

Vplyv membrán na permeáciu alaptidu z hydrogélů

ZUZANA VITKOVÁ, VERONIKA ŠMUNKOVÁ, PETRA HERDOVÁ, MARIÁN ŽABKA
Univerzita Komenského Bratislava, Farmaceutická fakulta, Katedra galenickej farmácie

Došlo 27. ledna 2011 / Prijato 28 února 2011

SÚHRN

Vplyv membrán na permeáciu alaptidu z hydrogélů

Predmetom príspevku je hodnotenie liberácie liečiva alaptid z gélov a jeho permeácia cez rôzne typy permeačných membrán. Pripravili sa gély na báze troch rôznych polymérov (3 % chitosan; 2,5 % hydroxypropylcelulóza; 3 % hydroxyetylcelulóza) v rôznej koncentrácii s prísadou humektantov (5 %; 15 % propylénglykol a 10 % glycerol) a konzervantu 0,3 % Sepicide HBR a liečiva 1 % alaptid a gély bez liečiva. Prestup liečiva z gélov do akceptorového roztoku sa hodnotil cez nasledovné membrány: celofán, kuracia koža, zvlečená hadia koža a stena tenkého čreva. Z výsledkov merania bolo zistené najväčšie percento uvoľneného alaptidu cez stenu tenkého čreva, menej cez kuraciu kožu a najmenej sa uvoľnilo cez hadiu kožu. V práci sa hodnotili aj reologické vlastnosti pripravených hydrogélů. Pseudoplastický tok bol zistený iba v prípade hydrogélů na báze hydroxypropylcelulózy. Naopak to bolo pri hydrogélůch na báze chitosanu a hydroxyetylcelulózy, ktoré vykazovali výrazný tixotropný charakter a miera tixotropie sa s časom zväčšovala. Na základe výsledkov merania pH boli vzorky na báze chitosanu a hydroxypropylcelulózy vyhodnotené ako nevyhovujúce, nakoľko dosahovali nižšie hodnoty pH a mohli by spôsobiť podráždenie pokožky. Fyziologickým hodnotám pH kože zodpovedal hydrogél na báze hydroxyetylcelulózy a to i po 14. dňoch po príprave.

Kľúčové slová: alaptid – hydrogél – permeačná membrána – reologické vlastnosti

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 132–136

SUMMARY

Influence of membranes on alaptide permeation from hydrogels

The paper evaluates the liberation of alaptide from gels through various types of permeable membranes. The gels were prepared on the basis of three different polymers (3% chitosan; 2.5% hydroxypropyl cellulose; 3% hydroxyethyl cellulose) in different concentrations with additions of humectants (5 %; 15% propylene glycol and 10% glycerol) and the preserving agent, 0.3% Sepicide HBR with 1% alaptide, and finally without the drug. The permeation of the drug from gels into the acceptor solution was evaluated with the use of the following membranes: the hydrophilic membrane from Chemosvit, the chicken skin, the stripped snakeskin, and the wall of the small intestine. The measurements showed that the highest percentage of the drug penetrated through the small intestine, a smaller percentage through the chicken skin, and the smallest amount through the snakeskin. Rheological properties of the prepared hydrogels were evaluated as well. The pseudo-plastic flow was only confirmed for the hydrogel prepared on the basis of hydroxypropyl cellulose. An utterly opposite situation was with the hydrogels prepared on the basis of chitosan and hydroxyethyl cellulose. They showed a significant thixotropic character and the degree of thixotropy increased with time. Based on the results of the pH measurement, the samples prepared on the basis of chitosan and hydroxypropyl cellulose have been shown to be inconvenient because they reached a lower pH and had a potential of causing skin irritation. The hydroxyethyl cellulose hydrogel matched the physiological values of skin pH even after 14 days since its preparation.

Key words: alaptide – hydrogel – permeable membrane – rheological properties

Čes. slov. Farm., 2011; 60, 132–136

Má

Adresa pre korešpondenciu:

PharmDr. Petra Herdová
Katedra galenickej farmácie, Farmaceutická fakulta UK
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: herdova@fpharm.uniba.sk

Úvod

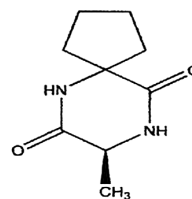
Podanie liečiv cez kožu má niekoľko výhod. Sú to napríklad:

- liečivá, ktoré sa bežne podávajú p.o. cestou, pri transdermálnom prechode obchádzajú gastrointestinálny trakt, nepodliehajú zmenám pH a nie sú ovplyvnené prípadným príjmom potravy a nespomaľuje sa ich prechod cez črevo;
- liečivá sa prvotne vyhnú portálnemu obehu;
- konštantný a kontinuálny prívod liečiv;
- kontrolované množstvo prívodu liečiv môže znížiť nárazový výskyt nežiaducich účinkov liečiv;
- okamžité prerušenie prívodu liečiva v čase potreby (napr. pri transdermálnych náplastiach) ¹⁾.

Medzi fyzikálno-chemické faktory, ktoré ovplyvňujú vstrebávanie liečiv patrí hydratácia stratum corneum, teplota ²⁾, pH ³⁾, koncentrácia liečiva ¹⁾ a základ dermálneho polotuhého lieku. Zloženie základu, v ktorom je liečivo aplikované na kožu, ovplyvňuje rýchlosť a rozsah absorpcie, ale zloženie lieku sa po aplikácii na kožu môže rýchlo meniť – vplyvom absorpcie niektorých pomocných látok a odparovaním vody ^{1, 4)}. Pri géloch dochádza vplyvom zvyšovania viskozity a zahusťovania základu k zníženiu absorpcie liečiva kožou ⁵⁾. Pri topickej aplikácii má pravdepodobne vplyv základu na dostupnosť liečiva väčší význam, ako pri iných cestách podania liekov. Základ, do ktorého je liečivo zapracované, by mal spĺňať niekoľko podmienok, konkrétne musí byť biokompatibilné, chemicky, mikrobiologicky a fyzikálne stabilné, musí mať schopnosť pohotovo uvoľniť liečivo do stratum corneum a byť kozmeticky prijateľné ⁴⁾.

Peptidové liečivá sa stali v posledných rokoch neoddeliteľnou súčasťou modernej terapie. Ich široké využitie spočíva nielen samostatne (ako liečiva), ale aj v možnosti využitia ako nosičov iných liečiv nepeptidovej povahy. Výroba niektorých proteínových polymérov využíva DNA-rekombinantné technológie, pričom takto vyrobené proteíny majú dokonca lepšie vlastnosti, ako prírodné, ktoré sa stali ich základom. Majú termosenzitívne vlastnosti, reagujú na zmeny pH prostredia, sú biokompatibilné, majú dobré mechanické vlastnosti a využívajú sa v tkanivovom inžinierstve, alebo ako membrány. Snaha napodobniť vlastnosti prirodzených makromolekúl viedla k vývoju proteínových polymérov, ktoré aj napriek tomu, že sú peptidovej, resp. proteínovej povahy, sú biokompatibilné a imunitný systém ich nedeteguje ⁶⁾.

Modelové liečivo alaptid, použité v tejto práci, má regeneračné a epitelizačné účinky, ktoré boli zatiaľ využité vo veterinárnej medicíne a v súčasnosti sa využívajú aj vo veterinárnej praxi (alaptid vo forme dermálneho polotuhého lieku) – krému. Po chemickej stránke je to synteticky pripravený, spirocyklický dipeptid. Je to chemický derivát prolyl-leucyl-glycín amidu ⁷⁾, analóg melanostatínu (inhibitor melanokortín-stimulujúceho hormónu, ktorý je súčasťou fyziologického melanokortínového systému, ktorý sa podieľa na regulácii pigmentácie, zápalových procesov, energetickej homeostázy, analgézie, imunomodulácie, kardiovaskulárnej regulácie, neuromuskulárnej regenerácie a ovplyvnení sexuálnych funkcií)⁸⁾.



Obr. 1. Štruktúrny vzorec alaptidu ⁹⁾

V súčasnej terapeutickkej praxi sa používa lokálne vo forme 2% masti, stimuluje rast granulačného tkaniva, urýchľuje epitelizačný proces a priebeh hojenia rán. Je indikovaný na lokálne ošetrovanie kožných a slizničných lézií – popálenín, odrenín, omrzlín, dekubítov, vredov, pooperačných rán, postkastračných sutur a chronických recidivujúcich poranení a poleptaní od solí ¹⁰⁾.

Rovnako ako aj v humánnej medicíne, aj vo veterinárnej sa čoraz viac začína uplatňovať biopolymér chitosan ako nosič rôznych druhov liečiv (napr. antibiotika, anti-parazitika, anestetika, analgetika) ¹¹⁾. Okrem toho bolo experimentmi na zvieratách dokázané, že chitosanové gély vyvolávajú migráciu zápalových buniek a podporujú tvorbu nového tkaniva, čím sa urýchľuje proces hojenia a regenerácie ¹²⁾.

POKUSNÁ ČASŤ

Použité chemikálie

Alaptid (ALA) – v mikronizovanej forme (Výzkumný ústav pro farmáciu a biochemii (VÚFB), ČR); čistená voda (Aqua purificata SL 1- FaF UK, SR); chlorid sodný (Centrachem, Švajčiarsko); chitosan – stredná molekulová hmotnosť (CHIT) – (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Nemecko); glycerol 85% (GL) – (Galvex spol. s.r.o., Banská Bystrica, SR); Propylénglykol (PG) – (Merck, Darmstadt, Nemecko); hydroxyetylcelulóza – Natrosol 250 HR (HEC) – (Aqualon, USA); hydroxypropylcelulóza – Klucel MCS (HPC) – (Aqualon, USA); kyselina mliečna (Lachema, o. p., ČR); konzervant – Sepicide HBR (Sep. HBR) – (SEPPIC, Paríž, Francúzsko; zloženie: butylparabén, etylhydroxybenzoát, natriummetylparabenát a propylparabén vo fenoxetanole).

Použité prístroje

Analytické váhy – Kern & Sohn GmbH (Nemecko); elektrická miešačka – VEB ML W Prüfgeräte – Werk (Nemecko); Viskotester VT 500 – Haake Mess-Technik GmbH (Nemecko); pH meter – WTW Weilheim (Švajčiarsko); spektrofotometer – Philips Pye Unicam (Veľká Británia); permeačná aparátúra – vyrobená na Katedre galenickej farmácie FaF UK, Bratislava (SR);

permeačné membrány:

kuracia koža – dodala predajňa Achberger mäso-údeniny, Bratislava, (SR),

polyetylénový celofán – Chemosvit, a.s., Svit, (SR),
sliznica bravčového tenkého čreva – Maspoma spol.
s.r.o., Zvolen, (SR),
zvlčená hadia koža – dodal súkromný chovateľ hada
užovky červenej (*Elaphe guttata*).

Zloženie hydrogélův

Pripravili sa gély tohto zloženia:

blank č. 1: 3% CHIT s prísadou: 15% PG + 0,3% Sep.
HBR

blank č. 2: 2,5% HPC s prísadou: 5% PG + 0,3% Sep.
HBR

blank č. 3: 3% HEC s prísadou: 10% GL + 0,3% Sep.
HBR

vzorka č. 1: 3% CHIT s prísadou: 15% PG + 0,3% Sep.
HBR + 1% ALA

vzorka č. 2: 2,5% HPC s prísadou: 5% PG + 0,3% Sep.
HBR + 1% ALA

vzorka č. 3: 3% HEC s prísadou: 10% GL + 0,3% Sep.
HBR + 1% ALA

Liberácia liečiva alaptidu z hydrogélův

Liberácia liečiva z hydrogélův sa sledovala a hodnotila podľa postupu uvedeného v práci ¹³⁾ po 15, 30, 45, 60, 90, 120 a 180 min. Obsah liečiva – alaptidu sa stanovil spektrofotometricky pri $\lambda = 220$ nm.

Stanovenie tokových vlastností

Reologické vlastnosti hydrogélův sa stanovili po 2, 7, 14 dňoch po príprave hydrogélův podľa práce ¹³⁾.

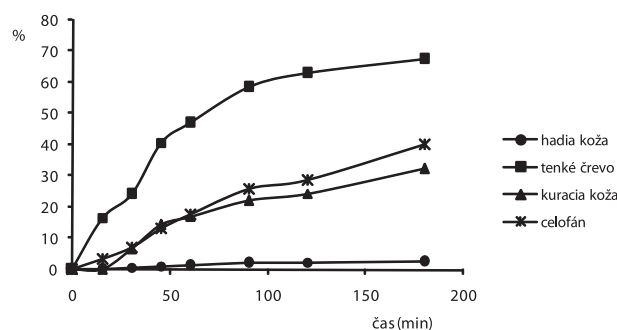
Stanovenie pH gélův

pH sa meralo po 2, 7, 14 dňoch po príprave hydrogélův na pH-metri, ktorý bol kalibrovaný dvoma referenčnými tlmivými roztokmi – fitalanovým o pH $4 \pm 0,02$ a boritanovým o pH $9 \pm 0,02$ pri $20 \pm 0,2$ °C.

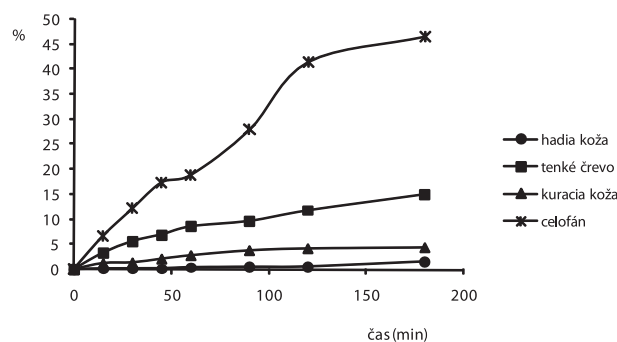
VÝSLEDKY

Z literatúry je známe, že k ľudskej koži najbližšie stojí prasacia, pokiaľ ide o jej zloženie ¹⁴⁾. V našich experimentoch sme mali k dispozícii hydrofilnú membránu a zo zvieračích membrán: prasacie tenké črevo, kuraciu a hadiu kožu. Naším cieľom bolo zistiť, ako ovplyvnia uvoľňovanie alaptidu z gélu a jeho permeáciu cez membrány.

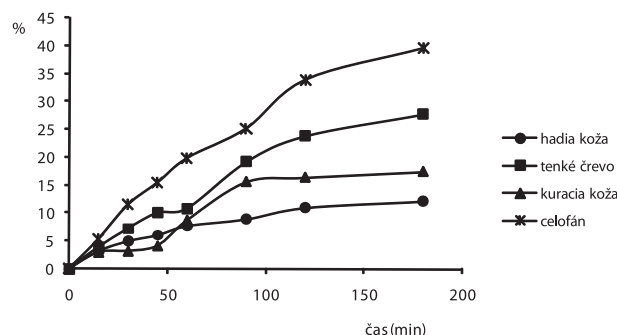
Liberácia alaptidu z 3% CHIT hydrogélův s obsahom 15% PG sa merala po 2. dňoch cez hadiu kožu, tenké črevo, kuraciu kožu a celofán. Z obrázku 2, ktorý zobrazuje priebeh liberácie ALA z týchto hydrogélův cez spomínané membrány vidieť, že najväčšie množstvo ALA (67,43 %) sa uvoľnilo cez tenké črevo. Najmenšie množstvo ALA (2,69 %) sa uvoľnilo cez hadiu kožu. Keďže zvlčená hadia koža je vrstva odumretých keratinocytov,



Obr. 2. Liberačný profil alaptidu z 3% CHIT hydrogélův s obsahom 15% PG + 0,3% Sep. HBR namerané po 2. dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán



Obr. 3. Liberačný profil alaptidu z 2,5% HPC hydrogélův s obsahom 5% PG + 0,3% Sep. HBR namerané po 2. dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán



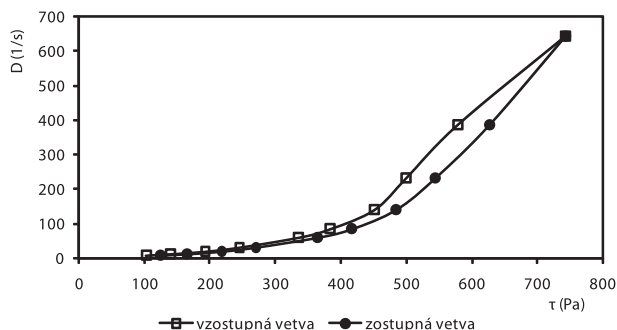
Obr. 4. Liberačný profil alaptidu z 3% HEC hydrogélův s obsahom 10% GL + 0,3% Sep. HBR namerané po 2. dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán

ktoré majú podobne ako v ľudskej koži len malú permeabilitu pre liečivá, vysvetľuje sa tým aj najmenšie uvoľnené množstvo ALA v porovnaní s ostatnými použitými biologickými membránami.

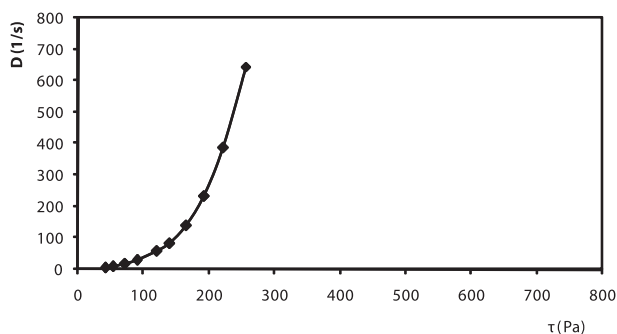
Na obrázku 3 je liberačný profil alaptidu z 3% HPC hydrogélův s obsahom 5% PG, merala sa po 2. dňoch cez rovnaké druhy permeačných membrán ako pri predchádzajúcom hydrogélův. Z obrázku 3 vidieť, že najväčšie množstvo ALA (46,61 %) sa opäť uvoľnilo cez celofán, z biologických membrán najviac ALA do akceptorového roztoku prepustilo tenké črevo (15,10 %) a najmenej hadia koža (1,67 %).

Obrázok 4 zobrazuje uvoľnené množstvá alaptidu z 3% HEC hydrogélův s obsahom 10% GL namerané po 2.

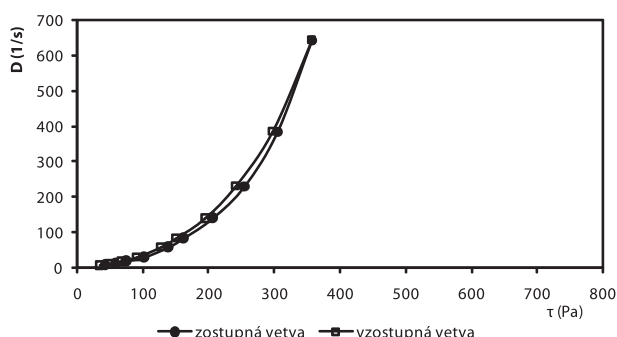
dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán. Najmenej priepustná pre ALA bola hadia koža (uvolnilo sa len 12,12 % ALA), najlepšiu priepustnosť z biologických membrán malo tenké črevo, cez ktoré sa uvolnilo 27,72 %



Obr. 5. Reogram 3% CHIT hydrogél s obsahom 15% PG + 1% ALA + 0,3 % Sep. HBR (po 2. dňoch)



Obr. 6. Reogram 2,5% HPC hydrogél s obsahom 5% PG + 1% ALA + 0,3% Sep. HBR (po 2. dňoch)



Obr. 7. Reogram 3% HEC hydrogél s obsahom 10% GL + 1% ALA + 0,3% Sep. HBR (po 2. dňoch)

ALA.

Okrem liberácie liečiva sa v práci hodnotili reologické vlastnosti pripravených hydrogélů. V prípade hydrogélů na báze HPC bol zistený pseudoplastický charakter sústavy (obr. 6). Hydrogély na báze CHIT (obr. 5) a HEC (obr. 7), ktoré obsahovali ALA, vykazovali výraznejší tixotropný charakter sústav v porovnaní s ich príslušnými blankami. Na základe tohto faktu sa dá predpokladať, že alaptid zvyšuje mieru tixotropie v hydrogélůch. Ďalšími meraniami sa zistilo, že miera tixotropie sa časom zväčšovala.

Z hľadiska problematiky pH – vzorka (č. 3) hydrogélů zloženia: 3% HEC s prísadou: 10% GL + 0,3% Sep. HBR + 1% ALA dosahovala hodnoty (5,8) zodpovedajúce fyziologickým hodnotám pH kože a to aj po 14. dňoch po príprave. V prípade hydrogélů (vzorka č. 2) 2,5% HPC s prísadou: 5% PG + 0,3% Sep. HBR + 1% ALA sa hodnoty pH pohybovali v rozmedzí 4,3–4,4. Podobné hodnoty pH dosahoval i hydrogél (vzorka č. 1) zloženia 3% CHIT s prísadou: 15% PG + 0,3 % Sep. HBR + 1% ALA (tab. 1). Nakoľko nízke hodnoty pH by mohli spôsobovať podráždenie postihnutého miesta, preto ich prípadné využitie v praxi nie je vhodné, aj keď množstvo uvoľneného alaptidu bolo porovnateľné s ostatnými hydrogélmi.

Počas skladovania u vzoriek s alaptidom, ani u blankov nedochádzalo k významnému poklesu alebo zvýšeniu viskozity. Z toho vyplýva, že použitý konzervant Sepicide HBR bol účinný a počas doby trvania experimentov zabránil mikrobiálnej kontaminácii, vplyvom ktorej by sa mohla radikálne zmeniť viskozita.

Na základe výsledkov merania bol celkovo vyhodnotený hydrogél (vzorka č. 3) zloženia: 3% HEC s prísadou: 10% GL + 0,3% Sep. HBR + 1% ALA ako najvhodnejší pre formuláciu liečiva. Hodnoty pH zodpovedali fyziologickým hodnotám kože a to i po 14 dňoch po príprave. Z hľadiska liberácie sa uvoľnilo z tohto gélu najvyššie percento alaptidu. Pri porovnaní reologických vlastností gélov, dosahoval gél tohto zloženia žiaduci tixotropný charakter, ktorý s časom narastol.

Zo získaných výsledkov možno konštatovať, že z hľadiska uvoľňovania a permeácie alaptidu cez membránu je najvhodnejšia membrána – tenké črevo. V prípade ďalších membrán boli rozdiely výsledkov vysoko štatisticky významné (nízka permeácia alaptidu).

Výskum bol podporený grantom VEGA č. 1/0024/11 a FaF UK č. 2/2011

Tab. 1. Výsledky pH merania na 2., 7. a 14. deň po príprave gélov

pH	vzorka č. 1	blank č. 1	vzorka č. 2	blank č. 2	vzorka č. 3	blank č. 3
2. deň	4,58	4,47	4,33	4,44	5,78	5,88
7. deň	4,60	4,47	4,38	4,42	5,77	5,90
14. deň	4,61	4,49	4,40	4,41	5,78	5,89

LITERATÚRA

1. **Attwood, D., Florence, A. T.:** Physical Pharmacy. London: Pharmaceutical Press 2008; 86, 88, 98, 99, 109-110, 111-112, 115, 137, 146.
2. **Park, J. H., Lee, J. W., Kim, Y. C., Prausnitz, M. R.:** The effect of heat on skin permeability. *Int. J. Pharm.* 2008; 359 (1-2), 94-103.
3. **Owen, D. H., Peters, J. J., Lavine, M. L., Katz, D. F.:** Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. *Contraception* 2003; 67 (1), 57-64.
4. **Bronaugh, R. L., Maibach, H. I.:** Topical absorption of dermatological products. New York: Marcel Dekker, Inc Portions. 2001; 291, 317-318, 459, 516.
5. **Gallagher, S. J., Trotter, L., Heard, C. M.:** Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness. *Int. J. Pharm.* 2003; 268 (1-2), 37-45.
6. **Galaev, I., Mattiasson, B.:** Smart polymers, Applications in Biotechnology and Biomedicine. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2008; 99, 101, 177-178, 204-205, 301, 367-370, 408, 428.
7. **Nedvídková, J., Kasafirek, E., Nedvídek, J., Pacák, K., Schreiber, V.:** An analog of MIF, alaptide: effect on serum prolactin, dopamine receptors and growth of rat adenohypophysis. *Endocrine Res.* 1994; 20(1), 39-46.
8. **Jakubke, H. D., Sewald, N.:** Peptides from A to Z Concise Encyclopedia. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2008; s. 217, 315.
9. Metodika řešení struktur organických látek z práškových dat. www.vscht.cz/.../Metodika_reseni_struktur_organickych_latek_uloha33a.doc [cit. 24-02-2011].
10. http://www.bioveta.sk/sortiment_dermatologika_alaptid.html [cit. 24-02-2011].
11. **Senel, S., McClure, S. J.:** Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanc. drug deliv. Rev.* 2004; 56(10), 1467-1480.
12. **Boucard, N. a kol.:** The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* 2007; 28(24), 3478-3488.
13. **Vitková, Z., Herdová, P., Šubová, M., Šimunková, V.:** Formulácia chlórhexidínu do hydrogélů. *Čes. slov. Farm.* 2009; 58(3), 116-118.
14. **Kurihara-Bergstrom, T., Woodworth, M., Feisullin, S., Beall, P.:** Characterization of the Yucatan miniature pig and small intestine for pharmaceutical applications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3773450> [cit. 24-02-2011].

KNIHY

Lacinová, L., Uhríková, D.: **Biofyzika napětovo závislých ionových kanálů.** Univerzita Komenského, Bratislava, 2010, 62 s. ISBN 978-80-223-2889-00.

Na Farmaceutickej fakulte Univerzity Komenského (FaF UK) v Bratislave už niekoľko rokov si môžu študenti vybrať voliteľný predmet Biofyzika napätovo závislých membránových kanálů, ktorý zabezpečuje Katedra fyzikálnej chémie liečiv FaF UK.

V ostatnom čase bol pre tento predmet vypracovaný základný učebný text. Jeho autorkami sú pani RNDr. Ľubica Lacinová, DrSc. a doc. RNDr. Daniela Uhríková, CSc.

V jeho úvode je konzistentne vysvetlená štruktúra a funkcia biologických membrán, v nadväznosti je interpretovaná problematika napätovo závislých ionových kanálů a spôsoby ich merania, vysvetľujú sa princípy fixácie napätia a prúdu a metódy izolácie jednotlivých prúdov.

Ďalšia časť učebného textu je venovaná napätovo závislým sodíkovým kanálom, ich ovplyvňovaniu jedno-

tlivými liečivami a ochoreniam spôsobenými mutáciami génov.

V nadväznosti ďalej sú stručne popísané aspekty napätovo závislých vápnikových kanálů a ochoreniam, ktoré sú s nimi spojené.

Záver učebného textu tvorí problematika draslíkových kanálů, od vápnika závislých draslíkových kanálů a hyperpolarizáciu aktivované cyklickými nukleotidmi modifikované kanály a ich farmakologické a patofyziologické aspekty.

Celý učebný text je napísaný koncízne, stručne a jasne. Doplnia ho 40 veľmi názorných obrázkov, ktoré ilustrujú najdôležitejšie partie učebnej matérie.

Vydanie tohto textu považujem za výborný edičný čin, pretože vhodnou formou doplnia základné a profilové predmety farmaceutického štúdia. Je vhodným úvodom do štúdia dynamicky rozvíjajúcej sa problematiky, ktorá zohráva v našom poznaní vzťahu liečivo a choroba čoraz dôležitejšiu úlohu.

J. Čižmárik