

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Nanonosiče pro dermální a transdermální podání léčiv
Nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery

Vedoucí diplomové práce: Doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmila Zbytovská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Josef Girgel

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2018

Josef Girgel

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval paní Doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmile Zbytovské za cenné rady a trpělivost při psaní diplomové práce.

Velký dík patří i mé rodině za hmotnou a psychickou podporu.

Obsah

1. Úvod	9
2. Zadání – Cíl práce.....	11
3. Literární rešerše	12
3.1 Kůže	14
3.1.1 Epidermis	14
3.1.2 Dermis (syn. corium,škára).....	17
3.1.3 Vlasový folikul.....	17
3.2 Absorpce látek přes kůži	18
3.3 Kontakt nanočástic s kůží.....	19
3.4 Vlastnosti nanočástic.....	20
3.4.1 Velikost částic, distribuce a morfologie.....	20
3.4.2 Povrchový náboj.....	21
3.4.3 Krystalický stav.....	22
3.4.4 Chemická stabilita	22
3.4.5 Sedimentace a krémovatění.....	22
3.4.6 Disoluce.....	22
4. Rozdělení nanonosičů léčiv	24
4.1 Uhlíkové nanočástice (uhlíkové nanotrubičky a fullereny)	24
4.2 Quantum dots (kvantové tečky)	25
4.3 Křemičitanové nanočástice	26
4.4 Oxidy kovů.....	26
4.5 Stříbrné nanočástice	27
4.6 Polymerní nanočástice	29
4.6.1 Hydrofóbní polymery.....	29
4.6.2 Micely	30
4.6.3 Dendrimery	30
4.7 Lipidové nanočástice.....	32
4.8 Klasifikace surovin pro výrobu lipidových nanočástic	33

4.8.1	Homolipidy (jednoduché lipidy)	33
4.8.2	Heterolipidy (Složené lipidy)	33
4.8.3	Komplexní lipidy	34
4.9	Solid lipid nanocarriers (SLN)	34
4.10	Nanostructured lipid carriers (NLC)	36
4.11	Liposomy a niosomy	38
4.11.1	Aplikace liposomů a niosomů	40
4.11.2	Proniosomy	41
4.11.3	Transferezomy	42
4.11.4	Ethosomy	44
4.11.5	Cerosomy	45
4.12	Emulze	46
5.	Hodnocení informačních zdrojů vzhledem k danému tématu	50
5.1	Výsledky z databází Web of science, Scopus, PubMed	50
5.2	Hodnocení četnosti aktuálních patentů vzhledem k dané problematice	54
6.	Diskuze	56
7.	Závěr	59
8.	Seznam tabulek	60
9.	Seznam obrázků	61
10.	Použitá literatura	62

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Student: Josef Girgel

Školitel: Doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmila Zbytovská

Název: Nanonosiče pro dermální a transdermální podání léčiv

Cílem této práce bylo zmapovat literaturu a nejlogičtěji ji rozčlenit a objasnit mechanismy interakce nosičů s kůží, míru jejich schopnosti proniknout do kůže a vyhodnotit jejich potenciální přínos do dalších let.

Kožní podání se zdá být výhodnější cestou oproti ostatním, hlavně díky vyšší compliance pacienta, vyhnutí se „*first pass*“ efektu v játrech, zajištění stabilní koncentrace v krvi při transdermálním podání a snížení nežádoucích účinků léčiv. Nicméně kůže slouží jako účinná ochranná bariéra proti vnějšímu okolí, zejména její nejsvrchnější vrstva stratum corneum.

V posledních letech se zájem mnoha výzkumných skupin zaměřil na nanonosiče, u kterých se předpokládá – díky jejich velikosti pohybujících se od desítek až po stovky nanometrů – efektivnější transport do i skrz kožní bariéru. Bylo potvrzeno, že některé nosiče jsou schopny permeovat kůží. U kovových nanočástic je jejich permeace spojena především s toxicitou a nacházejí zejména využití v medicíně a průmyslu. Lipidové a některé polymerní nosiče jsou zajímavými hlavně díky jejich biodegradabilitě a netoxicitě.

V této diplomové práci je aktuálně shrnuta daná problematika. Na konci práce jsou porovnány 3 citační a abstraktové databáze (Web of Science, Scopus a PubMed) vzhledem k množství článků na dané téma publikovaných ve vybraných časových intervalech. Dále jsou zde zmíněny výsledky z patentové databáze Derwent Innovations Index, ze které je jasně viditelný současný trend vývoje nanonosičů v posledních 18 letech.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: Josef Girgel

Consultant: Doc. Dr. rer. Nat. Mgr. Jarmila Zbytovská

Title of thesis: Nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery

The aim of this work was to map the literature and the most logically divide it and to elucidate the mechanisms of the carrier's interaction with the skin, the degree of their ability to penetrate the skin and to evaluate their potential to the next years.

Skin administration appears to be more advantageous way than others, mainly due to higher patient's compliance, avoiding the first pass effect of the liver, ensuring a stable blood concentration during transdermal administration and reducing adverse effect of the drug. However, the skin serves as an effective barrier to the external environment, especially its outermost layer called stratum corneum.

In a recent year, the interest of many research groups has focused on nanocarriers which are expected to deliver more efficient transport to and through the skin barrier due to their size ranging from tens to hundreds of nanometers. It has been confirmed that some of these carriers are able to permeate the skin. For metallic nanoparticles, their permeation is primary associated with toxicity and they are mostly used in medicine and industry. Lipid and some polymeric carriers are particularly interesting due to their biodegradability and non – toxicity.

In this thesis this issue is currently summarized. At the end of thesis, three citation and abstract databases (Web of Science, Scopus and PubMed) are compared to the number of articles published at selected time intervals. In addition, the results are mentioned from the patent database Derwent Innovation Index where is the current trend of nanocarriers development clearly visible over the 18 years.

Seznam zkratek

AFM – atomic force microscopy (mikroskop atomových sil)

API – active pharmaceutical ingredients (biologicky aktivní látka)

CPP – critical packing parameter, (param. kritického zabalení)

DLS – dynamic light scattering, (dynamický rozptyl světla)

EA – edge aktivator, (aktivátor hrany)

FTIR – Fourier transform infrared, (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)

LD – laser diffraction, (laserová difrakce)

NLC – nanostructured lipid carriers, (nanostrukturované nosiče lipidů)

NMF – nature moisture factor, (přírodní hydratační faktor)

NMR – nuclear magnetic resonance, (nukleární magnetická rezonance)

PAMAM – poly-amidoamin

PCS – photon correlation spectroscopy, (fotonová korelační spektroskopie)

PDI – polydispersity index, (index polydisperzity)

PLA – poly-mléčná kyselina

PLC – poly-ε-kaprolakton

PLGA – poly-lactid-co-glykolid

PNO – polynenasycené oleje

SEM – scanning electron microscopy, (sken. elektronový mikroskop)

SLN – solid lipid nanoparticles, (pevné lipidové nanočástice)

TDD – transdermal drug delivery, (transdermální podání léčiv)

TEM – transmission electron microscopy, (transmisní elektronový mikroskop)

XRD – X-ray diffraction, (rentgenová difrakce)

1. ÚVOD

Nanonosiče jsou v poslední době velmi podrobně a široce zkoumanou problematikou, kde se již některé začínají objevovat v prvních lékových formách. Termín „nano“ pochází z řeckého významu slova trpaslík a nanotechnologie je obor zabývající se a manipulující s materiálem v rozsahu miliardtin metru. I když je nanotechnologie mladým oborem, první nanočástice byly vynalezené jako nosiče léčiv před více než 40 lety. (Lane 2011)

Nanočástice jsou předmětem zájmu mnoha oborů chemických věd, životního prostředí, biotechnologie, farmaceutického průmyslu a medicíny. (Vogt et al. 2016) V dermatologii se používají například při fotoprotekci, fototermální a fotodynamické terapii. Dále při vlasových problémech, genové terapii a vakcinaci. (Filon et al. 2015) Hlavními důvody ve farmaceutickém odvětví jsou jejich bezprostřední výhody, které tyto částicové lékové formy nabízejí. Z farmakoterapie se jedná především o snížení nežádoucích účinků, zvýšení účinnosti terapie a řízené uvolňování. Dále při léčbě onemocnění kůže nebo léčiv s nízkou perorální biodostupností. (Vogt et al. 2016)

Právě subcellulární velikost nanočástic je klíčovou vlastností, která jim umožňuje působit na místech pro jiné lékové formy nedosažitelné (Rabišková, 2007). To je jeden z důvodů, proč je tato práce zaměřena na jejich využití v dermální a transdermální terapii.

Často kladené otázky týkající se mechanismu účinku nanočástic, jejich průnikem skrz nejsvrchnější část pokožky, či to, jakou velikost, tvar, náboj a vlastnosti povrchu jsou vhodné pro jejich účel, zatím nejsou s jistotou zodpovězeny. Tím se naskýtá problém, jak vyřešit správnou rovnováhu mezi zvýšením penetrace účinných látek procházejících skrz bariéru a současně zajistit dostatečnou retenci pro udržení koncentrace účinných látek v kůži. (Vogt et al. 2016)

Při hodnocení schopnosti penetrace či permeace se musí zohlednit stav pokožky, tedy musíme vzít v úvahu, jsou-li dané nanočástice nanášeny na zdravou, či porušenou kůži. Právě celistvost svrchní vrstvy (stratum corneum), má zásadní podíl na ochraně před vnějšími vlivy. Na druhou stranu je tu možnost zvýšení selektivity propustnosti poškozením funkce svrchní pokožky nízkofrekvenčním ultrazvukem, elektroporací, ablací laserem, mikrojehlami atd. V ideálním případě by nanonosiče

měly být schopny usnadnit transport látek skrz pokožku bez předchozí nutnosti ji porušovat. (Vogt et al. 2016)

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

V posledních letech bylo vypracováno nespočet prací zabývajících se tematikou dermálních a transdermálních nosičů léčiv. Pro lepší porozumění a přehled budoucím posluchačům se zájmem o tuto problematiku byla vypracována tato rešeršní práce, která měla za úkol sjednotit alespoň určitou část výsledků s ohledem na zjištění, které nosiče jsou nebo nejsou schopny penetrovat skrz stratum corneum a jakým principem k tomuto efektu dochází. Ucelit přehled dané problematiky a poskytnout novější informace s přidanou hodnotou o sjednocení klíčových slov ze 4 databází, včetně patentové, které nám mohou poskytnout určitou představu o vývoji dané problematiky. Hledání v databázích bylo zaměřeno na jednotlivé časové intervaly od roku 1981 až dodnes. V dalším srovnání mohou být uvedené počty výsledků jako ukazatelů velikosti jednotlivých databází.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

Teprve od 70. let minulého století, s příchodem transdermálních náplastí začala být kůže využívána pro systémové použití. (Prow et al. 2011) Z dosud získaných dat můžeme tvrdit, že struktura a složení kůže dovolí penetrovat přes stratum corneum jen malým lipofilním molekulám, které mají hmotnost menší, než 600 Da. (Baroli et al. 2007)

Od roku 1981, kdy byl poprvé na trh uveden skopolamin jako transdermálně podávaný přípravek, přibylo pár nových léčiv např. fentanyl, lidocaine, prilocain, nitroglycerin, estradiol, ethinyl estradiol, norethindron acetát, testosteron, klonidin a nikotin, které se dají vhodně využít. V roce 2001 jich bylo na trhu již 11 a US trh vydělal 1,2 bilionu USD. (Thong, Zhai and Maibach 2007)

Podáváním léčiva skrz kůži je alternativní cestou k orálnímu a parenterálnímu podání. Avšak TDD poskytuje jisté nezanedbatelné výhody. Především se léčiva mohou vyhnout „first pass“ efektu jater a snížit podráždění žaludeční sliznice. Poskytují stabilní absorpci po dlouhou dobu a snižují četnost podávání léčiva. Podáním TDD se vyhneme vysokým koncentracím léčiva v krvi, čímž omezíme vedlejší účinky léku. (Durand, Alhammad and Willett 2012). Souhrn výhodných a nevýhodných vlastností transdermálního podání je v Tab. 1.

Nanočástice v dermatologii jsou předmětem výzkumu od doby, co bylo prokázáno, že řada nanočástic je schopna penetrovat skrz vnější vrstvu pokožky, zatímco jiné permeovat do nižších vrstev dermis, odkud jsou schopny přejít do cévního řečiště. (Filon et al. 2015) Jejich intenzivním výzkumem jsme v dnešní době schopni syntetizovat různé typy kovových a magnetických částic, jejichž průměr je několik nanometrů i menších, navíc jejich povrchy mohou být modifikovány bioaktivními molekulami nebo sondami, které mohou být na povrch adsorbovány, potaženy, konjugovány nebo spojeny. (Baroli et al. 2007) Podobná kritéria platí i pro lipidové nosiče, které sice nedosahují tak malých měřítek, ale disponují jinými výhodami, jako nízká toxicita a biodegradovatelnost.

Nanočástice jsou definované jako částice, jejichž velikost je omezená v nanometrech a nepřesahuje určitý limit. Jejich velikost se pohybuje od 1 až do 1000 nm. Velikost částic se vztahuje k průměru kulatých částic nebo k přibližnému průměru

nepravidelných částic. Vzhledem k tomu, že ve výrobních procesích nejsme schopni dosáhnout přesné jedné velikosti částic, chápeme ji jako určitý rozsah. (Rabišková 2007)

U nanočástic je specifikovaná velikost kolem 4 nm, které mohou proniknout neporušenou pokožkou, mezi 4-20 nm mohou potenciálně proniknout neporušenou pokožkou a nanočástice mezi 21-45 nm pronikají jen porušenou. Částice větší než 45 nm nemohou penetrovat skrz kůži. (Filon et al. 2015) Avšak novější lipidové nosiče využívající jiných mechanismů permeace tyto kritéria nutně splňovat nemusí jako například ultradeformovatelné vesikuly apod. (Cevc and Vierl 2010)

Další aspekty, které hrají důležitou roli v rámci prostupu hlavně pro kovové nanočástice jsou disoluce ve fyziologickém médiu, která může působit lokální i systémový účinek a vyvolávat senzibilující, či toxický potenciál. Avšak mezi vědci zůstává spor o to, jakým způsobem interagují s kůží a jaké zdravotní problémy mohou způsobit. (Filon et al. 2015)

Tabulka 1-Výhody a nevýhody transdermální aplikace (Escobar-Chávez et al. 2012)

Výhody transdermálního podání	Nevýhody transdermálního podání
Delší působení	Možnost podráždění v místě podání
Snížení frekvence dávkování	Erytém, svědění a místní otok mohou být způsobeny lékem, lepidlem nebo jinými excipienty ve formulaci náplasti
Stálé hladiny léčiva v plazmě	Nízká schopnost permeability pokožky omezuje počet léčiv, které mohou být tímto způsobem podány
Vhodné pro léčiva s úzkým terapeutickým oknem	
Alternativní cesta podání hospitalizovaným pacientům, kteří netolerují perorální cestu (především trpící nevolností nebo v bezvědomí)	
Vylepšená biodostupnost	

Snížení nežádoucích účinků	
Flexibilita v ukončení podávání léčiva jednoduchým strhnutím náplasti	

3.1 Kůže

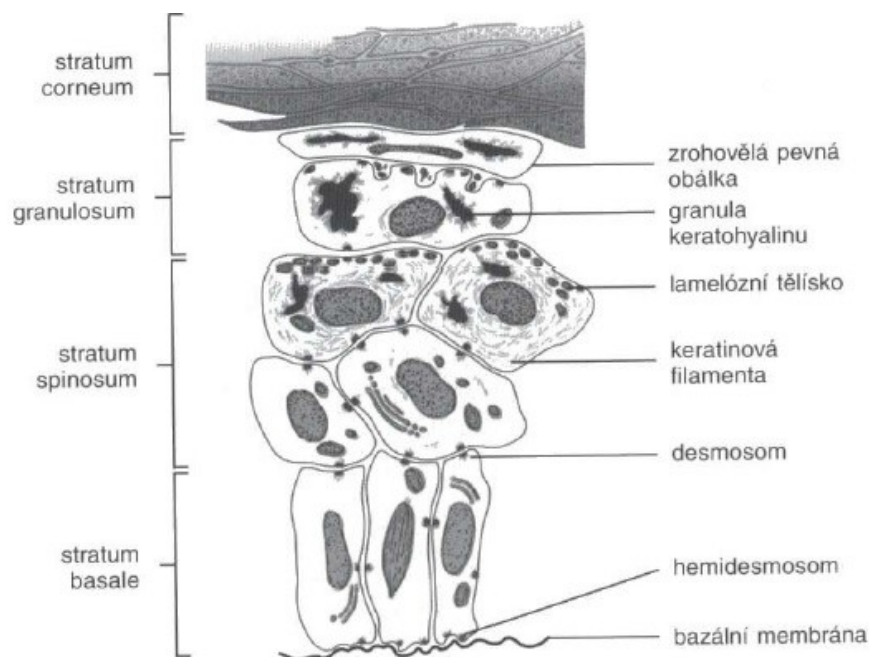
Kůže jako největší orgán těla je díky své velikosti velice zranitelná. Její velikost je individuální, avšak v průměru 1,7 m². (Wu and Guy 2009) Právě celistvost vnější bariéry hraje velkou roli v permeabilitě látek. Jednou z hlavních funkcí kůže je ochrana před vnějšími látkami, které by potencionálně mohly poškodit nebo narušit funkčnost organismu. Zabraňuje dehydrataci a umožňuje biochemické procesy některých sloučenin. Hraje roli v regulaci teploty (potní žlázy, receptory) a v imunologické odpovědi zajišťovanou Langerhansovými buňkami (makrofágy) schopnými pohlcovat antigeny a spustit imunitní reakci. (Filon et al. 2015)

Kůže hraje roli i v tvorbě stavebních látek jako kolagen, keratin, melanin, lipidy a sacharidy. Nacházejí se v ní receptory pro teplo, chlad, tlak, bolest, mazové a potní žlázy.

Kožní bariéra se skládá ze tří vrstev epidermis (pokožka), dermis (škára) a hypodermis (podkožní vazivo). (Liang et al. 2013)

3.1.1 Epidermis

Epidermis tvoří na povrchu vrstevnatý cylindrický epitel, který rohovatí. Od spodní vrstvy (stratum basale) zrají buňky přibližně 28 dní, na hlavě 14, než se dostanou k povrchu. Dochází k přeměně keratinocytů na korneocyty tzv. keratinizací keratinocytů. Jinak řečeno šupinatí a odlupují se a tímto mechanismem dochází k obnově svrchní části. (Štork 2013)



Obrázek 1- Schéma vývoje keratinocyty (Štork 2013)

Epidermis můžeme obecně rozdělit do dvou vrstev. Na živou a neživou část, které se dále rozdělují na další anatomicky rozdílné podvrstvy (Sala et al. 2018). Na Obr.1 lze vidět **stratum basale**, které je tvořeno kubicko-cylindrickými buňkami hlavně keratinocyty a melanocyty seřazenými v jedné řadě, které jsou navzájem spojenými desmozomy a hemidesmozomy připojeny k bazální membráně viz Obr. 1. Toto spojení tvoří rozhraní mezi epidermis a coriem. V melanocytech a keratinocytech je obsažený keratin součástí hemidesmosomu a to jako jeho intracelulární součást závěsného aparátu (tonofilamentum). Z desmosomu vybíhají transcellulární glykoproteiny zajišťující adhezi buněk, které zajišťují i zonulae adherens. Mezibuněčnou komunikaci zprostředkovávají gap junction. Dále jsou zde melanocyty nacházející se pouze ve stratum basale a vlasovém folikulu, tvořící zde barvivo melanin, který transportují do okolních buněk pomocí svých výběžků obklopujícími ostatní keratinocyty. Množství melaninu se liší podle místa na těle, tak i mezi jedinci. (Štork 2013)

Stratum spinosum je další vrstva směrem k povrchu. Její název vznikl podle tvaru ostatních mikrofilament v buňkách zřetelných během barvení buněk, kdy se smršťují mikrofilamenta a mezi desmozomy a dochází k tvorbě ostnů. Na obrázku 1

je vidět, jak se keratinocyty postupně stávají ploššími. Dochází už k postupné diferenciaci buněk.

Stratum granulosum obsahuje barvitelná granula keratohyalinu viz. Obr. 1, obsahující protein profilagrin, který se dále přeměňuje na filagrin. Hlavní funkcí filagrinu je spojovat vlákna keratinu. Ve vyšších vrstvách se filagrin rozkládá na samostatné aminokyseliny dále metabolizované na kyselinu urokanovou a pyrrolidinovou. Tyto látky zajišťují ochranu před UV zářením a hydratují pokožku. Celkově buňky zvyšují svoji metabolickou aktivitu, počet mitochondrií a ribosomů. Přitom tonofilamenta se zpevňují a vytvářejí s buněčnou membránou jeden celek, tzv. cementosomy, které vyplňují i mezibuněčný obsah a vytvářejí tak hydrofobní bariéru. Zároveň se ve vyšší vrstvě uvolňují lytické enzymy ničící organely buněk a dochází ke keratinizaci.

Stratum lucidum je jemná světlolomná vrstva viditelná poměrně dobře jen na kůži na dlaních a ploskách nohou. Tvoří přechod mezi zrohovatělou a nezrohovatělou částí.

Na obrázku 1 je **stratum corneum** nejsvrchnější vrstva, která zabraňuje a moduluje látky z vnějšího prostředí a zabraňuje jejich prostupu do hlubších vrstev kůže (Prow et al. 2011). Stratum corneum můžeme dále dělit na stratum conjunctum (kompaktní) a disjunctum, která je olupována a nahrazována další novou řadou buněk.

Tyto mrtvé a vysušené epidermální buňky zvané korneocyty leží v lipidové matrix produkovanou lamelárními granulemi. Jsou to bezjaderné ploché buňky ve tvaru šestiuhelníku poskládané do sloupců mezi sebou dobře pospojované corneodesmosomy a zabalené v extracelulární lipidové matrix ve spojení označovaném jako „*cihly a maltý*“. Toto celkové spojení pomáhá formovat pevnou vnější vrstvu. (Vogt et al. 2016), (Carazo et al. 2018)

Tloušťka stratum corneum je rozdílná na různých částech těla. Silnější je na dlaních a chodidlech, slabší zase na šourku a místech namáhaných ohybem. Buňka stratum corneum má průměr 30 a šířku 0,5 až 0,8 μm . Stratum corneum obsahuje i četné množství intercelulárních lipidů, které sem vyúsťují ze stratum spinosum, ve tvaru lamelárních listů obsahujících velké množství ceramidů, cholesterolu, estery

cholesterolu, mastných kyselin a hydrolytických enzymů (lipasy, proteasy, fosfatázy, glukosidázy). (Filon et al. 2015).

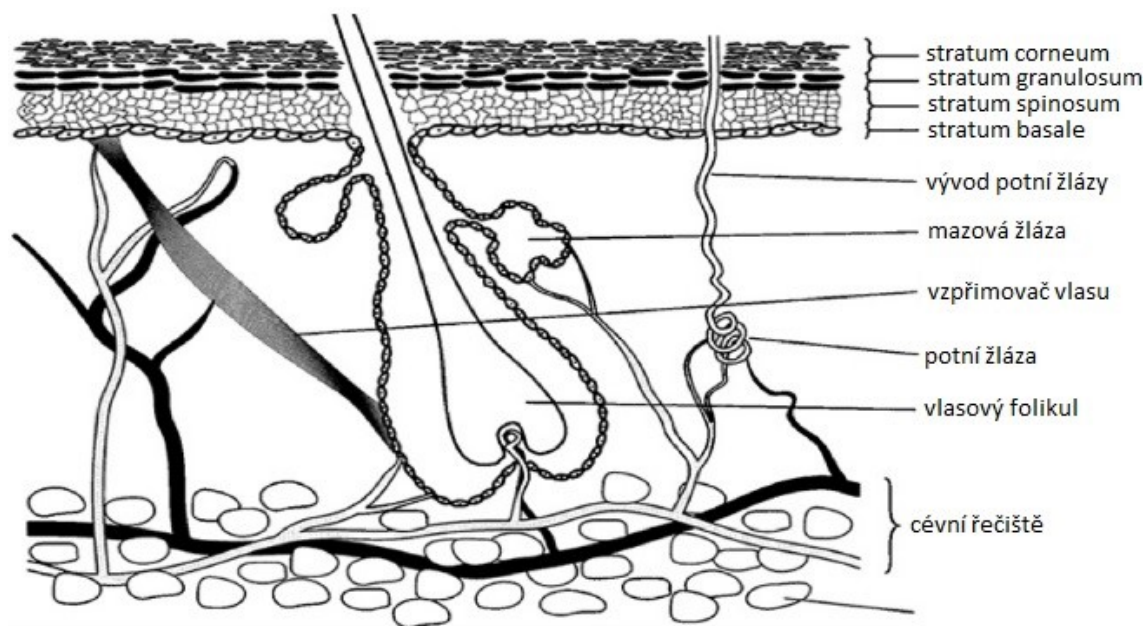
3.1.2 Dermis (syn. corium,škára)

Je střední vrstva složená převážně z vaziva, pevně připojena ke stratum basale. Její tloušťka je přibližně 0,6-3 mm podle místa na těle. Samotné rozhraní mezi epidermis a corium má tvar vlnovky. Vystupující část vlny směrem do epidermis se nazývá pars papillaris a hlouběji uložená vrstva pars reticularis. (Pizinger 2012) Vyskytují se zde převážně histiocyty, mastocyty a fibroblasty. Fibroblasty jsou zodpovědné za tvorbu fibril různých druhů, které se liší svými funkčními znaky. Jedná se o kolagenní, elastická a retikulinová. Kolagenní vlákna zajišťují především pevnost, elastická pevnost, pružnost a retikulinová vlákna slouží jako tzv. kotvicí fibrily, zajišťující připojení ke stratum basale a ke kolagenním vláknům v coriu, mimoto se objevují v blízkosti potních žláz a cév. (Štork 2013)

Corium je společně se stratum basale jako jediné vrstvy epidermis cévně vyživováno. Histologicky do každé z papil vchází jedna arteriola, která zde přechází do arteriální kličky. Živiny přecházejí pomocí prosté difúze do coria, stratum basale a vlasového kořínku.

3.1.3 Vlasový folikul

Vlas se řadí mezi keratinizovaná kožní adnexa. Na obrázku 2 je vidět struktura vlasu procházející celým epidermis až do coria, kde se jeho spodní část rozšiřuje v tzv. bulbus, ve kterém je umístěna vazivová papila. Hned nad ní jsou kapiláry se zárodečnou matrix, která obsahuje rychle se dělící buňky, jejichž diferenciací v dolní části folikulu vznikají nové části vlasu. Uvnitř folikulu je vlas tvořen medulou, cortexem a kutikulou, kterou dále obklopuje vnitřní epitelová pochva. Dále pokračuje zevní epitelová pochva a celé to je kryté vazivovou pochvou z fibril coria. (Štork 2013)



Obrázek 2- Schéma vlasového folikulu (Sala et al. 2018)

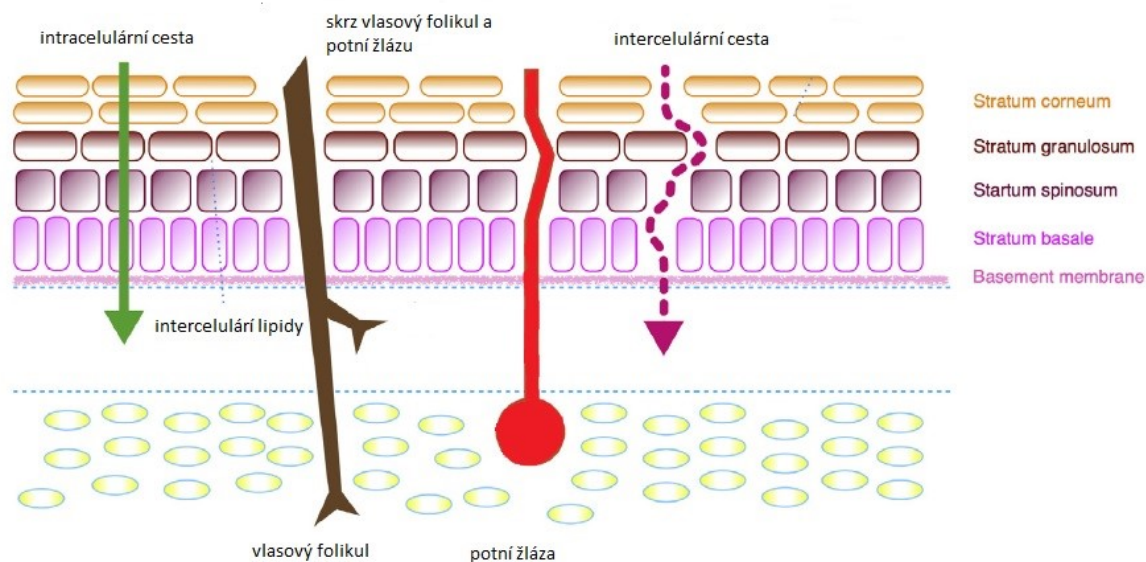
Právě průchod nanočástic do útvarů folikulu představuje jednu z velmi perspektivních cest dermatoterapie. Především vlasové bulby mohou sloužit jako úložiště pro léčiva a prodloužit jejich dobu uvolňování. Tento jev byl mnohem významnější u nanočásticových formulací na rozdíl od klasických technologických forem. (Lademann et al. 2007)

3.2 Absorpce látek přes kůži

Na obrázku 3 je vidět absorpce látek přes stratum corneum. Ta může proběhnout 4 různými cestami. Jedná se o intracelulární, intercelulární cestu, skrz potní žlázy a skrz vlasové folikuly (a přičleněné mazové žlázy). (Nastiti et al. 2017)

Intracelulární cesta je přímou cestou přes buněčné membrány buněk epidermis. Intercelulární cesta je naproti tomu klikatější cesta mezi epidermálními buňkami. Pro většinu látek je tato cesta upřednostňována. Malé molekuly se mohou volně pohybovat uvnitř mezibuněčných prostor a míra jejich toku se řídí převážně jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi. (Prow et al. 2011)

Přes vlasový folikul, potní žlázu a kožní prohlubně mohou látky pronikat nebo se kumulovat, odkud mohou být postupně uvolňovány do systémové cirkulace, avšak vezmeme-li v úvahu, že tyto kožní celky zaujímají pouze 0,1% kůže, jejich využití při permeaci se považuje za minimální. (Lane 2011)



Obrázek 3- Potencionální cesty absorpce (Filon et al. 2015)

Folikulární penetrace je důležitou a slibnou cestou pro selektivní dermatoterapii. V mnoha studiích bylo prokázáno, že přípravky obsahující nanočástice dosahovaly signifikantně hlubších vrstev po masáži povrchu kůže než nečásticové formulace. Přitom bez masáže oba systémy neprokázaly odlišné výsledky. Další bezpochyby velkou výhodou od nanočásticových formulací je i delší setrvání nanočástic ve folikulech. Byl proveden pokus, kdy byla měřena koncentrace léčiva ve folikulu na 6 dobrovolnících po několik dnů. Zatímco nanočástice byly detekovány i po 10 dnech, druhá formulace nebyla detekována už po 4 dnech. (Lademann et al. 2007) S ohledem na povrch vlasu se předpokládá, že se pohyb vlasu chová jako pumpa tlačící částice do hlubších vrstev vlasového folikulu. (Toll et al. 2004), (Lademann et al. 2007)

3.3 Kontakt nanočástic s kůží

Expozice látek vnějšího prostředí na kůži může vést buď k jejich absorpci (penetraci, permeaci), podráždění, toxicitě nebo k žádnému efektu.

Pouze nanočástice, které mohou projít skrz epidermální vrstvu mají schopnost vyvolat alergickou reakci. Mezi látky často vyvolávající alergii patří především kovy jako kobalt, nikl, paladium. Mezi nejčastější symptomy patří kontaktní dermatitida. Naopak kovové nanočástice obsahující zlato a stříbro jsou známy svým nealergenním potenciálem. (Filon et al. 2015)

Tyto obavy z penetrace pevných nanočástic odolávajících v živých organismech, by mohly vést k poškození živých epidermálních buněk nebo akumulaci v orgánech. Jako příklad je zlato, stříbro, oxidy kovů, kvantové tečky, fullerény a uhlíkové nanotrubičky. Co se týče koloidních nanosystémů založených na lipidové bázi, jsou tyto systémy biologicky odbouratelnými při aplikaci na kůži.

Při chronických zánětlivých kožních onemocněních jako je atopický ekzém nebo psoriáza dochází ke zvýšení prostupnosti a tvorbě možných haptenu jako senzibilizérů imunitní odpovědi, avšak zatím není mnoho důkazů. (Kubo, Nagao and Amagai 2012) Právě z tohoto hlediska je zde možné využití nedráždivých nanočástic pro efektivnější léčbu těchto chronických onemocnění. (Shao et al. 2016) Absorpci velkou rolí ovlivňuje pohlaví, rozdíly v tloušťce kůže, hustotě vlasových folikulů, průtok krve, věk, mechanická námaha a systémová onemocnění. (Zhang et al. 2013)

3.4 Vlastnosti nanočástic

Jedinečné nano-rozměry poskytují výrazný vzestup poměru plochy povrchu vzhledem k celkovému objemu, což vede k výrazně odlišnému chování in vitro/in vivo ve srovnání s tradičními mikročásticemi. (Wu, Zhang and Watanabe 2011)

Nanočástice mají tendenci spontánně samostatně nebo po kontaktu s fyziologickým médiem agregovat. Způsob interakce nanočástic s povrchem kůže je závislá na těchto rozhodujících vlastnostech nanočástic (tvar, velikost, zeta potenciál, povrchový náboj, stupeň agregace atd.). (Filon et al. 2015)

3.4.1 Velikost částic, distribuce a morfologie

Velikost částic je klíčovým faktorem používaným pro vyhodnocování fyzikální stability nanočástic. Různé techniky vyhodnocování velikosti částic a jejich distribuce jsou v praxi využívány. Jejich souhrn je v Tab. 2.

Pro velikost částic slouží fotonová korelační spektroskopie (PCS) také známá jako dynamický rozptyl světla (DLS), laserová difrakce (LD) a Coulterův čítač. PCS/DLS je široce využívanou metodou k určení velikosti částic a distribuce malých částic suspendovaných v tekutém médiu. Průměrná velikost částic a distribuce částic nám vyjadřuje index polydisperzity (PDI). Hodnoty PDI od 0,1 do 0,25 nám indikují úzké pole distribuce, zatímco hodnoty od 0,5 vykazují široké pole distribuce. Nevýhodou PCS/DLS metody je neschopnost měření suchých prachů a šíře měření je příliš úzká od 3 nm do 3 μm na to, aby zachytila rušivost rozměrnějších částic v nanočásticích. Proto se LD často využívá společně s PCS k vyloučení obsahu větších částic. Laserová difrakce má o mnoho širší spektrum měření (20 nm až 2000 μm) a může být využita pro měření suspenzí i suchých prachů. Nicméně, LD poskytuje pouze relativní distribuci částic, což v praxi znamená pouze číselný údaj o tom, kolik % částic je pod danou hranicí. Coulterův počítač má výhody ve vysoké přesnosti oproti LD a udává absolutní hodnoty velikosti. (Wu et al. 2011)

Navzdory tomu, že PCS, LD a Coulterův čítač poskytují pouze údaje o velikosti a distribuci částic, musí se pro jejich morfologické údaje využít jiných technik. Jako přímé vizualizační techniky slouží skenovací elektronový mikroskop (SEM), transmisní elektronový mikroskop (TEM) a mikroskop atomových sil (AFM). (Wu and Guy 2009)

3.4.2 Povrchový náboj

Povrchový náboj ovlivňuje permeaci a penetraci částic skrz membránu. Někteří autoři zjistili, že pozitivní náboj může zvýšit elektrostatické interakce s membránou a zvýšit tím schopnost proniknout, zatímco difuze negativně nabitých částic je zpomalována interakcí s kladně nabitými liposomálními komponenty.

Měření zeta potenciálu v původním médiu je měřítkem tloušťky difúzní vrstvy. Čím větší tloušťka vrstvy, tím vyšší naměřená hodnota a stabilnější částice. K měření zeta potenciálu slouží laserová Dopplerova elektroforéza, která měří pohyblivost suspendovaných částic v médiu. Obecným pravidlem je, že hodnoty zeta potenciálu nad 30 mV poskytují dobrou stabilitu. Nad 60 mV mají excelentní stabilitu. Hodnoty kolem 20 mají dobrou krátkodobou stabilitu a pod 5 mV rychle agregují. Toto pravidlo platí pro čistě elektrochemické interakce nebo ve směsi s nízkomolekulárními

surfaktanty. Po přidání surfaktantu s vyšší molekulovou hmotností tomu tak není. (Mishra et al. 2009)

3.4.3 Krystalický stav

Krystalinita nanočástic je obvykle vyhodnocena rentgenovou difrakcí (XRD) nebo diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC). XRD je schopna odlišit amorfni a krystalické částice stejně jako polymorfni fáze. DSC je často používána jen jako doplňkový nástroj k XRD. Krystalické látky mají obvykle ostrý bod tání, který chybí u amorfni materiálů. Bod tání může být taky využit k rozeznání dvou polymorfů. (Wu et al. 2011)

3.4.4 Chemická stabilita

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je nejběžněji využívaná technika vyhodnocení chemické stability léčiva, která poskytuje přesnou kvantitativní analýzu chemických nečistot. Hmotnostní spektrometrie je často spojována s HPLC k identifikaci molekulární struktury nečistot. (Saez, Souza and Mansur 2018) Další techniky jako FTIR (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací) nebo NMR (nukleární magnetická rezonance) mohou být také použity k vyhodnocení chemické stability, avšak nejsou tolik populární. (Vogt et al. 2016)

3.4.5 Sedimentace a krémovatění

Tradiční metodou k vyhodnocení sedimentace nebo krémovatění je vizuální pozorování za určitý čas. Změřením usazené nebo krémovate vrstvy, vztažené k celkovému obsahu za určitý čas, získáme tzv. sedimentační objem, který je brán jako stabilitní parametr. Další metody k tomuto účelu využívané jsou laserový zpětný rozptyl a infračervená spektroskopie (near-infrared transmission). (Wu et al. 2011), (Ngan et al. 2014)

3.4.6 Disoluce

Disoluce je jeden z parametrů, který závisí na druhu inkorporovaného léčiva, druhu výrobního procesu a typu nanočástice. Těmito parametry můžeme ovlivnit uvolňování léčiva z nanočástice. Obecně můžeme rozlišit profily disoluce na základě

rozložení látky v částici na: tuhé roztoky, léčiva obsažená v jádře a léčiva obsažená v matrix částice. (Harms and Muller-Goymann 2011)

U lipidových nanočástic je pro uvolňování léčiva zásadní krystalinita a polymorfismus, který výrazně ovlivňuje vlastnosti lipidové matrice. Čím je vyšší organizovanost struktury, tím je kapacita nanočástice menší. (Anthony 2012)

Tabulka 2- Nejběžnější techniky hodnocení nanočástic (Vogt et al. 2016), (Lademann et al. 2007), (Ahmad, Mohammed and Ibrahim 2017)

Fyzikální metody hodnocení částic	Technika vyhodnocení
Měření velikosti a distribuce částic	LD, Coulterův počítač, PCS/DLS
Charakteristika povrchu a morfologie částic	Transmisní elektronový mikroskop (TEM), optický mikroskop, skenovací elektronový mikroskop (SEM), mikroskop atomových sil (AFM)
Měření náboje částic/zeta potenciál	Laserová Dopplerova elektroforéza
Chemická stabilita	HPLC/FTIR/NMR/MS
Krystalinita	XRD/DSC
Sedimentace/krémovatění	Visuální kontrola, laser backscattering, infračervená spektroskopie
Metody inkorporace	
Separace volné části léčiva	Dialýza, centrifugace, gelová filtrace
Účinnost zachycení léčiva	Rozrušení vesikuly, rozpuštění vesikuly
Obsah léčiva	Modifikované HPLC metody
Hodnocení penetrace/permeace	
In vitro disoluce léčiva a permeační studie	Franzova difúzní cela, celofánová dialyzační metoda
In vivo permeační studie	Tape stripping, differential tape stripping, Ramanova spektrometrie

4. ROZDĚLENÍ NANONOSIČŮ LÉČIV

Nanonosiče se dají dělit na několik kategorií podle jejich složení, skupenství, způsobu výroby, tvaru atd. Podle složení můžeme nejobecněji nanočástice dělit na anorganické a organické. Dále podle jejich tvaru na nanotobolky a nanosféry. Nanotobolky mají jasně ohraničené jádro od vnější stěny, zatímco nanosféry mají maticový charakter, ve kterém je léčivo dispergováno. (Roberts et al. 2017)

Avšak úplně nejpřehlednější rozdělení je podle skupenství (fáze): pevné, kapalné a tekuté krystaly. Mezi pevné spadají kovové nanočástice, pevné lipidy a pevné polymerní nanonosiče. Do kapalných převážně micely a nanoemulze lipidů s nižším bodem tání, než je teplota těla. Jako poslední jsou uváděné méně známé tekuté krystaly vytvářející tekuté krystalické nanodisperze, které jsou více strukturalizované než tradiční micely. (Palmer and DeLouise 2016)

Léčivo je v nosiči buď rozpuštěno, zachyceno, zapouzdřeno, adsorbováno nebo připojeno. (Roberts et al. 2017)

4.1 *Uhlíkové nanočástice (uhlíkové nanotrubičky a fullereny)*

Uhlíkové nanotrubičky jsou molekuly složené výhradně z uhlíku, které mají válcovitou strukturu. Jejich využití mělo sloužit především ke zvyšování penetrace kůže. Bylo prokázáno, že jednostěnné a vícestěnné uhlíkové nanotrubičky mohou být internalizovány (tj. přesunuty do vnitřního kompartmentu) živými buňkami a projít skrz buněčnou membránu ve studii na buněčných kulturách. Nanotrubičky mohou adsorbovat léčivo na svůj povrch a následně desorbovat. (Degim and Kadioglu 2013) Byly připraveny vícestěnné uhlíkové nanotrubičky, které měly velikost 2-100 nm. Avšak po vyhodnocení se hromadily pouze na povrchu kůže a žádné nebyly detekovány v hlubších vrstvách. (Lane 2011)

Fullereny jsou také uhlíkové nanočástice, které mají sférickou, elipsoidní nebo trubkovou strukturu. (Lane 2011) Mají menší velikost než nanotrubičky. Jejich hodnocení penetrace přes kůži probíhalo na prasatech. Při zkoumání vlivu různých druhů rozpouštědel míru jejich penetrace, k žádné penetraci nedošlo, při použití minerálního oleje. Při změně rozpouštědla za toluen nebo cyklohexan byly částice

s průměrem 1 nm detekovány ve stratum corneum, k dalšímu zvýšení penetrace došlo při využití chloroformu. (Xia, Monteiro-Riviere and Riviere 2010)

Hodnocení penetrace peptidem substituovaného fullerenu probíhalo na přístroji, který po dobu 60, 90 minut působil mechanické napětí kůže. Po 8 hodinách byla vyhodnocena dermální penetrace konfokálním mikroskopem v masírované kůži. U nemasírované nebyla žádná penetrace prokázána ani po 24 h. (Rouse et al. 2007)

V posledních letech opět narůstá zájem o tyto nosiče, díky jejich skvělým fyzikálně chemickým vlastnostem. Uhlíkové nanotrubičky mohou být využity k usnadnění permeace s vnější podporou elektrického proudu. Zdá se, že tento materiál se zdá být zajímavým do budoucna, avšak jeho toxicita musí být ještě prozkoumána. (Kuche et al. 2018)

4.2 *Quantum dots (kvantové tečky)*

Quantum dots jsou nanokrystaly vyrobené z polovodičových materiálů obvykle složené z kovového jádra (CdSe) pokrytého pláštěm např. ZnS. Mohou mít další opláštění anebo funkční skupiny připojeny k povrchu. Tvarově to jsou sférické nebo elipsoidní útvary. Jejich průměr je vždy menší než 20 nm. (Roberts et al. 2017) Mají charakteristické fluorescenční vlastnosti, kterých se využívá ve sledování jejich trajektorie v kůži. Tohoto poznatku se začalo využívat i v biologii, kde se do budoucna jeví jako vhodní kandidáti pro značení molekul, organel atd. (Medintz et al. 2005) V literatuře nejsou jednotné výsledky jejich průchodem skrz stratum corneum, ale malé quantum dots mohou masážní technikou a po porušení svrchní vrstvy tape stripping penetrovat skrz kůži. (Gratieri et al. 2010) Další testování na potkanovi prokázalo hromadění Cd v játrech a ledvinách, což vyvolalo obavy z jejich toxicity. Velký vliv na absorpci může mít velikost, pH, teplota a vhodný plášť. (Tang et al. 2013)

Předpokládá se, že quantum dots jsou schopny penetrovat oslabenou nebo narušenou svrchní vrstvou, nikoli však zdravou lidskou kůží za normálních podmínek. (Roberts et al. 2017) Jejich velký potenciál do budoucna se nalézá ve fotodynamické terapii kožního melanomu. (Carazo et al. 2018) Souhrn schopnosti penetrace a permeace kovových nanočástic viz Tab. 3.

4.3 Křemičitanové nanočástice

Křemičitanové nanočástice se používají nejčastěji jako přísady a plniva pro kosmetiku, potraviny, barvy, avšak v poslední době se zkoumají i jako vhodné lékové nosiče. Bylo prokázáno, že nanočástice oxidu křemičitého o velikosti 42 nm, které byly nanесeny na mírně porušenou pokožku měly tendenci se hromadit ve vlasových folikulech a mohou být pohlceny dendritickými a epidermálními buňkami. Nanočástice velikosti větší, než 75 nm už nebyly detekovány v hlubších vrstvách kůže. (Rancan et al. 2012)

V jiné studii se zkoumala penetrace velmi vysokých dávek amorfního oxidu křemičitého na myší kůži, která jim byla vystavena po 3 dny. Nanočástice byly po té době detekovány v lymfatických uzlinách. Tyto zvýšené hladiny částic mohou být způsobené dlouhodobým stykem kůže s částicí a následně způsobeným zánětem a změnou propustnosti kůže. (Palmer and DeLouise 2016)

4.4 Oxidy kovů

Používání oxidů kovů, především TiO_2 a ZnO je poměrně časté, hlavně v kosmetice, kde se využívá jejich ochranného účinku proti UVA a UVB záření. (Lane 2011). Odhaduje se, že 70 % všech opalovacích krémů v roce 2005 obsahujících TiO_2 a 30 % se ZnO byly formulovány s nanočásticemi. Krémy obsahující nanočástice jsou často průhlednější a díky tomu esteticky přijatelnější. Rozšířenost TiO_2 přispěla k rozsáhlým studiím, týkajících se jeho chování ve styku s kůží. Většina studií neprokázala penetraci ani permeaci TiO_2 porušenou nebo podrážděnou pokožkou. Z toho lze konstatovat, že většina zůstává ve vnějších vrstvách stratum corneum. (Adachi et al. 2013)

Oxidy kovů jsou velice stabilní sloučeniny, neuvolňující ionty kovů. Je prokázáno, že nepenetrují ani nepermeují, pokud jejich velikost není menší než 10 nm, tudíž jsou považovány za sloučeniny s nízkým zdravotním rizikem. (Baroli et al. 2007)

Mezi slibné nosiče se do budoucna považují železné oxidy kovů. Magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a geotit. Magnetické nanočástice mohou být využity všestranně, podobně jako ostatní, avšak navíc s nimi může být manipulováno v magnetickém poli. Aplikace střídavého magnetického pole

v blízkosti nádoru vede ke zvýšení teploty v místě aplikace až na 42 °C, což je teplota označovaná jako hypertermie. Vhodné jako komplementární léčba spolu s chemoterapií a radioterapií u onkologicky nemocných pacientů pro řadu typů rakoviny, včetně melanomu. (Bucak, Banu and Sezer 2012), (Chang et al. 2018)

4.5 Stříbrné nanočástice

Stříbrné nanočástice jsou široce využívány v mnoha spotřebních produktech, které se staly nedílnou součástí života hlavně díky jejich antimikrobiální aktivitě. Začleněním stříbrných nanočástic do přípravků se dostávají do kontaktu s kůží. Právě díky silnému uvolňování Ag iontů z přípravků mohou s kůží interagovat či penetrovat. (Kraeling et al. 2018)

Bylo prokázáno, že může dojít k tzv. argyrii, která je způsobena ukládáním iontů stříbra do bazální vrstvy kůže a mírné permeace projevující se zvýšenými jaterními enzymy. Absorpce přes intaktní kůži je nízká, jelikož většina Ag precipituje ve svrchních vrstvách stratum corneum ve formě sulfidů nebo chloridů. (Wijnhoven et al.)

Stejných výsledků dosáhly i jiné studie. Neprokázaly permeaci stříbrných nanočástic ani po 14denním podávání na prasečí kůži. Částice byly nalezeny pouze ve svrchních vrstvách stratum corneum. (Samberg, Oldenburg and Monteiro-Riviere 2010)

Expozice stříbrných nanočástic v poslední době stoupá s množstvím kosmetickým přípravků, ve kterých působí jako konzervační látky. Obecným faktem je, že větší stříbrné částice precipitují v roztocích a emulzích za určitý čas, a to snižuje jejich antimikrobní aktivitu, avšak částice s malou velikostí zůstávají rozptýleny v přípravku a jejich konzervační aktivita je zachována. (Kokura et al. 2010)

V dalších studiích byla vyhodnocena penetrace stříbrných nanočástic (20 nm) opláštěné různými funkčními skupinami s rozdílnými povrchovými náboji (neutrální, záporný, kladný) ve vodném roztoku a o/v emulzi. Výsledky ukázaly, že pouze neutrální a kladně nabitě částice penetrovaly lidskou kůží, pokud byly ve vysokých dávkách v roztoku a méně v emulzi. Jen velmi málo nanočástic bylo nalezeno v epidermis a jen sotva detekovatelné množství v dermis. přesto kladně nabitě částice

penetrovaly více. Z výsledků však vyplývá, že povrchové opláštění silně neovlivní penetraci částic. (Kraeling et al. 2018)

Tabulka 3- Shrnutí penetrace, permeace a bezpečnosti kovových nanočástic (Filon et al. 2015)

NPs	Kritická velikost částic(nm)	Nebezpečnost	Penetrace	Permeace	Mechanismus absorpce částic
TiO ₂	-	Velmi malá	Ne	Ne	-
ZnO	-	Ne	Ne	Ne	-
FeO	-	Ne	Ano	Ne	-
Au	12	Ne	Ano	Nejistá	-
Ag	70	Velmi malá	Ano	Ano	Uvolnění iontů
QDs (CdSe)	12	Možná	Ano	Ano	Cd uvolnění
Si	42	Možná	Ano	Ne	Bude studováno
Co	80	Dráždí	Ano	Ano	Uvolnění iontů
Ni	77	Dráždí	Ano	Ano	Uvolnění iontů
Pd	13	Dráždí	Ano	Ano	Uvolnění iontů
Pt	5	Není známo	Malá	Ne	-
Rh	5	Není známo	Malá	Ne	-

4.6 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice můžeme obecně dělit podle několika různých kritérií. A to zejména na:

- I. Syntetické, semisyntetické a přírodní polymery (Zhang et al. 2013)
- II. a. Hydrofobní polymery stabilní ve vodném prostředí
b. Velké molekuly s dentrickými strukturami

4.6.1 Hydrofobní polymery

4.6.1.1 Nanotobolky a nanosféry

Polymerní nanokapsule jsou submikronové koloidní částice s jádrem, které jsou obklopeny pláštěm. Nanosféry se skládají z homogenní matrix, ve které je léčivo homogenně dispergováno. (Wu and Guy 2009) Polymer tvořící plášť nanokapsul má velký vliv v kontrolovaném uvolňování léčiva. Vnitřní část je obvykle tvořena z organické fáze, většinou olejové, málokdy z hydrofilního jádra. Olejové jádro je většinou tvořeno tekutým lipidem, směsí tekutých lipidů nebo pevným a tekutým lipidem. (Frank et al. 2015)

Nedegradovatelné materiály, které mají v kůži nejasný osud a mohou potencionálně vyvolávat imunitní odpovědi se využívají jen k modelovému chování polymerů. Z tohoto důvodu jsou vyhledávány materiály se schopnostmi se hydrolyticky nebo enzymaticky štěpit na netoxické produkty. K těmto účelům jsou vhodné hydroxyalkanoáty jako jsou polymléčné kyseliny (PLA), poly-laktid-koglykolid (PLGA) nebo poly- ϵ kapronolaktony (PLC). (Vogt et al. 2016) Další polymery z přírodních materiálů vhodné k využití jsou alginát sodný nebo albumin. (Amoabediny et al. 2018)

Jádro nanotobolky má výhodu ve vysokém objemu léčiva, které dokáže pojmu s relativně nízkým obsahem polymeru. Ve srovnání s liposomem je plášť robustnější, protože je kovalentně pospojován. (Wu and Guy 2009)

Polymerní nanotobolky vykazují zajímavé výhody zejména ve zvýšené stabilitě léčiva, lepší interakci, snížení vedlejších účinků, vyšší účinnosti. Hydrofobicita polymeru a velikost částic měla vliv na interakci s kůží. Proto správná

volba vlastností částice může být použita pro řízené uvolňování léčiva přímo do kůže. (Abdel-Mottaleb, Neumann and Lamprecht 2011)

Vlastnosti polymeru dosti závisí na kopolymerní substituci, která určuje hodnotu skelného přechodu a tím jeho deformabilitu. K těmto účelům se často používají kopolymery kyseliny metakrylové, která má snadno modulovatelné vlastnosti s použitím různých monomerů. (Vogt et al. 2016)

4.6.2 Micely

Polymerní micely jsou amfifilní blokové kopolymery, které ve vodném prostředí automaticky tvoří micely. Jejich velikost je mezi 5 až 50 nm. Biokompatibilita a bezpečnost hraje klíčovou roli v těchto nových systémech. Schopnost modulovat vlastnosti amfifilního bloku je důležitou vlastností, která zvyšuje jejich zájem v oblasti vědy. Konjugací s ligandy či antigeny se může zvýšit jejich stabilita a kontrolovat jejich uvolňování do cílových tkání. (Rode, Sharma and Mishra 2018)

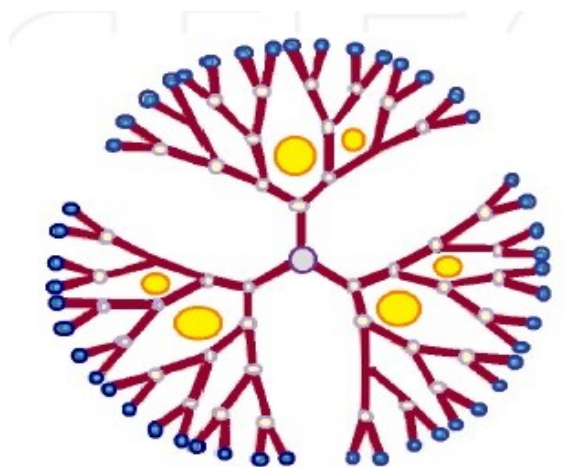
Micely se dají úspěšně použít pro hydrofilní i lipofilní léčiva, zaleží jen na vhodně zvoleném polymeru. Polyetylglykol (PEG) je nejčastěji používaným hydrofilním blokem. Hydrofobní jádro hraje důležitou roli v rozpustnosti slabě rozpustných látek ve vodě, proto jeho další modifikací může být zvýšena stabilita a množství enkapsulace léčiva. (Elsabahy and Wooley 2012)

4.6.3 Dendrimery

Dendrimery jsou monodisperzní jednotky, které jsou strukturně a chemicky jednotné. Jejich větvenost umožňuje konjugaci s četnými funkčními skupinami. (Palombo et al. 2014) Množství větví roste exponenciálně a jejich velikost je přibližně o 1 nm za každou generaci větší v rodině PAMAM. S tím souvisí i rozdělení dendrimerů podle počtu nasyntetizovaných generací. (Svenson and Tomalia 2005) Na obrázku 5 je vidět struktura dendrimeru se 4 generacemi a inkorporovaným léčivem.

V prvním kroku je důležité vytvoření jádra, na které se dále přidávají monomerní jednotky. Dalším přidáním nasyntetizovaného monomeru, který se přidá na stávající, vznikne další generace. Tento přístup umožňuje větvení jednotky, kterou

nám dává kontrolu nad molekulovou hmotností, tak i architekturou dendrimera. (Kabanov et al. 1998)



Obrázek 4- Větvená struktura dendrimera s inkorporovaným léčivem (Escobar-Chávez et al. 2012)

Právě druh vybraného polymeru ke konstrukci dendrimera polymerizací je klíčovým krokem, co se týče finální architektury a vlastností. Navíc použití monomeru je specifické v tom smyslu, že poskytují místa přizpůsobené pro molekulární rozpoznání a pohlcení. Vlastní 3D struktura dendrimera se chová stejně jako periferní funkční skupiny, právě tato architektura poskytuje vhodné fyzikální a chemické vlastnosti. Ve srovnání s lineárními polymery mají dendrimery „prázdné nevyplněné prostory“, které přidělují dendrimera jedinečné vlastnosti. Tyto prostory mohou v podstatě napodobovat určité struktury, které jsou fyziologicky rozpoznávané přirozenými bílkovinami. (Escobar-Chávez et al. 2012)

Dendrimery mají vysokou hustotu povrchového náboje v důsledku mnoha ionizovatelných skupin, díky kterým mohou na sebe vázat elektrostatickými vazbami léčiva. Tato asociace léčivo-dendrimer poskytuje léčiva s vyšší rozpustností a zlepšuje jejich průchod skrz biologické membrány a někdy zvyšuje i stabilitu léčiva. Počet molekul léčiva, které je možné začlenit, souvisí s počtem funkčních skupin na povrchu dendrimera. Nicméně všechny funkční skupiny na povrchu nejsou vhodné pro vazbu s léčivem, jedná se především o příliš velký sterický objem skupiny, molekulovou rotaci nebo stereochemické efekty. Dendrimery mohou mít na svém povrchu různé

skupiny s různým nábojem, pozitivním i negativním umožňujícím jim vytvořit komplex s různými typy léčiv. (Kabanov et al. 1998), (Escobar-Chávez et al. 2012)

Ve srovnávací studii dendrimery (20-30 nm) a solid lipid nanoparticles (SLN) o rozměrech částic 150- 170 nm, byla testována míra jejich penetrace na prasečí kůži. Ve srovnání s krémem zvýšily dopravení barviva (Nilská červeně) 8x do stratum corneum a 13x do epidermis. Pevné lipidové nanonosiče (SLN) zvýšily penetraci do stratum corneum pouze 3,8x do stratum corneum a 6,3x do epidermis. (Kuchler et al. 2009)

Toxicita a špatná biodegradovatelnost některých polymerů je stále největší nevýhodou. Využívání poly-amidoaminu (PAMAM) dendrimery vede ke tvorbě toxických akrylátů, což limituje jejich aplikaci. Lze nasyntetizovat i jiné např. peptidové dendrimery, které disponují nižší toxicitou, nižší cenou a lepší biodegradovatelností. (Dragicevic and Maibach 2018) Metody přípravy polymerních nosičů viz. Tab. 4.

Tabulka 4- Vybrané druhy výroby polymerních nosičů (Iqbal, Ali and Baboota 2018)

Způsoby přípravy polymerních nosičů
Nanoprecipitace
Vysolování
Superkritická fluidní technologie
Extruze
Mikrofluidizer
Metoda iontové gelace

4.7 Lipidové nanočástice

Lipidové nanočástice vynikají mezi všemi druhy nanočástic hlavně vyšším stupněm biokompatibility a všestranností jejich použití. Jsou už komerčně dostupně v lékových formách pro orální, inhalační, parenterální a topické podání. Lipidové nanoformulace mohou být šité na míru právě pro široké spektrum léčiv, které vyžadují

přesně požadované podmínky jako je druh onemocnění, cesta podání, cena, stabilita, toxicita a účinnost. Osvědčená účinnost a bezpečnost je jedním z klíčových prvků pro využití lipidových nanočástic k přípravě léčiv stejně jako vakcín, diagnostik a nutraceutik. (Anthony 2012)

Lipidové formulace mohou ochránit aktivní substanci před biologickou degradací a tím zvýšit účinnost léčiva. Dále snižují toxicitu určitých substancí změnou jejich biodistribuce do citlivých orgánů. Toto snížení toxicity může vést ke zvýšení dávek toxických léčiv v terapii a navíc dát šanci dalším látkám. (Anthony 2012)

Mikroemulze, SLN a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) jsou tekuté nebo koloidální disperze s nízkou viskozitou. Tím poskytují velice nízkou adhezenci ke kůži a mohou být nevhodné v některých případech. Inkorporací těchto formulací do krémů nebo hydrogelů zvýšíme schopnost adheze a stanou se vhodnějšími k aplikaci. (Souto, Doktorovova and Boonme 2011)

4.8 Klasifikace surovin pro výrobu lipidových nanočástic

4.8.1 Homolipidy (jednoduché lipidy)

Homolipidy jsou molekuly složené z mastných kyselin a alkoholu spolu spojené esterickou vazbou. Jako donor alkoholu nejčastěji slouží glycerol, kdy esterifikací jednotlivých hydroxylových skupin mohou vznikat mono-, di- a triglyceridy tzv. tuk. Řetězce dlouhé od C14-C24 jsou součástí běžného tuku, zatímco C6-C12 se nacházejí v kokosovém a palmo-jádrovém oleji. Mezi lipidy můžeme zařadit i oleje, ve kterých je alespoň jedna vazba v uhlovodíkovém řetězci nenasycená. Jejich typickou vlastností je kapalnost. Dále sem patří i vosky lišící se vyšší délkou řetězce mastné kyseliny. Typickými zástupci jsou včelí vosk, karnaubský vosk. Z glyceridů to jsou oleje a tuky a ze sterolů estery mastných kyselin s cholesterolem. Nejčastěji využívané mastné kyseliny jsou stearová (C18), palmitová (C16), myristová (C14) a laurová (C12).

4.8.2 Heterolipidy (Složené lipidy)

Jsou lipidy obsahující i jiné prvky ve svých skupinách např. dusík, fosfor atd. Patří sem skupiny z řad fosfolipidů, glykolipidů a sulfolipidů. Fosfolipidy jsou

esenciální lipidy tvořící buněčnou membránu ve všech druzích živých organismů. Typickým příkladem heterolipidu může být ceramid, který je základem všech sfingolipidů.

4.8.3 Komplexní lipidy

Se vyskytují převážně ve vazbách s proteiny a subcelulárními částmi. Patří sem převážně lipoproteiny a chylomikrony, které jsou zodpovědné za přesun cholesterolu v našem těle. Jsou tvořeny nepolárním jádrem a obklopující jednovrstevnou fosfolipidovou vrstvou, ve které je obsažen cholesterol a jeden či více apoproteinů. (Attama, Momoh and Builders 2012)

4.9 *Solid lipid nanocarriers (SLN)*

Z historického hlediska se jejich výzkum nejdříve zabíral intravenózním a později orálním podáním. Jedním z důvodů, proč se směr jejich výzkumu přesunul k dermálnímu podání, jsou nižší legislativní překážky, které dovolují jejich rychlejší zavedení na trh. (Muller et al. 2007)

SLN jsou nové potenciální koloidní nosiče, jako alternativní materiály k polymerním. Škála rozpětí, ve kterém se pohybují, je od 100-150 nm. Tyto nosiče jsou podobné k parenterálním emulzím o/v, ale tekutý lipid je nahrazen za pevný. (Raut, Doijad and Mohite 2018) Složení tedy obsahuje pevný lipid nebo směs pevných lipidů (glyceridy nebo vosky), surfaktant a vodnou fázi. (Rangsimawong et al. 2016)

Obvykle procentuální zastoupení jednotlivých složek tvořících disperzi je 0,1-30% (w/w) pevného lipidu nebo směsi pevných lipidů (tzn. pevný lipid je pevný za pokojové teploty nebo teploty těla) a surfaktantu od 0,5%-5% (w/w). (Pardeike, Hommoss and Muller 2009)

SLN mohou zvýšit perkutánní absorpci zapouzdřeného léčiva a v závislosti na složení nosiče a umístění léčiva v nosiči, můžeme dosáhnout cíleného zaměření efektu. To může přispět ke snížení nežádoucích účinků, zvláště ztenčení kůže při dlouhodobém používání kortikosteroidů. (Souto et al. 2011)

Jednou z nevýhod SLN je jev, který se vyskytuje při přípravě a skladování. Během skladování se lipidy přeměňují na stabilnější a uspořádanější struktury (např.

beta modifikaci). To může mít za následek vyloučení inkorporovaného léčiva a snížení kapacity nosiče. (Pardeike et al. 2009), (Zhai and Zhai 2014) Tabulka 5 obsahuje souhrn výhod a nevýhod SLN.

Tabulka 5- Výhody a nevýhody SLN nosičů (Raut et al. 2018)

Výhody SLN	Nevýhody SLN
Nejsou snadno pohlceny RES, vyhnou se oběhu skrz játra a slezinu	Malá obsahová (loading) kapacita
Možnost kontrolovaného uvolňování	Polymerní přechody během skladování mohou vést k vyloučení léčiva z
Možnost přesného zacílení může být zvýšeno opláštěním nebo připojením ligandu	Malá kapacita pro léčiva rozpustná ve vodě kvůli rozdělovacímu efektu během výrobního procesu
Vhodné pro lipofilní i hydrofilní léčiva	
Nevyužívá se při výrobě organické rozpouštědlo	
Užité lipidy jsou biokompatibilní a fyziologické	
Sterilizovatelné	
Nízká cena ve srovnání s polymery a fosfolipidy	
Jednoduchá výroba a scale-up	
Jednodušší kontrola farmakokinetiky	
Zvýšená stabilita oproti ostatním koloidním systémům	
Vhodná pro více způsobů podání	
Ochrana léčiva proti degradaci (např. retinol)	
Dobrá reprodukovatelnost s rozdílnými metodami přípravy	
Zvýšení biodostupnosti uchyceného léčiva	

SLN vytváří na povrchu kůže film, který se mísí s kožními lipidy a redukuje ztrátu vody, zvyšuje hydrataci pokožky a pomáhá chránit funkce stratum corneum. Jako hlavní mechanismy zvýšení permeace v tomto případě jsou:

- 1) Prodloužený kontakt s povrchem kůže
- 2) Okluzivní povaha formulace hydratující pokožku
- 3) Interakce lipidů přípravku s lipidy stratum corneum

Důkazem interakce lipidů nosiče s lipidy stratum corneum je změna fázového přechodu teploty (diferenciální skenovací kalorimetrie). (Roberts et al. 2017)

Vysoce negativně nabitá pokožka poskytuje prostor pro pozitivně nabité fosfolipidy, s kterými mohou vytvořit interakce a tím zvýšit schopnost permeace.

4.10 Nanostructured lipid carriers (NLC)

NLC jsou nanokoloidní nosiče charakterizované pevným jádrem, složené ze směsi pevných (dlouhé řetězce) a tekutých (krátké řetězce) lipidů. Stejně jako SLN i NLC jsou připraveny z biokompatibilních a biodegradabilních lipidů. Jsou nazývány i tzv. druhou generací nosičů. NLC byly vyvinuty s cílem překonat omezení související s používáním SLN. Ve srovnání s nimi mají vyšší kapacitu zapouzdření (loading capacity) pro řadu látek, nižší obsah vody v suspenzi částic a minimalizují potenciál vyloučení účinných látek během skladování. (Mehnert and Mader 2001) SLN mají vyšší penetrační schopnost ve srovnání s NLC a nanoemulzemi s podobným složením. SLN výrazně zvýšily koncentraci modelové látky od svrchní vrstvy stratum corneum až po svrchní část dermis. To se vysvětluje vyšším obsahem vody ve formulaci, která se postupně vypařuje a tím zvyšuje koncentraci léčiva, které přišlo do kontaktu s kůží. Zároveň tím dochází ke změně krystalické struktury, která vypuzuje léčivou látku. (Borgia et al. 2005)

Na druhou stranu bylo porovnávána schopnost zapouzdření beta-karotenu (vysoce lipofilní látka) v různých nosičích, tj. SLN, různé koncentrace NLC a emulze. Výsledkem bylo, že kapacita zapouzdření (loading efficiency) byla u SLN asi jen 20 %. U NLC se míra zapouzdření léčiva zvyšovala s množstvím tekutého lipidu. Emulze

obsahující 100 % tekutých lipidů měli kapacitu zapouzdření blízkou 100%. Výsledky ukazují, že množství zapouzdřeného beta karotenu souvisí s frakcí tekutého lipidu, který obsahují SLN, NLC a emulze. (Pan, Tikekar and Nitin 2016)

NLC s různým poměrem pevné a tekuté části vykazují rozdílné in vitro profily uvolňování léčiva. NLC s vyšším poměrem oleje k pevnému lipidu vykazují vyšší množství uvolněného léčiva vzhledem k NLC s nižším poměrem a k SLN. (Teeranachaideekul et al. 2008)

V dalších studiích zaměřujících se na množství lipidů se stejným poměrem pevných a tekutých lipidů v jádře NLC bylo uvedeno, že formulace obsahující větší množství lipidů vykazují větší velikost částic. Je to vysvětleno tím, že vložená energie do systému obou formulací byla stejná, a proto pro dispergaci většího množství lipidů (30 % w/w) byla vložena menší část energie na jednotku lipidu, než ve formulaci s menším obsahem (20 % w/w). Formulace s větším množstvím lipidu byla i méně stabilní ve srovnání s menším obsahem kvůli schopnosti jednodušeji rekrystalizovat. (Loo et al. 2013)

Dále byla řešena i stabilita částic z hlediska poměru pevného a tekutého lipidu. Formulace s poměrem pevného/tekutého lipidu 90:10 vykazovala větší míru stability v porovnání s formulací s poměrem 50:50. Velikost částic v první zmíněné formulaci byla stejná i po 3 měsících, kdežto ve druhé se zvýšila o 19 %. Mohlo by to být dáno větším množstvím pevného lipidu v první formulaci, který zabraňuje koalescenci kapiček. (Loo et al. 2013)

Kompozice s přidáním propylenglykolu vykazují vyšší fyzikální stabilitu oproti ostatním formulacím. Přidáním propylenglykolu navíc došlo i ke zmenšení velikosti částic a zvýšení fyzikální stability. Všechny formulace NLC nosičů výrazně zvyšovaly hydrataci pokožky během 7 dnů nanášení na předloktí 30 žen ve srovnání s neošetřenou pokožkou. (Loo et al. 2013)

Z dalších testovaných parametrů vykazovaly formulace NLC i vyšší schopnost ochrany polynenasycených olejů proti degradaci ve srovnání s emulzemi. Bylo sledováno zvyšující se peroxidové číslo polynenasyceného oleje (PNO) jako funkce času pod stresovými podmínkami (45 °C, expozice kyslíku a třepání). PNO jako součásti mnoha kosmetických přípravků podléhají degradaci. Míru degradace nám

pomáhá určit stabilitní ukazatel, v našem případě peroxidové číslo. NLC vykazovaly peroxidové číslo zhruba poloviční tj. 10 mmol O₂/kg oproti 20 mmol O₂/kg u emulzí za 9 dnů. (Muller et al. 2007)

NLC jsou velmi rychle rozvíjející se nosiče, které se od roku 1999, kdy došlo k jejich objevení, už po 6 letech dostaly na trh jako kosmetické přípravky. Jejich použití se zaměřuje především na regeneraci pokožky, zabránění předčasnému stárnutí pokožky, proti vráskám a správné hydrataci. (Muller et al. 2007)

4.11 Liposomy a niosomy

Liposomy a niosomy jsou duté lipidické nebo amfifilní dvouvrstvé struktury, které umožňují transport hydrofilních léčiv uvnitř jádra a přenos hydrofobních látek uvnitř lipidových vrstev. Liposomální dvouvrstvy jsou nejčastěji tvořeny cholesterolem a fosfolipidy nejčastěji lecitinem, u niosomů jde především o kombinaci cholesterolu s neionickými surfaktanty (Spany, Tweeny a Brije). U neionických surfaktantů tedy není žádná nabitá skupina, která je umístěna na hydrofilní části. (Moghassemi and Hadjizadeh 2014)

Neionické amfifilní molekuly využívané pro výrobu niosomů jsou tříděny do 4 kategorií. Podle chemické struktury to jsou alkylestery, alkylamidy, alkylethery a estery mastných kyselin. Výběr surfaktantu závisí především na hydrofilně-lipofilní rovnováze (HLB) konstantě a parametru kritického zabalení (CPP). CPP je kritérium, podle kterého se hodnotí schopnost surfaktantu tvořit sférické micely. (Moghassemi and Hadjizadeh 2014)

Cholesterol je přidáván kvůli zvýšení stability dvojvrstvy. Nadále snižuje permeabilitu dvojvrstvy a snižuje únik aktivních látek. K liposomání kompozici je často navíc kvůli zamezení oxidace fosfolipidů zahrnut neutrální pufr a antioxidant jako askorbát sodný. (Sala et al. 2018)

U niosomů bylo prokázáno, že hlavní skupiny surfaktantu Span 80 jsou pohyblivější a méně hydrofobní, než amfifilní skupiny liposomu. To vede k vyšší propustnosti pro hydrofilnější látky. Dále vezikuly tvořeny Span 80 jsou schopny se narušit a z poloviny se sloučit (hemifuse) s fosfolipidovými vezikuly. To je důležitou vlastností, protože úplné sloučení niosomu s fosfolipidovou membránou by vedlo

k přenosu obsahu vesikuly. To je prvním krokem k přenosu léčiva nebo genu do savčích buněk. Dosud sloučení niosomu s buňkou nebylo prokázáno. (Bartelds et al. 2018)

Niosomy stejně jako fosfolipidy mají schopnost se samovolně sestavit ve vodném prostředí a vytvořit jednu nebo více dvojvrstev. (Sala et al. 2018), (Moghassemi and Hadjizadeh 2014) Výrobní podmínky a chemické složení ovlivňují vznik malých unilamelárních vesikul (SUV), velkých unilamelárních vesikul (LUV), velkých multilamelárních vesikul (MLV) a multivesikulárních vesikul (MVV). Na rozdíl od emulzí jsou termodynamicky stabilní struktury. (Wu and Guy 2009)

Niosomy mohou mít odlišné vlastnosti na základě obsažených pomocných látek a procesu jejich zpracování. Například nasycené/nenasycené uhlovodíkové řetězce ovlivní únik léčiva, stejně tak hodnota teploty fázového přechodu, která závisí na délce nepolárních částí surfaktantů mezi sebou tvořící množství van der Waalsových můstků atd. (Bartelds et al. 2018)

Niosomy se staly terčem zájmu díky jejich některým výhodnějším vlastnostem, ve srovnání s liposomy. Jedná se především o nižší cenu, vyšší stabilitu a žádné zvláštní podmínky skladování. (Amoabediny et al. 2018) Další výhody jsou osmotická aktivita, snadná tvorba a modifikace struktury (díky funkčním skupinám obsaženým v polární části), neimunogenost, biodegradabilita, žádné zvláštní podmínky uchovávání, zvyšují orální a dermální penetraci, snadná kontrola vlastností niosomu (díky metodě přípravy, volbě surfaktantu, množství přidaného cholesterolu, velikosti, povrchovému náboji a koncentraci formulace suspenze). (Moghassemi and Hadjizadeh 2014)

Tvar a velikost niosomu závisí především na zvolené technice přípravy, zvoleném lipidu, a procesních proměnných. Tloušťka membrány se pohybuje kolem 5-6 nm. Průměr vesikul se pohybuje od 50 do několika stovek nm. (Wu and Guy 2009)

Niosomy mají velice nízkou toxicitu díky jejich neionickému charakteru. Jsou více kompatibilní oproti surfaktantům s nábojem. Díky jejich výhodnějším vlastnostem se stávají preferovanějším nosičem léčiv před liposomy. (Moghassemi and Hadjizadeh 2014)

4.11.1 Aplikace liposomů a niosomů

Aplikace liposomů pro topické použití léků a kosmetických přípravků představuje obrovskou oblast aktivity. Lipidové vesikuly se mísí s endogenními lipidy stratum corneum a přemísťují svoji náplň do kůže. Mikroskopické pozorování potvrdilo fúzi liposomu s lipidy stratum corneum a jejich setrvání na místě. Důležité je si uvědomit, že účinnost topického podání závisí především na fyzikálně chemických vlastnostech léčiva. (Choi and Maibach 2005)

Například uvolnění progesteronu z emulze Intralipid© bylo významně větší než z liposomální formulace, kde penetrovalo pouze 1 % léčiva za stejný čas. Uvolňování léčiva z liposomu probíhalo kinetikou 0. řádu, kontrolovanou pomalým mezifázovým transportem z dvouvrstvy liposomu do okolního vodného prostředí. (Wu and Guy 2009), (Knepp et al. 1987)

Na druhou stranu léčiva iritující pokožku mohou být technologicky zpracovány do liposomálního gelu (např. Ekonazol), který zvýší koncentraci léčiva v epidermis až 7x v porovnání s kontrolním přípravkem. Díky tomu je možné snížit množství podaného léčiva, a přitom zachovat ekvivalentní terapeutickou účinnost. (Wu and Guy 2009)

Existuje mnoho způsobů výroby vesikul, laboratorních až po velkovýrobní, kterými se dají vytvořit vesikuly různých rozměrů od 20 nm až po několik mikronů v průměru a složené z jedné nebo více dvojrstev. Nicméně většina z těchto technik není vhodná pro enkapsulaci citlivých látek kvůli jejich vystavení mechanickému tlaku, potenciálně škodlivým chemikáliím nebo nízkým/vysokým hodnotám pH během výroby. (Mozafari 2005) Využívané metody přípravy nosičů viz. Tab. 6.

Ve velkovýrobě je důležité použít techniky, které budou splňovat podmínky farmaceutického průmyslu. Jedním z nejdůležitějších kroků při výrobě je sterilizace. Je obecně známo, že lipidové vesikuly mohou být sterilizovány filtrací, další metody zahrnují chemické nebo fyzikální zacházení, které by je mohlo poškodit. Nicméně, většina virů nemůže být odstraněna filtrací a navíc je celý proces časově náročný. Avšak bylo prokázáno, že klasická teplotní sterilizace (121 C°, 20 min), nemusí narušit liposomální integritu. (Mozafari 2005)

Konvenční způsoby výroby liposomů zahrnují 4 kroky:

- 1) Odpaření organického rozpouštědla ze směsi lipidů
- 2) Dispergace lipidů ve vodném médiu
- 3) Přečištění výsledného liposomu
- 4) Analýza finálního produktu

Tabulka 6- Různé metody přípravy nanonosičů (Iqbal et al. 2018)

Způsoby přípravy lipidových a surfaktantových nosičů
Vysokotlaká homogenizace
Mikroemulze
„ <i>Solvent emulsification evaporation</i> “
„ <i>Solvent emulsification diffusion</i> “
„ <i>Membrane contact</i> “
Ultrasonifikace
„ <i>Multiple-emulsion</i> “

4.11.2 Proniosomy

Proniosomy jsou tzv. hybridní sloučeniny ve formě tekutého krystalu, které při hydrataci dávají vzniku niosomu. Mohou zvýšit biodostupnost inkorporovaného léčiva a poskytnout lepší terapeutickou aktivitu kontrolovaným řízením. Nízká toxicita, zvýšená schopnost penetrace a možnost modifikovaného uvolňování jsou určité výhody proniosomálních gelů. Tyto niosomy odvozené od proniosomu se zdají být alternativou k dalším vezikulárním nosičům, díky jejich zvýšené stabilitě a efektivní schopnosti penetrace. (Khatoon et al. 2017)

Bylo uvedeno, že každá z připravených formulací proniosomu obsahující levonorgestrel dosahovala kolem 100 % účinnosti enkapsulace. Takto velká čísla jsou přisuzována velké lipofilitě léčiva. Velikost částic je závislá na složení přípravku a vložené energii metody přípravy. Transdermální náplast obsahující proniosomový gel vykazovala i větší inhibiční aktivitu tvorby žlutého tělíska ve srovnání s mastí a kontrolou. Z pozorování lze tvrdit, že proniosomy vytváří kontrolovaný a prodloužený účinek levonorgestrelu ve srovnání s kontrolou. (Vora, Khopade and Jain 1998)

V další studii byla vyhodnocována účinnost antipsychoticky používaného léčiva risperidonu. Proniosomové transdermální náplasti s risperidonem vykazovaly lepší permeační schopnosti než konvenční liposomy. Vykazovali vyšší maximální koncentraci, plochu pod křivkou a plochu pod momentální křivkou. Poločas eliminace byl $18,59 \pm 0,72$ h oproti konvenčnímu liposomu, který dosahoval $21,56 \pm 0,89$ h. Relativní biodostupnost byla dokonce vyšší oproti orálnímu podání 1,31x. Je to vysvětleno tím, že C_{max} výrazně poklesla, zatímco výrazně vzrostla AUC. (Imam et al. 2015)

Pro přípravu gelu či prášku je potřeba neionický surfaktant, membránový stabilizátor, malé množství vody a alkoholického rozpouštědla jako ethanol, propanol, butanol, isopropanol, propylenglykol či tekutý polyethylenglykol.

4.11.3 Transferozomy

V roce 1992 bylo vědcům Cevc a Blume připsáno jako prvním vytvoření nového konvenčního liposomu k usnadnění prostupu léčiv skrz stratum corneum. Mechanické vlastnosti lipidové dvojvrstvy a její role v přírodě byli intensivně studovány. Jako příklad lze uvést elastomechaniku červených krvinek, která reguluje jejich filtrovatelnost. (Cevc and Gebauer 2003)

Transferozomy jsou novým typem liposomu. Pro tyto elastické liposomy (EL) se v praxi využívá mnoha názvů jako deformovatelné liposomy, ultradeformovatelné liposomy, flexibilní liposomy, ultraflexibilní liposomy a transferosomy. (Hussain et al. 2016)

Tvoří je fosfolipidy, cholesterol a „edge aktivátor“ (EA), molekula surfaktantu jako je např. cholát sodný, Span 80 nebo Tween 80. Tyto komponenty tvoří membránu vezikulu flexibilnější. (Ghanbarzadeh and Arami 2013)

Transferosomy se řadí mezi tzv. ultradeformovatelné nanonosiče, o kterých je deklarováno, že částice o velikosti 200-300 nm se dokáže zmáčknout a projít pórem, který je menší, než desetina jejich průměru a tím schopny penetrovat skrz neporušenou kůži. Penetrace těchto částic nejlépe funguje za podmínek in vivo spolu s hydratačním gradientem směrem od povrchu k živým strukturám. (Thong et al. 2007) Proto je velmi důležité, zda vyhodnocení probíhá in vivo/ in vitro nebo s okluzí či bez. Okluze částic zvyšuje schopnost penetrace běžných konvenčních přípravků, ale u transferozomů je tomu právě naopak. (Cevc et al. 2008)

Měřením a modelováním efektu hydratačního gradientu přes bariéry se demonstroval transport lipidových agregátů, který je řízen dehydratací v místě podání. Dehydratace vyvolaná vesikuly je pohyblivou silou, která začíná s určitou prodlevou. Tento čas koresponduje s časem, který je potřeba k dosažení limitní hydratace vesikul. Oba parametry (čas, rychlost) jsou úměrné k počátečnímu přebytku vody v místě podání a snižují se s vyšší relativní vlhkostí v místě podání. Systém obsahuje agregáty vesikul s neobvykle vysokou adaptibilitou a povrchovou hydrofilitou. (Cevc and Gebauer 2003), (Cevc et al. 2008)

Aplikace diklofenaku transferozomy v porovnání s komerčně dostupnými gely prokázalo stálé a prodloužené uvolňování a vyšší množství diklofenaku v kůži. Toho by se dalo vhodně využít v kombinované terapii orálních a topických přípravků u pacientů s revmatoidním onemocněním. (Cevc and Blume 2001)

Ve srovnávací studii byly porovnávány dermálně podávané transferosomy, konvenční liposomy a ethanolický roztok. Značený metotrexát byl použit jako sledovaná látka. Vyhodnocení probíhalo na neporušené krysí kůži, kde transferosomy prokázaly lepší penetrační schopnosti oproti konvenčním liposomům. Byly detekované fluorescenčním mikroskopem ve všech vrstvách epidermis. (Zeb et al. 2016)

Další výhodou je, že dokáží dopravit látky s velkou molekulovou hmotností např. vakcíny. (Rode et al. 2018)

Byly navrženy 2 možné hydrofilní cesty penetrace do SC:

- 1) „*Intercluster route*“ - nachází se mezi shlukem 3-10 korneocytů, tzv. propast, která má stejnou šířku a hloubku. Tyto propasti tvoří méně než 1% celkové plochy pokožky.
- 2) „*Intercorneocyte route*“ - se nachází mezi jednotlivými korneocyty, tato cesta tvoří více než 3% celkového povrchu kůže (Wu and Guy 2009)

Složení liposomů ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti a následně mění účinnost, s kterou procházejí skrz kůži. EA snižují přechodovou teplotu a destabilizují lipidovou dvojvrstvu EL pro zvýšení její fluidity. To je základním předpokladem průchodu skrz bariéru. Důkladným porozuměním EA je předpokladem pro zjištění ideálního EL.

Nejvíce preferovanými fosfolipidy jsou nenasycené sojový a vaječný fosfatidylcholin (10 % w/w). Obecně mají tyto lipidy nižší přechodovou teplotu. Za vyšších teplot jsou ve stavu tekutých krystalů, což způsobí lepší únik léčiva (díky lepší permeabilitě), při pokojové teplotě (25 °C), a když jsou aplikovány na kůži (32°C). Proto by měla být přechodová teplota nastavena mezi těmito teplotami pro zvýšení doby skladování. Amfifilní molekuly obsahující glycerolové můstky spojující acylové uhlovodíkové řetězce s polárními hlavami ovlivňují fázový přechod lipidové membrány zvýšením elasticity. (Hussain et al. 2016), (Mota et al. 2017)

Další komponenty mohou být PEGylované lipidy, kationické lipidy, cyklodextrin pro enkapsulaci léčiva, ethylalkohol jako vodný obsah a gel jako nosič vesikul.

4.11.4 Ethosomy

Ethosomy, jsou liposomy s vysokým obsahem ethanolu (až 45 %), penetrují kůži a zvyšují dodání léčiva do hlubších vrstev kůže či do systémové cirkulace. (Touitou et al. 2001), (Sala et al. 2018) Tyto nanonosiče jsou speciálně navrženy pro účelný přenos terapeutických látek s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi do hlubších vrstev kůže a skrz kůži. Ethosomy již podstoupily rozsáhlý výzkum od roku 1996, kdy byly vynalezeny. Ethosomy mohou být dále děleny na podkategorie, podle

jejich přidaných konstituentů na klasické ethosomy, binární ethosomy a transethosomy. (Abdulbaqi et al. 2016)

Z dat vyplývá, že velikost částic se zmenšovala s množstvím přidaného ethanolu, ale naopak rostla s množstvím fosfolipidu. Dále velikost ovlivnilo i množství energie při výrobě ultrazvukovou metodou. (Yang et al. 2017)

Ve srovnání s liposomy a vodným ethanolickým roztokem vytvářely ethosomy depozita po delší dobu v kožních adnexách a dermis. Tento fakt poukazuje na zvláště vhodné použití ethosomu pro léčiva, která je potřeba dostat skrz pokožku, léčiva pro vlasové folikuly, onemocnění mazových žláz, fotodynamickou terapii nebo anestetika. (Yang et al. 2017)

Navrhovaný mechanismus penetrace je dán schopností ethanolu rozpouštět (zkapalňovat) jak membrány ethosomu, tak lipidové dvojvrstvy stratum corneum, což dovoluje průchod měkkých a tvárných vezikul skrz disorganizovanou lipidovou bariéru kůže. (Thong et al. 2007) Další práce potvrzují tento fakt a přidávají, že fosfolipidy mezi stratum corneum s vezikulem mohou fúzovat a tím měnit teplotu přechodu lipidů. (Yang et al. 2017)

Jsou převážně složeny z fosfatidylcholinu, vysoké koncentrace alkoholu a vody. Obsažený fosfatidylcholin může být sojový, vaječný, dipalmityl fosfatidylcholin nebo hydrogenovaný. Z alkoholu můžeme použít ethanol nebo isopropylalkohol. Jako zástupce glykolu propylen glykol nebo transkutol. (Pirvu et al. 2010)

4.11.5 Cerosomy

Cerosomy jsou nové vezikulární nosiče obsahující v sobě množství ceramidu. Ceramidy jsou nejméně hydrofilní sfingolipidy, který jsou zodpovědné za správnou funkci kůže díky svoji lipofilitě. (Khazanov 2008) Tvoří až 50 % hmotnosti lipidové matrix stratum corneum a v menší míře je přítomen i v buněčných membránách. Bylo zjištěno, že lidé trpící psoriázou trpí nedostatkem ceramidů v kůži oproti zdravým jedincům. To vede ke zvýšené transepidermální ztrátě vody a suchosti pokožky, která vede až k zánětu. Právě strukturální podobnost synteticky vyrobeného ceramidu 6 s ceramidy kůže vede k usnadněné penetraci s látkou skrz organizovanou stratum corneum. (Abdelgawad et al. 2017)

Cerosomy jsou schopny výrazně zvýšit penetraci ve srovnání s jinými formulacemi. Ve studii byl vybrán diklofenak jako zástupce hydrofilních léčiv. Bylo prokázáno, že k permeaci došlo převážně polární transcelulární cestou bohatou na bílkoviny, a ne změnou struktury lipidové domény jak bylo předpokládáno. Toto zjištění zvýšené permeace může poukazovat na možnou volnou neinkorpanou část diklofenaku do vezikul a její penetraci skrz stratum corneum. (Fathi-Azarbayjani et al. 2015)

Při použití ceramidu 6 jako jediného lipidu pro tvorbu vezikul dochází po přidání vodného pufru k precipitaci bez ohledu na přítomnost povrchově aktivních látek vzhledem k malé hydrofilní hlavičce a velké hydrofobicitě ceramidu. Proto přidáním fosfatidylcholinu umožní inkorporaci ceramidu do vezikulární dvojvrstvy. Nicméně pokusy a vytvoření vezikuly bez přidání surfaktantu nebo molekuly alkoholu vyústily v agregaci po 1 h od hydratace. To ukazuje na nezbytnost přítomnosti surfaktantu k vytvoření dvojvrstvy (fosfatidylcholin-ceramid 6). (Abdelgawad et al. 2017)

4.12 Emulze

Mikroemulze byly poprvé vědecky popsány Hoarem a Schulmanem v roce 1943. Zjistili, že hrubé makroemulze se stabilizovaly po přidání povrchově aktivního činidla (středně dlouhého alkoholu a kosurfaktantu) a staly se průhlednými. (Roberts et al. 2017) Podle velikosti kapiček je můžeme rozdělit na transparentní (průhledné od 50-200 nm) a translucenční (mléčně zbarvené do 500 nm). (Yukuyama et al. 2016)

Nanoemulze jsou isotropní disperzní systémy 2 nesmíselných kapalin, normálně stávajících buď z olejové fáze dispergované ve vodné fázi (o/v) nebo vodné fáze dispergované v olejové fázi (v/o) s přidáním emulgátoru. Jako emulgátory jsou nejčastěji použity surfaktanty, ale proteiny a lipidy jsou také efektivní při přípravě nanoemulzí. Navzájem tvoří kapičky nebo jiné olejové fáze nanometrických velikostí (od 50 do 500nm). (Wu et al. 2013)

Hlavním rozdílem mezi klasickými emulzemi (makroemulze), nanoemulzemi a mikroemulzemi je v šíři velikosti kapiček a stabilitní charakteristice. Nanoemulze jsou na rozdíl od mikroemulzí kineticky stabilní, ale termodynamicky nestabilní.

(Yukuyama et al. 2016) Mohou být stabilní po velmi dlouhou dobu díky jejich malé velikosti a s užitím vhodného surfaktantu. Přidání surfaktantu je nezbytnou částí pro vytvoření malých kapiček stejně jako ke snížení mezipovrchového napětí. Surfaktant také hraje důležitou roli jako stabilizátor emulzí snížením repulsivních elektrostatických interakcí a sterického bránění. (Gupta et al. 2016) Vlastnosti různých typů emulzí jsou srovnány v Tab. 7.

Právě malá velikost vede ke kineticky stabilnímu systému, který je schopný odolávat destabilizaci, kvůli gravitační separaci (sedimentaci), flokulaci a koalescenci. Procesy nestability shrnuje Obr. 5. Malá velikost poskytuje velkou povrchovou plochu a jednotnou distribuci na pokožce, dobrou okluzi, tvorbu filmu, estetickou kvalitu a pocit. (Roberts et al. 2017)

Tabulka 7- Srovnání vlastností makroemulzí, nanoemulzí a mikroemulzí (Gupta et al. 2016)

	Makroemulze	Nanoemulze	Mikroemulze
Velikost	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
Tvar	Kulovitý	Kulovitý	Kulovitý, lamelární
Stabilita	Termodynamicky nestabilní, málo kineticky stabilní	Termodynamicky nestabilní, kineticky stabilní	Termodynamicky stabilní
Metody přípravy	Vysoko i nízko energetické metody	Vysoko i nízko energetické metody	Nízkoenergetické metody přípravy
Polydisperzita	Vysoká	Většinou nízká	Většinou nízká

Nanoemulze se dají výhodně využít i pro zacílení léčiva pro kožní onemocnění jako růžovka (rosacea). Optimalizovaná nanoemulze vykazovala dobré vlastnosti pro cílení do kůže. Retence nanoemulze na kůži vykazovala vysoké hodnoty i po 24 hodinách. Optimalizací přípravku bylo docíleno cílené podání do kůže. Kůže tak

působí jako rezervoár léčiva a tím déletrvajícího účinku přípravku bylo dosaženo v místě léze. (Yu et al. 2014)

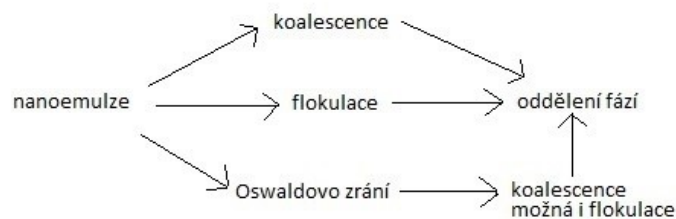
Pro přípravu nanoemulzí se mohou využít jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva. Jsou to netoxické a nedráždivé systémy, hlavně díky nízké koncentraci surfaktantu, které mohou být podávány na kůži, mukózní membrány, ale i parenterálně. Jejich použití našlo uplatnění především ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu v indikacích jako zánět, protistárnoucí a hydratační přípravky. Mají částečné využití i při chronických onemocněních kůže jako je atopická dermatitida nebo suchost, kde zvyšují hydrataci pokožky bez podráždění a ztenčení kožní bariéry.

Nanoemulze zvyšují průchod skrz kožní bariéru několika způsoby:

- 1) poskytují vysokou rozpouštěcí kapacitu pro lipofilní i hydrofilní látky, tím zvyšují kapacitu nosiče (loading capacity) a aplikované množství.
- 2) Jejich velký povrch a dobrý kontakt s pokožkou, spolu s dobrými okluzivními vlastnostmi zajišťuje dobrý kontakt s povrchem kůže.
- 3) Komponenty jako oleje a surfaktanty mohou mít přímý efekt na zvýšení permeace přípravku skrz stratum corneum.

Přípravu nanoemulzí můžeme obecně rozdělit podle energie dodané do systému na nízkoenergetické a vysokoenergetické. Vysokoenergetické jako vysokotlaká homogenizace a ultrazvuk spotřebují výrazně více energie. Až 10^8 - 10^{10} W Kg⁻¹ energie je potřeba k vytvoření malých kapiček. Na druhou stranu nízkoenergetické metody využívají specifické vlastnosti systému pro vytvoření malých kapiček bez spotřeby významné energie cca 10^3 W Kg⁻¹. K této metodě se řadí teplota fázové inverze (PIT) a bod emulzního zvratu (EIP). (Gupta et al. 2016)

Nanoemulze jsou obvykle tvořeny ve dvou krocích. V prvním je nejprve vytvořena makroemulze a ve druhém přeměněna na nanoemulzi.



Obrázek 5- Procesy nestability nanoemulzí (Gupta et al. 2016)

Princip vysokotlakého homogenizátoru (HPH) spočívá ve vytvoření vysokého tlaku pístem pumpy na hrubou emulzi. Ta je tlačena skrz úzkou štěrbinu, která má velikost v řádu mikronů. Zde dochází k rozbití kapek na menší kapičky, tím jsou vystaveny tahovému a smykovému tření. Tento proces se obvykle opakuje několikrát, dokud není velikost kapiček konstantní. Podobnou metodou je mikrofluidace. Termín se někdy zaměňuje za HPH. Mikrofluidizér má dobře měnitelnou velikost mikrokanálu, kterou je makroemulze pumpována. V ultrazvuku, vysokoenergetické vlny vytvářejí turbulence (kvůli kavitaci), která láme kapičky na menší. Tento proces pokračuje stejně jako HPH, dokud kapky nemají konstantní velikost. (Yukuyama et al. 2016)

V nízkoenergetických metodách jsou kapičky formovány na menší, v takovém případě systém reaguje fázovou inverzí jako odpovědí na změny složení nebo teploty a prochází stavem nízkého mezifázového napětí. K tomuto procesu stačí dodání malého množství energie, které lze snadno dosáhnout míchadlem (batch stirrer). (Gupta et al. 2016)

Blízko bodu fázového zvratu (EIP) systém prochází stavem, při kterém je mezifázové napětí tak malé, že se hodnoty mohou pohybovat kolem $10 \mu\text{N m}^{-1}$. V praxi to znamená, že při emulzi v/o roztok pomalu ředíme vodou, v opačném případě o/v roztok ředíme olejovou fází. V metodě PIT se fázová změna tvoří změnou teploty, nejčastěji chlazením zahřáté směsi pod teplotu fázové změny. (Gupta et al. 2016) PIT metoda může být použita jedině v případě, kde je surfaktant citlivý na změnu teploty. Tj. pouze u surfaktantu, u kterého změna teploty vyvolá změny v hydrataci řetězce (Solans et al. 2003).

5. HODNOCENÍ INFORMAČNÍCH ZDROJŮ VZHLEDEM K DANÉMU TÉMATU

Hodnocením informačních zdrojů můžeme podle počtu nalezených výsledků z jednotlivých databází kvantifikovat vývoj situace nanočástic od 80. let 20. století až do dnes. Srovnáme-li výsledky abstraktových databází s databázemi patentovými, můžeme průběžně odhadovat, které nanočástice mají nadějně předpoklady a naopak, kterým se daří méně.

Toto vyhodnocení může pomoci v dalším bádání na poli nanočásticových struktur sloužící jako nosiče léčiv, stejně jako zdroj informací k lepšímu zorientování se v širokém tématu.

5.1 Výsledky z databází *Web of science, Scopus, PubMed*

Na zhodnocení byly vybrány databáze Web of science (WoS), Scopus a PubMed. Z každé databáze byly vytvořeny 2 tabulky. Rozdíl spočíval ve změně klíčových slov, tzn. v první tabulce je použito skin delivery, místo kterého je ve druhé tabulce použito drug delivery.

Jako klíčové slovo byl vybrán vždy na prvním místě daný nosič, na druhém skin delivery/drug delivery a na třetím rozmezí let publikovaných článků, knih, abstraktů atd. Jako příklad SLN (topic) AND skin delivery (topic) AND 1981-1990 (year published).

Při vyhledávání jsem narazil na fráze cerosomes a cerasomes, které jsou totožné. Proto jsem provedl pro každou z frází samostatné vyhledávání, které je uvedeno ve stejném řádku se znaménkem plus.

Tabulka 8- Počet výsledků z databáze WoS Core collection, skin delivery dne 6.8.2018

	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
Klíčová slova						
SLN	0	1	13	76	153	123
NLC	0	0	5	51	112	111

Liposomes	2	177	177	302	573	417
Niosomes	0	9	19	53	124	94
Proniosomes	0	1	3	12	22	17
Transfersomes	0	7	31	32	76	86
Ethosomes	0	3	12	50	117	93
Cerosomes+Cerasomes	0+0	0+0	0+0	0+0	1+0	1+2
Nanoemulsions	0	0	3	44	101	72

Tabulka 9-Hodnocení databáze WoS Core collection, drug delivery 17.8.18

Klíčová slova	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	0	35	107	298	661	486
NLC	0	1	19	118	328	361
Liposomes	38	1389	1289	2554	4962	3534
Niosomes	1	42	50	114	277	249
Proniosomes	0	1	5	20	47	35
Transfersomes	0	8	28	33	74	87
Ethosomes	0	1	9	39	112	98
Cerosomes+Cerasomes	0	0	0	0+1	1+15	1+13
Nanoemulsions	0	2	14	119	421	381

Vyhledávání ve Scopusu probíhalo obdobným postupem jako ve Web of Science. Pro stejný názorný příklad bylo využito následujícího dotazu (TITLE-ABS-KEY (sln) AND TITLE-ABS-KEY (skin AND delivery)) AND PUBYEAR > 1980 AND PUBYEAR < 1991.

Tabulka 10- Výsledky hledání z databáze Scopus, skin delivery, 6.8.2018

Klíčová slova	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018

SLN	0	2	12	56	102	85
NLC	0	0	2	22	99	86
Liposomes	181	179	181	303	538	305
Niosomes	1	11	14	47	109	68
Proniosomes	0	1	4	13	37	17
Transfersomes	0	12	20	24	66	50
Ethosomes	0	4	17	54	119	74
Cerosomes+Cerasomes	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0
Nanoemulsions	0	1	0	34	100	67

Tabulka 11- Hodnocení databáze Scopus, drug delivery, 17.8.18

Klíčová slova	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	0	31	80	255	603	447
NLC	0	1	12	83	324	347
Liposomes	635	2178	2072	3220	5278	3160
Niosomes	6	62	60	135	322	210
Proniosomes	0	4	8	20	72	33
Transfersomes	0	13	23	29	77	57
Ethosomes	0	4	18	65	142	91
Cerosomes+Cerasomes	0+0	0+0	0+0	0+2	1+12	0+9
Nanoemulsions	0	5	11	126	438	310

Výsledky hledání v databázi Pubmed byly hledány stejným způsobem jako v databázích Web of Science a Scopus. Pro vzorový příklad dotazu vypadal dotaz takto: ((SLN) AND skin delivery) AND ("1981"[Date - Publication] : "1990"[Date - Publication]). Výsledky z databáze PubMed se nacházejí v tabulkách 12 a 13.

Tabulka 12- Výsledky hledání v databázi Pubmed, skin delivery 6.8.2018

Klíčová slova	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	0	1	6	29	54	49
NLC	0	0	0	17	51	41
Liposomes	18	120	113	218	356	206
Niosomes	18	120	115	219	366	218
Proniosomes	0	0	2	12	16	12
Transfersomes	18	120	113	218	357	207
Ethosomes	0	2	10	29	70	47
Cerosomes	0	0	0	0	1	0
Nanoemulsions	0	1	1	20	56	44

Tabulka 13- Výsledky hledání z databáze PubMed, drug delivery 17.8.18

Klíčová slova	1981- 1990	1991- 2000	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	0	34	82	182	349	234
NLC	0	1	20	78	243	229
Liposomes	704	3081	1818	2585	4090	2368
Niosomes	707	3107	1836	2589	4117	2408
Proniosomes	0	2	4	18	34	20
Transfersomes	704	9	17	17	51	46
Ethosomes	0	2	10	37	84	49
Cerosomes+Cerasomes	0+0	0+0	1+0	2+1	1+11	1+6
Nanoemulsions	0	4	11	100	336	252

5.2 Hodnocení četnosti aktuálních patentů vzhledem k dané problematice

Patenty byly čerpány z databáze Derwent Innovations Index, která je součástí platformy WoS, která je v provozu od roku 1994..

U jednotlivých nanočásticových systémů jsem vyhodnocoval výsledky s frází skin delivery/ drug delivery, od roku 2001 až do roku 2018. Tyto data korespondují s daty, která jsou vybrána v abstraktových databázích od 21. století. To by nám mělo umožnit odlišit patenty, které mají sloužit ve formě k podání na kůži a obecně podávaných látek, které obsahuje fráze drug delivery. Zkratky SLN a NLC byly uvedeny do vyhledávače slovem.

Tabulka 14- Patenty z Darwent Innovations Index, skin delivery 23.8.18

Klíčová slova	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	0	1	6	1
NLC	0	0	3	0
Liposomes	17	19	20	7
Niosomes	0	0	1	1
Proniosomes	0	0	0	0
Transfersomes	0	0	0	0
Ethosomes	0	1	2	0
Cerosomes+Cerasomes	0+0	0+0	0+0	0+0
Nanoemulsions	0	4	1	1

Tabulka 15- Patenty Z databáze Darwent citations index, drug delivery, 23.8. 2018

Klíčová slova	2001- 2005	2006- 2010	2011- 2015	2016- 2018
SLN	1	7	16	5

NLC	0	0	2	3
Liposomes	90	97	96	61
Niosomes	1	3	3	2
Proniosomes	0	0	0	0
Transfersomes	0	0	1	0
Ethosomes	0	2	2	0
Cerosomes+Cerasomes	0	0	0	0+0
Nanoemulsions	1	1	3	4

6. DISKUZE

Nanočástice jsou v poslední době pod drobnohledem mnoha výzkumných skupin, což je trend vyplývající z množství literatury objevující se v databázích. Tento trend začíná v 80. letech, kdy se začínají objevovat prvotní články, týkající se liposomů, které byly objeveny v roce 1965 Alecem Banghamem. (Torchilin 2005) Právě liposomy jsou nejstarší a nejvíce prozkoumané vezikulární nosiče, a právě z tohoto důvodu mají pravděpodobně nejvíce výsledků z databází.

Další typy částic se v databázích začínají objevovat až v 90. letech. Jedná se o niosomy, SLN, ethosomy, nanoemulze a transferosomy. Úplně nejmladší skupinou jsou cero/cerasomy vyskytující se v databázích pod dvěma názvy a první články se objevují v rozmezí od roku 2011 až 2015.

Značné jsou rozdíly v množství výsledků pro hesla skin/drug delivery vyskytující se ve všech třech databázích. Z toho lze předpokládat, že se výzkum zaměřuje více na jiné aplikační podání, než je topické.

Databáze WoS a Scopus mají velice podobné fluktuace počtu výsledků u jednotlivých typů nosičů. Podle absolutního počtu výsledků můžeme říci, že je databáze WoS o něco rozsáhlejší databází než Scopus a počet výsledků hledání je větší u všech hledaných klíčových slov. Databáze PubMed je z výsledků hledání nejmenší.

PubMed se liší v počtu výsledků, a to převážně u liposomů, niosomů a transferosomů. To může být dáno jiným mechanismem hledání a použitím automaticky generovaných klíčových slov, které zahrnují širší spektrum viz. Tab 12 a 13. V praxi to znamená, že se při hledání vezikulárních nosičů (např. transferosomu) většinou objevují všechny dostupné vezikulární nosiče. Je důležité zmínit, že PubMed je z těchto tří databází jako jediná volně přístupná, tedy neplacená, což může mít vliv na kvalitu hledání.

SLN jsou druhými nejčastěji nalezenými částicemi ve WoS viz. Tab. 8. V databázi Scopus tomu bylo podobně až do současnosti, kdy se před ně s klíčovým heslem skin delivery dostala jejich druhá generace NLC viz. Tab. 10. V databázi PubMed je pořadí zkreslené výše zmíněným efektem, kde se na prvním místě dokonce

vyskytly niosomy následovanými transferosomy a liposomy až na třetím místě viz. Tab 12.

Ze všech tří databází vyplývá zvyšující se zájem o NLC. Za období 2011 až 2015 se počet výsledků oproti předchozímu sledovanému období zvýšil přibližně 2x ve WoS (Tab. 8), přibližně 5x ve Scopusu (Tab. 10) a přesně 3x v PubMed s heslem skin delivery. Z absolutního hlediska došlo k největšímu zvýšení hledaných výrazů ve WoS. S výrazem drug delivery bylo zvýšení zájmu o tyto nosiče ještě patrnější, kdy se počet výsledků ve WoS zvýšil přibližně 3x (Tab. 9), ve Scopusu 4x (Tab. 11) a v PubMed 3x (Tab. 13).

Cero/cerasomy jako jediné nezaznamenaly rostoucí trend v počtu výsledků z databází s heslem skin delivery. Může to nasvědčovat tomu, že tyto nosiče neposkytují žádné větší výhody od ostatních. Naopak s heslem drug delivery bylo výsledků 30 a to v součtu za období 2011 až 2018 v (Tab. 9). Ve Scopus jich bylo nalezeno 22 a v PubMed 19.

Transferosomy uváděné jako první ultradeformovatelné vezikuly nemají vůbec tolik pozornosti, kolik by se dalo očekávat. Ve WoS je počet vyhledaných výsledků za období 2011 až 2015 76 (Tab. 8), což znamená zvýšení oproti předchozímu období o 44. Další období za roky 2016 až 2018 vedlo ke zvýšení také o 10.

Naproti tomu ethosomy jsou jediným nosičem, který má podobné množství vyhledaných výsledků s hesly skin delivery a drug delivery. S největší pravděpodobností se tento nosič, obsahující ethanol, připravuje především pro topické podání, které představuje jeho hlavní oblast zájmu.

Absolutně nejvíce patentů spojených se skin delivery mají liposomy následované SLN, nanoemulzemi, ethosomy, NLC a niosomy. K relativně velkému počtu výsledků získaných z databází nemají transferosomy, proniosomy a cerosomy buď žádný nebo pouze 1 patent. viz. Tab. 14.

Co se týče patentů, zvyšující se trend s heslem skin delivery nenastává, ale spíše klesá. Od roku 2001 se během každých pěti sledovaných let patentovalo přibližně 20 liposomálních formulací, ale za období 2016 až srpen 2018 (více než 3,5 roku) pouze 7 (Tab. 14). U ostatních nanočástic je pokles ještě rapidnější. Z celkových 8 patentů SLN částic jich bylo za předposlední sledované období 2011 až 2015

patentováno 6 a za poslední období jen 1 patent. U niosomů a nanoemulzí je situace podobná a u obou došlo pouze k 1 patentování za rok 2016 až 2018 (Viz. Tab. 14).

Situace patentů s heslem drug delivery také nezaznamenala zvyšující se počet patentů za poslední období. Pouze NLC a nanoemulze si polepšily oproti předchozímu období o 1 patent, což je patrné z tabulky 15. O liposomech můžeme říci, že si drží svoji úroveň a můžeme očekávat stejný počet patentů jako za předchozí roky.

Naproti tomu SLN měly 7 patentů za období 2006 až 2010, v dalším sledovaném období došlo ke vzrůstu o 9 patentů, avšak za poslední období 2016 až 2018 došlo k propadu, kdy jich bylo patentováno pouze 5. Ethosomy mající celkově 4 patenty nezaznamenaly žádný nárůst za roky 2016 až 2018 (Tab. 15).

Cero/cerasomy nemají zatím patentovanou žádnou formulaci. Pro transfersomy byl nalezen pouze jeden patent v letech 2011 až 2015, což je patrné v tabulce 15.

Důležité je zdůraznit, že většina transdermálních patentů je spjata s fyzikálními akceleranty, který buď kůži naruší nebo zvýší průchod částice kůží.

7. ZÁVĚR

V posledních letech vzrostla paleta nosičů léčiv, u kterých se dlouho zkoumal jejich vliv, interakce a schopnost penetrace skrz stratum corneum. Cesty absorpce léčiv jako intercelulární, intracelulární, skrz potní žlázy či skrz vlasový folikul jsou jedinými možnými využitelnými cestami průniku léčiva. Z výsledků často vyplývá, že schopnost permeace skrz stratum corneum je z velké části ovlivněna fyzikálně chemickými vlastnostmi léčiva, elastickými vlastnostmi nosiče (např. transferosomy) nebo schopností narušit ochranou bariéru kůže akceleranty, které se vyskytují ve formulacích jako ethosomy. Velmi důležitou roli hraje samotná hydratace pokožky, která má velký vliv na permeaci léčiv a zvyšuje okluzivní faktor. Tím dojde k nabobtnání a narušení lipidové vrstvy stratum corneum tvořící neprůchodnou vrstvu v kůži. Okluzivní faktor je důležitý především pro SLN, NLC a nanoemulze.

Lipidové nosiče ethosomy, transferosomy, cerosomy, SLN, NLC a nanoemulze, jsou schopny zvýšit permeaci skrz pokožku ve srovnání s konvenčními liposomy. (Kumar, Pathak and Bali 2012), (Sudhakar, Jain and Charyulu 2016), (Gannu P.Kumar and Rajeshwarrao 2011), (Fathi-Azarbayjani et al. 2015)

Za normálních podmínek, při kterých není kožní bariéra nijak porušená je transdermální podání léčiv omezeno pouze na molekuly, které jsou relativně lipofilní, malé a nenabitě. (Roberts et al. 2017) Pro jejich efektivnější transdermální dopravení je zapotřebí využití fyzikálních či chemických metod urychlování. (Dragicevic and Maibach 2018)

8. SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1-</i> Výhody a nevýhody transdermální aplikace (Escobar-Chávez et al. 2012).....	13
<i>Tabulka 2-</i> Nejběžnější techniky hodnocení nanočástic (Vogt et al. 2016), (Lademann et al. 2007), (Ahmad, Mohammed and Ibrahim 2017)	23
<i>Tabulka 3-</i> Shrnutí penetrace, permeace a bezpečnosti kovových nanočástic (Filon et al. 2015)	28
<i>Tabulka 4-</i> Vybrané druhy výroby polymerních nosičů (Iqbal, Ali and Baboota 2018).....	32
<i>Tabulka 5-</i> Výhody a nevýhody SLN nosičů (Raut et al. 2018)	35
<i>Tabulka 6-</i> Různé metody přípravy nanonosičů (Iqbal et al. 2018)	41
<i>Tabulka 7-</i> Srovnání vlastností makroemulzí, nanoemulzí a mikroemulzí (Gupta et al. 2016)	47
<i>Tabulka 8-</i> Počet výsledků z databáze WoS Core collection, skin delivery dne 6.8.2018....	50
<i>Tabulka 9-</i> Hodnocení databáze WoS Core collection, drug delivery 17.8.18	51
<i>Tabulka 10-</i> Výsledky hledání z databáze Scopus, skin delivery, 6.8.2018.....	51
<i>Tabulka 11-</i> Hodnocení databáze Scopus, drug delivery, 17.8.18	52
<i>Tabulka 12-</i> Výsledky hledání v databázi Pubmed, skin delivery 6.8.2018.....	53
<i>Tabulka 13-</i> Výsledky hledání z databáze PubMed, drug delivery 17.8.18	53
<i>Tabulka 14-</i> Patenty z Darwent Innovations Index, skin delivery 23.8.18.....	54
<i>Tabulka 15-</i> Patenty Z databáze Darwent citations index, drug delivery, 23.8. 2018.....	54

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1- Schéma vývoje keratinocyty (Štork 2013)	15
Obrázek 2- Schéma vlasového folikulu (Sala et al. 2018)	18
Obrázek 3- Potencionální cesty absorpce (Filon et al. 2015)	19
Obrázek 4- Větvená struktura dendrimery s inkorporovaným léčivem (Escobar-Chávez et al. 2012)	31
Obrázek 5- Procesy nestability nanoemulzí (Gupta et al. 2016)	49

10. POUŽITÁ LITERATURA

- Abdel-Mottaleb, M. M. A., D. Neumann & A. Lamprecht (2011) Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, 36-42.
- Abdelgawad, R., M. Nasr, N. H. Moftah & M. Y. Hamza (2017) Phospholipid membrane tubulation using ceramide doping "Cerosomes": Characterization and clinical application in psoriasis treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 258-268.
- Abdulbaqi, I. M., Y. Darwis, N. A. K. Khan, R. Abou Assi & A. A. Khan (2016) Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine*, 11.
- Adachi, K., N. Yamada, Y. Yoshida & O. Yamamoto (2013) Subchronic exposure of titanium dioxide nanoparticles to hairless rat skin. *Experimental Dermatology*, 22, 278-283.
- Ahmad, M. Z., A. A. Mohammed & M. M. Ibrahim (2017) Technology overview and drug delivery application of proniosome. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22, 302-311.
- Amoabediny, G., F. Haghirsadat, S. Naderinezhad, M. N. Helder, E. A. Kharanaghi, J. M. Arough & B. Zandieh-Doulabi (2018) Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67, 383-400.
- Anthony, A. A. a. M. A. M. a. P. F. B. (2012) Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development.
- Attama, A. A., M. A. Momoh & P. F. Builders. 2012. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. InTech.
- Baroli, B., M. G. Ennas, F. Loffredo, M. Isola, R. Pinna & M. A. Lopez-Quintela (2007) Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1701-1712.
- Bartelds, R., M. H. Nematollahi, T. Pols, M. C. A. Stuart, A. Pardakhty, G. Asadikaram & B. Poolman (2018) Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *Plos One*, 13.
- Borgia, S. L., M. Regehly, R. Sivaramakrishnan, W. Mehnert, H. C. Korting, K. Danker, B. Roder, K. D. Kramer & M. Schafer-Korting (2005) Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, 110, 151-163.
- Bucak, S., Y. Banu & A. D. Sezer. 2012. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*.
- Carazo, E., A. Borrego-Sanchez, F. Garcia-Villen, R. Sanchez-Espejo, P. Cerezo, C. Aguzzi & C. Viseras (2018) Advanced Inorganic Nanosystems for Skin Drug Delivery. *Chemical Record*, 18, 891-899.
- Cevc, G. & G. Blume (2001) New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1514, 191-205.
- Cevc, G. & D. Gebauer (2003) Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. *Biophysical Journal*, 84, 1010-1024.
- Cevc, G., S. Mazgareanu, M. Rother & U. Vierl (2008) Occlusion effect on transcutaneous NSAID delivery from conventional and carrier-based formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 359, 190-197.
- Cevc, G. & U. Vierl (2010) Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release*, 141, 277-299.

- Chang, D., M. Lim, J. Goos, R. R. Qiao, Y. Y. Ng, F. M. Mansfeld, M. Jackson, T. P. Davis & M. Kavallaris (2018) Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Choi, M. J. & H. I. Maibach (2005) Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacology and Physiology*, 18, 209-219.
- Degim, I. T. & D. Kadioglu (2013) Cheap, Suitable, Predictable and Manageable Nanoparticles for Drug Delivery: Quantum Dots. *Current Drug Delivery*, 10, 32-38.
- Dragicevic, N. & H. Maibach (2018) Combined use of nanocarriers and physical methods for percutaneous penetration enhancement. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 127, 58-84.
- Durand, C., A. Alhammad & K. C. Willett (2012) Practical considerations for optimal transdermal drug delivery. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69, 116-124.
- Elsabahy, M. & K. L. Wooley (2012) Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 41, 2545-2561.
- Escobar-Chávez, J. Juan, Revilla-Vázquez, Alma, Luisa, C. Domínguez-Delgado, Luisa, I. Rodríguez-Cruz, Marlen, N. Aléncaster, Casas & R. Díaz-Torres 2012. Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery In *Recent advances in novel drug carrier systems*, 201-240. INTECH Open Access Publisher.
- Fathi-Azarbayjani, A., K. X. Ng, Y. W. Chan & S. Y. Chan (2015) Lipid Vesicles for the Skin Delivery of Diclofenac: Cerosomes vs. Other Lipid Suspensions. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5, 25-33.
- Filon, F. L., M. Mauro, G. Adami, M. Bovenzi & M. Crosera (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72, 310-322.
- Frank, L. A., R. V. Contri, R. C. R. Beck, A. R. Pohlmann & S. S. Guterres (2015) Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7, 623-639.
- Gannu P. Kumar & P. Rajeshwarrao (2011) Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1, 208 - 219.
- Ghanbarzadeh, S. & S. Arami (2013) Formulation and evaluation of piroxicam transferosomal gel: an approach for penetration enhancement. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23, 587-590.
- Gratieri, T., U. F. Schaefer, L. H. Jing, M. Y. Gao, K. H. Kostka, R. F. V. Lopez & M. Schneider (2010) Penetration of Quantum Dot Particles Through Human Skin. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6, 586-595.
- Gupta, A., H. B. Eral, T. A. Hatton & P. S. Doyle (2016) Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826-2841.
- Harms, M. & C. C. Muller-Goymann (2011) Solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21, 89-99.
- Hussain, A., A. Samad, S. K. Singh, M. N. Ahsan, M. W. Haque, A. Faruk & F. J. Ahmed (2016) Nanoemulsion gel-based topical delivery of an antifungal drug: in vitro activity and in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 23, 652-667.
- Imam, S. S., M. Aqil, M. Akhtar, Y. Sultana & A. Ali (2015) Formulation by design-based proniosome for accentuated transdermal delivery of risperidone: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study. *Drug Delivery*, 22, 1059-1070.
- Iqbal, B., J. Ali & S. Baboota (2018) Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. *International Journal of Dermatology*, 57, 646-660.
- Kabanov, V. A., A. B. Zezin, V. B. Rogacheva, Z. G. Gulyaeva, M. F. Zansochova, J. G. H. Joosten & J. Brackman (1998) Polyelectrolyte behavior of astramol poly(propyleneimine) dendrimers. *Macromolecules*, 31, 5142-5144.

- Khatoon, M., K. U. Shah, F. U. Din, S. U. Shah, A. U. Rehman, N. Dilawar & A. N. Khan (2017) Proniosomes derived niosomes: recent advancements in drug delivery and targeting. *Drug Delivery*, 24, 56-69.
- Khazanov, E. a. P. A. a. S. J. P. a. B. Y. (2008) Physicochemical and Biological Characterization of Ceramide-Containing Liposomes: Paving the Way to Ceramide Therapeutic Application. *Langmuir*, 24, 6965-6980.
- Knepp, V. M., R. S. Hinz, F. C. J. Szoka & R. H. Guy (1987) Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. I. Investigation of transdermal potential. *Journal of Controlled Release*, 5, 211 - 221.
- Kokura, S., O. Handa, T. Takagi, T. Ishikawa, Y. Naito & T. Yoshikawa (2010) Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 6, 570-574.
- Kraeling, M. E. K., V. D. Topping, Z. M. Keltner, K. R. Belgrave, K. D. Bailey, X. G. Gao & J. J. Yourick (2018) In vitro percutaneous penetration of silver nanoparticles in pig and human skin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 314-322.
- Kubo, A., K. Nagao & M. Amagai (2012) Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 440-447.
- Kuche, K., R. Maheshwari, V. Tambe, K. K. Mak, H. Jogi, N. Raval, M. R. Pichika & R. K. Tekade (2018) Carbon nanotubes (CNTs) based advanced dermal therapeutics: current trends and future potential. *Nanoscale*, 10, 8911-8937.
- Kuchler, S., M. R. Radowski, T. Blaschke, M. Dathe, J. Plendl, R. Haag, M. Schafer-Korting & K. D. Kramer (2009) Nanoparticles for skin penetration enhancement - A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 243-250.
- Kumar, A., K. Pathak & V. Bali (2012) Ultra-adaptable nanovesicular systems: a carrier for systemic delivery of therapeutic agents. *Drug Discovery Today*, 17, 1233-1241.
- Lademann, J., H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf & W. Sterry (2007) Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66, 159-164.
- Lane, M. E. (2011) Nanoparticles and the skin - applications and limitations. *Journal of Microencapsulation*, 28, 709-716.
- Liang, X. W., Z. P. Xu, J. Grice, A. V. Zvyagin, M. S. Roberts & X. Liu (2013) Penetration of Nanoparticles into Human Skin. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6353-6366.
- Loo, C. H., M. Basri, R. Ismail, H. L. N. Lau, B. A. Tejo, M. S. Kanthimathi, H. A. Hassan & Y. M. Choo (2013) Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 13-22.
- Medintz, I. L., H. T. Uyeda, E. R. Goldman & H. Mattoussi (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, 4, 435-446.
- Mehnert, W. & K. Mader (2001) Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 165-196.
- Mishra, P. R., L. Al Shaal, R. H. Muller & C. M. Keck (2009) Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371, 182-189.
- Moghassemi, S. & A. Hadjizadeh (2014) Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185, 22-36.
- Mota, A. H., P. Rijo, J. Molpeceres & C. P. Reis (2017) Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532, 710-728.
- Mozafari, M. R. (2005) Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 711-719.

- Muller, R. H., R. D. Petersen, A. Hornmoss & J. Pardeike (2007) Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
- Nastiti, C., T. Ponto, E. Abd, J. E. Grice, H. A. E. Benson & M. S. Roberts (2017) Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery'. *Pharmaceutics*, 9.
- Ngan, C. L., M. Basri, M. Tripathy, R. A. Karjiban & E. Abdul-Malek (2014) Physicochemical Characterization and Thermodynamic Studies of Nanoemulsion-Based Transdermal Delivery System for Fullerene. *Scientific World Journal*.
- Palmer, B. C. & L. A. DeLouise (2016) Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. *Molecules*, 21.
- Palombo, M., M. Deshmukh, D. Myers, J. M. Gao, Z. Szekeley & P. J. Sinko (2014) Pharmaceutical and Toxicological Properties of Engineered Nanomaterials for Drug Delivery. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 54, 54, 581-598.
- Pan, Y. J., R. V. Tikekar & N. Nitin (2016) Distribution of a model bioactive within solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers influences its loading efficiency and oxidative stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 511, 322-330.
- Pardeike, J., A. Hommoss & R. H. Muller (2009) Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366, 170-184.
- Pirvu, C. D., C. Hlevca, A. Ortan & R. Prisada (2010) ELASTIC VESICLES AS DRUGS CARRIERS THROUGH THE SKIN. *Farmacologia*, 58, 128-135.
- Pizinger, K. 2012. Dermatovenerologie. Plzeň: Euroverlag.
- Prow, T. W., J. E. Grice, L. L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E. M. T. Wurm, C. Yoong, T. A. Robertson, H. P. Soyer & M. S. Roberts (2011) Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 470-491.
- Rabišková, M. (2007) Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx> (last accessed).
- Rancan, F., Q. Gao, C. Graf, S. Troppens, S. Hadam, S. Hackbarth, C. Kembuan, U. Blume-Peytavi, E. Ruhl, J. Lademann & A. Vogt (2012) Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *Acs Nano*, 6, 6829-6842.
- Rangsimawong, W., P. Opanasopit, T. Rojanarata, S. Duangjit & T. Ngawhirunpat (2016) Skin Transport of Hydrophilic Compound-Loaded PEGylated Lipid Nanocarriers: Comparative Study of Liposomes, Niosomes, and Solid Lipid Nanoparticles. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 39, 1254-1262.
- Raut, I. D., R. C. Doijad & S. K. Mohite (2018) SOLID LIPID NANOPARTICLES: A PROMISING DRUG DELIVERY SYSTEM. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9, 862-871.
- Roberts, M. S., Y. Mohammed, M. N. Pastore, S. Namjoshi, S. Yousef, A. Alinaghi, I. N. Haridass, E. Abd, V. R. Leite-Silva, H. A. E. Benson & J. E. Grice (2017) Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, 247, 86-105.
- Rode, A., S. Sharma & D. K. Mishra (2018) Nanocarriers: A Novel Approach for Enhanced Drug Delivery through Skin. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 12, S13-S20.
- Rouse, J. G., J. Z. Yang, J. P. Ryman-Rasmussen, A. R. Barron & N. A. Monteiro-Riviere (2007) Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Letters*, 7, 155-160.
- Saez, V., I. D. L. Souza & C. R. E. Mansur (2018) Lipid nanoparticles (SLN & NLC) for delivery of vitamin E: a comprehensive review. *International Journal of Cosmetic Science*, 40, 103-116.
- Sala, M., R. Diab, A. Elaissari & H. Fessi (2018) Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535, 1-17.

- Samberg, M. E., S. J. Oldenburg & N. A. Monteiro-Riviere (2010) Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, 118, 407-413.
- Shao, M., Z. Hussain, H. E. Thu, S. Khan, H. Katas, T. A. Ahmed, M. Tripathy, J. Leng, H. L. Qin & S. N. A. Bukhari (2016) Drug nanocarrier, the future of atopic diseases: Advanced drug delivery systems and smart management of disease. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 147, 475-491.
- Solans, C., J. Esquena, A. M. Forgiarini, N. Uson, D. Morales, P. Izquierdo, N. Azemar & M. J. Garcia-Celma (2003) Nano-emulsions: Formation, properties, and applications. *Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution*, 109, 525-554.
- Souto, E. B., S. Doktorovova & P. Boonme (2011) Lipid-based colloidal systems (nanoparticles, microemulsions) for drug delivery to the skin: materials and end-product formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21, 43-54.
- Sudhakar, C. K., S. Jain & R. N. Charyulu (2016) A COMPARISON STUDY OF LIPOSOMES, TRANSFERSOMES AND ETHOSOMES BEARING LAMIVUDINE. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7, 4214-4221.
- Svenson, S. & D. A. Tomalia (2005) Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 2106-29.
- Tang, L., C. L. Zhang, G. M. Song, X. Jin & Z. W. Xu (2013) In vivo skin penetration and metabolic path of quantum dots. *Science China-Life Sciences*, 56, 181-188.
- Teeranachaideekul, V., P. Boonme, E. B. Souto, R. H. Muller & V. B. Junyaprasert (2008) Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*, 128, 134-141.
- Thong, H. Y., H. Zhai & H. I. Maibach (2007) Percutaneous penetration enhancers: An overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20, 272-282.
- Toll, R., U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer & U. Blume-Peytavi (2004) Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 168-176.
- Torchilin, V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145-160.
- Toutitou, E., B. Godin, N. Dayan, C. Weiss, A. Piliponsky & F. Levi-Schaffer (2001) Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier. *Biomaterials*, 22, 3053-3059.
- Vogt, A., C. Wischke, A. T. Neffe, N. Ma, U. Alexiev & A. Lendlein (2016) Nanocarriers for drug delivery into and through the skin - Do existing technologies match clinical challenges? *Journal of Controlled Release*, 242, 3-15.
- Vora, B., A. J. Khopade & N. K. Jain (1998) Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception. *Journal of Controlled Release*, 54, 149-165.
- Wijnhoven, W. P. S., W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. V. D. Meent, S. Dekkers, W. H. D. Jong, M. v. Zijverden, A. J. A. M. Sips & R. E. Geertsma Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3, 109-138.
- Wu, L. B., J. Zhang & W. Watanabe (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 456-469.
- Wu, X. & R. H. Guy (2009) Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 19, 371-384.
- Wu, Y., Y. H. Li, X. H. Gao & H. D. Chen (2013) The application of nanoemulsion in dermatology: an overview. *Journal of Drug Targeting*, 21, 321-327.
- Xia, X. R., N. a. A. Monteiro-Riviere & J. E. Riviere (2010) Skin penetration and kinetics of pristine fullerenes (C60) topically exposed in industrial organic solvents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242, 29 - 37.

- Yang, L., L. F. Wu, D. Z. Wu, D. S. Shi, T. Wang & X. L. Zhu (2017) Mechanism of transdermal permeation promotion of lipophilic drugs by ethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 3357-3364.
- Yu, M., H. X. Ma, M. Z. Lei, N. Li & F. P. Tan (2014) In vitro/in vivo characterization of nanoemulsion formulation of metronidazole with improved skin targeting and anti-rosacea properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 92-103.
- Yukuyama, M. N., D. D. M. Ghisleni, T. J. A. Pinto & N. A. Bou-Chacra (2016) Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 13-24.
- Zeb, A., O. S. Qureshi, H. S. Kim, J. H. Cha & J. K. Kim (2016) Improved skin permeation of methotrexate via nanosized ultradeformable liposomes. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3813-3824.
- Zhai, Y. J. & G. X. Zhai (2014) Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topical delivery. *Journal of Controlled Release*, 193, 90-99.
- Zhang, Z., P. C. Tsai, T. Ramezanli & B. B. Michniak-Kohn (2013) Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5, 205-218.
- Štork, J. e. a. 2013. *Dermatovenerologie*. Galén.