnymi látkami

Pre prípravu hydrogélových vzoriek s aktívnymi látkami boli vybrané dve terapeuticky pôsobiace aktívne látky, diklofenak sodný a ketoprofen; a jedna kozmeticky použiteľná aktívna látka, kyselina salicylová. Český liekopis [26] hovorí, že množstvo aktívnej látky by malo zodpovedať 1 % z celkového množstva pripraveného gélu. Z tohto dôvodu bolo pre prípravu gélových vzoriek s aktívnymi látkami navážených 0,5 gramov príslušnej aktívnej látky, ktorá bola rozpustená v 10 ml 99% farmaceutického etanolu. Dokonale rozpustená aktívna látka bola ručne vmiešaná do pripraveného gélového základu, ktorého vznik bol popísaný v kapitole 5.6.1. Etanol bol pri príprave gélových vzoriek s aktívnymi látkami využitý nielen ako látka pre rozpúšťanie aktívnych látok, ale zároveň aj ako látka konzervačná.

Tabuľka 4 Vytvorené gélové vzorky s aktívnymi látkami a ich vnútorné pH

Vzorka	Aktívna látka	V _{20% NaOH} [ml]	finálne pH
2% Polygel CB + voda	0,5 g diklofenak v 10 ml EtOH	1,0	7,21
2% Polygel CB + 1% LH		0,8	8,04
4% Polygel CB + 5% LH		0,4	8,10
2% Polygel CB + voda	0,5 g ketoprofen v 10 ml EtOH	0,6	6,32
2% Polygel CB + 1% LH		0,4	7,81
4% Polygel CB + 5% LH		0,4	8,09
2% Polygel CB + voda	0,5 g kyselina salicylová v 10 ml EtOH	0,6	6,52
2% Polygel CB + 1% LH		0,4	7,54
4% Polygel CB + 5% LH		0,4	8,00
5% Xanthan + voda	0,5 g diklofenak v 10 ml EtOH	-	6,57
5% Xanthan + 1% LH		-	7,13
5% Xanthan + 5% LH		-	7,51
5% Xanthan + voda	0,5 g ketoprofen v 10 ml EtOH	-	6,09
5% Xanthan + 1% LH		-	6,14
5% Xanthan + 5% LH		-	7,02
5% Xanthan + voda	0,5 g kyselina salicylová v 10 ml EtOH	0,5	6,26
5% Xanthan + 1% LH		0,5	6,18
5% Xanthan + 5% LH		-	7,01

5.6.3 Príprava gélov bez aktívnych látok

Gélové vzorky bez aktívnych látok boli pripravované spôsobom popísaným v kapitole 5.6.1. Aj v týchto géloch bolo k pripravenému gélovému základu pridaných 10 ml etanolu. V tomto prípade slúžil etanol len ako konzervačná látka.

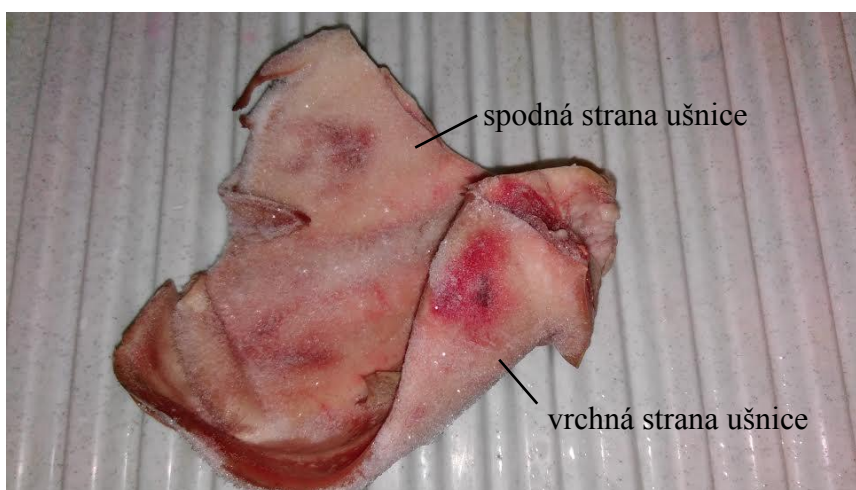
Tabuľka 5 Vytvorené gélové vzorky bez aktívnych látok a ich vnútorné pH

Vzorka	Konzervačná látka	V _{20% NaOH} [ml]	finálne pH
2% Polygel CB + voda	10 ml EtOH	0,6	6,51
2% Polygel CB + 1% LH		0,7	7,26
4% Polygel CB + 5% LH		0,4	7,58
5% Xanthan + voda	10 ml EtOH	-	6,14
5% Xanthan + 1% LH		-	7,03
5% Xanthan + 5% LH		-	7,50

5.7 Príprava kožných membrán

Dôležitou súčasťou experimentov bola príprava a použitie kožných membrán. Pre simuláciu transdermálneho transportu bola použitá koža z ušnice prasťa. Ušnice z prasťa boli pre ďalšie experimenty upravované podľa postupov objasnených v rešerši v kapitole 4.3.2. Prasacie uši boli zadovážené prostredníctvom dvoch dodávateľov: Šmak Plus Žilina (30 ks) a Jaroslav Gaško, Žilina (20 ks).

Nepigmentované a tepelne neupravované prasacie uši boli umyté deionizovanou vodou a následne boli osušené vatou. Z ušnic boli odstránené chlípky. Pomocou chirurgického skalpela bolo čo možno najdokonalejšie odstránené podkožné tukové väzivo tak, aby ostala epidermis a dermis v neporušenom stave. Takto pripravené kožné membrány boli zabalené do hliníkovej fólie a boli zamrazené na teplotu -30°C . Pred samotným použitím kožných membrán boli tieto rozmrazené na laboratórnu teplotu a boli použité v difúzných experimentoch do dvoch hodín od rozmrazenia.



Obrázok 15 Celá zamrazená prasacia ušnica

5.8 Príprava zásobného roztoku chloridu sodného

Pre prípravu zásobného roztoku chloridu sodného o koncentracii 0,15 M bolo rozpustených 8,8 g NaCl v jednom litri deionizovanej vody. 0,15M roztok chloridu sodného bol použitý ako prijímací roztok vo Franzových difúzných celách. Použitie práve 0,15M roztoku chloridu sodného v difúzných experimentoch je objasnené v kapitole 6.1.1.

5.9 Difúzne experimenty

Uvoľňovanie Lignohumátu a aktívnych substancií z pripravených gélových matric bolo experimentálne realizované pomocou difúzných experimentov. Pre tieto účely boli využité difúzne cely vo vertikálnom usporiadaní, tzv. Franzove cely. K dispozícii boli vždy 3 tieto difúzne aparátúry.

Pred začatím experimentov boli styčné plochy membrány a komôr namazané inertnou silikónovou pastou na zábrusy. Magnetické miešadlo bolo vložené do prijímacej komory a následne bola membrána umiestnená na prijímaciu komoru cely a darovacia komora bola dobre pritlačená na membránu. Inertná silikónová pasta bola použitá pre to, aby membrána dobre priláhla k difúznej komore a zároveň, aby difúzia prebiehala výhradne cez difúzne prostredie, teda cez gél.

Do prijímacej komory difúznej cely bolo nadávkovaných 20 ml 0,15M roztoku chloridu sodného pomocou dlhej tenkej ihly. Následne boli zvážené približne 2 g gélovej vzorky a táto vzorka bola umiestnená na membránu, ktorá fyzicky oddeľovala dve komory difúznej cely. Všetky gélové vzorky boli postupne umiestnené na syntetickú membránu a aj na kožnú membránu, pripravenú podľa postupu v kapitole 5.7. Takto pripravená difúzna aparátúra bola

umiestnená na viacmiestné miešadlo a bola prichytená pomocou držiaka na laboratórny stojan. Rýchlosť miešania bola nastavená na hodnotu 250 RPM. Na záver bola darovacia komora s gélovou vzorkou obalená parafilmom, aby nedochádzalo k vysušaniu hydrogélu. Regulácia teploty vonkajšieho plášťa difúznej cely nebola využitá. Všetky difúzne experimenty boli realizované dvakrát, aj so syntetickou, aj s kožnou membránou.



Obrázok 16 Ukážka zostavenej difúznej aparatury so syntetickou membránou

5.9.1 Odbery vzoriek pre spektrofotometrickú analýzu

Vo vybraných časových intervaloch, 4; 24; 48 hodín, boli realizované odbery vzoriek z prijímacej komory difúznej aparatury. Vzorky boli odoberané ručne pomocou dlhých tenkých ihl tak, že ihla bola umiestnená až do stredu prijímacej komory a následne bol prijímací roztok s príslušným množstvom prestúpených látok nasatý do injekčnej striekačky tak, aby nasaté množstvo odpovedalo výške dávkovacieho otvoru. Objem vzorky bol umiestnený do kremennej kyvety. Daná vzorka bola spektrofotometricky zmeraná a následne bol objem vzorky nadávkovaný naspäť do difúznej cely, za účelom udržania konštantného objemu v cele.

5.9.2 Odbery vzoriek pre chromatografickú analýzu

Séria difúzných experimentov pre chromatografickú analýzu bola vykonaná nezávisle na difúzných experimentoch pre spektrofotometrickú analýzu. Difúzna aparatura bola zostavená rovnakým spôsobom, ktorý je popísaný v kapitole 5.9. Vo vopred stanovených časových intervaloch, 4; 24; 48 hodín, boli odoberané vzorky z prijímacej komory difúznej cely. Bol odoberaný vždy 1 ml vzorky z prijímacej časti difúznej cely, ktorý bol následne umiestnený do reagenčnej nádoby Eppendorf s príslušným označením. Odobraný objem vzorky bol nahradený čerstvým 0,15M roztokom chloridu sodného. Jednotlivé odobrané vzorky boli uložené v chladničke a boli ďalej spracované pre chromatografické merania.

5.10 Metódy charakterizácie kožných membrán a aktívnych látok

V tejto kapitole bol popísaný spôsob charakterizácie pripravených kožných membrán a množstva prestúpených účinných látok a humínových látok pomocou vhodných inštrumentálnych metód.

5.10.1 Charakterizácia kožných membrán

Prasacie ušnice boli narezané pomocou chirurgického skalpela tak, aby bolo odstránené podkožné tukové väzivo a aby bola zachovaná vrstva epidermis s dermis. Boli pripravené

nasledujúce vzorky tkanív: spodná strana ušnice zo strany separácie; spodná strana ušnice z vonkajšej strany; horná strana ušnice zo strany separácie a horná strana ušnice z vonkajšej strany. Vonkajšou stranou prasacej ušnice sa rozumie vrstva epidermis a stranou separácie, rez príslušného tkaniva.

Pre charakterizáciu kožných membrán bol použitý skenovací elektrónový mikroskop typu ZEISS EVO LS 10. Pre pozorovanie týchto tkanivových preparátov bolo zvolené zväčšenie v rozmedzí 100–1000krát. Vstupný prúd bol nastavený na hodnotu 10 kV. Výstupom z merania pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu boli snímky kožných membrán s rôznym zväčšením, ktoré boli diskutované v kapitole 6.3.1.

Okrem skenovacieho elektrónového mikroskopu bol pre komplexnú charakterizáciu kožných membrán použitý aj optický mikroskop LaboMed LX 500 s fotoaparátom Canon EOS 1100D. Vlastné meranie preparátov bolo realizované pri 10-násobnom zväčšení.

5.10.2 Metódy štúdia uvoľňovania Lignohumátu draselného

Na základe poznatkov z vypracovanej literárnej rešerše, ktoré objasnili voľbu inštrumentálnej metódy pre charakterizáciu uvoľnených aktívnych substancií, bola zvolená metóda UV-VIS pre charakterizáciu uvoľneného Lignohumátu z pripravených gélových matric.

Pre stanovenie uvoľneného množstva Lignohumátu z hydrogélových vzoriek bola využitá UV-VIS spektroskopia. Jednotlivé vzorky boli odoberané podľa postupu popísaného v kapitole 5.9.1 a boli postupne umiestnené do kremennej mikrokyvety. Na spektrofotometre HITACHI U-3900H boli premerané spektrá v rozsahu vlnových dĺžok 250–800 nm. Po spektrofotometrickom meraní bol objem vzorky vrátený naspäť do difúznej cely za účelom udržania konštantného objemu. Hodnoty absorbancie boli odčítané pri vlnovej dĺžke 465 nm a tieto dáta boli ďalej spracovávané pomocou programu MS Excel a výsledky boli diskutované v kapitole 6.3.3.

Aby bolo možné vyhodnotiť a stanoviť množstvo Lignohumátu, ktorý prestúpil z gélovej matrice do prijímacieho roztoku, bolo potrebné zostaviť kalibračnú radu. Boli pripravené kalibračné roztoky s definovaným množstvom Lignohumátu. Práškový Lignohumát bol rozpustený v 100 ml 0,15M NaCl, tak aby bola výsledná koncentrácia roztoku $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Ďalej boli vytvorené ďalšie kalibračné roztoky postupným riedením roztoku o koncentrácií $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ tak, aby vznikli roztoky o koncentrácií 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Takto pripravené kalibračné roztoky boli spektrofotometricky zmerané. Boli odčítané hodnoty absorbancie pri 465 nm, ktoré boli následne vynesené do grafu závislosti absorbancie na koncentrácií príslušného kalibračného roztoku v programe MS Excel.

5.10.3 Metódy štúdia uvoľňovania aktívnych látok

Pre stanovenie množstva uvoľnených aktívnych látok (diklofenak sodný, ketoprofen, kyselina salicylová) z hydrogélových matric bola, na základe literárnej rešerše, zvolená analytická metóda HPLC s DAD detekciou na chromatografickom zariadení typu Agilent 1260.

HPLC Agilent 1260 je zostavený z detektoru s diódovým poľom s 10 mm absorpčnou celou, kvartérnej pumpy, héliového degaséru a z chladeného autosampleru. Vlastná separácia bola realizovaná na kolóne typu Poroshell 120 EC-C18, 4,6 cm × 50 mm, s veľkosťou častíc 2,7 μm .

Chromatografická separácia prebiehala v móde izokratickej elúcie. Zloženie mobilnej fáze bolo zmes 0,05M kyseliny orthofosforečnej a acetonitrilu v pomere 60:40. Prietok mobilnej fáze bol nastavený na hodnotu 0,5 ml a množstvo nastrekovaného vzorku na hodnotu $5 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Každá odobraná vzorka bola pred umiestnením do vialky prefiltrovaná cez $0,45 \mu\text{m}$ membránový filter. Na základe rozmedzia vlnových dĺžok jednotlivých aktívnych látok uvedeného v [26], boli zvolené vlnové dĺžky detekcie jednotlivých aktívnych substancií, ktoré sú uvedené v tabuľke 6. Z jednotlivých chromatogramov boli odčítané hodnoty plôch píkov vzoriek pri daných vlnových dĺžkach detekcie a v odpovedajúcich retenčných časoch. Pre spracovanie dát bol použitý software Agilent Chemstation a program MS Excel. Výsledky boli diskutované v kapitole 6.3.4.

Tabuľka 6 Zvolené vlnové dĺžky detekcie aktívnych substancií pre HPLC

Aktívna látka	Vlnová dĺžka DAD [nm]
Diklofenak sodný	210
Ketoprofen	233
Kyselina salicylová	303

Príprava štandardných roztokov

Bol pripravený roztok každej aktívnej látky o koncentrácií $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ rozpustením 1 mg aktívnej látky v 50 ml 0,15M roztoku chloridu sodného (roztok A). Ďalej bol pripravený vodný roztok Lignohumátu o koncentrácií $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ rozpustením 5 mg práškoveho Lignohumátu v 50 ml deionizovanej vody (roztok B). Výsledný štandardný roztok, o známej koncentrácií aktívnej látky, bol pripravený z roztokov A a B v pomere 1:9. Boli overené retenčné časy jednotlivých aktívnych látok pri zvolených vlnových dĺžkach detekcie.

Kalibračná rada

Pre kvantifikáciu uvoľneného diklofenaku sodného, ketoprofenu a kyseliny salicylovej z gélových matríc, boli pripravené kalibračné roztoky. Tieto kalibračné roztoky terapeuticky a kozmeticky pôsobiacich aktívnych látok boli pripravené v 0,15M roztoku chloridu sodného (prijímací roztok v difúznej cele) o koncentráciách: 0,5; 1; 5; 10; $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Boli odčítané hodnoty plôch pík, ktoré odpovedali retenčným časom a charakteristickým vlnovým dĺžkam jednotlivých aktívnych látok. Následne bola vynesená závislosť plôch pík na koncentrácií príslušného kalibračného roztoku v programe MS Excel. Rovnice lineárnych regresíí boli použité pre ďalšie výpočty.

6 DISKUSIA A VÝSLEDKY

6.1 Difúzne experimenty

Realizácia sérií difúzných experimentov bola hlavným predpokladom pre vytvorenie vhodného experimentálneho modelu pre transdermálny transport aktívnych látok z gélových matric. Pre tieto účely bola použitá vertikálna difúzna cela, ktorá sa bežne využíva pre štúdium transportu účinných látok z rôznych liekových foriem. Pred samotným meraním reálnych vzoriek bolo potrebné optimalizovať jednotlivé pracovné úkony tak, aby bol difúzny experiment realizovaný správne.

6.1.1 Optimalizácia metódy

Počas skúšobných difúzných experimentov sme narazili na nedostatky pri práci s Franzovou difúznou celou, ktoré bolo potrebné odstrániť. Jednotlivé optimalizačné kroky sú popísané v nasledujúcich odstavcoch.

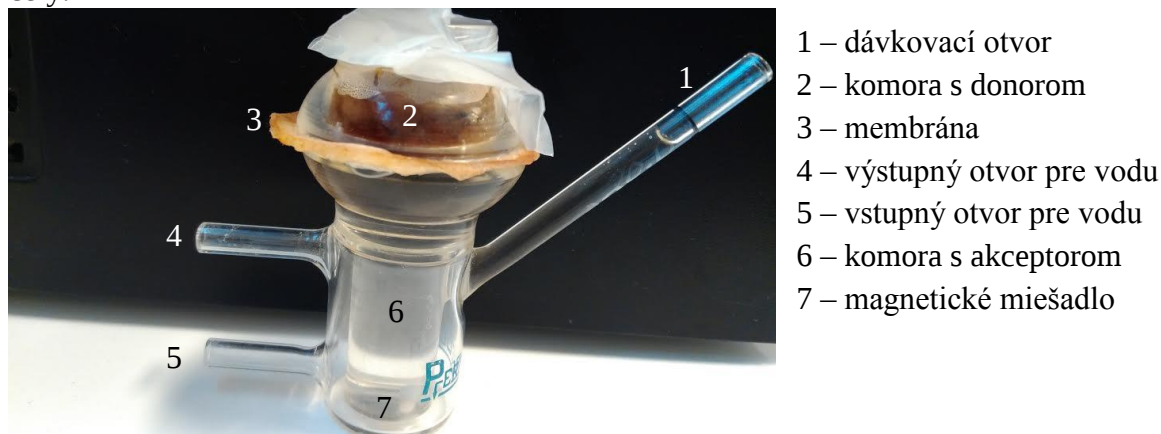
Pri aplikácii gélovej vzorky na syntetickú aj kožnú membránu bolo potrebné gél dokonale rozprestrieť na celý povrch membrány tak, aby nevznikali vzduchové bubliny medzi gélovou vzorkou a membránou. Prítomnosť vzduchových bublín by spôsobila menšiu efektívnu plochu prestupu aktívnej látky a zároveň by nebola táto plocha rovnaká pre jednotlivé experimenty.

0,15M roztok chloridu sodného bol zvolený ako prijímací roztok v difúznej cele nielen z dôvodu simulácie fyziologických podmienok, ale taktiež z dôvodu regulácie osmotického tlaku na stranách membrány. Prijímací roztok s touto iónovou silou zabezpečil kontinuálne uvoľňovanie aktívnych látok z gélových matric a potlačil tendenciu gélových vzoriek nasávať si tekutinu z receptorového priestoru difúznej cely.

Ďalším zistením bolo, že odbery vzoriek prijímacieho roztoku s uvoľnenými aktívnymi látkami, ktoré boli ďalej analyzované, bolo potrebné realizovať pomocou dlhých tenkých ihliel. Jedine pomocou dlhých tenkých ihliel bolo možné dosiahnuť vnútorný priestor prijímacej komory difúznej cely. Uvoľnené účinné látky neboli homogénne rozptýlené v priestore dávkovacieho otvoru aj napriek tomu, že bol prijímací roztok nepretržite premiešavaný, čo sme pozorovali aj na sfarbení roztokov v týchto dvoch priestoroch. A práve z tohto dôvodu bolo potrebné dosiahnuť vnútorný priestor prijímacej komory, kde boli uvoľnené látky rozptýlené homogénne. Je nutné dodať, že samotné odoberanie bolo možné realizovať len po výšku dávkovacieho otvoru. V prípade, že by bola táto vzdialenosť prekročená, došlo by opäť k tvorbe bublín v prijímacej komore difúznej cely.

Po spektrofotometrickej analýze odobranej vzorky bolo potrebné túto vzorku vrátiť naspäť do difúznej cely, za účelom udržania konštantného objemu v cele. Spätná injekcia vzorku do difúznej cely nebola realizovaná takým istým spôsobom ako odber vzorky, nakoľko mohli pri takomto postupe opäť vzniknúť bubliny v prijímacej komore Franzovej cely. Vzorka bola injektovaná do difúznej cely tak, aby ihla smerovala len do dávkovacieho otvoru a aby nezasiahla vnútorný priestor prijímacej komory. Kontakt medzi darovacou a prijímacou komorou by mal byť zachovaný bez tvorby bublín tak, aby uvoľňovacie procesy prebehli v čo možno najväčšej intenzite a správne.

Jednotlivé optimalizačné kroky slúžili k vytvoreniu univerzálneho postupu, podľa ktorého boli ďalej realizované všetky difúzne experimenty s použitím Franzovej difúznej cely.



- 1 – dávkovací otvor
- 2 – komora s donorom
- 3 – membrána
- 4 – výstupný otvor pre vodu
- 5 – vstupný otvor pre vodu
- 6 – komora s akceptorom
- 7 – magnetické miešadlo

Obrázok 17 Difúzna ceta vo vertikálnom usporiadaní (diameter 25 mm), s kožnou membránou.

6.2 Kožná membrána

Veľká pozornosť bola venovaná práve príprave membrán z prasacích ušnic a ich použitiu v súvislosti s difúznymi experimentmi. Na základe poznatkov z literárnej rešerše (napr. [26, 36]) bol pre simuláciu transdermálneho transportu použitý práve tento kožný model.

Pred samotným použitím prasacích membrán bolo potrebné narezat' prasacie ušnice tak, aby bolo odstránené podkožné tukové väzivo a aby ostala vrstva epidermis neporušená. Práve najvrchnejšia vrstva epidermis, *Stratum corneum*, bola pre simuláciu transdermálneho transportu principiálna, preto jej kvalita a stav boli pri výbere kožnej membrány rozhodujúce. Kožná membrána nesmela byť na žiadnom mieste porušená a pred každým použitím membrány bol skontrolovaný jej vzhľad. Ďalšou nemenej dôležitou podmienkou bola požiadavka na jednotnú hrúbku kožnej membrány v každom jej mieste. Odporúča sa, aby mali tkanivá v ideálnom prípade jednotnú hrúbku z toho dôvodu, aby boli experimenty realizované s vysokou mierou presnosti. Pri príprave kožných membrán, pre účely tejto práce, boli použité chirurgické skalpely a ušnice boli narezávané ručne. Kožné membrány sa môžu pripravovať nielen pomocou chirurgického skalpela, ale aj pomocou špeciálnych nástrojov (Obrázok 11).

V začiatkoch práce s prasacími ušnicami bolo potrebné osvojiť si spôsob narezávania ušnic a overiť priepustnosť pripravených kožných membrán. Ušnice z prasaťa boli narezávané tak, aby bolo čo možno najdokonalejšie odstránené podkožné tukové väzivo a aby neboli membrány ani príliš hrubé, ani príliš tenké. V prípade, že nebolo poriadne odstránené podkožné tukové väzivo, nedochádzalo k difúzií látok skrz takúto membránu, pretože bola príliš hrubá. Naopak, ak bola kožná membrána príliš tenká, dochádzalo pri dávkovaní prijímacieho roztoku k jeho pretekaniu von z difúznej cely. Hranica medzi podkožným tukovým väzivom a začiatkom dermis s epidermis nebola príliš viditeľná, a preto bolo ďalším cieľom narezat' kožné membrány bez porušenia epidermis. V niekoľkých prípadoch bol stav narezávanej kože overený pomocou optického mikroskopu. Priepustnosť ručne narezaných kožných membrán bola overená realizovaním skúšobných difúzných pokusov pre uvoľňovanie Lignohumátu z ľubovoľnej gélovej matrice.

Čerstvé narezané kožné membrány bolo potrebné využiť v difúzných experimentoch čo najskôr, nakoľko sa jednalo o biologický materiál, ktorý sa postupom času rozkladal. V prípade, že boli narezané membrány uchovávané v hliníkovej fólii pri teplote -30°C , bolo možné ich využiť pre tieto účely aj neskôr. V zamrazenom stave nepodliehali narezané kožné tkanivá žiadnej skaze.

Popri kožných membránach, ktoré boli súčasťou simulácie experimentálneho modelu transdermálneho transportu aktívnych látok z hydrogélových matric, boli v difúzných experimentoch využité aj syntetické membrány s veľkosťou pórov $0,23\ \mu\text{m}$. Syntetické membrány boli referenčnými membránami ku membránam biologického pôvodu. Kožné membrány boli nasadzované medzi darovaciu a prijímaciu komoru difúznej cely, identicky ako pri membráne syntetickej. Pri napĺňaní prijímacej komory $0,15\text{M}$ roztokom chloridu sodného dochádzalo v počiatoch často k pretekaniu tohto roztoku von z Franzovej cely, čo mohlo byť pravdepodobne spôsobené nehomogenitou ručne narezávanej kožnej membrány. Manipulácia s kožnou membránou si preto vyžiadala niekoľko opatrení, ktoré pomohli pri riešení problémov s pretekaním prijímacieho roztoku pri jeho dávkovaní. Bolo potrebné dostatočne namazať zábrus inertnou silikónovou pastou a poriadne pritlačiť membránu na komoru difúznej cely. Časom bola osvojená technika narezávania prasacích ušnic a tento nedostatok bol odstránený.

Kožná membrána bola pred nasadením na Franzovu difúznu celu upravená tak, aby tvarovo približne odpovedala veľkosti otvoru so zábrusom. Kožná membrána bola v časti, kde nebola pokrytá gélovou vzorkou, na vzduchu vysušená. Vysušanie bolo pravdepodobne spôsobené stratou ceramidov v *Stratum corneum* epidermis, čo spôsobilo dehydratáciu membrány. Táto skutočnosť nijako neovplyvnila priebeh difúzných experimentov, pretože styčná plocha medzi gélom a prijímacím roztokom nebola vysušená, čo bolo, pri každom experimente, vizuálne overené.

6.3 Metódy charakterizácie kožných membrán, uvoľňovania aktívnych látok a Lignohumátu

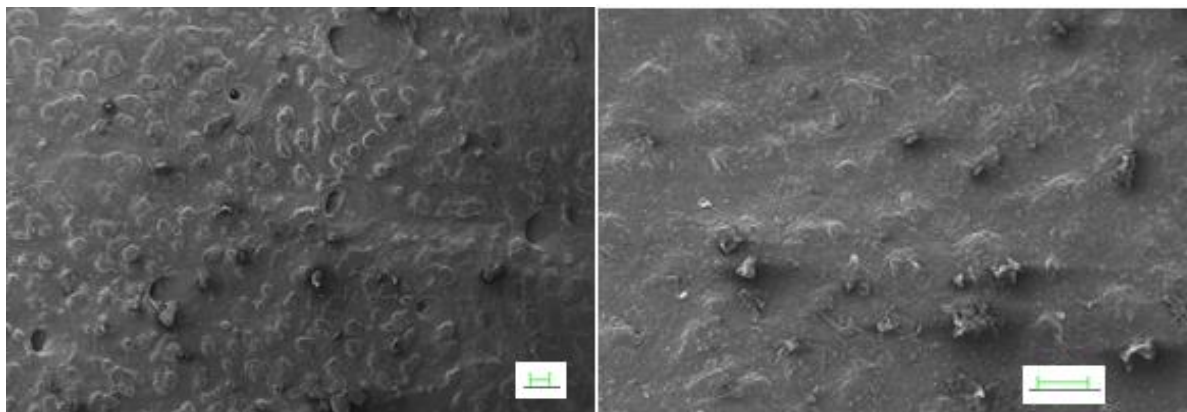
6.3.1 Charakterizácia kožných membrán

Narezané ušnice, ktoré boli použité v difúzných experimentoch ako kožné membrány, boli charakterizované prostredníctvom optického mikroskopu a elektrónového skenovacieho mikroskopu. Hrúbka ručne narezaných kožných membrán bola zmeraná ručne pomocou mikrometra.

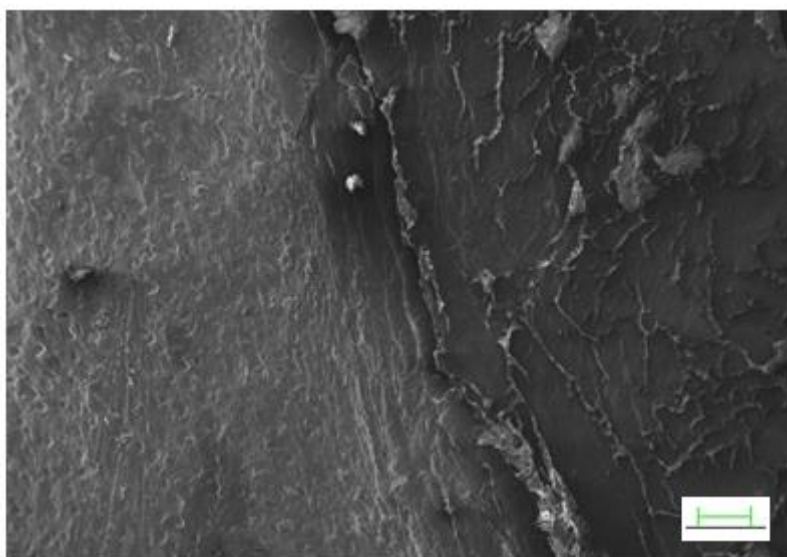
Skenovací elektrónový mikroskop

Hlavnou motiváciou pre charakterizáciu prasacích kožných tkanív pomocou elektrónového skenovacieho mikroskopu bola možnosť detailne pozorovať povrchy týchto biologických materiálov vo vysokom rozlíšení. Prostredníctvom skenovacieho elektrónového mikroskopu boli vyhotovené snímky tkanivových preparátov, ktoré neboli pred touto charakterizáciou použité v žiadnom experimente. Biologické membrány, ktoré boli prichystané pre tieto účely, boli zámerne pripravované aj z vrchnej strany, aj zo spodnej strany ušnice, z toho dôvodu, aby bolo možné porovnávať potenciálne rozdiely v ich povrchovej štruktúre. Zároveň mala táto

inštrumentálna metóda ukázať odlišnosti v štruktúre povrchu membrán, zo strany rezu a zo strany epidermis.



Obrázok 18 Snímky prasacieho kožného tkaniva zo SEM. Štruktúra membrány zo **spodnej strany ušnice zo strany epidermis** (vľavo), 100-násobné zväčšenie, mierka 100 μm . Štruktúra membrány z **vrchnej strany ušnice zo strany epidermis** (vpravo), 250-násobné zväčšenie, mierka 100 μm .



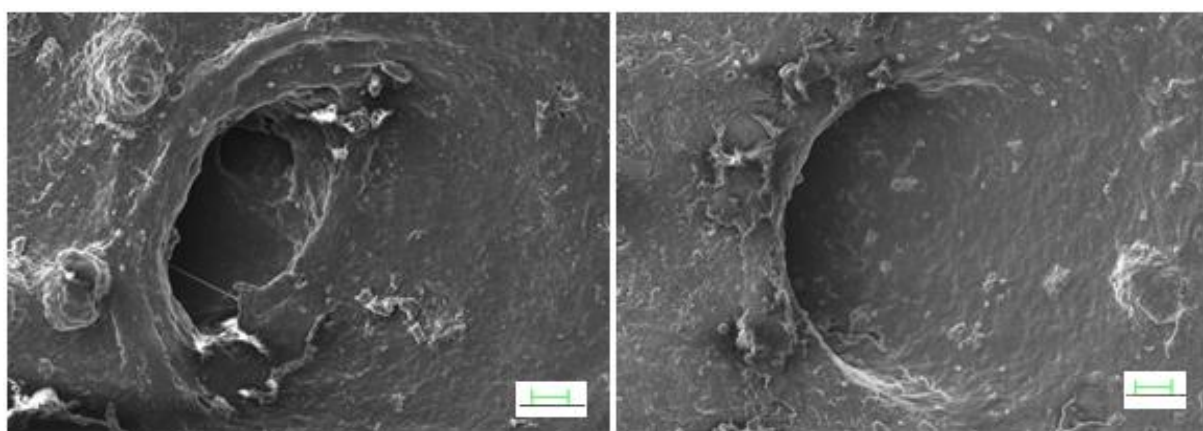
Obrázok 19 Snímka prasacieho kožného tkaniva zo SEM. **Prierez kožnej membrány**, 200-násobné zväčšenie, mierka 100 μm .

Povrchová štruktúra membrán sa výrazne nelíšila, s ohľadom na stranu ušnice, z ktorej boli kožné vzorky pripravované (Obrázok 18). Kožný preparát zo spodnej strany ušnice zo strany epidermis mal relatívne hladký povrch s dobre pozorovateľnými kožnými pórmami (Obrázok 18 – vľavo). Snímky ukázali, že najvrchnejšia vrstva epidermis, *Stratum corneum*, bola kompaktná a nebola nijak porušená. V okolí kožných pórov môžeme pozorovať prítomnosť ďalších kožných útvarov. Predpokladáme, že sa jedná o odumreté, odlupujúce sa bunky rohovej vrstvy epidermis, keratinocyty, ktoré sú typické pre *Stratum corneum*. Prostredníctvom SEM sme mohli túto vrstvu prasacej kože pozorovať vo veľmi dobrej kvalite a mohli sme si overiť stav najvrchnejšej vrstvy epidermis. Z týchto záverov vyplýva, že aj

spodná strana prasacej ušnice, aj vrchná strana, je z hľadiska kompaktnosti povrchu epidermis, vhodnou voľbou pre prípravu kožných membrán pre difúzne experimenty.

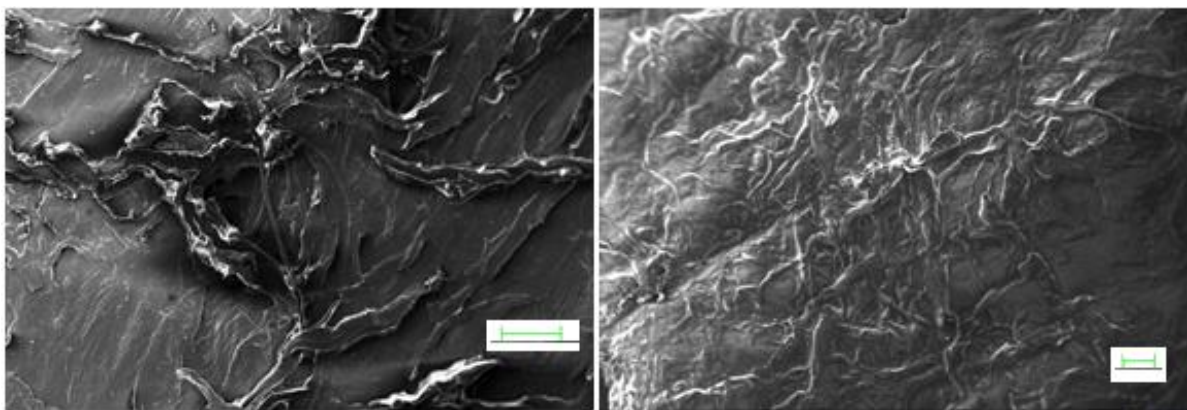
Prípadné povrchové nerovnosti alebo nedostatky v štruktúre ucha by mohli byť charakteristické len pre daný konkrétny typ prasacieho ucha, ktorý bol skúmaný pomocou SEM. Sprostredkované prasacie ušnice boli navzájom odlišné, a preto je zrejmé, že každá kožná membrána bola svojim spôsobom unikát.

Na detaile prierezu tkaniva z prasacieho ucha (Obrázok 19) môžeme pozorovať jasne vymedzenú hranicu medzi epidermis a vrstvou kože po reze. Táto hranica nie je hladká a nerovnomernosti sú pravdepodobne dôsledkom ručného narezávania prasacích ušníc. Na strane po reze sa pravdepodobne objavujú pozostatky tukových buniek a väzivových vlákien podkožného tukového väziva. Táto snímka nám dáva predstavu o charaktere povrchu kožnej membrány zo strany rezu a o kvalite prevedenia manuálneho chirurgického rezu.



Obrázok 20 Snímky prasacieho kožného tkaniva zo SEM. Štruktúra kožného póru **spodnej ušnice zo strany epidermis** (vľavo), 900-násobné zväčšenie, mierka 20 μm . Štruktúra kožného póru **vrchnej ušnice zo strany rezu** (vpravo), 900-násobné zväčšenie, mierka 20 μm .

Kožné póry, ktoré boli nasnímané z rôznych strán ušnice, neukazujú výrazné rozdiely vo svojich povrchových štruktúrach (Obrázok 20). V okolí kožného póru zo strany epidermis môžeme pozorovať výskyt odumretých zrohovatených buniek *Stratum corneum* a v okolí póru zo strany rezu môžeme pozorovať zhluk pravdepodobne tukových buniek. Inak nie je štruktúra kožných pórov ničím zvláštna.



Obrázok 21 Snímky prasacieho kožného tkaniva zo SEM. Štruktúra membrány zo **spodnej strany ušnice zo strany rezu** (vľavo), 300-násobné zväčšenie, mierka 100 μm . Štruktúra membrány z **vrchnej strany ušnice zo strany rezu** (vpravo), 80-násobné zväčšenie, mierka 200 μm .

Na snímkach kožných membrán po reze môžeme vidieť pozostatky väzivových tkanív, ktoré sú, spolu s tukovými bunkami, hlavnou súčasťou podkožného tukového väziva (Obrázok 21). Štruktúra povrchu membrány sa opäť výrazne nelíši. Na snímke kožného tkaniva zo spodnej prasacej ušnice, zo strany rezu, môžeme pozorovať približený kožný pór, ktorého štruktúra má rysy podobné kožnému póru epidermis (Obrázok 21 – vľavo).

Zhotovené snímky vybraných kožných preparátov prostredníctvom SEM priblížili charakter povrchu kožných tkanív. Pomocou tejto inštrumentálnej metódy boli preukázané štruktúrne rozdiely medzi povrchom epidermis a povrchom vrstvy rezu. Tieto rozdiely sú zároveň znakom, že jednotlivé vrstvy kože prasat'a sú usporiadané približne rovnako ako vrstvy kože človeka. Charakterizácia kožných membrán pomocou SEM preukázala, že prasacie ušnice sú vhodným kožným modelom pre experimentálnu simuláciu transdermálneho transportu aktívnych látok z gélových matric.

Optický mikroskop

Pre úplnú charakterizáciu kožných membrán bolo v úmysle použiť optický mikroskop. Vzhľadom na hrúbku niektorých kožných preparátov nebola táto charakterizácia príliš úspešná. Väčšina pripravených kožných membrán nebola dostatočne tenká a intenzita presvietenia nebola dostatočujúca na to, aby sme boli schopní niečo detailne pozorovať. Na vzorovej snímke (Obrázok 22) môžeme vidieť kožný preparát po difúznom experimente, kde bola použitá gélová vzorka s obsahom Lignohumátu. Lignohumát zafarbil túto kožnú membránu do hneda, čo môžeme vidieť aj na snímke. Jedná sa o výrez kožného tkaniva zo strany epidermis, kde môžeme pozorovať odlupujúce sa bunky keratinocytov. Táto metóda nebola vhodná pre podrobnú charakterizáciu kožných membrán.



Obrázok 22 Snímka z optického mikroskopu. Kožná membrána zo strany epidermis po difúznom experimente, 10-násobné zväčšenie.

Stanovenie hrúbky kožných membrán

Poslednou zložkou komplexnej charakterizácie kožných membrán bolo určenie ich hrúbky. Meraním tejto vlastnosti membrán sme chceli overiť jednotnosť hrúbky ručne narezaných kožných tkanív, nakoľko sme predpokladali, že hrúbka membrán by mohla ovplyvniť intenzitu prestupu jednotlivých látok do prijímacieho roztoku. Plánovanou inštrumentálnou metódou charakterizácie hrúbky narezaných koží bola profilometria, ktorá by nám pomohla posúdiť kožný reliéf a topografiu membrán. Narezané kožné membrány neboli pre tieto účely dostatočne tenké, mohlo dôjsť k poškodeniu hrotu prístroja, a preto nebol tento experiment realizovaný.

Pre stanovenie hrúbky membrán bol použitý ručný mikrometer. Bolo pripravených vždy 5 vzoriek narezaných čerstvých tkanív a 5 vzoriek vysušených tkanív. Každá kožná vzorka bola premeriavaná na desiatich rozdielnych miestach a následne bola stanovená priemerná hodnota hrúbky čerstvých aj usušených kožných membrán.

Tabuľka 7 Hodnoty hrúbok čerstvých kožných tkanív

	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5
Meranie č.	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]
1	720	710	960	750	1050
2	670	600	980	670	1110
3	1030	650	540	690	1060
4	1400	630	1000	960	1070
5	660	610	1280	520	1140
6	670	590	1220	650	1100
7	650	550	1070	620	1110
8	860	600	1110	710	1040
9	630	620	1010	690	1010
10	710	600	930	590	1090
priemer	800	616	1010	685	1078
smerodajná odchýlka	231,47	40,05	190,11	110,66	37,09

Z nameraných hodnôt môžeme pozorovať, že hrúbky jednotlivých kožných vzoriek sa navzájom líšili (Tabuľka 7). Taktiež sa líšili aj hodnoty hrúbok v rámci jednej vzorky. Všetky kožné membrány boli pripravované rovnakým spôsobom, no aj napriek tomu sa hodnoty hrúbok na jednotlivých miestach tkaniva nezhodovali. Tieto rozdiely mohli byť pravdepodobne dôsledkom rôzne veľkých pozostatkov podkožného tukového väziva na pripravených kožných vzorkách. Z týchto zistení vyplýva, že pomocou manuálnej prípravy kožných membrán nebolo možné vytvoriť membrány s jednotnou hrúbkou. Priemerná hodnota hrúbky čerstvej kožnej membrány bola stanovená na $(837,80 \pm 230,77) \mu\text{m}$.

Tabuľka 8 Hodnoty hrúbok usušených kožných membrán

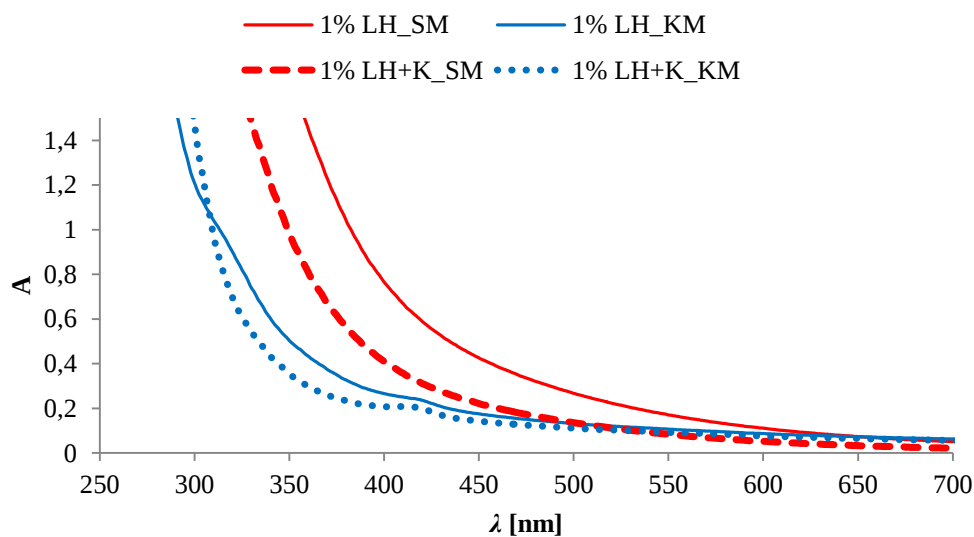
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5
Meranie č.	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]
1	800	740	780	700	860
2	750	960	620	680	790
3	700	1000	760	900	810
4	890	980	890	730	760
5	750	960	740	790	850
6	820	950	920	690	720
7	760	780	890	830	690
8	790	770	750	760	800
9	810	710	690	680	720
10	860	760	760	920	830
priemer	793	861	780	768	783
smerodajná odchýlka	53,30	111,13	89,89	85,18	55,51

Hodnoty hrúbok vysušených kožných membrán neboli až tak rozdielne, ako to bolo v prípade čerstvých kožných membrán (Tabuľka 8). Je dôležité poznamenať, že sa nejednalo o vysušené vzorky pôvodne čerstvých membrán, ktoré boli charakterizované v Tabuľke 7, boli to odlišné vzorky. Menšie rozdiely medzi priemerom hodnôt hrúbok jednotlivých kožných membrán mohli byť pravdepodobne spôsobené úplnou dehydratáciou tukových buniek podkožného tukového väziva. Predpokladáme, že hrúbka vrstiev epidermis a dermis bola vo všetkých prípadoch podobná, ale hrúbka orezávaného podkožného tukového väziva sa pre jednotlivé kožné vzorky líšila. Po dehydratácii podkožného tukového väziva, tým pádom, zostala už len vrstva epidermis s dermis, ktorá je podľa predpokladu približne rovnako hrubá pre všetky merané vysušené membrány. Hrúbka vysušených kožných membrán bola meraná len pre účely charakterizácie kožných membrán. Priemerná hodnota hrúbky vysušenej kožnej membrány bola stanovená na $(797,00 \pm 88,37) \mu\text{m}$.

6.3.2 UV-VIS spektrofotometria – optimalizácia metódy

Prvotným zámerom pre použitie tejto spektrálnej metódy bola kvantitatívna charakterizácia uvoľnených farmaceuticky a kozmeticky pôsobiacich aktívnych látok. Bola realizovaná séria difúzných experimentov, kde boli použité gélové matrice s rôznymi druhmi disperzného

prostredia. Naším cieľom bolo zistiť, či sa budú z týchto gélových matric uvoľňovať skrz oba typy membrán, popri Lignohumáte, aj príslušné aktívne látky. Ďalšou perspektívou bolo, že v prípade, že sa budú účinné látky uvoľňovať, budeme kvantifikovať ich množstvo pomocou UV-VIS spektrofotometrie, rovnako ako budeme charakterizovať množstvo uvoľneného Lignohumátu draselného. Na základe spektrofotometrických meraní sa preukázalo, že sa uvoľňujú aj aktívne látky, aj Lignohumát draselný, skrz syntetickú aj kožnú membránu. Po spracovaní absorpčných spektier bolo avšak zistené, že nie sme schopní určiť charakter uvoľňovania aktívnych látok, po viac ako 4 hodinách trvania experimentu, zo závislostí absorbancie na vlnovej dĺžke, nakoľko sa súčasne uvoľňoval z humínových gélových matric aj Lignohumát draselný, ktorý vo väčšine prípadoch prekryl signál príslušnej aktívnej látky v absorpčnom spektre (Obrázok 23). Na Obrázku 23 môžeme ďalej vidieť porovnanie absorpčných spektier 4 konkrétnych gélových vzoriek po 24 hodinách trvania difúzneho experimentu. Z jednoduchého absorpčného spektra sme boli schopní približne posúdiť ako ovplyvnila, napríklad, prítomnosť farmakologicky aktívnej látky uvoľňovanie Lignohumátu alebo aký vplyv mala na uvoľňovanie humínovej látky voľba membrány. Z takto pripravených absorpčných spektier boli následne odčítané hodnoty absorbancie Lignohumátu draselného pri vlnovej dĺžke 465 nm a tieto dáta boli ďalej spracované.



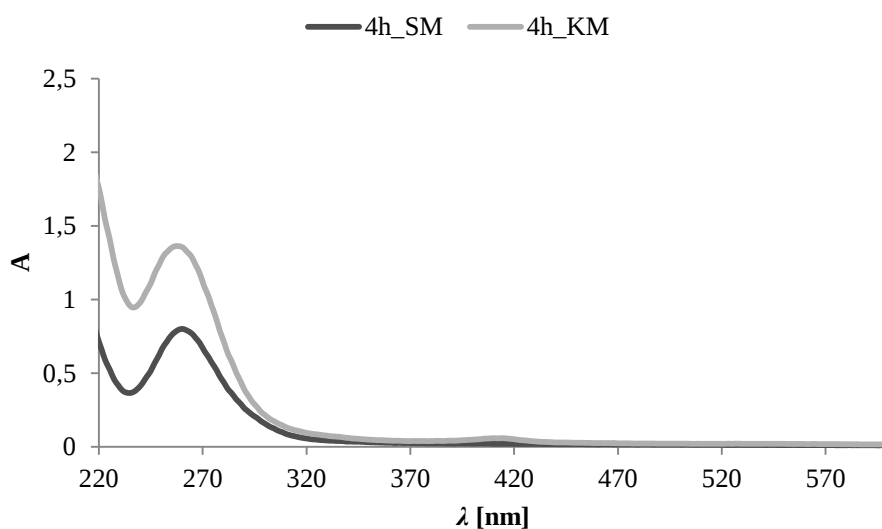
Obrázok 23 Ukážka: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke, po 24 hodinách trvania experimentu. Vzorka 2% Polygel CB+1% LH; bez ketoprofenu/ s ketoprofenom; syntetická membrána/ kožná membrána.

V prípade použitej kožnej membrány bola vo väčšine absorpčných spektier preukázaná, okrem monotónneho priebehu absorpčného spektra, aj prítomnosť ďalšieho signálu v okolí 414 nm. Podľa [68] by sa mohlo jednať o absorbanciu oxyhemoglobínu, ktorý sa pravdepodobne dostal do prijímacieho roztoku, po styku kožnej membrány s 0,15M roztokom chloridu sodného. Zároveň sme predpokladali, že prítomnosť oxyhemoglobínu neovplyvnila ani uvoľňovanie aktívnych látok, ani uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric.

Pomocou závislostí absorbancie na vlnovej dĺžke jednotlivých aktívnych látok bolo možné porovnať iba vplyv membrány na uvoľňovanie týchto účinných substancií z gélových

matric, ktorých disperzné prostredie bolo tvorené vodou. Vo všeobecnosti bolo preukázané, že aktívne látky prestupujú aj skrz membránu syntetickú, aj skrz membránu kožnú. Zaujímavosťou bolo, že aktívne látky prestupovali intenzívnejšie skrz kožnú membránu, po prvých štyroch hodinách pozorovania difúzneho experimentu (Obrázok 24). Ďalej bolo zistené, že dochádza, v porovnaní s kožnou membránou, po viac ako 4 hodinách trvania experimentu, k intenzívnejšiemu uvoľňovaniu účinných látok skrz membránu syntetickú. Efektívnejšie uvoľňovanie aktívnych látok skrz kožnú membránu, v začiatkoch difúzneho procesu, mohlo byť pravdepodobne dôsledkom takých interakcií aktívnych látok s vrstvami membrány, ktoré účinné látky nezadržiavali v štruktúre tejto biologickej membrány a umožnili jej prestup. Postupom času mohlo dochádzať pravdepodobne k akumulácii ďalších zložiek gélu vo vrstvách kožnej membrány, ktoré potlačili uvoľnenie aktívnych látok z gélových vzoriek do prijímacieho roztoku vo Franzovej difúznej cele.

Prostredníctvom výstupov zo spektrofotometrických meraní bolo preukázané, že je možné popísať uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric, ale zároveň sme dospeli k záveru, že táto metóda nebola vhodná pre charakterizáciu a kvantitatívnu evaluáciu uvoľnených aktívnych látok, z dôvodov, ktoré boli objasnené v predchádzajúcich riadkoch. Na základe získaných výsledkov nebolo možné vybrať a aplikovať difúzny model, ktorý by popisoval molekulárny transport skrz rôzne bariéry, a charakter difúzných podmienok vo vertikálnej Franzovej cele (model ustálenej vs. neustálenej difúzie).



Obrázok 24 Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke; porovnanie vplyvu membrány na uvoľňovanie **ketoprofenu** z gélovej matrice: **2% Polygel CB+voda**.

6.3.3 Metódy štúdia uvoľňovania Lignohumátu draselného

Lignohumát draselný tvoril disperzné prostredie hydrogélových vzoriek a jeho uvoľňovanie z jednotlivých gélových matric bolo skúmané pomocou UV-VIS spektrofotometrie. Humínové látky sú schopné absorbovať svetelné žiarenie v celom rozsahu vlnových dĺžok UV-VIS oblasti, z čoho vyplýva, že UV-VIS spektrofotometria je univerzálnou metódou pre charakterizáciu humínových látok, a teda zároveň aj Lignohumátu draselného v difúzných experimentoch. V tejto kapitole bol popísaný vplyv: zahusťujúcej látky; aktívnej látky;

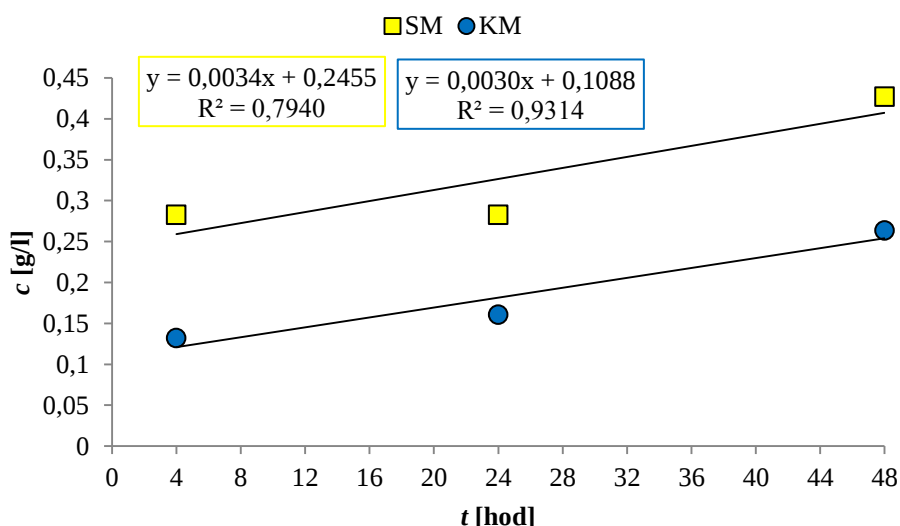
charakteru membrány a použitých zásobných roztokov Lignohumátu pri príprave gélových matric, na uvoľňovacie procesy Lignohumátu draselného z hydrogélových vzoriek.

Nasledujúce riadky popisujú využitie matematických postupov pre spracovanie dát zo spektrofotometrických meraní. Obdobným spôsobom boli spracované dáta pre všetky gélové vzorky s obsahom Lignohumátu. Boli odčítané hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 465 nm pre každú vzorku, odobranú v preddefinovanom čase, prijímacieho roztoku s uvoľneným Lignohumátom. Vlnová dĺžka 465 nm bola zvolená z toho dôvodu, že je jednou z bežne využívaných vlnových dĺžok pri charakterizácii humínových látok (napr. [71]). Pomocou rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky Lignohumátu draselného boli následne vypočítané koncentrácie uvoľnenej humínovej látky v čase, pre gélové matrice s obsahom Lignohumátu. Všetky difúzne experimenty boli realizované vždy dvakrát a množstvo Lignohumátu bolo stanovené s odchýlkou od skutočnej hodnoty v rozmedzí 0,84–7,23 %. Je teda možné konštatovať, že vlastný difúzny experiment bol reprodukovateľný a v systéme skúmaného v čase, dochádzalo k nárastu koncentrácie uvoľňovaného Lignohumátu draselného.

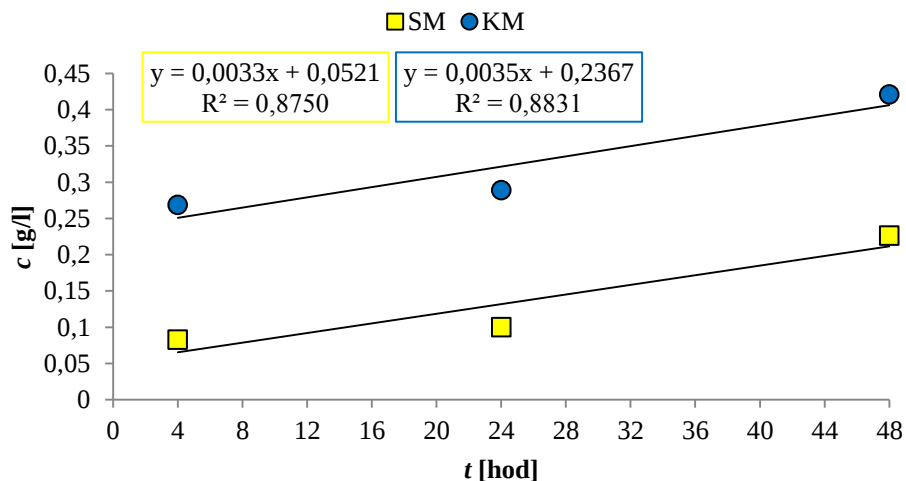
Vplyv membrány a zahusťujúcej látky na uvoľňovanie Lignohumátu

Pre tvorbu hydrogélových matric boli použité dve zahusťujúce látky: syntetický Polygel CB a prírodný Xanthan. Jedným z cieľov difúzných experimentov bolo porovnať, akým spôsobom ovplyvňuje typ zahusťujúcej látky a charakter membrány uvoľňovanie Lignohumátu z pripravených gélových matric. Pre posúdenie vplyvu zahusťujúcej látky boli pre tento difúzny experiment vybrané nasledujúce gélové vzorky:

- 2% Polygel CB+1% roztok Lignohumátu
- 4% Polygel CB+5% roztok Lignohumátu
- 5% Xanthan+1% roztok Lignohumátu
- 5% Xanthan+5% roztok Lignohumátu



Obrázok 25 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorka 2% Polygel CB+1% LH.

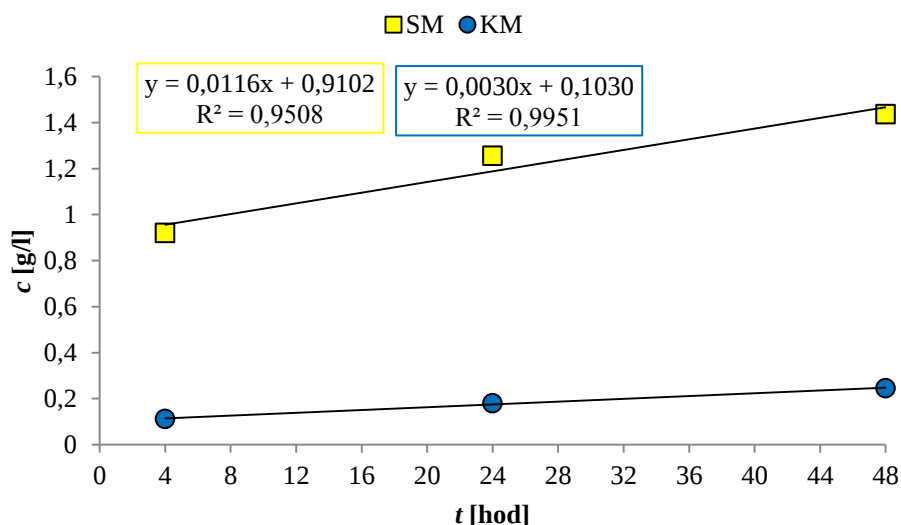


Obrázok 26 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorka 5% Xanthan+1% LH.

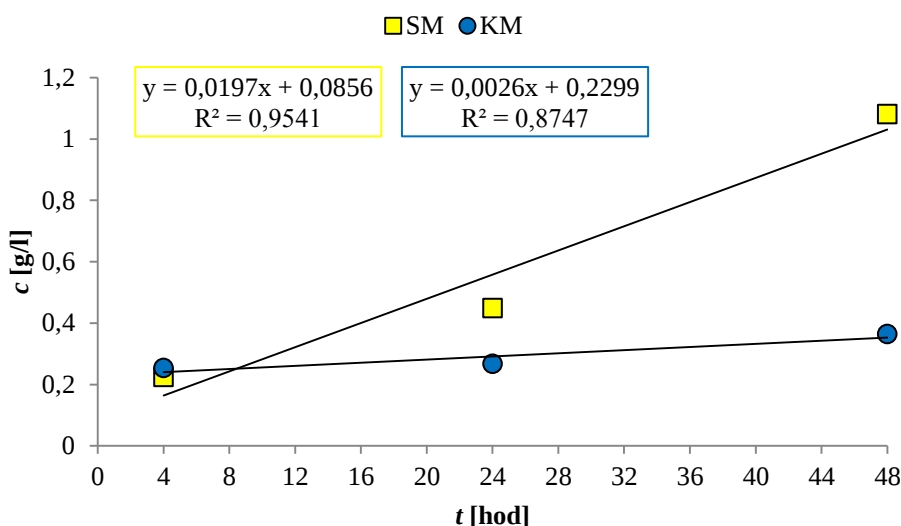
Transport molekúl v roztoku alebo molekulárny transport skrz membránu sa bežne definuje pomocou difúzných tokov. Koncentrácia uvoľnenej látky v prijímacom roztoku je jednou z veličín, ktoré úzko súvisia s charakterom difúzných procesov, hodnotami akumulovaných difúzných tokov a aj difúznymi koeficientmi, a preto bola kľúčom pre spracovanie uvoľňovacích charakteristík humínovej látky.

Zo závislostí koncentrácie na čase odberov môžeme vidieť, že koncentrácia Lignohumátu s časom rastie (Obrázok 25 a 26). Z týchto závislostí zdanlivo nesprávne vyplýva, že v čase $t = 0$, už bolo v prijímacom roztoku difúznej komory prítomné nejaké množstvo Lignohumátu. Aplikácia konkrétneho difúzneho modelu (ustálená vs. neustálená difúzia) by bola možná jedine za predpokladu, že by trendová spojnica pretínala osu y v záporných hodnotách. Pre všetky naše závislosti koncentrácie na čase avšak platilo, že ak by sme predĺžili trendovú spojnicu tak, aby pretínala osu y , preukázali by sme, že trendová spojnica pretína osu y v kladných hodnotách. Z týchto záverov teda vyplýva, že nebolo možné aplikovať konkrétny difúzny model na experimenty tohto charakteru. Z vyššie spomínaných dôvodov by bolo, do budúcnosti, vhodnejšie pozorovať uvoľňovanie Lignohumátu v kratších časových intervaloch, minimálne v začiatkoch. Na základe stanovených koncentrácií, ktoré boli určené z hodnoty smernice rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky Lignohumátu, u vzoriek pripravených zo zahusťujúcich látok Polygelu CB a Xanthanu a 1% (hm.) roztoku Lignohumátu, môžeme pozorovať rozdiely v uvoľňovaní Lignohumátu draselného s ohľadom na typ použitej membrány, ale aj na typ zahusťujúcej látky. Uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric Polygelu CB bolo intenzívnejšie v prípade použitej syntetickej membrány (Obrázok 25). Slabšie uvoľňovanie Lignohumátu skrz biologickú membránu mohlo byť spôsobené obmedzenou priepustnosťou kožnej membrány alebo aj dlhším zadržiavaním Lignohumátu vo vrstvách kožného tkaniva. Naopak, prestup Lignohumátu z gélových matric Xanthanu bol intenzívnejší v prípade použitej kožnej membrány (Obrázok 26). Tento rastlinný polysacharid mohol pravdepodobne interagovať s bunkami rohovej vrstvy epidermis, a tým umožnil lepší prestup Lignohumátu do prijímacieho roztoku. Hodnoty koncentrácií a smernice rovníc lineárnych regresíí nie sú významne odlišné, z čoho je možné usudzovať, že rozdiely v rýchlosti uvoľňovania Lignohumátu, v neskoršom štádiu difúzných

experimentov, sú minimálne. Dôležitým prínosom týchto experimentov bolo zistenie, že Lignohumát draselný prechádza z vytvorených gélov, cez kožné tkanivo, až do prijímacieho roztoku difúzne celý.



Obrázok 27 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorka **4% Polygel CB+5% LH**.



Obrázok 28 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorka **5% Xanthan+5% LH**.

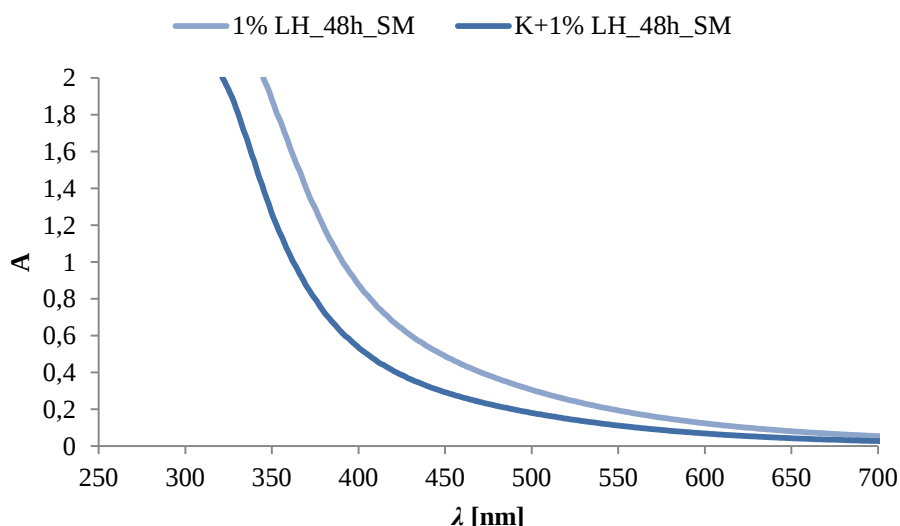
Už na prvý pohľad sa hodnoty koncentrácií a smerníc na Obrázku 27 a 28, u syntetických membrán, líšia od hodnôt smerníc lineárnych závislostí na Obrázku 25 a 26. Tieto rozdiely sú pravdepodobne spôsobené použitím rôzne koncentrovaných zásobných roztokov Lignohumátu pri tvorbe gélových matric. Podľa očakávaní bolo preukázané, že intenzívnejší prestup Lignohumátu do prijímacieho roztoku bol z gélových vzoriek pripravených z 5% roztoku Lignohumátu. Taktiež je zjavné, že prestup Lignohumátu bol efektívnejší cez syntetickú membránu, a to v prípade vzoriek z Polygelu CB a aj v prípade vzoriek z Xanthanu (Obrázok 27 a 28). Priepustnosť kožnej membrány bola v prípade vzorky 5% Xanthan+5% LH prekvapivo menšia ako v prípade vzorky 5% Xanthan+1% LH.

Bolo experimentálne preukázané, že Lignohumát je schopný prestúpiť kožné tkanivo. Z týchto zistení vyplýva, že Lignohumát sa uvoľňuje zo všetkých pripravených gélových matric a prechádza cez oba typy vybraných membrán do prijímacieho roztoku.

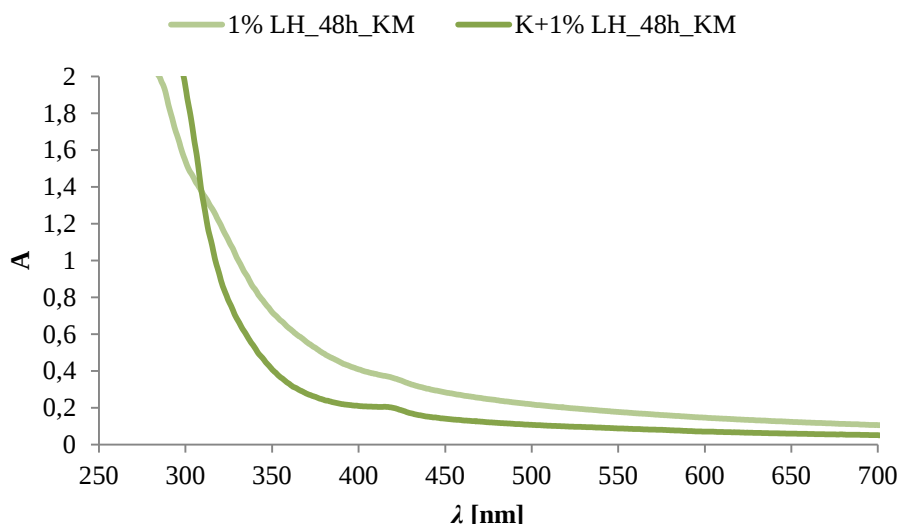
Vplyv aktívnej látky na uvoľňovanie Lignohumátu

Pri príprave humínových hydrogélů boli využité farmaceuticky pôsobiace aktívne látky. Látky s farmakologickým účinkom boli diklofenak sodný a ketoprofen, a kozmeticky použiteľná látka bola kyselina salicylová. Príprava gélových vzoriek s aktívnymi látkami bola popísaná v kapitole 5.6.2. Predpokladali sme, že prítomnosť aktívnych látok v humínových hydrogélůch môže ovplyvniť uvoľňovanie Lignohumátu draselného z týchto matric. Uvoľnený Lignohumát bol aj v tomto prípade charakterizovaný pomocou UV-VIS spektrofotometrie.

Podľa predpokladu, získané výsledky preukázali, že uvoľňovanie Lignohumátu je ovplyvnené prítomnosťou aktívnych látok v gélových matriciach. Všeobecne platí, že uvoľňovanie Lignohumátu draselného je intenzívnejšie z gélových vzoriek bez účinných látok. Účinné látky chemicky interagujú s Lignohumátom draselným a výsledkom týchto interakcií je pravdepodobne zadržiavanie Lignohumátu v gélových vzorkách. Domnievame sa, že diklofenak sodný interagoval s Lignohumátom draselným najmenej intenzívne a pozitívne ovplyvnil jeho uvoľňovanie zo všetkých skúmaných gélových matric, do prijímacieho roztoku. Ketoprofen pravdepodobne reagoval s Lignohumátom draselným, a v porovnaní s gélovými vzorkami bez aktívnych látok, nepodporil uvoľňovanie tejto humínovej látky. Prítomnosť kyseliny salicylovej, v gélových vzorkách s obsahom Lignohumátu, negatívne ovplyvnila jeho uvoľňovanie. Prestup Lignohumátu draselného bol, aj v tomto prípade, intenzívnejší z gélových matric bez tejto účinnej látky. Obrázky 29 a 30 reprezentovali závislosti konkrétnych gélových vzoriek, ktoré mali dotvoriť celkovú predstavu o uvoľňovaní Lignohumátu z gélových matric s a bez účinnej látky, skrz oba typy membrán.



Obrázok 29 Porovnanie 2% Polygel CB+1% LH po 48 hodinách trvania experimentu; s/bez ketoprofenu; syntetická membrána.



Obrázok 30 Porovnanie 2% Polygel CB+1% LH po 48 hodinách trvania experimentu; **s/bez ketoprofenu; kožná membrána.**

Gélové vzorky s aktívnymi látkami, ktoré boli pripravené zo 4% Polygelu CB a 5% zásobného roztoku Lignohumátu a 5% Xanthanu, preukázali rovnaký charakter uvoľňovania Lignohumátu draselného ako gélové vzorky pripravené z 1% zásobného roztoku Lignohumátu. Diklofenak opäť podporil uvoľňovanie, prítomnosť ketoprofenu a kyseliny salicylovej negatívne ovplyvnila uvoľňovanie tejto humínovej látky. Grafické závislosti, ktoré reprezentujú tieto gélové matrice sú súčasťou Prílohy 6.

Môžeme pozorovať aj rozdiely v prestupe Lignohumátu skrz odlišné typy membrán. Bolo preukázané, že prestup Lignohumátu bol vo všeobecnosti intenzívnejší v prípade použitej syntetickej membrány, čo dokazujú aj hodnoty koncentrácií Lignohumátu v prijímacom roztoku difúznej cely (Tabuľka 9). Prestup Lignohumátu draselného z gélových vzoriek s aktívnymi látkami, v závislosti na dobe trvania difúzneho experimentu skrz kožnú membránu, bol vo všeobecnosti menej intenzívny, pravdepodobne z dôvodu menšej priepustnosti kožného tkaniva a zadržiavania Lignohumátu vo vrstvách tohto biologického tkaniva.

Tabuľka 9 Koncentrácie Lignohumátu draselného v prijímacom roztoku po 48 hodinách trvania experimentu; D – diklofenak sodný; K – ketoprofen; S – kyselina salicylová.

	syntetická membrána	kožná membrána
VZORKY	c [g.l ⁻¹]	c [g.l ⁻¹]
2% Polygel CB+1% LH+EtOH+D	0,2555	0,2585
4% Polygel CB+5% LH+EtOH+D	0,9382	0,7877
2% Polygel CB+1% LH+EtOH+K	0,2545	0,1303
4% Polygel CB+5% LH+EtOH+K	0,7211	0,2727
2% Polygel CB+1% LH+EtOH+S	0,2585	0,2979
4% Polygel CB+5% LH+EtOH+S	0,8513	0,7756

Tabuľka 9 Pokračovanie. Koncentrácie Lignohumátu draselného v prijímacom roztoku po 48 hodinách trvania experimentu; D – diklofenak sodný; K – ketoprofen; S – kyselina salicylová.

	syntetická membrána	kožná membrána
VZORKY	c [g.l ⁻¹]	c [g.l ⁻¹]
5% Xanthan+1% LH+EtOH+D	0,3848	0,2313
5% Xanthan+5% LH+EtOH+D	1,0806	0,3636
5% Xanthan+1% LH+EtOH+K	0,2353	0,1596
5% Xanthan+5% LH+EtOH+K	0,7746	0,6857
5% Xanthan+1% LH+EtOH+S	0,2091	0,1161
5% Xanthan+5% LH+EtOH+S	0,6675	0,1444

Hodnoty koncentrácií v tabuľke 9 ozrejmili charakter uvoľňovania Lignohumátu draselného z gélových matric, s obsahom humínovej látky a farmaceuticky a kozmeticky účinných látok. Prestup Lignohumátu z gélových vzoriek 2% *Polygelu CB* s 1% roztokom Lignohumátu preukázal, že intenzita uvoľnenia humínovej látky z gélu s diklofenakom sodným bola približne rovnaké skrz oba typy membrán. Uvoľňovanie Lignohumátu z gélových vzoriek s ketoprofenom bolo intenzívnejšie skrz syntetickú membránu, ale bolo menej intenzívne ako u vzoriek s diklofenakom sodným. Uvoľňovanie Lignohumátu z gélov s kyselinou salicylovou bolo, až na jednu výnimku, intenzívnejšie skrz syntetickú membránu. Bolo preukázané, že diklofenak sodný podporil uvoľňovanie Lignohumátu, z gélových vzoriek z *Polygelu CB* a aj zo vzoriek z Xanthanu, najviac zo všetkých troch aktívnych látok. Je to pravdepodobne spôsobené reakciou zahusťujúcej látky, *Polygelu CB* a Xanthanu, s touto aktívnou látkou.

Uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric, ktoré boli pripravené zo 4% *Polygelu CB* a 5% roztoku Lignohumátu, bolo intenzívnejšie skrz syntetickú membránu. Ketoprofen a kyselina salicylová negatívne ovplyvnili uvoľňovanie Lignohumátu draselného v prípade použitej kožnej membrány. Na základe hodnôt koncentrácií je možné predpokladať, že sa skrz kožnú membránu uvoľnilo menšie množstvo Lignohumátu z týchto gélových matric. Predpokladáme, že dochádzalo k interakciám medzi zložkami gélových vzoriek a kožnou membránou. Naopak, Lignohumát prešiel skrz syntetickú membránu vo vysokej intenzite.

V prípade gélových vzoriek, ktoré boli pripravené z 5% Xanthanu a 1% roztoku Lignohumátu, dochádzalo k uvoľňovaniu Lignohumátu skrz oba typy membrán. Vo všeobecnosti platilo, že diklofenak podporuje uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric zo všetkých aktívnych látok najviac. Ketoprofen a kyselina salicylová podporovali uvoľňovanie Lignohumátu skrz syntetickú membránu približne rovnako.

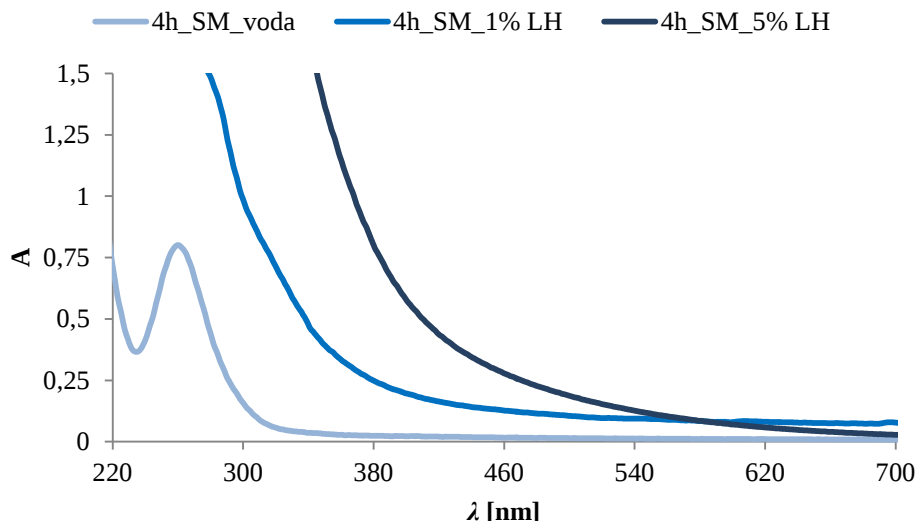
5% Xanthan a 5% roztok Lignohumátu vytváral základ pre poslednú sadu gélových vzoriek. Uvoľňovanie Lignohumátu bolo aj v tomto prípade intenzívnejšie skrz syntetickú membránu. Diklofenak podporil uvoľňovanie Lignohumátu z gélových matric skrz syntetickú membránu vo veľkej miere. Kyselina salicylová, v prípade prestupu Lignohumátu skrz kožnú membránu, príliš nepodporila uvoľňovanie tejto humínovej látky z gélových vzoriek. Diklofenak aj ketoprofen pravdepodobne ovplyvnili uvoľňovanie Lignohumátu skrz oba typy membrán, a to pozitívne.

Bolo dokázané, že prítomnosť aktívnej látky v gélových matriciach ovplyvňuje uvoľňovanie Lignohumátu draselného do prijímacieho roztoku Franzovej difúznej cely. Vo všetkých prípadoch bolo preukázané, že Lignohumát prestupuje z gélových vzoriek, s obsahom aktívnych látok, do analyzovaného prijímacieho roztoku. Ďalej bolo zistené, že vyššia koncentrácia Lignohumátu v príslušnej gélovej vzorke spôsobuje strmší koncentračný gradient pozdĺž membrány, ktorá oddeľuje darovaciu a prijímaciu komoru difúznej cely. Koncentračný gradient bol hnacou silou vlastných difúzných experimentov, z čoho vyplýva, že intenzita prenikania Lignohumátu skrz príslušnú membránu bola závislá na množstve prítomného Lignohumátu v gélových vzorkách. Z výsledkov taktiež vidíme, že Lignohumát prestúpil skrz oba typy použitých membrán. Zároveň boli preukázané nasledovné rozdiely: uvoľňovanie skrz syntetickú a kožnú membránu; uvoľňovanie z gélových vzoriek s odlišnými aktívnymi látkami. Lignohumát draselný sa uvoľnil z príslušnej liekovej formy a bol schopný penetrovať kožné tkanivo. Na základe výsledkov tohto experimentu je zrejmé, že Lignohumát, ako obohacujúca látka gélových vzoriek, môže potenciálne pôsobiť svojimi účinkami na ľudský organizmus.

Vplyv disperzného prostredia na uvoľňovanie Lignohumátu

Jedným z cieľov tejto kapitoly bolo popísať charakter uvoľňovania Lignohumátu draselného z gélových matric s obsahom aktívnych látok, ktoré boli vytvorené pomocou rôznych disperzných prostredí. Disperzné prostredia boli: 1% roztok Lignohumátu, 5% roztok Lignohumátu a voda. Gélové matrice s obsahom účinných látok, ktorých disperzné prostredie bolo tvorené vodou, slúžili ako potvrdenie toho, že nielen aktívne látky ovplyvnili uvoľňovanie Lignohumátu, ale aj Lignohumát ovplyvnil uvoľňovanie aktívnych látok do prijímacieho roztoku vo Franzovej difúznej cele. Súčasne bol potvrdený výrok, že Lignohumát draselný prekrýva, vo väčšine prípadoch, signál aktívnej látky v absorpčnom spektre už po viac ako 4 hodinách. Prípadné rozdiely v charaktere uvoľňovania aktívnych látok bolo možné pozorovať, z absorpčných spektier, len v prvých 4 hodinách trvania experimentu. Z týchto poznatkov vyplynulo, že pomocou UV-VIS spektrofotometrie nebolo možné kvantitatívne charakterizovať množstvo uvoľnených aktívnych látok z gélových matric, a preto bola pre tieto účely zvolená metóda HPLC-DAD.

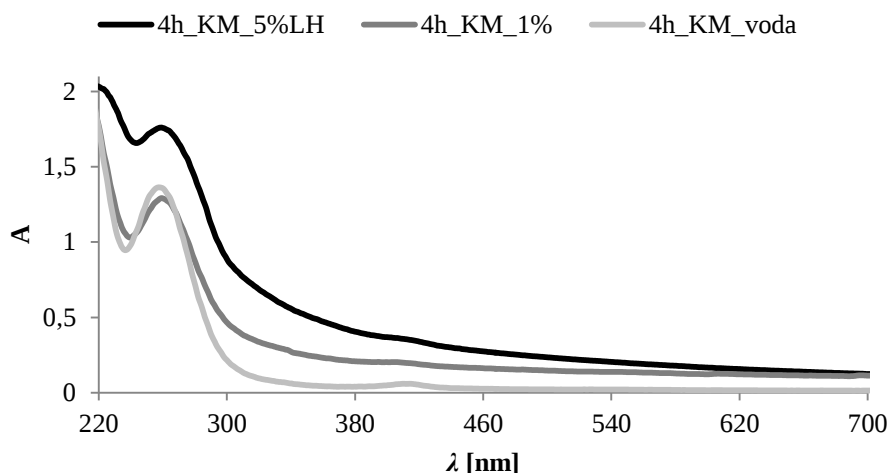
Na Obrázku 31 môžeme vidieť absorpčné spektrá vzoriek prijímacieho roztoku gélových matric s rôznymi disperznými prostrediami, v zahusťujúcej látke Polygel CB, s obsahom ketoprofenu. Bol preukázaný charakter prestupu ketoprofenu a Lignohumátu draselného skrz syntetickú membránu, po 4 hodinách trvania difúzneho experimentu.



Obrázok 31 Absorpčné spektrá. Porovnanie disperzných prostredí pre gélovú vzorku Polygel CB+K; po 4 hodinách; syntetická membrána.

Je zrejmé, že prítomnosť Lignohumátu v prijímacom roztoku výrazne ovplyvnila vzhľad absorpčných spektier, v porovnaní s vodným disperzným prostredím. Intenzita signálu Lignohumátu draselného bola natoľko dominantná, že zakryla prípadnú odozvu aktívnej látky v absorpčnom spektre. Zároveň bol preukázaný vplyv rôzne koncentrovaných zásobných roztokov Lignohumátu, z ktorých boli jednotlivé gélové vzorky vytvorené (Obrázok 31). Všeobecne platilo, že čím viac bol zásobný roztok Lignohumátu, z ktorého boli gély pripravované, koncentrovanejší, tým viac tejto humínovej látky prestúpilo do prijímacieho roztoku. Množstvo Lignohumátu draselného v prijímacom roztoku difúznej cely bolo teda závislé na množstve Lignohumátu, ktorý bol súčasťou gélových matric.

Na Obrázku 32 môžeme vidieť charakter uvoľňovania Lignohumátu a ketoprofenu z gélových matric, skrz kožnú membránu. Absorpčné spektrá ukazovali, v porovnaní s Obrázkom 31, aj signál aktívnej látky, po 4 hodinách trvania difúzneho experimentu, pravdepodobne z toho dôvodu, že bolo uvoľňovanie skrz kožnú membránu pomalšie a menej intenzívne ako skrz membránu syntetickú. Po uplynutí tejto doby už nebol charakter uvoľňovania účinnej látky zjavný a opäť platilo, že UV-VIS spektrofotometria bola použitá len pre kvantitatívny popis humínovej látky. Zároveň bolo možné pozorovať, v prípade použitej kožnej membrány, signál v okolí 414 nm, ktorý pravdepodobne odpovedal už spomínanému oxyhemoglobínu, ktorý sa z tohto biologického tkaniva uvoľnil. Ďalej bolo preukázané, že Lignohumát sa uvoľňuje najintenzívnejšie z gélových matric, ktoré boli pripravené z 5% zásobného roztoku tejto humínovej látky.



Obrázok 32 Absorpčné spektrá. Porovnanie disperzných prostredí pre gélovú vzorku Polygel CB+K; po 4 hodinách; kožná membrána.

Ďalšie absorpčné spektrá, vzoriek Polygelu CB a diklofenaku sodného a Polygelu CB a kyseliny salicylovej, mali veľmi podobné rysy ako spektrá vzoriek Polygelu CB a ketoprofenu. Absorpčné spektrá sú súčasťou Prílohy 7. Vo všeobecnosti platilo, že Lignohumát sa intenzívnejšie uvoľňuje z gélových matríc, ktoré boli pripravené pomocou 5% roztoku Lignohumátu. Ďalej bola opäť preukázaná interferencia signálu Lignohumátu draselného a aktívnych látok, už po viac ako 4 hodinách trvania difúzneho experimentu. Vyhodnotením spektier bolo preukázané aj uvoľňovanie látok z kožnej membrány. Bolo teda opäť potvrdené, že táto spektrálna metóda nebola vhodná pre stanovovanie koncentrácie uvoľnených aktívnych látok. Konkrétne, spektrá Polygelu CB a diklofenaku sodného, ktoré odpovedali uvoľňovaniu aktívnej látky a Lignohumátu skrz kožnú membránu, ukázali výrazný vplyv interferencie signálu látok uvoľnených z kožnej membrány a interferencie aktívnych látok a humínovej látky. V prípade gélových vzoriek s kyselinou salicylovou, bez ohľadu na typ použitej membrány, bolo možné taktiež pozorovať prekrytie signálu aktívnej látky signálom Lignohumátu draselného v absorpčných spektrách. Zaujímavosťou bol intenzívnejší prestup Lignohumátu draselného skrz kožnú membránu, v porovnaní s prestupom cez membránu syntetickú, z gélových matríc s obsahom kyseliny salicylovej, v prvých štyroch hodinách trvania experimentu.

Uvoľňovanie Lignohumátu draselného a aktívnych látok z gélových matríc, ktoré boli pripravené zo zahusťujúcej látky Xanthan, bolo taktiež ovplyvnené typom disperzného prostredia (Príloha 8). Bolo preukázané, že prítomnosť Lignohumátu v gélových matriciach ovplyvňuje nielen uvoľňovanie samotnej humínovej látky, ale aj účinných substancií. Až na jednu výnimku bolo potvrdené, že množstvo uvoľneného Lignohumátu z gélovej matrice súvisí s množstvom Lignohumátu v zásobných roztokoch. Platilo, že Lignohumát sa uvoľňoval najviac z gélových matríc, ktorých disperzné prostredie tvoril 5% roztok Lignohumátu. Interferencie signálov aktívnych látok s humínovou látkou, po viac ako 4 hodinách trvania difúzneho experimentu, boli natoľko významné, že nebolo vhodné použiť UV-VIS spektrofotometriu pre kvantitatívnu charakterizáciu uvoľnených aktívnych látok z gélových matríc. Zároveň bola, v experimentoch s kožnou membránou, preukázaná

prítomnosť signálu oxyhemoglobínu v okolí 414 nm, pre všetky disperzné prostredia. Z týchto zistení jednoznačne vyplýva, že typ disperzného prostredia výrazne ovplyvnil uvoľňovanie aktívnych látok a Lignohumátu draselného z gélových matric a metóda UV-VIS bola vhodná len pre kvantitatívnu charakterizáciu uvoľnenej humínovej látky z gélových matric s obsahom Lignohumátu.

6.3.4 Metódy štúdia uvoľňovania aktívnych látok

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s detekciou na diódovom poli bola využitá pre charakterizáciu uvoľnených aktívnych látok z gélových matric. Hlavným zámerom pre výber tejto chromatografickej metódy bolo kvantitatívne vyhodnotenie uvoľnených, farmaceuticky a kozmeticky pôsobiacich, aktívnych látok. Táto analytická metóda sa bežne využíva v praxi pre stanovovanie množstva farmaceuticky aktívnych substancií v rôznych liekových formách, čo preukázali aj experimenty popísané v kapitole 4.3.3.

Pre účely tejto práce bola použitá kolóna so silne nepolárnou stacionárnou fázou a s veľkosťou silikagélových častíc 2,7 μm . Predpokladali sme, že doba zadržiavania jednotlivých aktívnych látok v póroch stacionárnej fáze bude odlišná, vzhľadom na ich chemický charakter. Z chemickej štruktúry diklofenaku sodného bolo zrejmé, že sa jedná o látku nepolárnu. V prípade nepolárneho sorbentu, ktorým kolóna C18 je, by sa mali, podľa predpokladov, zadržiavať najdlhšie nepolárne analyty. Naopak, kyselina salicylová je silne polárna organická kyselina, ktorá by sa mala, na nepolárnom sorbente, zadržiavať najmenej, z trojice aktívnych látok diklofenak sodný – ketoprofen – kyselina salicylová. Pre stanovenie retenčných časov aktívnych látok boli pripravené roztoky štandardov týchto účinných substancií, ktorých príprava bola popísaná v kapitole 5.10.3.

Pomocou HPLC metódy boli analyzované vzorky uvoľnených aktívnych látok z gélových matric, ktoré boli odoberané z prijímacej komory Franzovej difúznej cely v preddefinovaných časoch. Výber gélových matric s obsahom aktívnych látok, ktoré boli súčasťou difúzných experimentov, pre účely chromatografickej analýzy, sú uvedené v tabuľke 10. Uvoľňovanie aktívnych látok bolo, aj v tomto prípade, experimentálne realizované skrz dva typy membrán, syntetickú a kožnú membránu, a difúzne experimenty trvali 48 hodín. Pre účely kvantitatívnej charakterizácie konkrétnych aktívnych látok bolo potrebné chromatografickú metódu validovať a optimalizovať.

Tabuľka 10 *Chromatografická analýza; gélové matrice s aktívnymi látkami*

zahusťujúca látka: Polygel CB	zahusťujúca látka: Xanthan
2% Polygel CB+voda+D	5% Xanthan+voda+D
2% Polygel CB+1% LH+D	5% Xanthan+1% LH+D
2% Polygel CB+voda+K	5% Xanthan+voda+K
2% Polygel CB+1% LH+K	5% Xanthan+1% LH+K
2% Polygel CB+voda+S	5% Xanthan+voda+S
2% Polygel CB+1% LH+S	5% Xanthan+1% LH+S

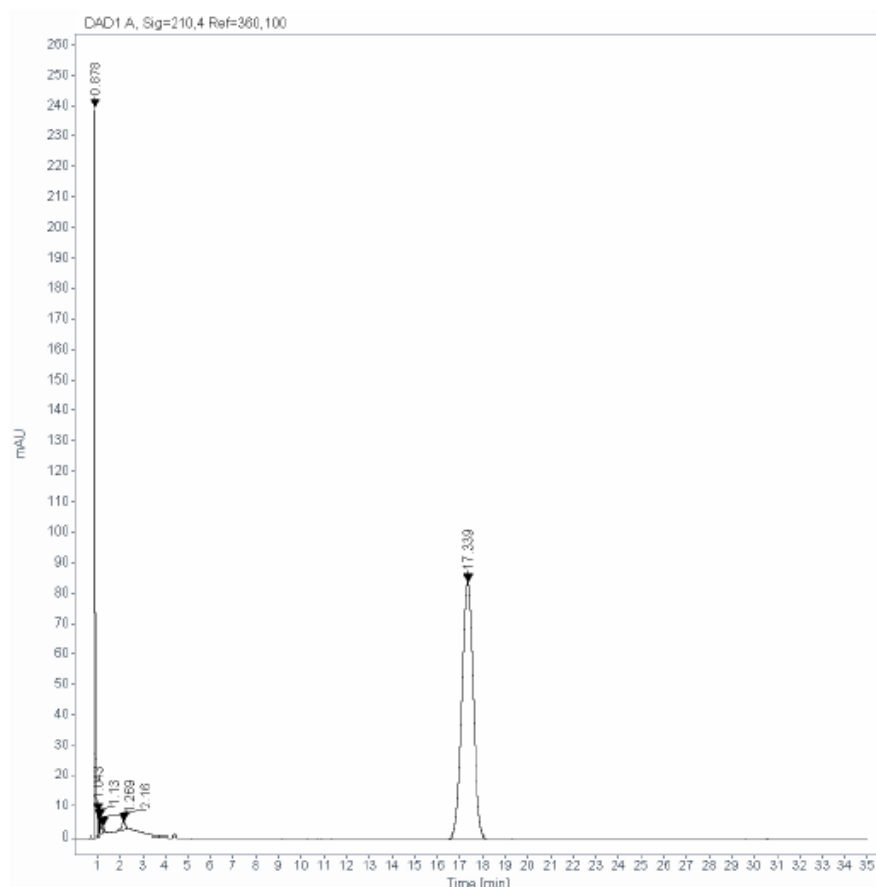
HPLC metóda – validácia

Pre identifikáciu a kvantifikáciu jednotlivých účinných látok, vo vzorkách odobraného prijímacieho roztoku, bolo potrebné, v prvom rade, analyzovať čisté štandardy, pomocou

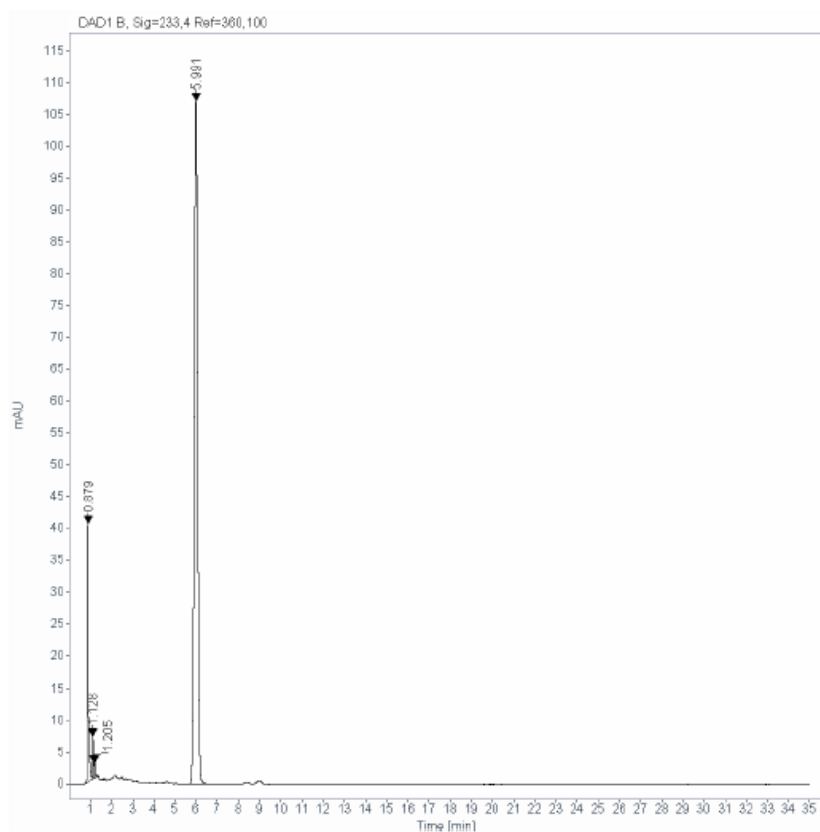
ktorých boli overené retenčné časy týchto substancií. Následne boli zmerané kalibračné roztoky každej účinnej látky, v rozsahu koncentrácií 0,5; 1; 5; 10; 50 mg·l⁻¹. Dáta, z chromatografických meraní, boli vyhodnotené prostredníctvom softwaru Agilent Chemstation. Vyhodnotenie lineárnosti kalibrácie bolo realizované prostredníctvom analýzy lineárnej regresie v programe MS Excel. Presnosť metódy bola overená meraním štandardných roztokov a vybraných odobraných vzoriek, ktoré boli obohatené o koncentráciu 2 mg·l⁻¹ príslušnej aktívnej látky. Výťažnosť HPLC metódy bola overená pomocou analýzy vzoriek aktívnych látok v prijímacom roztoku, ktorý bol odobraný z difúznej cely. Tieto vzorky boli obohatené čistými štandardmi o koncentráciu 10 mg·l⁻¹.

Tabuľka 11 *Retenčné časy aktívnych substancií*

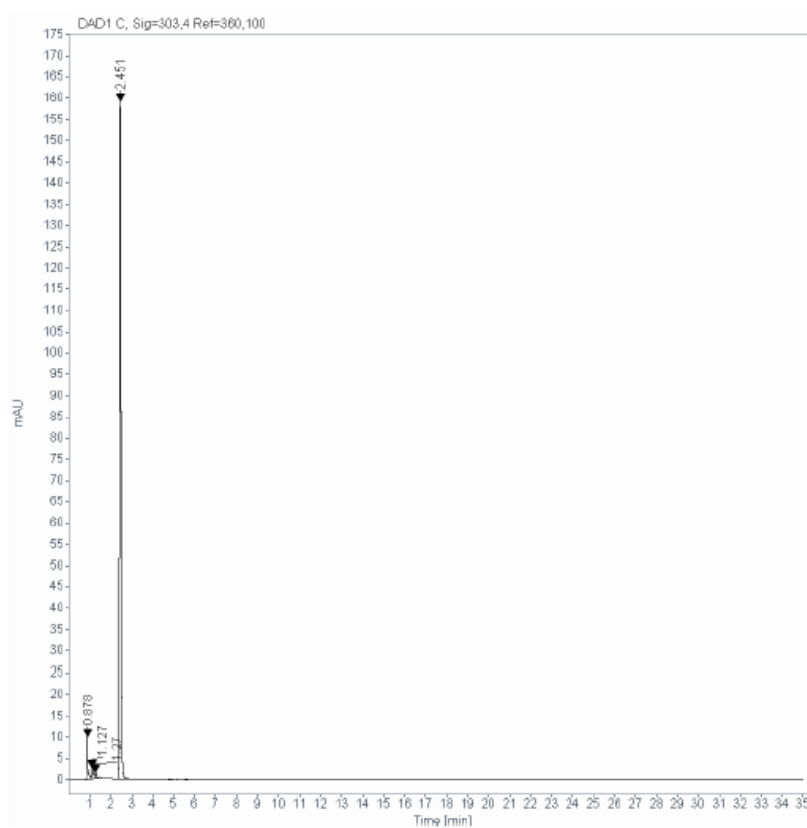
Aktívna látka	Vlnová dĺžka DAD [nm]	Retenčný čas [min]
Diklofenak sodný	210	17,34
Ketoprofen	233	5,99
Kyselina salicylová	303	2,45



Obrázok 33 *Chromatogram čistého štandardu – diklofenak sodný; vlnová dĺžka 210 nm*



Obrázok 34 Chromatogram čistého štandardu – ketoprofen; vlnová dĺžka 233 nm



Obrázok 35 Chromatogram čistého štandardu – kyselina salicylová; vlnová dĺžka 303 nm

Tabuľka 12 *Výťažnosť HPLC metódy a ďalšie parametre validácie*

Aktívna látka	Rovnica lineárnej regresie, v tvare $y = kx$	Korelačný koeficient r^2	Výťažnosť [%]
Diklofenak sodný	$y = 312,166x$	1,000	93,5
Ketoprofen	$y = 108,221x$	0,935	90,9
Kyselina salicylová	$y = 84,215x$	1,000	102,9

6.3.5 Charakterizácia aktívnych látok s využitím HPLC metódy

Jedným z cieľov tejto kapitoly bolo popísať množstvo uvoľnených aktívnych látok z rôznych gélových matric v závislosti na čase a objasniť, či Lignohumát draselný podporuje alebo potlačuje transdermálny transport účinných substancií. Ďalej bol popísaný vplyv: kožnej a syntetickej membrány na transport účinných substancií do prijímacieho roztoku a dvoch typov zahusťujúcich látok na uvoľňovanie aktívnych látok.

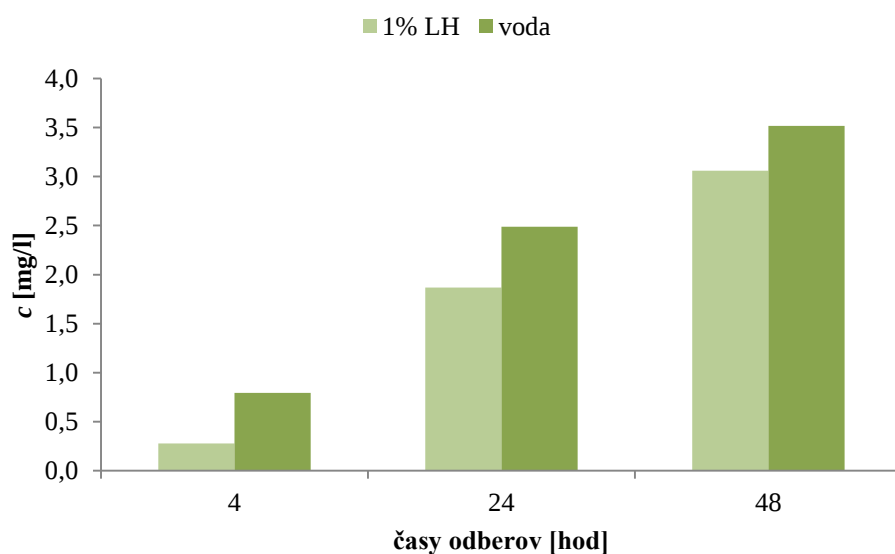
Polygel CB a diklofenak sodný

Bolo preukázané, že diklofenak sodný sa uvoľňuje z gélových matric, ktoré boli vytvorené pomocou zahusťujúcej látky Polygel CB. Jedinou výnimkou, ktorá nepreukázala uvoľňovanie tejto aktívnej látky, bol difúzny experiment realizovaný s gélovou vzorkou, kde bolo disperzné prostredie tvorené vodou a transport bol realizovaný skrz kožnú membránu (Obrázok 37).

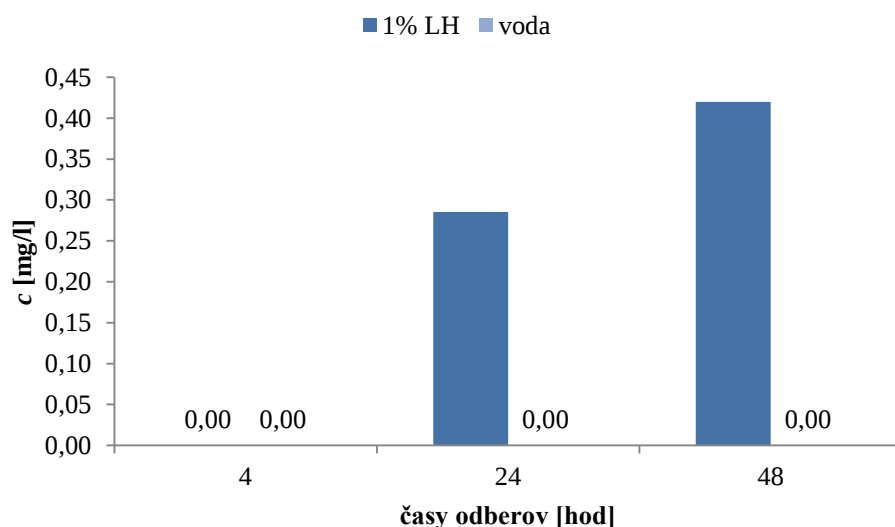
Uvoľňovanie diklofenaku sodného z gélových matric, kde bola disperzným prostredím voda, prebiehalo skrz syntetickú membránu intenzívnejšie ako z gélových matric, ktoré boli vytvorené z 1% zásobného roztoku Lignohumátu (Obrázok 36). Zároveň môžeme pozorovať, že množstvo uvoľneného diklofenaku sodného rastie lineárne s časom, pre oba typy disperzných prostredí. Domnievame sa, že Lignohumát draselný potlačil uvoľňovanie tejto aktívnej látky. Predpokladali sme, že ak je v každej pripravenej gélovej vzorke 500 mg aktívnej látky na 50 g gélu, tak potom v 2 g gélu, ktoré boli aplikované do darovacej komory Franzovej difúznej cely, bude 20 mg tejto účinnej substancie. V ideálnom prípade by teda malo prestúpiť 20 mg aktívnej látky z gélovej matrice do prijímacieho roztoku, čo by predstavovalo 100 % uvoľnenej aktívnej látky. Z týchto predpokladov vyplýva, že sa z gélových matric, pripravených z vody, uvoľnilo, za 48 hodín trvania experimentu, 0,9 % diklofenaku sodného z pôvodného množstva, ktoré bolo aplikované do darovacej komory. Z gélových matric, ktoré boli pripravené z 1% roztoku Lignohumátu, sa uvoľnilo 0,8 % tejto aktívnej látky, z pôvodne aplikovaného množstva. Predpokladáme, že diklofenak sodný pravdepodobne interagoval so zložkami gélových matric, a z tohto dôvodu nebolo množstvo diklofenaku sodného, ktorý prestupoval skrz syntetickú membránu z gélových matric, významné.

Na Obrázku 37 pozorujeme charakter uvoľňovania diklofenaku sodného skrz biologickú membránu. Z porovnania závislostí koncentrácie na čase odberov vzoriek je zrejmé, že diklofenak sodný prestupoval skrz kožnú membránu menej intenzívne ako skrz membránu syntetickú. Množstvo uvoľnenej aktívnej látky netvorilo ani 1 % z celkového aplikovaného množstva na difúznu celu, čo mohlo byť pravdepodobne spôsobené interakciou diklofenaku sodného s kožným tkanivom, alebo jeho prípadným zadržiavaním vo vrstvách epidermis

a dermis. Zaujímavým poznatkom bolo, že Lignohumát draselný, v tomto prípade, podporil uvoľnenie diklofenaku sodného a jeho prestup skrz kožnú membránu.



Obrázok 36 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+D; uvoľňovanie **diklofenaku sodného** skrz **syntetickú membránu**.

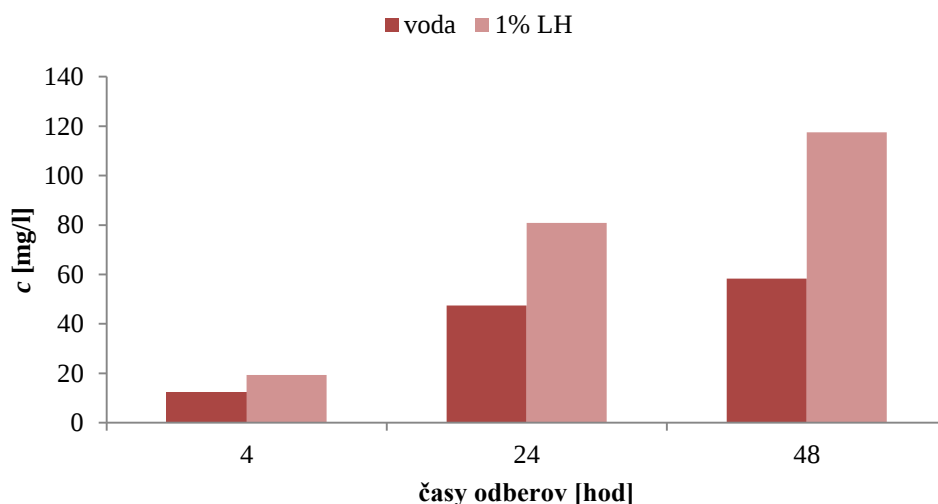


Obrázok 37 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+D; uvoľňovanie **diklofenaku sodného** skrz **kožnú membránu**.

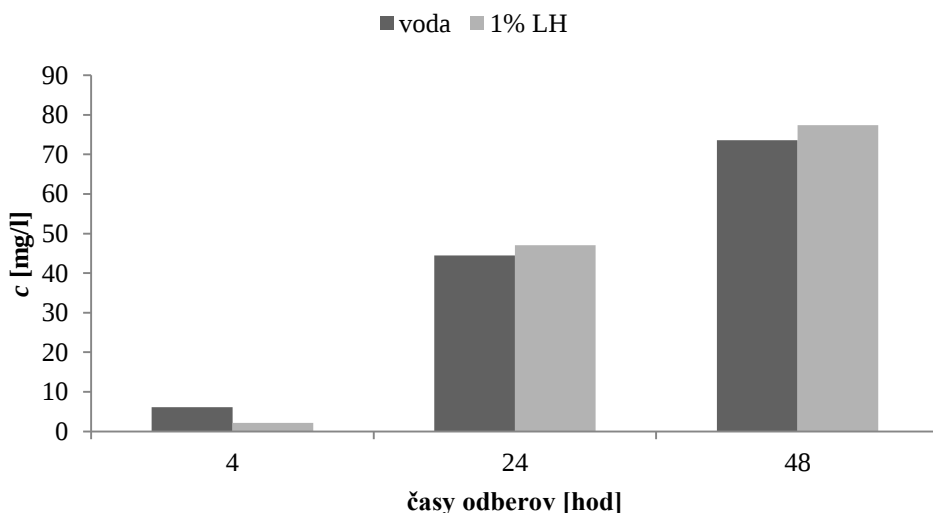
Polygel CB a ketoprofen

Ďalšia farmaceuticky pôsobiaca látka, ketoprofen, sa uvoľňovala z gélových matric, ktoré boli pripravené z Polygelu CB. Uvoľňovanie tejto aktívnej látky skrz syntetickú membránu bolo, v porovnaní s kožnou membránou, intenzívnejšie. Lignohumát draselný pravdepodobne reagoval s týmto derivátom slabšej organickej kyseliny, a aj v tomto prípade bolo preukázané, že Lignohumát draselný podporuje uvoľňovanie ketoprofenu z gélových matric. Ďalej bolo zistené, že množstvo uvoľnenej aktívnej látky rastie lineárne s časom, v prípade oboch typov disperzných prostredí.

Na Obrázku 38 môžeme vidieť charakter uvoľňovania ketoprofenu z gélových matricí skrz syntetickú membránu. Uvoľňovanie ketoprofenu má stúpajúci trend, z čoho vyplýva, že sa táto aktívna látka uvoľňovala postupne, po dobu 48 hodín. Zároveň je zjavné, že Lignohumát draselný podporil prestup ketoprofenu z gélových matricí skrz syntetickú membránu. Bolo preukázané, že z gélových matricí pripravených z vody, sa uvoľnilo skrz syntetickú membránu približne 15 % ketoprofenu z pôvodného množstva, ktoré bolo nasadené na Franzovu celu. Množstvo prestúpeného ketoprofenu z gélových matricí z 1% roztoku Lignohumátu, skrz syntetickú membránu, dosahovalo približne 30 % z pôvodne aplikovaného množstva tejto aktívnej látky.



Obrázok 38 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+K; uvoľňovanie **ketoprofenu** skrz **syntetickú membránu**.



Obrázok 39 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+K; uvoľňovanie **ketoprofenu** skrz **kožnú membránu**.

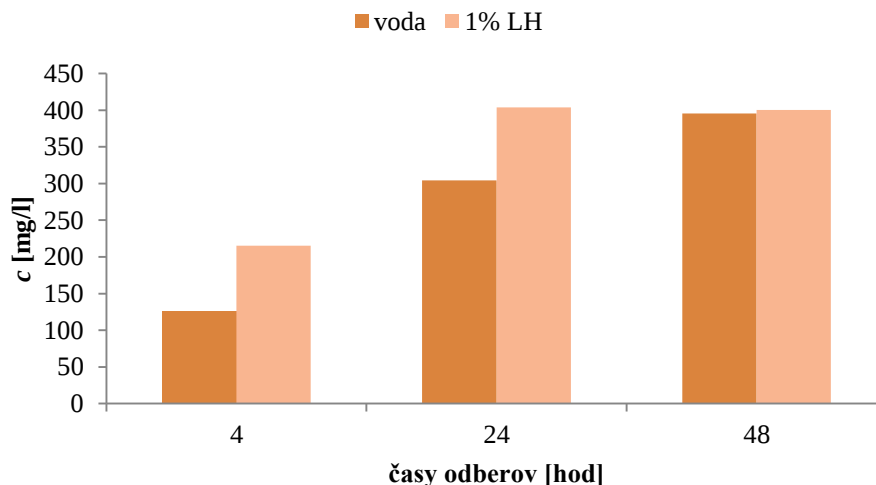
Uvoľňovanie ketoprofenu skrz kožnú membránu bolo menej intenzívne, čo je možné vidieť aj na závislosti koncentrácie na čase realizovaných odberov (Obrázok 39). Po 4 hodinách experimentu sme mohli pozorovať, že uvoľňovanie tejto aktívnej látky bolo

intenzívnejšie z gélových matric, ktorých disperzné prostredie tvorila voda. S postupom času, ketoprofen prestupoval vo väčšej miere z gélových vzoriek, ktoré boli pripravené pomocou 1% roztoku Lignohumátu. Rozdiely v intenzitách prestupov z jednotlivých gélových matric nie sú významné. Z vodných gélov sa uvoľnilo asi 18 % ketoprofenu a z humínových gélov prestúpilo skrz kožnú membránu skoro 20 % ketoprofenu, z pôvodne aplikovaného množstva.

Polygel CB a kyselina salicylová

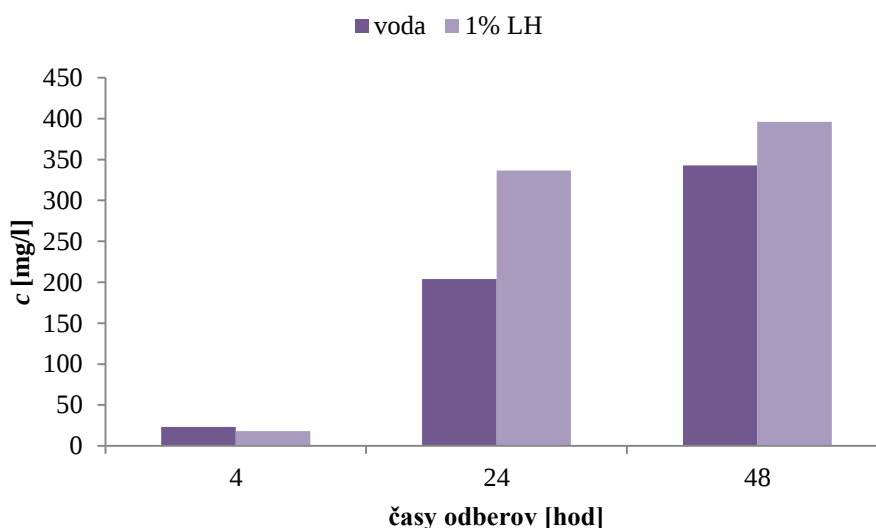
Bolo preukázané, že kyselina salicylová, ktorú definujeme v našich experimentoch ako látku s farmaceutickými ale aj kozmetickými účinkami, sa uvoľňovala najintenzívnejšie zo všetkých troch aktívnych látok. Podľa predpokladov, táto aktívna látka pravdepodobne rozpustila *Stratum corneum* epidermis a rozrušila pevnú medzibunkovú „stenu“ pokožky prasacej ušnice. Z tohto dôvodu je zrejmé, že kyselina salicylová prestúpila skrz kožnú membránu bez väčších komplikácií. Zároveň predpokladáme, že táto aktívna látka nebola pravdepodobne tak pevne viazaná v matriciach gélov, a preto bola schopná prestúpiť skrz oba typy membrán vo vysokej miere. Chromatografické merania taktiež ukázali vysoké intenzity signálov pri charakterizácii tejto aktívnej látky. Z tohto dôvodu bolo potrebné nariediť všetky vzorky, s obsahom kyseliny salicylovej, 0,15M roztokom chloridu sodného, v pomere 1:10. Toto riedenie bolo následne zohľadnené pri výpočtoch koncentrácií danej látky.

Takmer 99 % kyseliny salicylovej sa uvoľnilo z gélov pripravených z vody, skrz syntetickú membránu, a z gélov pripravených z 1% roztoku Lignohumátu sa uvoľnilo až 101 % tejto aktívnej látky, z pôvodne nasadeného množstva (Obrázok 40). Je dôležité poznamenať, že viac ako 100% výťažnosť bola pravdepodobne dôsledkom nehomogénne rozptýlenej aktívnej látky v konkrétnej vzorke, ktorá bola aplikovaná na Franzovu celu. Z Obrázku 40 ďalej vyplýva, že Lignohumát draselný podporil uvoľňovanie kyseliny salicylovej z gélových matric. Po 48 hodinách trvania difúzneho experimentu, ktorého súčasťou bola humínová gélová vzorka, bol pravdepodobne dosiahnutý stav úplného nasýtenia prijímacieho roztoku kyselinou salicylovou. Naopak, u vodných gélových vzoriek s obsahom kyseliny salicylovej môžeme pozorovať lineárny nárast koncentrácie v čase. Experimentálne dáta ďalej ukázali takmer zhodné hodnoty koncentrácií kyseliny salicylovej po 48 hodinách, v oboch prípadoch disperzných prostredí. Bolo preukázané, že kyselina salicylová prestupuje z gélových vzoriek skrz syntetickú membránu v plnej miere, v závislosti na pôvodne nasadenom množstve.



Obrázok 40 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+S; uvoľňovanie **kyseliny salicylovej** skrz syntetickú membránu.

Kyselina salicylová prestúpila skrz kožnú membránu do prijímacieho roztoku vo Franzovej difúznej cele vo vysokej intenzite (Obrázok 41). Ak porovnáme prestup napríklad diklofenaku sodného a kyseliny salicylovej cez kožnú membránu, môžeme pozorovať markantné rozdiely v intenzite uvoľňovania týchto aktívnych látok (Obrázok 37 a 41). Z gélových matric, ktoré boli pripravené z vody, bolo uvoľnených približne 86 % kyseliny salicylovej. Z humínových gélových vzoriek bolo uvoľnených 99 % kyseliny salicylovej, z pôvodne nasadeného množstva. Z charakteru uvoľňovania môžeme pozorovať, že Lignohumát draselný podporil uvoľnenie kyseliny salicylovej z gélových matric (Obrázok 41). Z výsledkov je možné konštatovať, že kyselina salicylová veľmi dobre prestupuje aj skrz syntetickú membránu, aj skrz membránu biologickú.

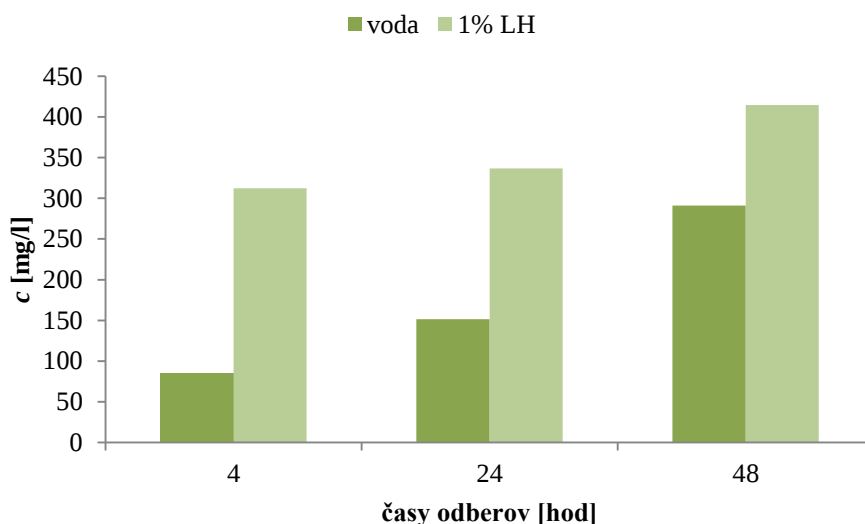


Obrázok 41 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 2% Polygel CB+voda/1% LH+S; uvoľňovanie **kyseliny salicylovej** skrz kožnú membránu.

Xanthan a diklofenak sodný

Bolo preukázané, že diklofenak sodný sa uvoľnil aj z gélových matric pripravených zo zahusťujúcej látky na prírodnej báze, Xanthanu. Je zjavné, že uvoľňovanie tejto aktívnej látky bolo výrazne intenzívnejšie z gélových matric pripravených zo Xanthanového základu ako z Polygelu CB. Predpokladáme, že diklofenak sodný neinteragoval so zložkami gélovej matrice, a preto bolo jeho uvoľňovanie efektívnejšie.

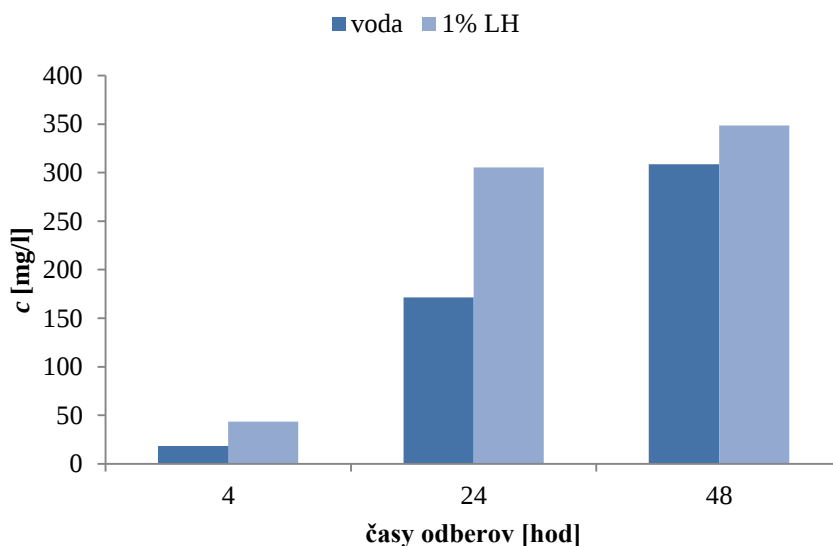
Množstvo uvoľneného diklofenaku sodného, skrz syntetickú membránu, stúpalo v závislosti na čase (Obrázok 42). Ďalej je zjavné, že Lignohumát draselný opäť účinkoval ako urýchľovač transportu tejto aktívnej látky a podporil jej uvoľňovanie do prijímacieho roztoku v difúznej cele. Množstvo uvoľneného diklofenaku sodného z humínových gélových matric, po 48 hodinách trvania experimentu, tvorilo takmer 104 % z pôvodne nasadeného množstva. Z viac ako 100% zastúpenia diklofenaku sodného v prijímacom roztoku môžeme usudzovať, že aktívna látka nebola v príslušnej nasadenej gélovej vzorke homogénne rozptýlená, čo môže byť pravdepodobne dôsledkom ručného zapracovávania rozpustenej účinnej látky do gélového základu. Gélové matrice, ktoré boli pripravené z vody, uvoľnili skoro 73 % diklofenaku, z pôvodne aplikovaného množstva. Z percentuálneho vyjadrenia množstva prestúpenej aktívnej látky skrz syntetickú membránu, môžeme tvrdiť, že Lignohumát draselný jednoznačne podporil uvoľnenie diklofenaku sodného z gélových vzoriek (Obrázok 42).



Obrázok 42 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+D; uvoľňovanie **diklofenaku sodného** skrz **syntetickú membránu**.

Na Obrázku 43 môžeme vidieť charakter uvoľňovania diklofenaku skrz kožnú membránu. Zo závislosti koncentrácie na čase je zjavné, že množstvo uvoľnenej aktívnej látky rástlo, v závislosti na čase, pre oba typy disperzných prostredí. V porovnaní s uvoľňovaním diklofenaku sodného z gélových matric z Polygelu CB (Obrázok 37 a 43), skrz kožnú membránu, predpokladáme, že gélový základ výrazne ovplyvnil uvoľňovanie tejto aktívnej látky. Diklofenak nebol pravdepodobne tak pevne viazaný na jednotlivé komponenty gélovej matrice, a preto bolo jeho uvoľňovanie intenzívnejšie. Prestup tejto účinnej látky bol,

v malej miere, ovplyvnený aj použitím kožnej membrány. Množstvo prestúpeného diklofenaku sodného skrz kožnú membránu bolo dostatočne intenzívne na to, aby sme mohli tento vplyv kožnej membrány zanedbať. Z vodnej gélovej vzorky bolo uvoľnených približne 77 % diklofenaku a z humínovej gélovej vzorky bolo uvoľnených približne 87 % tejto účinnej látky, po 48 hodinách trvania experimentu, skrz kožnú membránu. Bolo preukázané, že aj v tomto prípade Lignohumát draselný podporil uvoľnenie aktívnej látky.



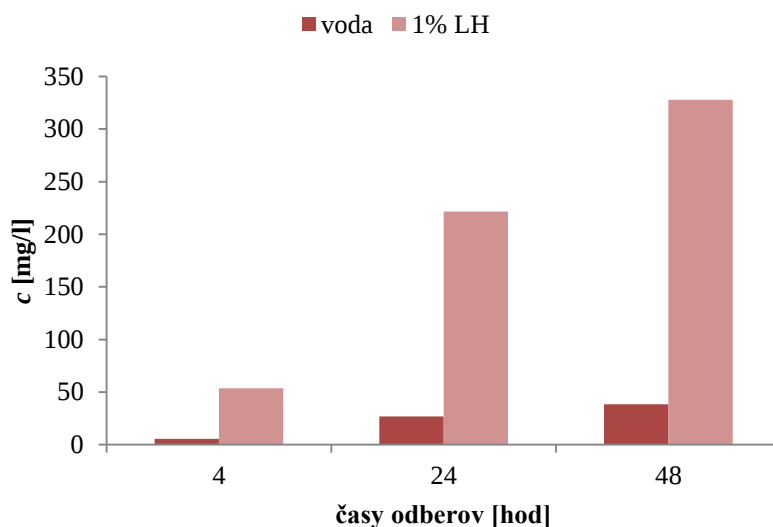
Obrázok 43 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+D; uvoľňovanie **diklofenaku sodného** skrz **kožnú membránu**.

Xanthan a ketoprofen

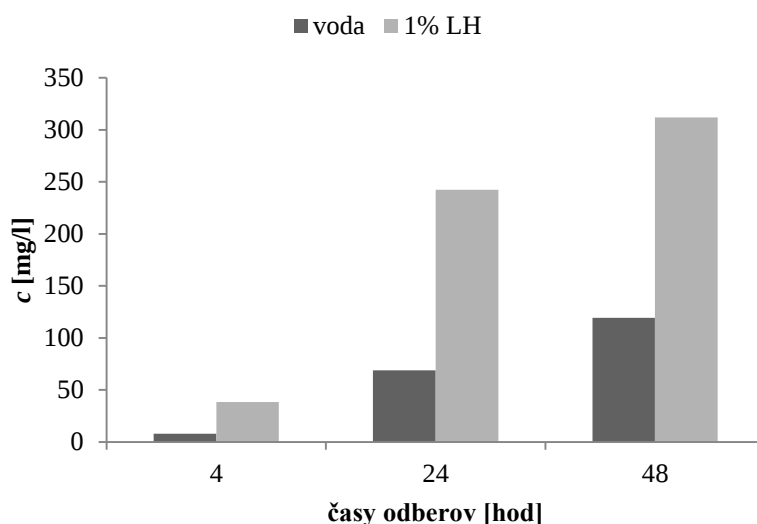
Uvoľňovanie ketoprofenu, ako ďalšej farmaceuticky pôsobiacej aktívnej látky, bolo úspešne realizované aj skrz syntetickú, aj skrz kožnú membránu.

Obrázok 44 jednoznačne preukázal, že uvoľňovanie ketoprofenu, skrz syntetickú membránu, je efektívnejšie z humínových gélových matric. Lignohumát draselný môžeme teda, aj v tomto prípade, považovať za enhancera transportu tejto aktívnej látky, nakoľko vo výraznej miere podporil jej uvoľnenie. Z gélových matric, ktoré boli pripravené z 1% roztoku Lignohumátu, sa uvoľnilo 82 % ketoprofenu a z gélových matric, ktorých disperzné prostredia tvorila len voda, bolo uvoľnených necelých 10 % tejto aktívnej látky, z pôvodne aplikovaného množstva. Významný rozdiel v percentuálnej výťažnosti uvoľnenia len potvrdil, že Lignohumát draselný hrá rolu urýchľovača transdermálneho transportu ketoprofenu.

Charakter uvoľňovania ketoprofenu z gélových matric skrz kožnú membránu môžeme vidieť na Obrázku 45. V porovnaní s gélovými matricami z Polygelu CB, sa ketoprofen uvoľňoval, skrz biologickú membránu, efektívnejšie z gélových matric, ktoré boli pripravené zo zahusťujúcej látky Xanthan (Obrázok 38 a 45). Predpokladáme, že interakcie medzi aktívnou látkou a zložkami gélu neboli natoľko významné, aby nejakým spôsobom potlačili uvoľnenie ketoprofenu z gélovej vzorky. Lignohumát draselný, ktorý bol súčasťou humínovej gélovej vzorky, opäť podporil uvoľnenie ketoprofenu. Približne 30 % ketoprofenu sa uvoľnilo z vodnej gélovej vzorky a takmer 78 % z gélu, ktorý obsahoval 1% roztok Lignohumátu.



Obrázok 44 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+K; uvoľňovanie **ketoprofenu** skrz **syntetickú membránu**.



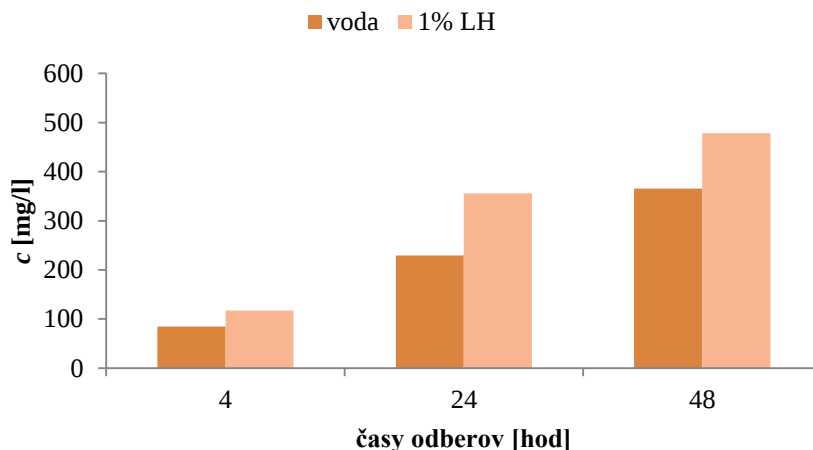
Obrázok 45 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+K; uvoľňovanie **ketoprofenu** skrz **kožnú membránu**.

Xanthan a kyselina salicylová

Uvoľňovanie kyseliny salicylovej z gélových matríc, ktoré boli pripravené zo zahusťujúcej látky Xanthan, bolo intenzívne v oboch prípadoch použitých membrán. Bolo opäť preukázané, že kyselina salicylová pôsobila keratolyticky na najvrchnejšiu vrstvu epidermis kožnej membrány, nakoľko bol prestup tejto účinnej látky veľmi efektívny. Lignohumát draselný podporil uvoľňovanie kyseliny salicylovej z gélových matríc a to aj skrz membránu syntetickú, aj skrz membránu kožnú.

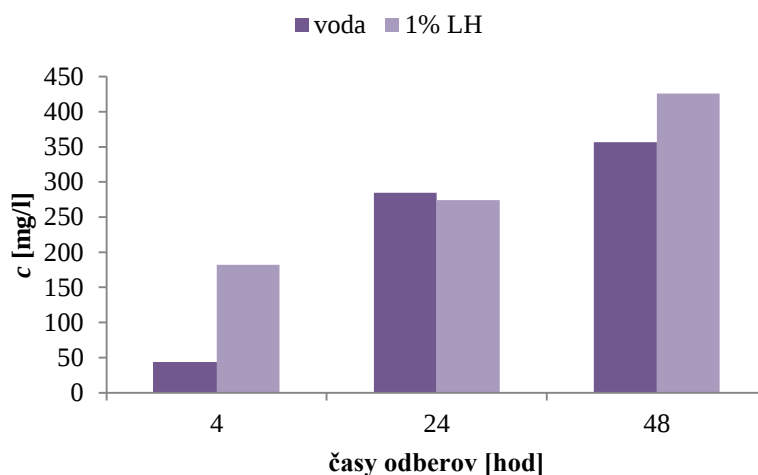
Uvoľňovanie kyseliny salicylovej z gélových matríc, skrz syntetickú membránu, bolo efektívnejšie v prípade gélovej vzorky s obsahom 1% roztoku Lignohumátu (Obrázok 46). Gélová vzorka, ktorá bola tvorená len vodným disperzným prostredím, uvoľnila približne 91 % kyseliny salicylovej, skrz syntetickú membránu, po 48 hodinách trvania experimentu.

Z humínovej gélovej vzorky prestúpilo takmer 120 % tejto aktívnej látky. Domnievame sa, že pôvodne nasadené 2 g gélovej vzorky na Franzovu difúznu celu, neobsahovali predpokladaných 20 mg aktívnej látky. 120% výťažnosť bola pravdepodobne dôsledkom nehomogénneho rozptýlenia aktívnej látky v konkrétnej gélovej vzorke.



Obrázok 46 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+S; uvoľňovanie **kyseliny salicylovej** skrz **syntetickú membránu**.

Uvoľňovanie kyseliny salicylovej skrz kožnú membránu bolo o niečo málo intenzívnejšie ako skrz membránu syntetickú (Obrázok 47). Z Obrázku 47 je ďalej zrejmé, že Lignohumát draselný bol enhancerom transportu aktívnej látky. Z vodnej gélovej vzorky sa uvoľnilo, skrz kožnú membránu, približne 89 % kyseliny salicylovej z pôvodne aplikovaného množstva do darovacej komory difúznej cely. Z gélovej vzorky, ktorá obsahovala 1% roztok Lignohumátu, sa uvoľnilo až 107 % tejto účinnej látky. Prekročená hranica 100 % by mohla opäť signalizovať väčšie množstvo aktívnej látky oproti predpokladanému množstvu, v pôvodne nasadenej vzorke.



Obrázok 47 Závislosť koncentrácie na čase odberov. Vzorky 5% Xanthan+voda/1% LH+S; uvoľňovanie **kyseliny salicylovej** skrz **kožnú membránu**.

Súhrn výsledkov z chromatografických meraní

Okrem jediného prípadu (Obrázok 37), bolo preukázané, že sa všetky tri farmaceuticky pôsobiace aktívne látky uvoľňujú z gélových matric a prestupujú skrz oba typy membrán, syntetickú aj kožnú. Vo všeobecnosti je možné tvrdiť, že gélové vzorky ľahšie prestupujú skrz syntetickú membránu. Kožná membrána tvorila akúsi biologickú bariéru, ktorá síce transport aktívnych látok umožnila, ale, podľa predpokladov, bol tento transport menej efektívny.

Najzaujímavejším poznatkom z výsledkov chromatografických meraní bol fakt, že Lignohumát draselný výrazne ovplyvňuje uvoľňovanie aktívnych látok do prijímacieho roztoku Franzovej difúznej cely. Táto humínová látka pôsobila ako enhancer transportu účinných látok a významne podporila ich uvoľňovanie. Nakoľko nie je známa presná štruktúra tejto humínovej látky, môžeme vzájomné interakcie medzi Lignohumátom draselným a aktívnymi látkami len predpokladať. Lignohumát draselný je zmes humínových látok, ktorá je z väčšej časti tvorená soľami humínových kyselín. Na základe chemických štruktúr jednotlivých aktívnych látok a Lignohumátu draselného je pravdepodobné, že sa nejaké interakcie medzi aktívnymi látkami a touto humínovou látkou mohli vyskytnúť.

V neposlednej rade boli preukázané výrazné rozdiely v uvoľňovaní aktívnych látok z gélových matric, ktoré boli vytvorené z dvoch rôznych zahusťujúcich látok, Polygelu CB a Xanthanu. Xanthan, zahusťujúca látka prírodného charakteru, výrazne ovplyvnila uvoľňovanie účinných substancií z gélových matric. Domnievame sa, že aktívne látky neboli v gélových matriciach z Xanthanu tak pevne viazané ako v gélových matriciach z polymérneho Polygelu CB, a preto bolo ich uvoľňovanie efektívnejšie.

Tabuľka 13 *Percentuálna výťažnosť (po 48 hodinách trvania experimentu) a retenčné časy jednotlivých aktívnych látok, D – diklofenak sodný; K – ketoprofen; S – kyselina salicylová*

VZORKY	syntetická membrána		kožná membrána	
	výťažnosť [%]	retenčný čas [min]	výťažnosť [%]	retenčný čas [min]
2% Polygel CB+voda+D	0,88	17,100	0	-
2% Polygel CB+1% LH+D	0,76	16,879	0,10	17,709
2% Polygel CB+voda+K	14,58	5,796	18,40	6,011
2% Polygel CB+1% LH+K	29,36	5,754	19,34	5,959
2% Polygel CB+voda+S	98,83	2,402	85,66	2,395
2% Polygel CB+1% LH+S	100,09	2,395	99,02	2,452
5% Xanthan+voda+D	72,76	16,989	77,19	16,934
5% Xanthan+1% LH+D	103,64	16,955	87,11	16,983
5% Xanthan+voda+K	9,57	5,610	29,80	5,607
5% Xanthan+1% LH+K	81,96	5,595	77,94	5,598
5% Xanthan+voda+S	91,35	2,379	89,18	2,385
5% Xanthan+1% LH+S	119,56	2,377	106,51	2,383

7 ZÁVER

Táto diplomová práca sa zaoberá návrhom a experimentálnym štúdiom transdermálneho transportu farmaceuticky aktívnych substancií z gélových matric, s obsahom humínovej látky, do prijímacieho roztoku Franzovej difúznej cely. Významnú časť práce tvorí diskusia o príprave a charakterizácii kožných membrán, objasnenie výberu vhodnej analytickej metódy pre kvantitatívnu charakterizáciu uvoľnených aktívnych látok a Lignohumátu draselného, ale aj optimalizácia samotnej difúznej techniky.

Prasacia ušnica bola vybraná ako modelová kožná bariéra pre simuláciu transdermálneho transportu, nakoľko sa anatomicky podobá ľudskej koži. Ušnice boli narezávané ručne pomocou chirurgického skalpela a boli charakterizované pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu. Zo skúmania povrchov kožných membrán je zrejmé, že kvalita, homogenita a jednotnosť hrúbky takýchto membrán, je výrazne ovplyvnená ručným narezávaním. Zároveň bolo úspešne overené uvoľňovanie látok cez membránu biologického pôvodu, z čoho vyplýva, že kožná membrána z prasacej ušnice je vhodným kožným modelom pre experimenty takéhoto charakteru.

Difúzne experimenty boli realizované prostredníctvom vertikálnej difúznej cely, ktorá sa pre štúdium uvoľňovania aktívnych látok v praxi bežne využíva. Bolo skúmané uvoľňovanie diklofenaku sodného, ketoprofenu a kyseliny salicylovej z gélových matric s obohacujúcou látkou, Lignohumátom draselným. Uvoľnená humínová látka bola kvantitatívne charakterizovaná pomocou UV-VIS spektrofotometrie a koncentrácia uvoľnených aktívnych látok bola stanovená prostredníctvom HPLC-DAD. Bol overený a diskutovaný vzájomný vplyv aktívnych látok a Lignohumátu draselného pri uvoľňovaní z gélových vzoriek. Zároveň bol diskutovaný vplyv charakteru membrány, disperzného prostredia a zahusťujúcej látky.

Bolo preukázané, že Lignohumát draselný prechádza skrz syntetickú aj kožnú membránu do prijímacieho roztoku Franzovej difúznej cely. Zároveň bol overený a diskutovaný vplyv aktívnych látok na uvoľňovanie humínovej látky a ďalších faktorov. Vo všeobecnosti platí, že uvoľňovanie Lignohumátu je efektívnejšie z gélových matric bez účinných látok a skrz syntetickú membránu. Uvoľňovanie Lignohumátu je intenzívnejšie z gélových matric, ktoré sú vytvorené pomocou prírodnej zahusťujúcej látky Xanthan, a ktorých disperzné prostredie je tvorené 5% roztokom humínovej látky.

Uvoľňovanie farmaceuticky pôsobiacich aktívnych látok bolo úspešne realizované prostredníctvom navrhutej difúznej techniky. Bolo preukázané, že účinné látky prestupujú z gélových matric s obsahom Lignohumátu, skrz syntetickú aj kožnú membránu, do prijímacieho roztoku Franzovej cely. Bol overený a diskutovaný vplyv Lignohumátu, disperzného prostredia a ďalších faktorov, na uvoľňovanie aktívnych látok z gélových matric. Vo všeobecnosti platí, že aktívne látky sa uvoľňujú efektívnejšie skrz syntetickú membránu a z gélových vzoriek, ktoré boli pripravené pomocou prírodnej látky Xanthan. Ďalším zistením je, že kyselina salicylová sa, zo všetkých troch aktívnych látok, uvoľňuje najintenzívnejšie. Ťažiskovým zistením diplomovej práce bolo, že Lignohumát draselný je enhancer transdermálneho transportu študovaných účinných látok a podporuje uvoľnenie aktívnych látok do príslušného prostredia.

8 LITERATÚRA

- [1] PAL, K., A. K. BANTHIA a D. K. MAJUMDAR. Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications. *Designed Monomers & Polymers* [online]. 2009, 12(3), 197-220 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1163/156855509X436030. ISSN 1385772x. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1163/156855509X436030>
- [2] KIRSCHNER, Chelsea M. a Kristi S. ANSETH. Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia* [online]. 2013, 61(3), 931-944 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.actamat.2012.10.037. ISSN 13596454. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359645412007847>
- [3] PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 50(1), 27-46 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964110000090>
- [4] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>
- [5] LÓPEZ-CEBRAL, Rita, Patrizia PAOLICELLI, Vanessa ROMERO-CAAMAÑO, Begoña SEIJO, Maria Antonietta CASADEI a Alejandro SANCHEZ. Spermidine-Cross-linked Hydrogels as Novel Potential Platforms for Pharmaceutical Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, 102(8), 2632-2643 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1002/jps.23631. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915309850>
- [6] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* [online]. 2007, 28(34), 5185-5192 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005819>
- [7] ANDRADE, Joseph D. *Hydrogels for medical and related applications: a symposium*. Washington: American Chemical Society, 1976. ACS symposium series, 31. ISBN 0841203385.
- [8] EDITED BY RICHARD BAKER. *Controlled release of bioactive materials: [based on the Symposium at the 6th International Meeting of the Controlled Release Society in New Orleans, Louisiana, August, 1979]*. New York [etc.]: Academic Press, 1980. ISBN 0120744503.
- [9] KOFINAS, P. Hydrogels prepared by electron irradiation of poly(ethylene oxide) in water solution: unexpected dependence of cross-link density and protein diffusion coefficients on initial PEO molecular weight. *Biomaterials* [online]. 1996, 17(15), 1547-1550 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/0142-9612(96)89781-X. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014296129689781X>

- [10] KIM, Jang Kyoung, Hyung Jin KIM, Jee-Young CHUNG, Jong-Hwan LEE, Seok-Beom YOUNG a Yong-Hee KIM. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2014, 37(1), 60-68 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1007/s12272-013-0280-6. ISSN 0253-6269. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0280-6>
- [11] WENNINGER, John A a Gerald N MCEWEN. *International cosmetic ingredient handbook*. 3rd ed. Washington, D.C.: Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, c1995. ISBN 1882621107.
- [12] NATALIA MICHALUN a M. Varinia MICHALUN. *Milady's skin care and cosmetic ingredients dictionary*. 3rd ed. Clifton Park, NY: Milady/Cengage Learning, 2010. ISBN 1435480201.
- [13] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2016-02-18]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [14] LIN, Chien-Chi a Andrew T. METTERS. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, 58(12-13), 1379-1408 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.004. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X06001694>
- [15] KLIMUNDOVA, J, D SATINSKY, H SKLENAROVA a P SOLICH. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. *Talanta* [online]. 2006, 69(3), 730-735 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.11.011. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914005007411>
- [16] WEBER, J.: Definition of soil organic matter, Humintech. [online]. 2009, [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.humintech.com/>
- [17] PENA-MENDEZ, 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), 13-24 [cit. 2016-03-15]. ISSN 1214-0287. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/26596326_Humic_substances-compounds_of_still_unknown_structure_application_in_agriculture_industry_environment_and_biomedicine
- [18] SKOKANOVÁ, Marianna, Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262–265.
- [19] VON WANDRUSZKA, Ray. *Geochemical Transactions* [online]. 1(1), 10 [cit. 2016-03-15]. DOI: 10.1186/1467-4866-1-10. ISSN 14674866. Dostupné z: <http://www.geochemicaltransactions.com/content/1/1/10>
- [20] *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.

- [21] GOLDMAN, Lee a Andrew I SCHAFER (eds.). *Goldman's Cecil medicine*. 24th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders, c2012. ISBN 978-1-4377-3665-6.
- [22] KOTINGOVÁ Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické listy*. 2009, č. 103, 533 – 539 s.
- [23] KRAJČÍ Dimitrolos. *Kožní systém - Praktické cvičení*. Ústav histologie a embryologie. Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 62 s.
- [24] JUNQUEIRA, Luiz Carlos UCHOA, José CARNEIRO a Robert O KELLEY. *Základy histologie*. Vyd. v ČR 1. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- [25] JAKAŠA, Ivone. *Dermal absorption of chemicals through normal and compromised skin*. Netherlands: Ponsen & Looije, 2006, 166 s. ISBN 9064646414.
- [26] Český lékopis 1997. *Lékopis - Unguenta 2001* [online]. 1997 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_2_1_Unguenta.htm
- [27] BRACHT, Stefan. Transdermal therapeutic systems: a review. In: *Drug delivery: Innovations in Pharmaceutical Technology* [online]. 2000, 92-98 s. [cit. 2014-10-29]. Dostupné z: <http://iptonline.com/articles/public/IPTFIVE92NP.pdf>
- [28] HRABÁLEK, Alexandr a Kateřina VÁVROVÁ. *Lze překonat kožní bariéru?: Aktuální farmakoterapie*. 2005, 8-11 s. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2005/01/02.pdf>
- [29] HRABÁLEK, Alexandr et al. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické Listy*. 1999, č. 93, 107-119 s. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_107-119.pdf
- [30] BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2001, 14(2), 101-114 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00167-1. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098701001671>
- [31] PRESNER, Ken. The Power of Electroporation. In: *The world's best Zapper* [online]. 2009 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://zap.intergate.ca/electroporation.htm>
- [32] JULURU, Ravi, Chinmay SHUKLA, Hongjun YIN a Grazia STAGNI. Skin Microdialysis-Based Estimation of Systemic Bioavailability Fraction. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, 101(1), 405-413 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1002/jps.22762. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915317822>

- [33] VEJANI, Charchil a Robert A. BELLANTONE. An in situ method to quantitatively determine dissolved free drug concentrations in vitro in the presence of polymer excipients using pulsatile microdialysis (PMD). *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, 496(2), 275-281 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.064. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315301617>
- [34] NAGELREITER, C., D. MAHRHAUSER, K. WIATSKA, S. SKIPIOL a C. VALENTA. Importance of a suitable working protocol for tape stripping experiments on porcine ear skin: Influence of lipophilic formulations and strip adhesion impairment. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, 491(1-2), 162-169 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.06.031. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315005517>
- [35] KIELHORN, J, Stephanie MELCHING-KOLLMUSS a I MANGELSDORF. *Dermal absorption*. Geneva: World Health Organization, 2006. Environmental health criteria, 235.
- [36] 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 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x. ISSN 0909-752x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x>
- [37] VALLET, V., C. CRUZ, D. JOSSE, A. BAZIRE, G. LALLEMENT a I. BOUDRY. In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin. *Toxicology in Vitro* [online]. 2007, 21(6), 1182-1190 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.03.007. ISSN 08872333. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233307000835>
- [38] VERBAAN, F.J., S.M. BAL, D.J. VAN DEN BERG, W.H.H. GROENINK, H. VERPOORTEN, R. LÜTTGE a J.A. BOUWSTRA. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *Journal of Controlled Release* [online]. 2007, 117(2), 238-245 [cit. 2016-02-25]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.11.009. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365906006018>
- [39] Skin Graft-series. *University of Maryland Baltimore Washington Medical Centre* [online]. 2013 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://www.mybwmc.org/library/3/100100>
- [40] DAS, Biswarup, Amit Kumar NAYAK a Upendranath NANDA. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and in vitro skin permeation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, 62, 514-517 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.09.049. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813013005370>
- [41] ROTTKE, Michael, Dominique Jasmin LUNTER a Rolf DANIELS. In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2014, 86(2), 260-266 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.09.018. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964111300324X>

- [42] SINTOV, Amnon C. a Igor GREENBERG. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 471(1-2), 516-524 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.040. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314003809>
- [43] PATEL, Hetal K., Bhavesh S. BAROT, Punit B. PAREJIYA, Pragna K. SHELAT a Arunkumar SHUKLA. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: Ex vivo permeation and skin irritation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2013, 102, 86-94 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.011. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776512004596>
- [44] JANA, Sougata, Sreejan MANNA, Amit Kumar NAYAK, Kalyan Kumar SEN a Sanat Kumar BASU. Carbopol gel containing chitosan-egg albumin nanoparticles for transdermal aceclofenac delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, 114, 36-44 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.045. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513006139>
- [45] ŽILNIK, L.Fele, A. JAZBINŠEK, A. HVALA, F. VREČER a Andreas KLAMT. Solubility of sodium diclofenac in different solvents. *Fluid Phase Equilibria* [online]. 2007, 261(1-2), 140-145 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.1016/j.fluid.2007.07.020. ISSN 03783812. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381207004013>
- [46] GIRI, Arindam, Manas BHOWMICK, Sagar PAL a Abhijit BANDYOPADHYAY. Polymer hydrogel from carboxymethyl guar gum and carbon nanotube for sustained trans-dermal release of diclofenac sodium. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2011, 49(5), 885-893 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.08.003. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813011003035>
- [47] ASASUTJARIT, Rathapon, Suthira THANASANCHOKPIBULL, Asira FUONGFUCHAT a Sukitaya VEERANONDHA. Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2011, 411(1-2), 128-135 [cit. 2016-03-17]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.054. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311002900>
- [48] AL-KAHTANI, Ahmed A. a B.S. SHERIGARA. Controlled release of diclofenac sodium through acrylamide grafted hydroxyethyl cellulose and sodium alginate. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, 104, 151-157 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.018. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714000204>
- [49] FOUAD, Shahinaze A., Emad B. BASALIOUS, Mohamed A. EL-NABARAWI a Saadia A. TAYEL. Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: In vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 453(2), 569-578 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.009. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313004985>

- [50] QI, Xiaole, Xiaoxue QIN, Rong YANG, Jiayi QIN, Wenyan LI, Kun LUAN, Zhenghong WU a Li SONG. Intra-articular Administration of Chitosan Thermosensitive In Situ Hydrogels Combined With Diclofenac Sodium–Loaded Alginate Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2016, 105(1), 122-130 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.019. ISSN 00223549. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915001343>
- [51] LI, XingYi, Zhaoliang ZHANG a Hao CHEN. Development and evaluation of fast forming nano-composite hydrogel for ocular delivery of diclofenac. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 448(1), 96-100 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.03.024. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313002433>
- [52] BHATTACHARYA, Shiv Sankar, Subham BANERJEE, Ashoke Kumar GHOSH, Pronobesh CHATTOPADHYAY, Anurag VERMA a Amitava GHOSH. A RP-HPLC method for quantification of diclofenac sodium released from biological macromolecules. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, 58, 354-359 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.065. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813013001657>
- [53] GIRAY, Seda, Tuğba BAL, Ayse M. KARTAL, Seda KIZILEL a Can ERKEY. Controlled drug delivery through a novel PEG hydrogel encapsulated silica aerogel system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2012, 100A(5), 1307-1315 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1002/jbm.a.34056. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.34056>
- [54] UCHINO, Tomonobu, Fons LEFEBER, Gert GOORIS a Joke BOUWSTRA. Characterization and skin permeation of ketoprofen-loaded vesicular systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2014, 86(2), 156-166 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.02.009. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641113000787>
- [55] GUE, E., J.F. WILLART, S. MUSCHERT, F. DANEDE, E. DELCOURT, M. DESCAMPS a J. SIEPMANN. Accelerated ketoprofen release from polymeric matrices: Importance of the homogeneity/heterogeneity of excipient distribution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 457(1), 298-307 [cit. 2016-02-29]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.09.023. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313008582>
- [56] DVOŘÁK, J., R. HÁJKOVÁ, L. MATYSOVÁ, L. NOVÁKOVÁ, M.A. KOUPPARIS a P. SOLICH. Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2004, 36(3), 625-629 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.07.018. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708504003218>
- [57] WANG, Zheng, Hua WU, Chunyan LIAO, Nuo ZHOU, Wenze CHENG a Ying WAN. Sustained release of ketoprofen from fibrous chitosan-poly(ϵ -caprolactone) membranes. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, 84(1), 624-630 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.038. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710010246>

- [58] MADAN, Raman K. a Jacob LEVITT. A review of toxicity from topical salicylic acid preparations. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2014, 70(4), 788-792 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.jaad.2013.12.005. ISSN 01909622. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962213013352>
- [59] LEBWOHL, Mark. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *International Journal of Dermatology* [online]. 1999, 38(1), 16-24 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1046/j.1365-4362.1999.00500.x. ISSN 0011-9059. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-4362.1999.00500.x>
- [60] MIKAMI, E., T. GOTO, T. OHNO, H. MATSUMOTO a M. NISHIDA. Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, 28(2), 261-267 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/S0731-7085(01)00564-7. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708501005647>
- [61] MATEUS, Rita, David J. MOORE, Jonathan HADGRAFT a Majella E. LANE. Percutaneous absorption of salicylic acid – in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, 475(1-2), 471-474 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.061. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517314006279>
- [62] DESAI, N.C. a R.D. SENTA. Simultaneous Rp-HPLC determination of salicylamide, salicylic acid and deferasirox in the bulk API dosages forms. *Journal of Taibah University for Science* [online]. 2015, 9(2), 245-251 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.jtusc.2014.11.006. ISSN 16583655. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1658365514001265>
- [63] DAS, Raghunath a Sagar PAL. Hydroxypropyl methyl cellulose grafted with polyacrylamide: Application in controlled release of 5-amino salicylic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2013, 110, 236-241 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.033. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513002919>
- [64] CAO, Shuqin, Xinjian FU, Ningxia WANG, Hong WANG a Yajiang YANG. Release behavior of salicylic acid in supramolecular hydrogels formed by l-phenylalanine derivatives as hydrogelator. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, 357(1-2), 95-99 [cit. 2016-03-01]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.01.054. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517308000744>
- [65] 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 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115306123>
- [66] PAVLICOVÁ, Renata. *Příprava hydrogelů s obsahem huminových látek pro kosmetické aplikace*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.

- [67] Franz cells. *PermeGear* [online]. PermeGear, Inc., 2015 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://permegear.com/franz-cells/>

- [68] WILLEM G. ZIJLSTRA; ANNEKE BUURSMA; ONNO W. VAN ASSENDELFT. *Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin: determination and application*. Utrecht [u.a.]: VSP International Science Publ, 2000. ISBN 9067643173.

- [69] KLÖCKING, Renate, Björn HELBIG, Alexander STEINBÜCHEL a Martin HOFRICHTER. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. *Biopolymers Online* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005 [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1002/3527600035.bpol1013. ISBN 3527600035. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol1013>

- [70] PALANOVÁ, V. *Návrh a optimalizace metody experimentálního studia uvolňování huminových látek z gelových aplikačních forem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 48 s.

- [71] CHEN, Y., N. SENESI a M. SCHNITZER. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios1. *Soil Science Society of America Journal*[online]. 1977, **41**(2), 352- [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x. ISSN 0361-5995. Dostupné z: <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/41/2/SS0410020352>

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

9.1 Použité skratky

<i>skratka</i>	<i>význam skratky</i>
CB	Polygel CB
X	Xanthan
LH	Lignohumát draselný
SM	syntetická membrána
KM	kožná membrána
D	diklofenak sodný
K	ketoprofen
S	kyselina salicylová
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia
HPLC-DAD	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s detekciou na diódovom poli
UV-VIS	viditeľná a ultrafialová oblasť
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze
DAD	detektor s diódovým poľom
FDA	z angl. Food and Drug Administration
OECD	z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development
PHEMA	poly(2-hydroxyetyl)metakrylát
PVA	polyvinylalkohol
PEG	polyetylénglykol
PNIPAAm	poly- <i>N</i> -isopropylakrylamid
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová
HPMC	hydroxypropylmetylcelulóza
RPM	počet otáčok za minútu

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
A	absorbancia	[-]
λ	vlnová dĺžka	[nm]
c	hmotnostná koncentrácia	[g/l]
t	čas	[hod]
h	hrúbka membrány	[μm]
m	hmotnosť	[g]
V_{NaOH}	objem neutralizačného činidla	[ml]
W_S	hmotnosť naboptnalého gélu	[g]
W_d	hmotnosť xerogélu	[g]
$C_D(0)$	počiatočná koncentrácia v donore	[mol/m ³]
$C_R(0)$	počiatočná koncentrácia v receptore	[mol/m ³]
$C_D(t)$	koncentrácia v donore v čase t	[mol/m ³]
$C_R(t)$	koncentrácia v receptore v čase t	[mol/m ³]
β	konštanta aparatury	[m ⁻²]
R^2	korelačný koeficient	[-]
V_D	objem roztoku v donore	[m ³]
V_R	objem roztoku v receptore	[m ³]

10 ZOZNAM PRÍLOH

- PRÍLOHA 1 Spektrofotometer HITACHI U-3900H a ukážka dlhej tenkej ihly (120 mm).
- PRÍLOHA 2 Chromatograf Agilent 1260.
- PRÍLOHA 3 Kalibračná priamka Lignohumátu draselného.
- PRÍLOHA 4 Kalibračné priamky: diklofenaku sodného; ketoprofenu a kyseliny salicylovej.
- PRÍLOHA 5 Ukážka chromatogramov – vzorka: 5% Xanthan+1% LH+D; 4/24/48 hodín trvania experimentu; uvoľňovanie diklofenaku sodného skrz kožnú membránu.
- PRÍLOHA 6 Závislosti absorbancie na vlnovej dĺžke pre ďalšie gélové matrice; porovnania uvoľňovania Lignohumátu z gélových matric s/bez aktívnej látky; kožná vz. syntetická membrána.
- PRÍLOHA 7 Absorpčné spektrá. Porovnanie disperzných prostredí pre gélové vzorku: Polygel CB+D; po 4 hodinách; syntetická/ kožná membrána, Polygel CB+S; po 4 hodinách; syntetická/ kožná membrána.
- PRÍLOHA 8 Absorpčné spektrá. Porovnanie disperzných prostredí pre gélové vzorku: Xanthan+D; po 4 hodinách; syntetická/ kožná membrána, Xanthan+K; po 4 hodinách; syntetická/ kožná membrána, Xanthan+S; po 4 hodinách; syntetická/ kožná membrána.

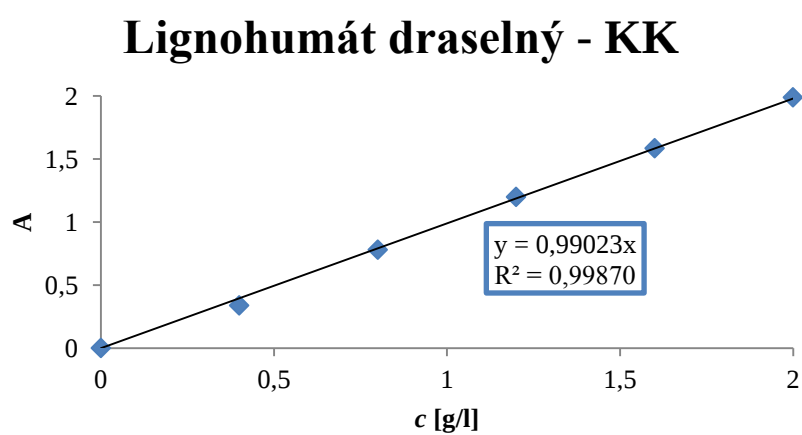
PRÍLOHA 1



PRÍLOHA 2

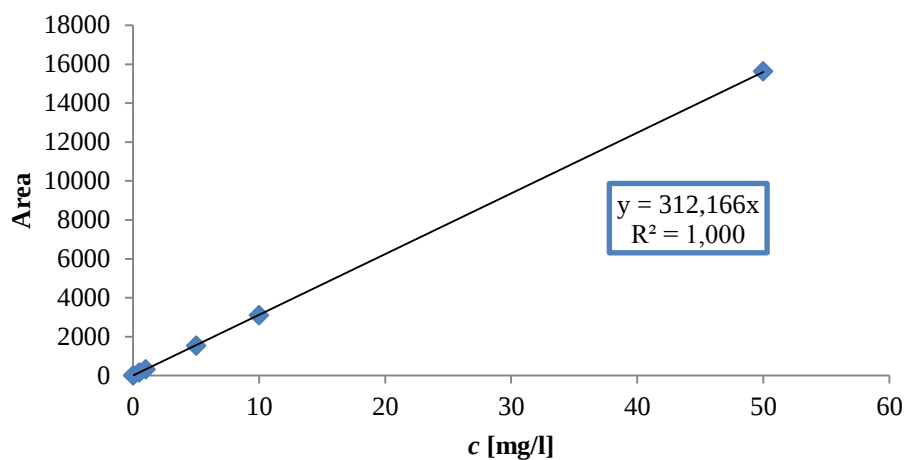


PRÍLOHA 3

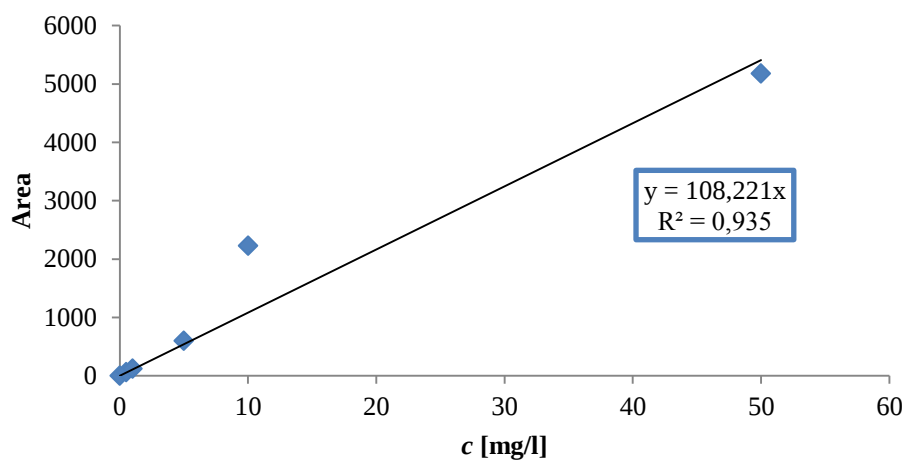


PRÍLOHA 4

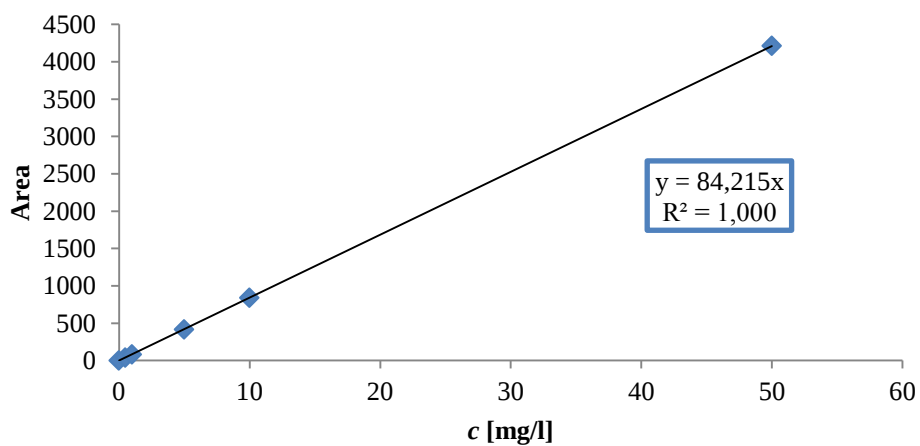
Diklofenak sodný - KK



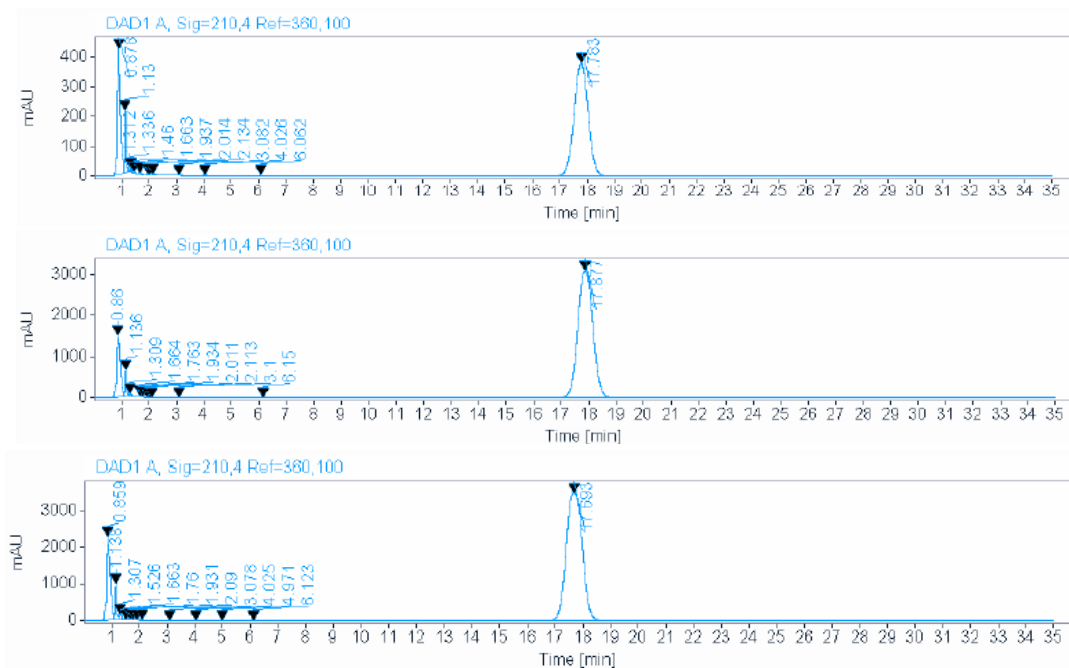
Ketoprofen - KK



Kyselina salicylová - KK

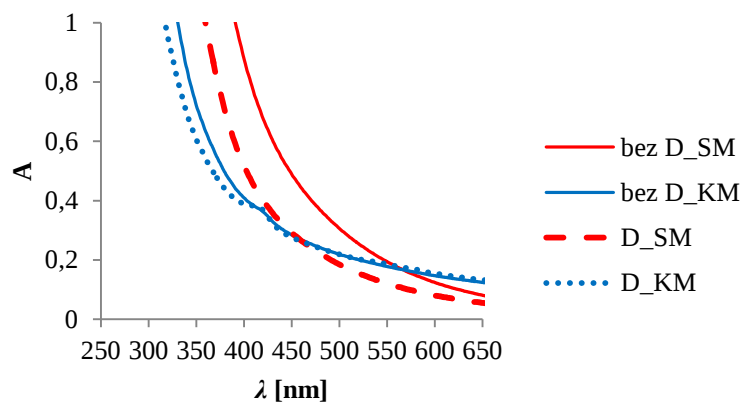


PRÍLOHA 5

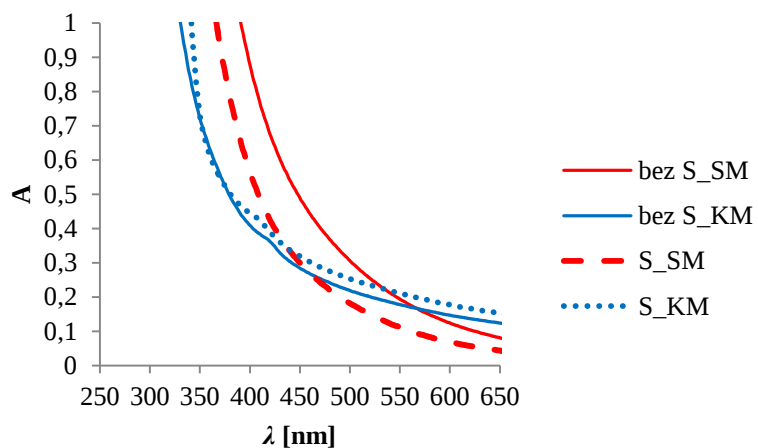


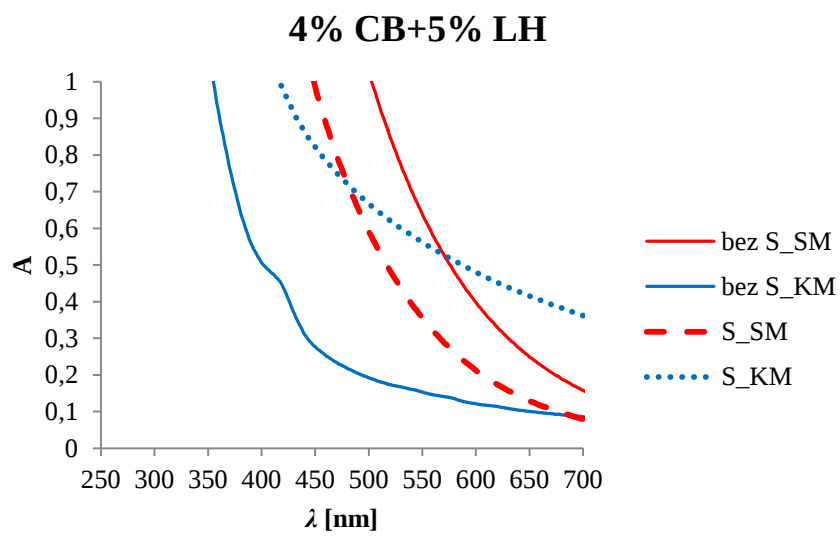
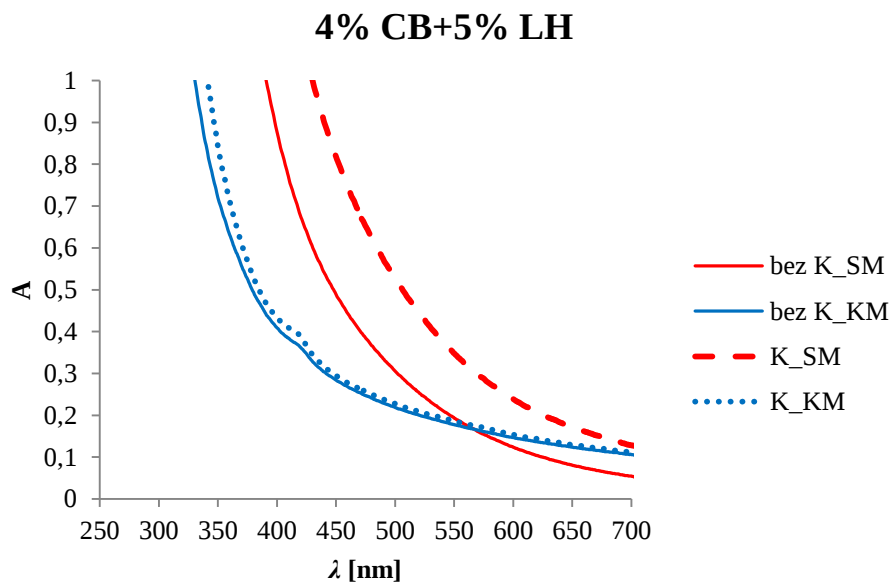
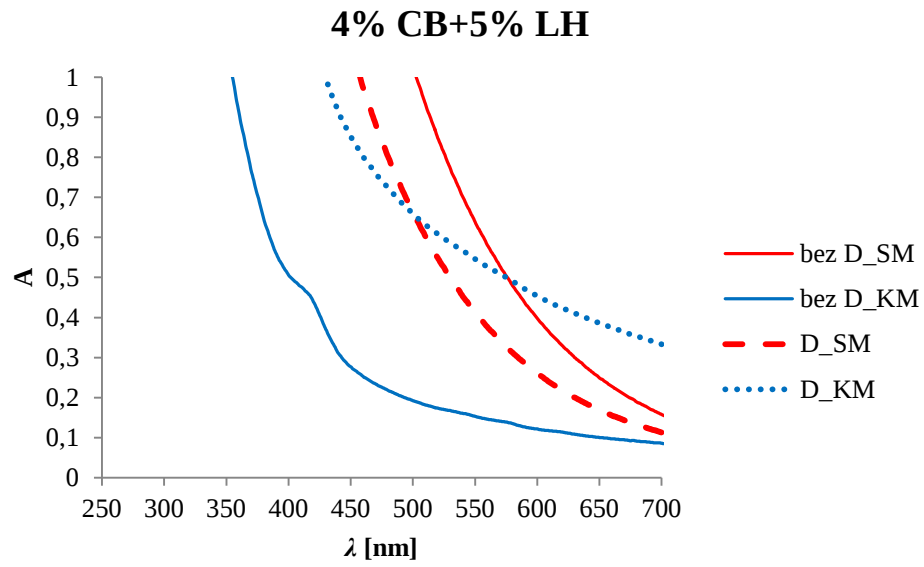
PRÍLOHA 6

2% CB+1% LH

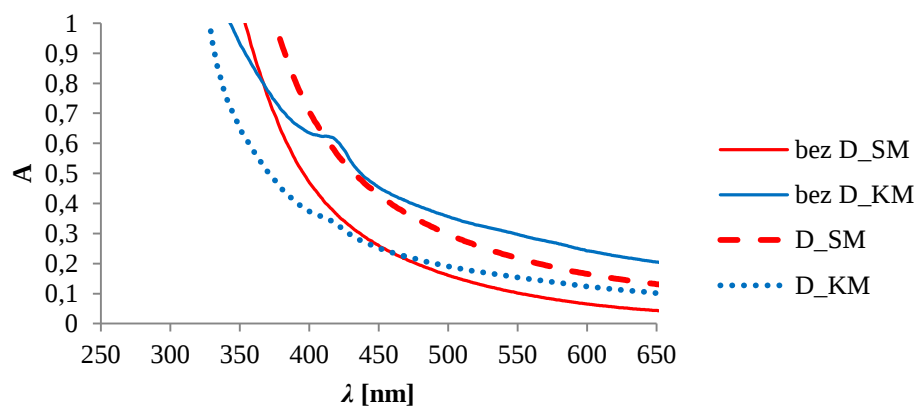


2% CB+1% LH

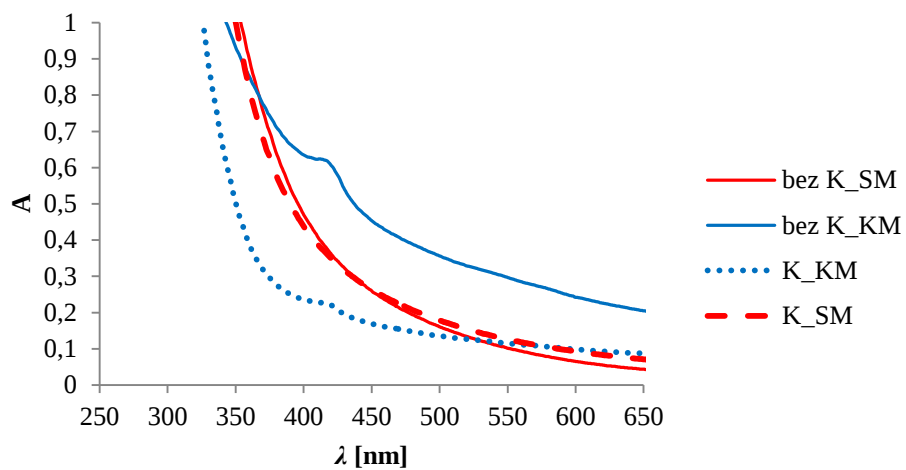




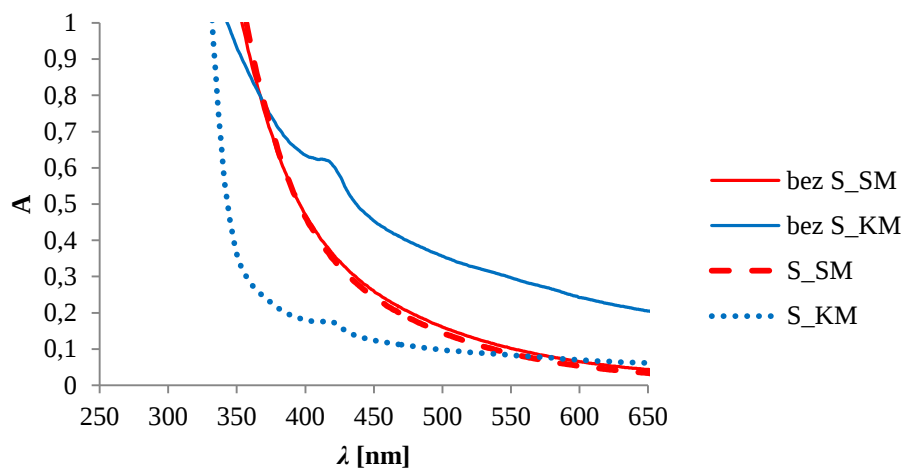
5% X+1% LH

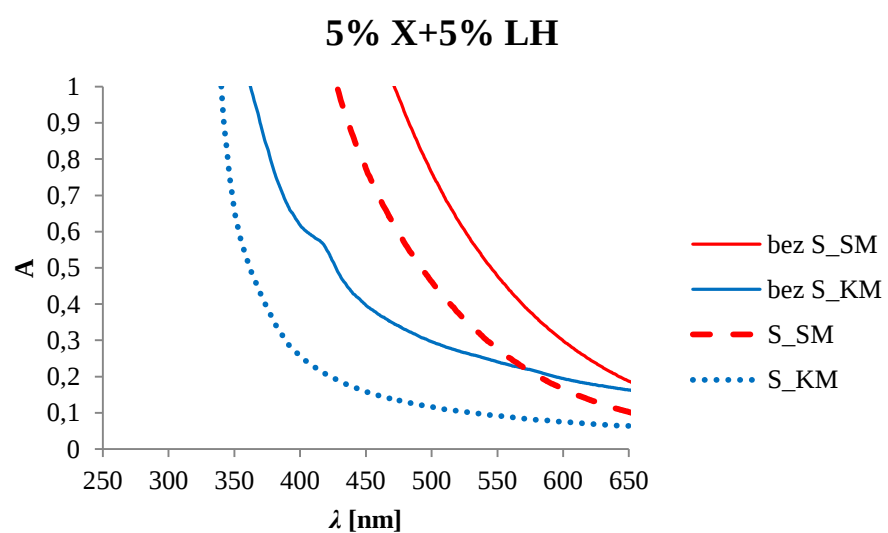
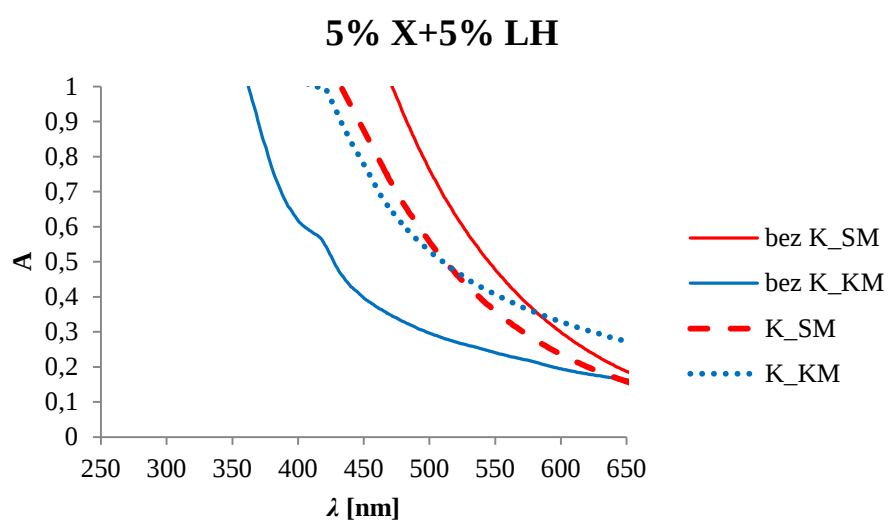
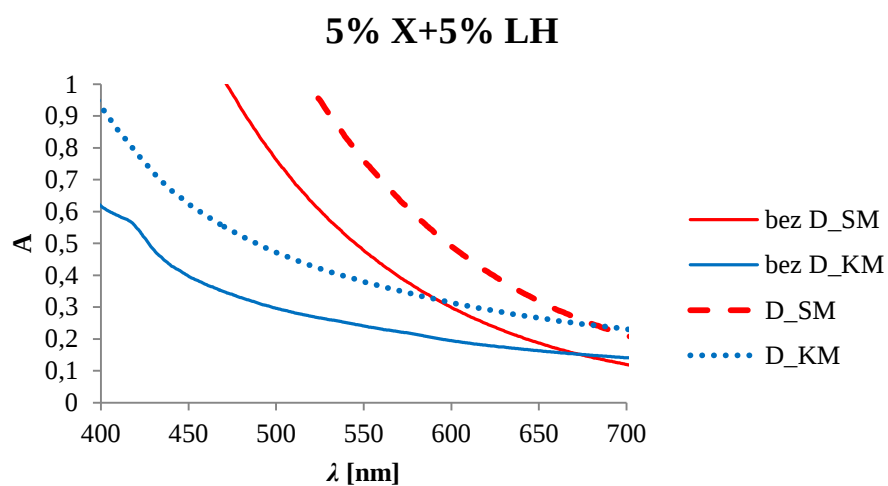


5% X+1% LH

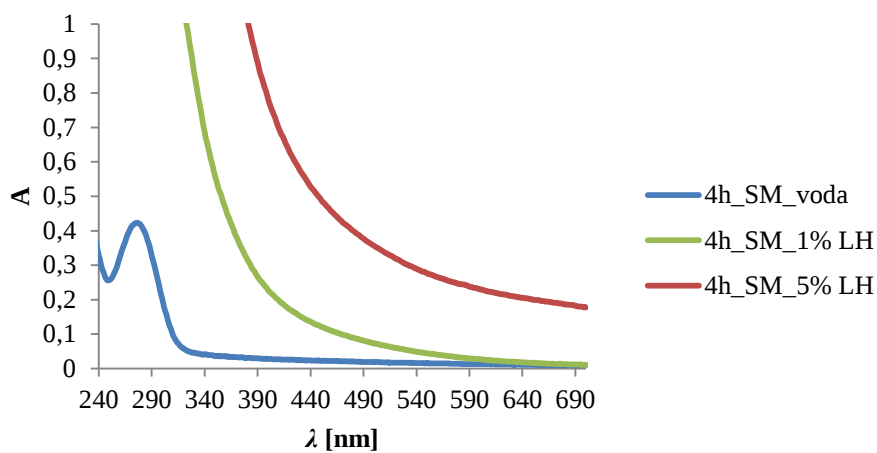


5% X+1% LH

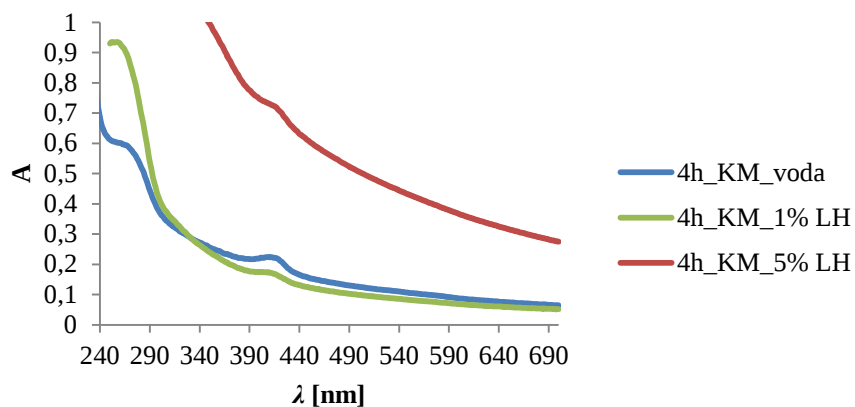




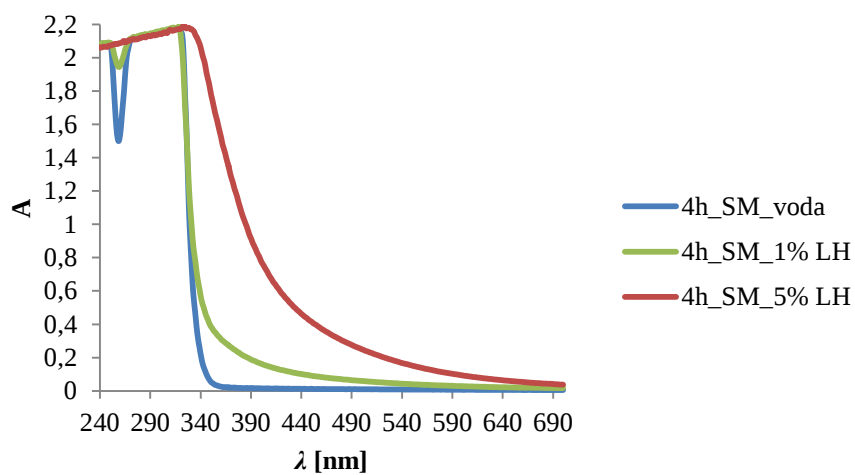
Polygel CB+diklofenak sodný_SM



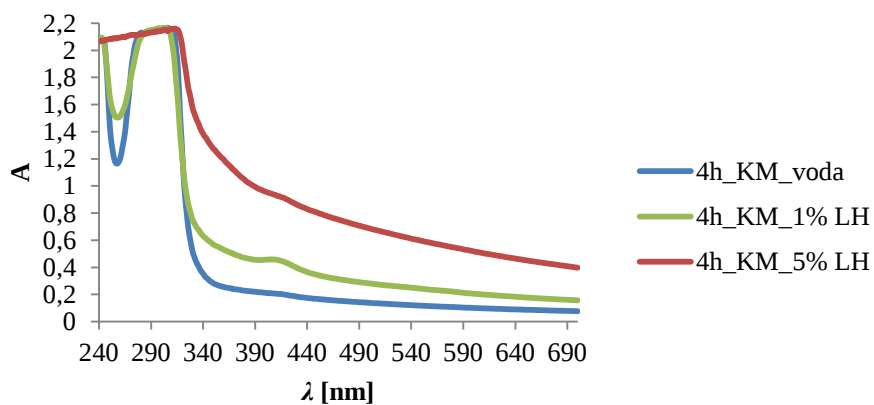
Polygel CB+diklofenak sodný_KM



Polygel CB+kyselina salicylová_SM

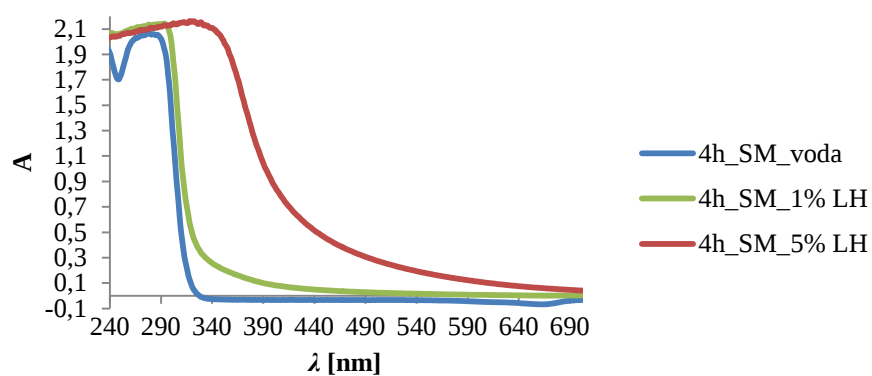


Polygel CB+kyselina salicylová_KM

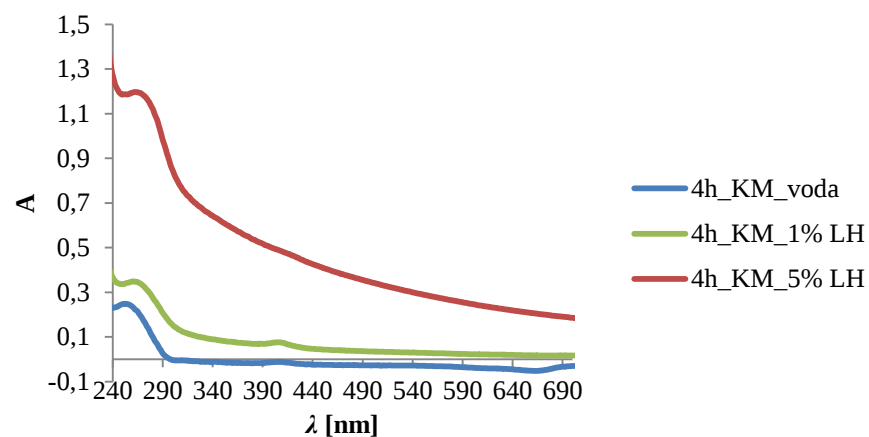


PRÍLOHA 8

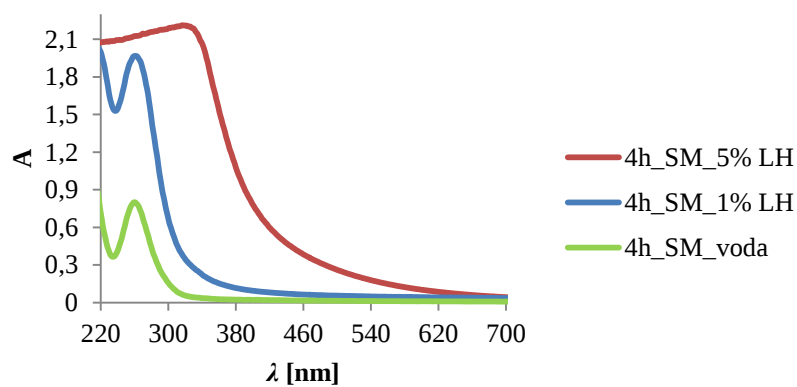
Xanthan+diklofenak_SM



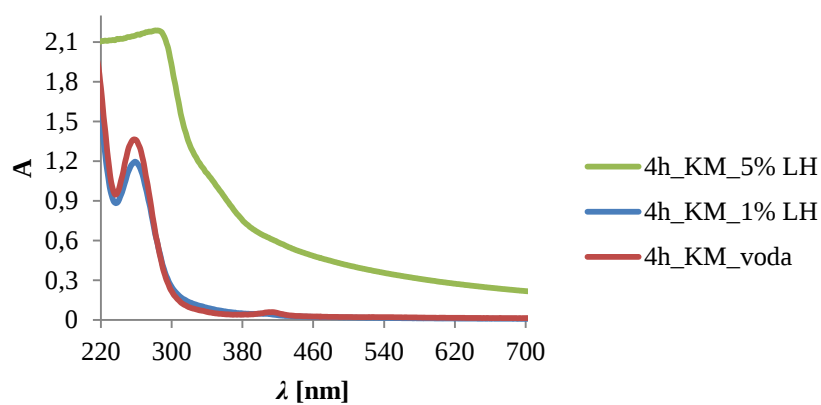
Xanthan+diklofenak_KM



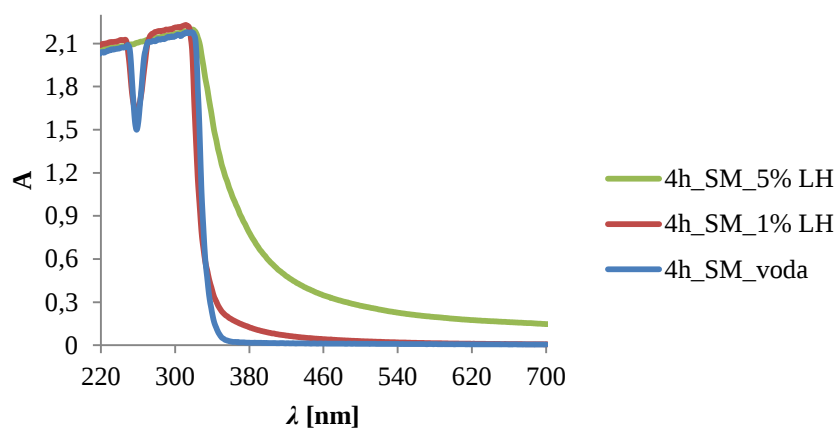
Xanthan+ketoprofen_SM



Xanthan+ketoprofen_KM



Xanthan+kyselina salicylová_SM



Xanthan+kyselina salicylová_KM

