

Vplyv membrán na permeáciu alaptidu z hydrogélov

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 hydrogélov

Predmetom príspevku je hodnotenie liberácie liečiva alaptidu z gélov a jeho permeácia cez rôzne typy permeačných membrán. Pripravili sa gely na báze troch rôznych polymérov (3 % chitosan; 2,5 % hydroxypropylcelulóza; 3 % hydroxyethylcelulóza) v rôznej koncentrácií s prísadou humaktantov (5 %; 15 % propylénglykol a 10 % glycerol) a konzervantu 0,3 % Sepicide HBR a liečiva 1 % alaptid a gely 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 hydrogélov. Pseudoplastický tok bol zistený iba v prípade hydrogélu na báze hydroxypropylcelulózy. Naopak to bolo pri hydrogéloch na báze chitosanu a hydroxyethylcelulózy, 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 nevhovujúce, nakoľko dosahovali nižšie hodnoty pH a mohli by spôsobiť podráždenie pokožky. Fyziologickým hodnotám pH kože zodpovedal hydrogel na báze hydroxyethylcelulózy a to i po 14. dňoch po príprave.

Kľúčové slová: alaptid – hydrogel – 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 pseudoplastastic 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

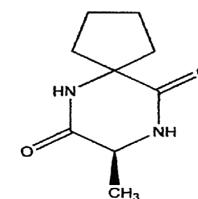
Podanie liečiv cez kožu má niekoľko výhod. Sú to napríklad:

- 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 portálному obehu;
- konštantný a kontinuálny prívod liečiv;
- kontrolované množstvo prívodu liečiv môže znížiť nárazový výskyt nežiaducích 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, teplota²⁾, pH³⁾, koncentrácia liečiva¹⁾ 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 zahustovania základu k znižovaniu absorpcie liečiva kožou⁵⁾. 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, konkrétnie musí byť biokompatibilné, chemicky, mikrobiologicky a fyziálne stabilné, musí mať schopnosť pohotovo uvoľniť liečivo do stratum corneum a byť kozmeticky prijateľné⁴⁾.

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 vyrobene proteíny majú dokonca lepsie 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 vedla k vývoju proteínových polymérov, ktoré aj napriek tomu, že sú peptidovej, resp. proteínovej povahy, sú biokompatibilné a imunitný systém ich nedeteguje⁶⁾.

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 amidu⁷⁾, analóg melanostatínu (inhibítora melanokortín-stimulujúceho hormónu, ktorý je súčasťou fyziologického melanokortinového 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 alaptidu⁹⁾

V súčasnej terapeutickej praxi sa používa lokálne vo forme 2% masti, stimuluje rast granulačného tkaniva, urýchľuje epithelizačný proces a priebeh hojenia rán. Je indikovaný na lokálne ošetroenie kožných a slizničných lézií - popálenín, odrenín, omrzlin, dekubitov, vredov, pooperačných rán, postkastračných sutur a chronických recidivujúcich poranení a poleptaní od solí¹⁰⁾.

Rovnako ako aj v humánnej medicíne, aj vo veterinárnej sa čoraz viac začína uplatňovať biopolymér chitosan ako nosič rôznych druhov liečiv (napr. antibiotika, antiparazitika, anestetika, analgetika)¹¹⁾. Okrem toho bolo experimentmi na zvieratách dokázané, že chitosanové gely vyvolávajú migráciu zápalových buniek a podporujú tvorbu nového tkaniva, čím sa urýchľuje proces hojenia a regenerácie¹²⁾.

POKUSNÁ ČASŤ

Použité chemikálie

Alaptid (ALA) – v mikronizovanej forme (Výzkumný ústav pro farmaci 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); hydroxyethylcelulóza – 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, ethylhydroxybenzoát, nátriummetylparabenát a propylparabén vo fenoxyetanole).

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 aparátura – vyrobenná 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), zvlečená hadia koža – dodal súkromný chovateľ hada užovky červenej (*Elaphe guttata*).

Zloženie hydrogélov

Pripávali sa gely 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 hydrogélov

Liberácia liečiva z hydrogélu sa sledovala a hodnotila podľa postupu uvedeného v práci¹³⁾ 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 hydrogélov sa stanovili po 2, 7, 14 dňoch po príprave hydrogélov podľa práce¹³⁾.

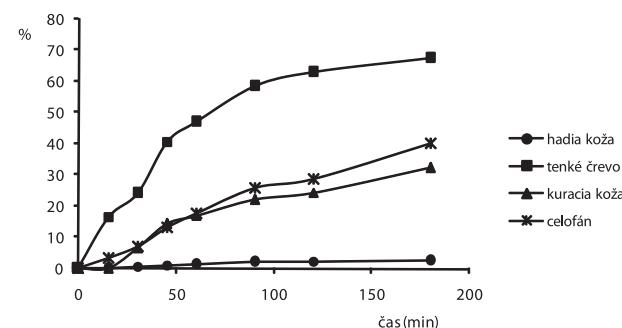
Stanovenie pH gélov

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

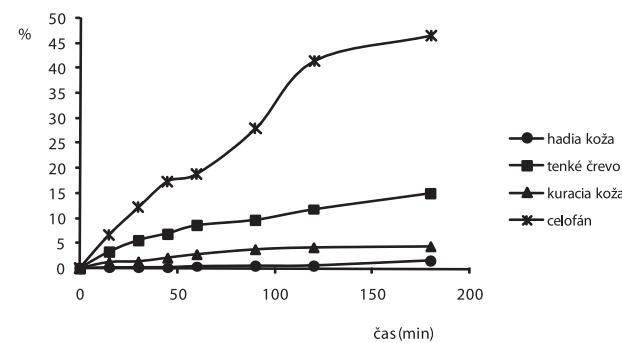
VÝSLEDKY

Z literatúry je známe, že k ľudskej koži najbližšie stojí prasacia, pokiaľ ide o jej zloženie¹⁴⁾. V našich experimentoch sme mali k dispozícii hydrofilnú membránu a zo zvieracích membrán: prasacie tenké črevo, kuraciu a hadiu kožu. Našim cieľom bolo zistiť, ako ovplyvnia uvoľňovanie alaptidu z gélu a jeho permeáciu cez membrány.

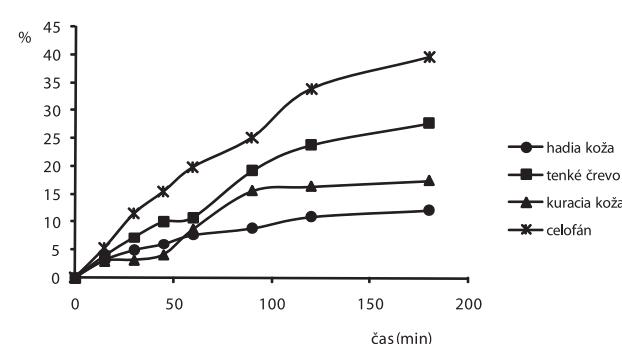
Liberácia alaptidu z 3% CHIT hydrogélov s obsahom 15% PG sa merala po 2. dňoch cez hadiu kožu, tenké črevo, kuraciu kožu a celofán. Z obrázku 2, ktorý zobrazuje priebeh liberácie ALA z týchto hydrogélov cez spomínané membrány vidieť, že najväčšie množstvo ALA (67,43 %) sa uvoľnilo cez tenké črevo. Najmenšie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



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



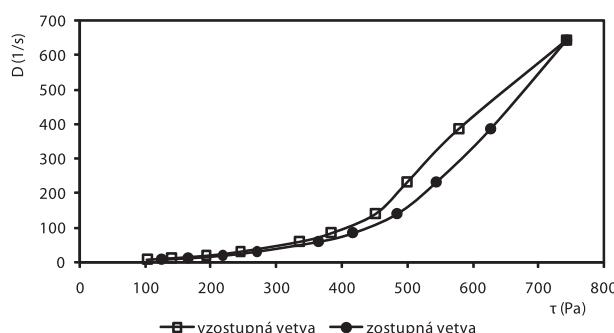
Obr. 4. Liberačný profil alaptidu z 3% HEC hydrogéloch s obsahom 10% GL + 0,3% Sep. HBR namerané po 2. dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán

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.

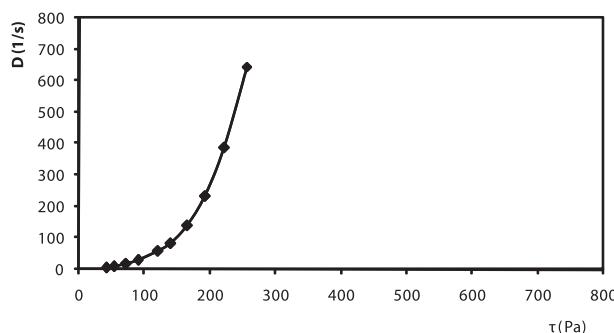
Na obrázku 3 je liberačný profil alaptidu z 3% HPC hydrogélov s obsahom 5% PG, merala sa po 2. dňoch cez rovnaké druhy permeačných membrán ako pri predchádzajúcom hydrogéle. Z obrázku 3 vidieť, že najväčšie množstvo ALA (46,61 %) sa opäť uvoľnilo cez celofán, z biologických membrán najviac ALA do akceptorového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

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

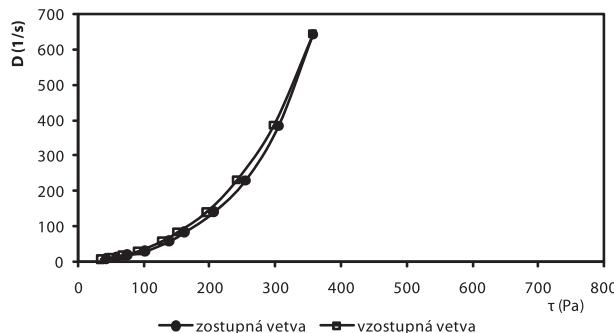
dňoch cez rôzne druhy permeačných membrán. Najmenej priepustná pre ALA bola hadia koža (uvoľnilo sa len 12,12 % ALA), najlepšiu priepustnosť z biologických membrán malo tenké črevo, cez ktoré sa uvoľnilo 27,72 %



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



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



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

ALA.

Okrem liberácie liečiva sa v práci hodnotili reologické vlastnosti prípravených hydrogélov. V prípade hydrogélu 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 hydrogéloch. Ďalšími meraniami sa zistilo, že miera tixotropie sa časom zväčšovala.

Z hľadiska problematiky pH – vzorka (č. 3) hydrogélu 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 hydrogélu (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 hydrogel (vzorka č. 1) zloženia 3% CHIT s prísadou: 15% PG + 0,3 % Sep. HBR + 1% ALA (tab. 1). Nakolko nízke hodnoty pH by mohli spôsobiť podráždenie postihnutého miesta, preto ich prípadné využitie v praxi nie je vhodné, aj keď množstvo uvoľneného alaptidu bolo porovnatelné s ostatnými hydrogélmami.

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 hydrogel (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.

Z 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 štatistiky 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., Trottet, 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 hydrogélov. 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 napäťovo závislých iónových kanálov**. 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 napäťovo závislých membránových kanálov, ktorý zabezpečuje Katedra fyzikálnej chémie liečiv FaF UK.

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

V jeho úvode je konzistentne vysvetlená štruktúra a funkcia biologických membrán, v nadväznosti je interpretovaná problematika napäťovo závislých iónových kanálov a spôsoby ich merania, vysvetľujú sa princípy fixácie napäťia a prúdu a metódy izolácie jednotlivých prúdov.

Ďalšia časť učebného textu je venovaná napäťovo závislým sodíkovým kanájom, ich ovplyvňovaniu jedno-

tlivými liečivami a ochoreniam spôsobenými mutáciami génov.

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

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

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

Vydanie tohto textu považujem za výborný edičný čin, pretože vhodnou formou dopĺňa 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