

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

DEXTRANY JAKO PERMEAČNÍ MARKERY A NOSIČE PRO ORÁLNÍ TRANSMUKOSÁLNÍ PODÁNÍ LÉČIV

PAVEL BERKA^{a,b}, KAREL BERKA^c
a PAVEL DOLEŽAL^a

^a Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Ak. Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, ^b InStar Technologies a.s., Mrštíkova 399/2a, 460 07 Liberec, ^c Katedra fyzikální chemie, RCPTM, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
pavel.dolezal@faf.cuni.cz

Došlo 16.9.19, přepracováno 5.2.20, přijato 3.3.20.

Klíčová slova: dextransy, sublingvální podání, poloměr gyrace, nosiče léčiv

Úvod

Dextransy patří mezi vysoce biokompatibilní, netoxické, neimunogenní makromolekulární látky. Dlouho byly považovány za kontaminanty při zpracování cukru a jiné potravinářské výrobě. Jako zvláštní substance vznikající činností mikrobů byl dextrans poprvé identifikován Loui-sem Pasteurem jako mikrobiální produkt ve víně¹. Jedná se o D-glukosyl-homopolysacharidy, které mají α -1,6-glukosidické vazby, liší se molekulovou hmotností, prostorovým

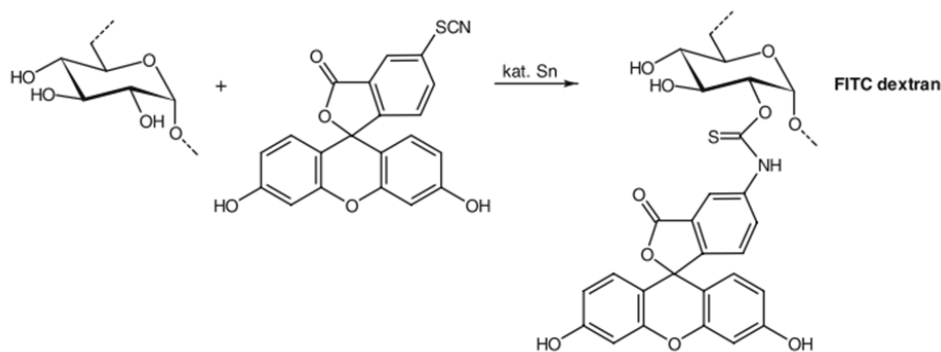
uspořádáním, typem a stupněm větvení a délkou větvených řetězců. V závislosti na mikrobiálních produkčních kmenech a kultivačních podmínkách jsou dextransy různě větveny prostřednictvím vazeb α -(1→2), α -(1→3) a α -(1→4) a podle toho klasifikovány do dalších podskupin na dextransy typu A, typu B (alternany) a typu C (mutany).

Dextransy jsou syntetizovány ze sacharosy různými bakteriemi rodu *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Streptococcus* z čeledi *Lactobacillaceae*². Dextransy jsou hydrofilní, ve vodě rozpustné rozvětvené polysacharidy složené z glukosových jednotek (polyglukany)³. V hlavním řetězci těchto makromolekul jsou hexosové jednotky spojeny vazbou α -(1→6) a boční větve jsou připojeny vazbami α -(1→3) (cit.²). Komerčně jsou běžně dostupné dextransy s průměrnou molekulovou hmotností 1 až 2000 kDa.

Nedocenitelné služby poskytují fluorescenčně značené dextransy různých molekulových hmotností s různými substituenty, které jsou v široké škále komerčně dostupné. Fluorescein isothiokyanát dextrans (FITC-dextrans) se v tomto odvětví výzkumu dobře zavedl již od 70. let 20. století. Isothiokyanátová skupina fluoresceinu se kovalentně váže na dextrans za vzniku nízko substituovaného FITC-dextransu (stupeň substituce 0,004–0,01), viz obr. 1.

V lékařství jsou dextransy využívány pro své antitrombotické vlastnosti. Dextransy snižují agregaci erytrocytů a adhezivitu krevních destiček⁵. Větší molekuly pak uplatňují své osmotické vlastnosti a využívají se k léčbě hypovolémie, v současnosti jsou však nahrazovány hydroxyethylškrobem.

Dextransy s molekulovou hmotností 40, 60 a 70 kDa (označované jako dextrans 40, 60 a 70) v 6 nebo 10 % vodných roztocích jsou v současné době používány pro náhradu mírných ztrát krve. Hydrofilní polymer v podstatě nahrazuje krevní proteiny, např. albuminy, ve smyslu zvýše-



Obr. 1. Příprava fluorescenčně značených dextransů (FITC-dextransy) pomocí fluorescein isothiokyanátu⁴

ní či udržení koloidního osmotického tlaku potřebného pro bilanční rovnováhu tekutin intersticiálního prostoru a plasmu. Vzhledem k nízké antigenicitě a vysoké rozpustnosti ve vodě je pro klinické použití vhodný dextran produkovaný linií Lm NRRL B-512. Vysoké procento glykosidických vazeb α -(1→6) v dextranech je zodpovědné za biologickou stabilitu v krevním oběhu člověka⁴.

Antitrombotický účinek dextranů se využívá při profylaktické léčbě hluboké žilní trombózy a pooperační plicní embolie. Dextran 40 zlepšuje průtok krve, což je pravděpodobně způsobeno snížením viskozity krve a inhibicí agregace erytrocytů.

Dextran 70 je na seznamu esenciálních léčiv WHO⁶. Dextrany se také využívají v očních kapkách jako lubrikant a pro stabilizaci některých iontů v infuzních roztocích⁴. Přítomnost dextranu ve vodných roztocích napomáhá udržet příznivé fyziologické prostředí v důsledku koloidního osmotického tlaku. Proto se používají při uchování životaschopných orgánů např. pro transplantace a jako složky pro oční formulace⁴.

Díky jejich farmakokinetickým vlastnostem a současně velkému počtu volných hydroxylových skupin, které mohou být snadno konjugovány s léčivými (včetně peptidů a proteinů), a to jednak přímo nebo pomocí linkeru, jsou dextrany považovány za ideální nosiče pro systémovou aplikaci léčiv s možností cílení na specifická místa účinku jak pasivně, tak aktivními mechanismy^{4,7}. Výhodou dextranů je jejich již zmíněná biokompatibilita a biodegradabilita⁸.

Vazbou na dextran lze dosáhnout různých vylepšení vlastností léčiva, např. zvýšení rozpustnosti (např. u oxytocinu⁹), zvýšení vychytávání v lymfatických uzlinách (bleomycin¹⁰), zvýšení terapeutického účinku (isometamidium¹¹), snížení nefrotoxicity (gentamicin¹²), cílení do jater (acyclovir¹³), zvýšení analgetického a antipyretického účinku při současném snížení ulcerogenicity (flurbiprofen a suprofen¹⁴) a snížení hepatotoxicity a ulcerogenicity (valproát¹⁵). Vazbou enzymů na dextran lze zvýšit jejich stabilitu při fyziologickém pH i jejich termální stabilitu, prodloužit jejich biologický poločas a snížit riziko výskytu alergických reakcí při opakovaném podání¹⁶. Od sedmdesátých let minulého století byly zkoumány konjugáty dextranů s různými léčivými. Nejvíce příkladů by se pravděpodobně našlo ve výzkumu protinádorových léčiv: antracyklin doxorubicin^{17,18}, protilátky^{19,20}, ara-C (cit.²¹), asparaginasa²², methotrexát²³, mitomycin C (cit.²⁴), cisplatina²⁵, magnetické nanočástice pro léčbu nádorů pomocí hypertermie²⁶, radionuklidy ¹²⁵I (cit.²⁷) a ^{99m}Tc (cit.²⁸). Ukazuje se tedy, že dextrany mají mnoho využití, které se navíc po úpravách dají nadále rozšířit.

Dextrany byly také testovány jako nosiče použitelné pro oromukosální podání léčiv. Již Tolo a Jonsen v roce 1975 zjistili, že přes králičí orální mukózu *in vitro* prochází radioaktivně značené dextrany až do velikosti 70 kDa (cit.²⁹). Většina následujících měření v oblasti ústní dutiny se prováděla na bukálních membránách. Hoogstraate a spol. zkoumali průnik FITC-dextranu 4,4 kDa (FD4) přes prasečí bukální sliznici *in vivo*, s glykodeoxycholátem sodným jako enhancerem, resp. urychlovačem³⁰. Bukální

Tabulka I

Přehled hodnot zdánlivého permeabilního koeficientu P_{app} přes sublingvální a bukální membrány

M_w [kDa]	R_g [nm]	P_{app} [cm s^{-1}]	$\log P_{app}$	Membrána	Zprac.	Lit.
3,3	1,9	$3,22 \pm 1,04 \cdot 10^{-8}$	-7,49	SL	Z	tato práce
16,8	4,1	$2,02 \pm 0,65 \cdot 10^{-8}$	-7,69	SL	Z	tato práce
38,5	6,1	$6,40 \pm 3,34 \cdot 10^{-9}$	-8,19	SL	Z	tato práce
16,8	4,1	$6,90 \pm 11,4 \cdot 10^{-9}$	-8,16	SL	Č	35
16,8	4,1	$3,80 \pm 4,80 \cdot 10^{-9}$	-8,42	SL	ŠZ	35
70	8,0	$1,52 \pm 0,89 \cdot 10^{-10}$	-9,82	SL	Č	35
70	8,0	$2,41 \pm 1,51 \cdot 10^{-10}$	-9,62	SL	ŠZ	35
4,4	2,2	$8,0 \pm 5,0 \cdot 10^{-8}$	-7,10	BUK	Č	31
12	3,5	$5,0 \pm 3,0 \cdot 10^{-9}$	-8,30	BUK	Č	31
19,6	4,4	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-9}$	-9,00	BUK	Č	31
4,4	2,2	$1,12 \pm 0,69 \cdot 10^{-8}$	-7,95	BUK	Č	32
9,4	3,2	$2,96 \pm 2,07 \cdot 10^{-8}$	-7,53	BUK	Č	32
20	4,5	$< 5 \cdot 10^{-10}$	< LOD	BUK	Č	32
40	6,2	$< 5 \cdot 10^{-10}$	< LOD	BUK	Č	32

SL = prasečí sublingvální membrána, BUK = prasečí bukální membrána; LOD = detekční limit, Z = zmražená, Č = čerstvá, ŠZ = šokově zmražená

podání 200 μl 20 mM roztoku FD4 v „Hill Top komůrce“ vedlo v průběhu 4 hodin k hodnotám absolutní biologické dostupnosti na úrovni 1,8 %. Současné podávání 10 mM (0,45 % *m/v*) glykodeoxycholátu zvýšilo biologickou dostupnost FD4 až na 12,7 %. Po aplikaci bylo pozorováno rychlé dosažení ustáleného stavu, který trval až do odstranění permeační komůrky ze sliznice. Nielsen a spol.³¹ nechali procházet FITC-dextrany o různé velikosti (4 kDa až 40 kDa) přes prasečí bukální sliznici *in vitro*. Hodnoty zdánlivého permeačního koeficientu P_{app} přes prasečí bukální sliznici *in vitro* lineárně klesaly (tab. I) s rostoucí molekulovou hmotností FITC-dextranu. Junginger a spol.³² měřili průnik FITC-dextranů 4,4, 9,4, 19,6 a 35,6 kDa přes prasečí bukální sliznici *in vitro*. Hodnoty permeačního koeficientu FD4 činily $1,12 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ a signifikantně se nelišily od hodnot $2,96 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ pro FD10; pro FD20 a FD40 byly naměřené hodnoty pod detekčním limitem $0,05 \cdot 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$. Konfokální mikroskopie ukázala, že FITC-dextrany FD4 a FD10 procházejí přes bukální sliznici hlavně paracelulární cestou.

S ohledem na nízkou permeabilitu zvláště větších dextranů je několik autorů používalo jako marker integrity membrány. Nicolazzo a spol.³³ při pokusech s permeací kofeinu a estradiolu přes různě zpracované membrány používali jako marker integrity FD20. Tento FITC-dextran použili také Goswami a spol.³⁴ při studii průchodu různě velkých polyethylenglykolů jako markeru integrity sublingválních a bukálních prasečích membrán. Membránu považovali za porušenou, pokud prošlo více než 0,6 % FD20 za hodinu.

Lze tedy shrnout, že permeabilita dextranů přes neporušené membrány dutiny ústní je velikostně limitována, což z nich činí dobrý marker integrity těchto membrán i pro permeabilitní pokusy s menšími látkami. Dokonce i nejmenší námi zvolený FD4 prochází bukálními membránami jen obtížně, byť se jeho podání dá zlepšit pomocí urychlovačů.

V této práci jsme se zaměřili na využití dextranů k proměření a vyhodnocení permeačních charakteristik čerstvé a zmrazené prasečí sublingvální membrány jako možného standardu pro preklinické hodnocení orálně podávaných transmukozálních léčiv. Návazně uvádíme pro počet toho, jak by sublingvální permeace dextranů mohla kvantitativně vyznít z hlediska systémového podání či přenosu léčiv.

Experimentální část

Materiál

Fluorescein isothiokyanát (FITC)-dextrany: FD4 ($M_w = 3,3 \text{ kDa}$); FD20 ($M_w = 16,8 \text{ kDa}$); FD40 ($M_w = 38,5 \text{ kDa}$) a FD70 ($M_w = 70 \text{ kDa}$) (Sigma Aldrich, ČR), chlorid sodný (Dr. Kulich Pharma, ČR), kyselina fosforečná, hyd-

rogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný (Penta Chemicals, ČR), azid sodný (Chemapol, ČR), čištěná voda (FaF UK, Hradec Králové, ČR), čerstvé prasečí jazyky (Maso Planá, ČR).

Příprava sublingválních membrán

Proužky membrán sublingvální sliznice byly získány ze spodní části čerstvých prasečích jazyků (*Sus scrofa*, var. *domestica*). Po euthanasii zvířete (směsí oxidu uhličitého se vzduchem) byly neporušené vyříznuté jazyky opatrně osprchovány a opláchnuty vlažnou vodou (36 až 38 °C), uloženy do plastových sáčků a zchlazeny na 4 až 6 °C. Z jatek do laboratoře FaF UK byly transportovány přibližně 3 hodiny v mobilním chladicím boxu (2 až 8 °C).

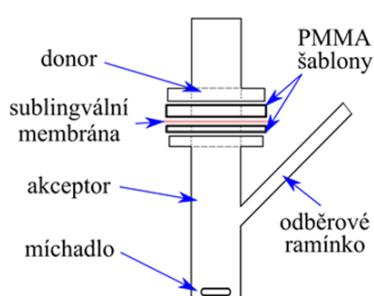
Většina svalové tkáně byla poté odstraněna pomocí skalpelu, nůžek a pinsety. Výsledná cca 2 mm silná membrána se zbytky svaloviny byla ponořena na cca 20 min do zchlazeného (4 až 6 °C) fyziologického roztoku s přísadkou 0,002 % azidu sodného (pro konzervaci a fixaci proteinových struktur). Plátky sliznice byly poté jemně chirurgickým skalpelem zbaveny zbývající svaloviny a částečně i submukózy. Takto připravené sublingvální membrány měly tloušťku cca 0,4 až 0,6 mm. Zpracované membrány byly opět krátce uloženy ve fyziologickém roztoku s přísadkou 0,002 % azidu sodného a buď ihned použity pro testování s označením „čerstvé“ (Č), kdy od usmrcení donoru do začátku permeačního experimentu uplynulo maximálně 8 hodin, nebo byly zamraženy.

Membrány, které pro permeační experimenty nebyly ihned využity, byly zpracovány a uchovávány dvěma způsoby. Buď byly po osušení a zatavení do plastového sáčku uloženy do mrazicího boxu (–15 až –25 °C), v něm pomalu zamraženy a uchovány a označovány jako „zmražené“ (Z), nebo byly po osušení uloženy do plastového sáčku, ponořeny na 1 minutu do tekutého dusíku (–180 °C) a poté uloženy do mrazicího boxu (–15 až –25 °C) a označovány jako „šokově zmražené“ (ŠZ).

Permeační *in vitro* experimenty

Po uchycení membrán v permeačních celách a doplnění akceptorové fáze byly membrány teplotně a hydratačně ekvilibrovány 15 minut v termostatané lázni (obr. 2). Jako akceptorová fáze byl použit izotonizovaný fosfátový pufr o pH 7,4, který byl stále promícháván magnetickým míchadlem a temperován na vodní lázni při $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Plocha slizniční membrány přístupná pro permeaci činila 1 cm^2 .

Testování permeace dextranů bylo prováděno s disperzemi příslušných dextranů (FD4, FD20, FD40 nebo FD70) ve fosfátovém pufru o pH 6,8. Vzorky akceptorové fáze (0,6 ml) byly odebírány v předem stanovených časových intervalech v průběhu 24 hodin a vždy doplňovány čerstvým pufrům. Odebrané vzorky byly před analýzou



Obr. 2. Schéma Franzovy difuzní cely a sestava Franzových permeačních cel ve vodní lázni

uchovávány v lednici (2 až 8 °C). Pokusy byly opakovány minimálně 3krát.

Stanovení FITC-dextranů

Stanovení fluorescenčně značených dextranů bylo provedeno na spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2 (ThermoFisher, USA). Excitační vlnová délka byla nastavena na 419 nm, emisní vlnová délka na 529 nm. Kalibrační standardy dextranů byly rozpuštěny v akceptorovém pufru o pH 7,4.

Zpracování naměřených dat

Primární naměřená data z permeačních experimentů získaná ze spektrofluorimetrického stanovení byla dále korigována na odebrané a nahrazené objemy akceptorové fáze v šabloně v programu MS Excel. Korigovaná data byla přepočtena na množství množství permeantu, které v daném čase prošlo přes 1 cm² sublingvální mukózy. Takto upravená data byla otestována na přítomnost odlehlých hodnot pomocí Deanova-Dixonova Q-testu. Kumulativní množství permeantu, které prošlo přes sublingvální membránu v čase, bylo vyneseno do grafu, byla nalezena lineární část křivky a proložena přímkou.

Zdánlivý permeační koeficient P_{app} byl vypočítán podle vzorce:

$$P_{app} = (dQ/dt) / (C_0 \cdot A) \quad (1)$$

kde dQ/dt je směrnice lineární části kumulativní křivky, C_0 je počáteční koncentrace permeantu v donoru, A (1,0 cm²) je plocha dostupná pro permeaci.

Permeační koeficienty byly vypočteny z lineární části křivky a jsou prezentovány jako průměry s vyznačením směrodatné odchylky (\pm SD); počet opakování n je uveden v příslušných grafech. Statistická významnost byla prověřena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA).

Výsledky a diskuse

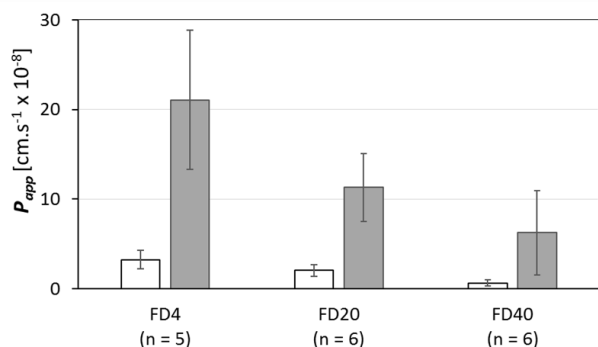
Dextrany jako takové lze použít, kromě jiných výše zmiňovaných aplikací, také pro testování permeability a integrity membrán. Permeabilita obecně záleží jak na typu membrány, tak na vlastnostech permeantu, což pro dextrany dokumentují informace zmiňované v úvodním přehledu.

V případě této naší práce se jedná o hodnocení použitelnosti metod zpracování sublingvální sliznice, odhadu časového intervalu použitelnosti v rámci *in vitro* permeačních pokusů a k odhadu molekulové hmotnosti dextranů, která je limitem pro jejich průchod přes různě zpracované sublingvální membrány.

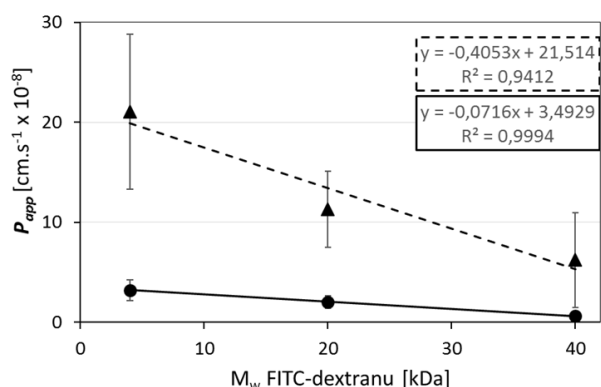
Základní výsledky permeačních *in vitro* experimentů s dextrany FD4, FD20 a FD40 přes sublingvální membrány pouze „zmražené“, tedy bez použití kryoprotektiv i bez použití např. postupu „šokového zmražení“ v tekutém dusíku³⁵, jsou graficky uvedeny na obr. 3.

Z naměřených výsledků je zřejmé, že se stoupající molekulovou hmotností dextranů naměřená hodnota zdánlivého permeačního koeficientu P_{app} klesá. Samo o sobě, a v daném případě pouze jako trend bez statistické významnosti, to překvapivé není, v případě látek stejného chemického složení a molekulární struktury by větší molekula měla pronikat pomaleji. Zajímavější je to, že hodnoty P_{app} z pozdějších hodin permeačního pokusu (tmavé sloupce) jsou velmi podstatně a statisticky významně (při $P = 95\%$) cca 6 až 10krát vyšší než hodnoty P_{app} z prvních 8 hodin pokusu. Ukazuje to, že závažnost narušení „zmražením“ membrány se s časem projevuje stále dramatictější. Zejména dlouhodobější permeační experimenty jsou proto v tomto ohledu problematické, přestože se membrána může makroskopicky jevit jako stále zachovaná.

Současně se ukazuje, že postup zpracování a uchování mukozálních membrán „zmražením“ není vhodný, na



Obr. 3. Zdánlivé permeační koeficienty P_{app} dextranů FD4, FD20 a FD40 přes zmrazené sublingvální membrány do 8. hodiny (bílé) a po 18. hodině (šedé) *in vitro* experimentu



Obr. 4. Vztah mezi molekulovou hmotností M_w a zdánlivým permeačním koeficientem P_{app} dextranů FD4, FD20 a FD40 u „zmrazené“ membrány *in vitro* do 8. hodiny (●) a po 18. hodině (▲) probíhajícího experimentu

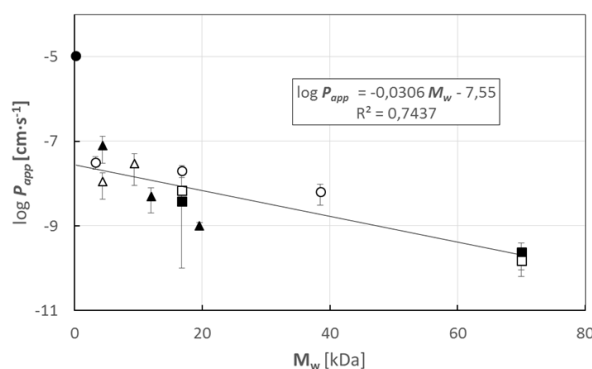
rozdíl od zpracování analogických preparátů kožních membrán. V jejich případě se uchování po pomalém zmražení a při teplotách kolem $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pokládá za dobře přijatelné³⁶. Tato skutečnost zřejmě souvisí s hydratací obou typů membrán. U kožní bariéry jde vždy o velmi málo hydratované a keratinizované svrchní vrstvy kůže³⁷. Permeační bariéra u nekeratinizované sublingvální membrány se ovšem nachází ve vrstvách hydratovaných buněk³⁴. Je tedy zřejmé, že tato bariérová etáž sublingvální sliznice je již od počátku pokusu i po opatrném rozmrazení pouze „zmrazené“ membrány poškozena, přičemž se toto její poškození v průběhu pokusu dále dramaticky zvyšuje, podíl na tom má pravděpodobně i vlastní průchod látek přes membránu. V rámci stávajících protichůdných informací umožnilo použité pokusné uspořádání takové poškození doložit (obr. 4), ukázat na nevhodnost pomalého „zmrazení“ pro zpracování a uchování sublingválních sliznic a doporučit nejvýše 8hodinový permeační pokus.

Použitá procedura zpracování sublingválních membrán bez kryoprotektivního ošetření byla vedena záměrem vyhnout se arteficiálnímu ovlivnění permeačních vlastností a měřených parametrů z *in vitro* permeačních pokusů. Otázka vlivu přítomnosti kryoprotektivních látek na transoromukozální membrány není zatím uzavřena³⁸, a to především kvůli rozdílnosti jejich interakcí v membráně. Například často používaný kryoprotektant dimethylsulfoxid může způsobovat tvorbu pórů v membránách³⁹. Ostatní kryoprotektanty (např. extracelulární sacharosa, albumin a intracelulární glycerol) interagují s vodou a ostatními polárními látkami v mukóze v rámci prevence tvorby ledových krystalů a zvyšují tak viskozitu polárního prostředí. Proto je pravděpodobné, že následně mohou ovlivňovat také orální transmukozální permeabilitu.

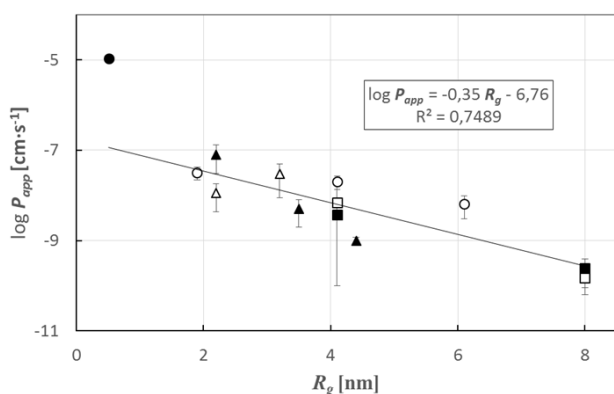
Vzhledem k chemické podobnosti jednotlivých dextranů použitých v této studii je jediným parametrem, který

bude jejich pasivní průnik danou membránou určovat, jejich molekulová hmotnost, resp. jejich velikost představovaná např. poloměrem gyrace. Většina hodnot poloměru gyrace dextranů byla změřena a publikována již dříve. Lze jich využít buď přímo, nebo jejich doplňujícím interpolačním výpočtem, který jsme provedli dle dat uvedených De Belderem³. Souhrn příslušných hodnot pro publikované i změřené a dopočítané údaje uvádí tab. I.

Naměřené hodnoty oromukozální permeability P_{app} dextranů jsou pro údaje z tab. I ve vztahu k molekulové hmotnosti M_w zaneseny na obr. 5 a ke gyračnímu poloměru R_g na obr. 6. Z obou grafů je patrné, že logaritmus permeabilitního koeficientu je lineárně závislý na molekulové hmotnosti ($\log P_{app} = -0,03 \cdot M_w - 7,55$; $r^2 = 0,74$) i gyračním poloměrem ($\log P_{app} = -0,35 \cdot R_g - 6,74$; $r^2 = 0,75$), a to ve sledované oblasti zhruba stejně.



Obr. 5. Závislost hodnot zdánlivých permeačních koeficientů $\log P_{app}$ na molekulové hmotnosti M_w dextranů (data z tab. I: ● kofein³⁵; ○ tato práce (Z); ■ Berka (ŠZ); □ Berka (Č); ▲ Nielsen³¹; △ Junginger³²)



Obr. 6. Závislost hodnot zdánlivého permeačního koeficientu $\log P_{app}$ na gyračním poloměru R_g dextranů (data z tab. I: ● kofein³⁵; ○ tato práce (Z); ■ Berka (SZ); □ Berka (Č); ▲ Nielsen³¹; Δ Junginger³²)

Nicméně všechny použité datové sady nemají stejnou validitu. Při srovnání způsobu přípravy membrán pro permeační pokusy se ukázalo, že poškozená „zmražená“ sublingvální membrána je mnohem propustnější, než membrána „čerstvá“, či „šokově zmražená“. Podobně data publikovaná Jungingerem a spol.³² ukazují velkou variabilitu změřených hodnot. Po vyloučení těchto nepřesných měření nalézáme v případě molekulové hmotnosti $\log P_{app} = -0,03 \cdot M_w - 7,74$; (při $r^2 = 0,77$), která je při nižší hodnotě koeficientu determinace horším parametrem pro velikostní závislost permeabilitního koeficientu než gyrační poloměr, pro který vychází $\log P_{app} = -0,39 \cdot R_g - 6,70$; ($r^2 = 0,87$). Rozdíl se projevuje především u menších dextranů.

Orientačně je v obou grafech na obr. 5 a 6 vyznačena také poloha $\log P_{app}$ kofeinu získaná v analogických permeačních pokusech³⁵ pro srovnání s permeabilitou modelového nízkomolekulárního léčiva.

Otázka, jak velkou dávku dextranů by bylo možné sublingválně podat, výrazně závisí na jejich velikosti. Pro základní náhled lze využít rovnici (1) následovně:

$$Q = P_{app} \cdot C_0 \cdot A \cdot \Delta t \quad (2)$$

Při předpokladu aplikace 10% roztoku dextranu (podobného jako pro náhrady ztrát krve) a omezení časového intervalu jeho kontaktu se sliznicí na 5 min (z důvodu při praktické aplikaci předpokládaného odmývání roztoku slinami, tzv. „salivary wash-out“) může nekeratinizovaná oromukozální membránou (cca 50 cm²) projít až kolem 75 μg v případě FD4 (tab. II).

Přitom P_{app} představuje střední odhad zdánlivého permeabilitního koeficientu a Q je množství látky přenesené přes membránu. Přenesené a přes membránu hypoteticky podané množství dextranu s rostoucí molekulovou hmotností velmi rychle klesá. Použitelnost tohoto odhadu s ohledem na zaměření tohoto příspěvku nebude dále ko-

Tabulka II

Odhady průniku jednotlivých typů dextranů při podání v 10% roztoku

Dextran	P_{app} [cm s ⁻¹]	Q [μg]
FD4	$5 \cdot 10^{-8}$	75
FD10	$5 \cdot 10^{-9}$	7,5
FD20	$1 \cdot 10^{-9}$	1,5
FD70	$2 \cdot 10^{-10}$	0,3

mentována. Nabízí se pouze představa, jak by výsledky a jejich interpretace vypadaly za situace, při níž by byla vazebná místa na dextranech obsazena léčivem. V takovém případě by transmukosální a zejména sublingvální cesta pro nízkomolekulární dextranové nosiče s léčivou mohla přinést řadu zajímavých aplikací. Zvláště tehdy, pokud by se přenesená dávka dala zvýšit prodloužením doby pro absorpci, např. využitím uvolňování z nanovláken.

Závěry

Nalezené hodnoty oromukosální permeability P_{app} dextranů dokumentují citlivost nekeratinizovaných sublingválních membrán na podmínky tepelného zpracování a skladování, pomalé zmrazování je vážně narušuje. Lze doporučit nejvýše 8hodinový pokus.

Dextrany s molekulovou hmotností vyšší než 20 kDa mohou sloužit jako markery permeační integrity sublingválních membrán.

Poloměr gyrace dextranů odráží charakteristiky orální transmukosální propustnosti *in vitro* lépe než příslušné hodnoty molekulové hmotnosti.

Makromolekulární soustavy s analogickým poloměrem gyrace jako má 4 kDa dextran, případně nízkomolekulární léčiva na takový makromolekulární nosič navázaná, mají potenciál pro sublingvální systémové podávání.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547 Univerzity Karlovy v Praze.

LITERATURA

1. Pasteur L.: Bull. Soc. Chim. Paris 11, 30 (1861).
2. Sidebotham R. L.: Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30, Tipson R.S., Horton D. (ed.), Academic Press, New York, 371 (1974).
3. de Belder A. N.: *Dextran - Handbook*, str. 64. Amer-sham Biosciences AB, Uppsala 2003.

4. Heinze T., Liebert T., Heublein B., Hornig S., v knize: *Polysaccharides II*, str. 199 (Klemm D., ed.). Springer, Berlin 2006.
 5. Jones C. I., Payne D. A., Hayes P. D., Naylor A. R., Bell P. R. F., Thompson M. M., Goodall A. H.: *J. Vasc. Surg.* 48, 715 (2008).
 6. WHO, *World Health Organization Model List of Essential Medicines*, 2. vyd. World Health Organization (2019).
 7. Mehvar R.: *J. Control. Release* 69, 1 (2000).
 8. Pan H., Kopeček J.: *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers*, str. 81, (Torchilin V., ed.). Springer, New York 2008.
 9. Snell C. R., Smyth D. G.: *Biochem. J.* 165, 43 (1977).
 10. Muranishi S., Takahashi Y., Hashida M., Sezaki H.: *J. Pharmacobiodyn.* 2, 383 (1979).
 11. Aliu Y. O., Sannusi A.: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2, 265 (1979).
 12. Kikuchi S., Inaba A., Takahashi M., Aramaki Y., Tsuchiya S.: *Int. J. Pharm.* 42, 193 (1988).
 13. Tu J., Zhong S., Li P.: *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 959 (2004).
 14. Shrivastava S. K., Jain D. K., Shrivastava P. K., Trivedi P.: *Trop. J. Pharm. Res.* 8, 221 (2009).
 15. Praveen B., Shrivastava P., Shrivastava S. K.: *Acta Pharm. Sci.* 51, 169 (2009).
 16. Marshall J. J.: *Trends Biochem. Sci.* 3, 79 (1978).
 17. Bernstein A., Hurwitz E., Maron R., Arnon R., Sela M., Wilchek M.: *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 379 (1978).
 18. Danhauser-Riedl S., Hausmann E., Schick H.-D., Bender R., Dietzfelbinger H., Rastetter J., Hanauske A.-R.: *Invest. New Drugs* 11, 187 (1993).
 19. Fagnani R., Halpern S., Hagan M.: *Nucl. Med. Commun.* 16, 362 (1995).
 20. Takashina K., Kitamura K., Yamaguchi T., Noguchi A., Tsurumi H., Toshio T.: *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1145 (1991).
 21. Nishikawa M., Kamijo A., Fujita T., Takakura Y., H. Sezaki, Hashida M.: *Pharm. Res.* 10, 1253 (1993).
 22. Wileman T. E.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 6, 167 (1991).
 23. Onishi H., Nagai T.: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 35, 1183 (1987).
 24. Takakura Y., Matsumoto S., Hashida M., Sezaki H.: *J. Controlled Release* 10, 97 (1989).
 25. Schechter B., Pauzner R., Arnon R., Wilchek M.: *Cancer Biochem. Biophys.* 8, 277 (1986).
 26. Mitsumori M., Hiraoka M., Shibata T., Okuno Y., Nagata Y., Nishimura Y., Abe M., Hasegawa M., Nagae H., Ebisawa Y.: *Hepatogastroenterology* 43, 1431 (1996).
 27. Andersson A., Holmberg A., Carlsson J., Carlsson J., Pontén J., Westermark B.: *Int. J. Cancer* 47, 439 (1991).
 28. Bue P., Márquez M., Malmström P.-U., Westlin J.-E., Nilsson S., Holmberg A. R.: *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* 80, 2385 (1997).
 29. Tolo K., Jonsen J.: *Arch. Oral Biol.* 20, 419 (1975).
 30. Hoogstraate A. J., Verhoef J. C., Tuk B., Pijpers A., van Leengoed L. A. M. G., Verheijden J. H. M., Junginger H. E., Boddé H. E.: *J. Pharm. Sci.* 85, 457 (1996).
 31. Nielsen H. M., Verhoef J. C., Ponec M., Rassing M. R.: *J. Controlled Release* 60, 223 (1999).
 32. Junginger H. E., Hoogstraate J. A., Verhoef J. C.: *J. Controlled Release* 62, 149 (1999).
 33. Nicolazzo J. A., Reed B. L., Finnin B. C.: *J. Pharm. Sci.* 92, 2399 (2003).
 34. Goswami T., Jasti B. R., Li X.: *Arch. Oral Biol.* 54, 577 (2009).
 35. Berka P., Stránská D., Semecký V., Berka K., Doležal P.: *Int. J. Pharm.* 572, 118711 (2019).
 36. Franz T. J.: *J. Invest. Dermatol.* 64, 190 (1975).
 37. Harrison S. M., Barry B. W., Dugard P. H.: *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 261 (1984).
 38. Marxen E., Axelsen M. C., Pedersen A. M. L., Jacobsen J.: *Int. J. Pharm.* 511, 599 (2016).
 39. Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13982 (2006).
- P. Berka^{a,b}, K. Berka^c, and P. Doležal^a** (^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, ^b InStar Technologies, Liberec, ^c Department of Physical Chemistry, RCPTM, Faculty of Science, Palacký University Olomouc): **Dextrans as Permeation Markers and Carriers for Oral Transmucosal Drug Delivery**
- Dextrans are studied as markers of oral transmucosal permeability and as possible drug carriers. The therapeutic use of dextrans is primarily limited to the intravenous route of administration. This work focuses on extending the knowledge of dextran permeation by the sublingual route. First, it is documented that non-keratinized sublingual membranes are very sensitive to heat treatment and storage conditions (more than skin membranes). Slow freezing disrupts them seriously, leading to disproportionately high permeability values, even for dextrans with a molecular weight higher than 20 kDa, which, however, may well serve as permeation markers. The dextran gyration radius reflects *in vitro* oral transmucosal permeability characteristics more appropriately than the pertinent molecular weight values. Macromolecular systems with a gyration radius analogous to 4 kDa dextran, possibly coupled with low molecular weight drugs, have sufficient potential for sublingual systemic drug delivery.
- Keywords:** dextrans, sublingual administration, gyration radius, drug carriers
- Acknowledgements*
PB and PD acknowledge support from Charles University Prague (Project no. SVV 260 547).