

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



Inkorporace vybraných imidazoliových iontových
kapalin do modelových lipidových membrán a vliv na
jejich permeabilitu

*Incorporation of selected imidazolium ionic liquids in model
lipid membranes and their permeability effect*

Diplomová práce

Tereza Seidlová

V Hradci Králové 2024

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Tereza Seidlová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především svému školiteli Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D za odborné vedení, vstřícné jednání a za všestrannou pomoc při vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat celé katedře farmaceutické technologie a Skin Barrier Research Group, bez které by tato práce nevznikla. Za podporu a zázemí děkuji i své rodině a přátelům.

Děkuji také za finanční podporu Karlově Univerzitě (GAUK 1156120, SVV 260 661) a Grantové agentuře České republiky (22-20839K).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Tereza Seidlová

Název diplomové práce: Inkorporace vybraných imidazoliových iontových kapalin do modelových lipidových membrán a vliv na jejich permeabilitu

Při transdermálním podávání léčiv je jedním z hlavních úskalí překonat téměř nepropustnou kožní bariéru, která je lokalizována ve *stratum corneum* (SC). Avšak existují sloučeniny, které umožňují, popř. usnadňují tuto bariéru překonat, tzv. akceleranty transdermální penetrace. Mezi tyto sloučeniny se řadí i iontové kapaliny (IL). IL jsou soli, jejichž teplota tání je pod 100 °C a za normálních podmínek se nachází v kapalném skupenství. Disponují velkou škálou proměnlivých znaků a mohou se kombinovat nespočetně mnoha způsoby, kterými lze dosáhnout žádoucích vlastností. Bylo dokázáno, že mají schopnost usnadňovat průchod kožní bariérou.

V tomto experimentu byly zkoumány dvě molekuly, 1-oktyl-3-methylimidazolium bromid (C₈MIM) a 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromid (C₁₂MIM) a jejich účinek na průchod SC. Místo lidské kůže byly použity modelové lipidové membrány, které umožňují lépe pochopit efekt IL v porovnání s komplexní a rozmanitou biologickou tkání. Byly prováděny permeační pokusy s využitím theofylinu (TH) a sodné soli diklofenaku (DIC) jako modelových molekul podání.

Experiment prokázal několikanásobně vyšší permeabilitu kožní bariéry při využití IL. Ve srovnání C₈MIM a C₁₂MIM se ukázal C₈MIM jako lepší akcelrelant transdermální penetrace.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Tereza Seidlová

Title of the thesis: Incorporation of selected imidazolium ionic liquids in model lipid membranes and their permeability effect

One of the main difficulties of transdermal drug administration is to overcome the almost impermeable skin barrier, which is located in the *stratum corneum* (SC). However, there are compounds that allow, or they make it easier to overcome this barrier, the so-called (trans)dermal penetration enhancers. These compounds also include ionic liquids (IL). IL are salts whose melting point is below 100 °C and under normal conditions they are in a liquid state. They have a large range of variable characters and can be combined in countless ways to achieve desired properties. They have been shown to have the ability to facilitate passage through the skin barrier.

In this experiment, two IL, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide (C₈MIM) and 1 dodecyl-3-methylimidazolium bromide (C₁₂MIM) were investigated as skin permeation enhancers. Instead of human skin, model lipid membranes were used to better understand the effect of IL compared to complex and diverse biological tissue. Permeation experiments were performed using theophylline (TH) and diclofenac sodium (DIC) as model molecules.

The experiment demonstrated several times higher permeability of the skin barrier when using IL. In the comparison of C₈MIM and C₁₂MIM, C₈MIM proved to be a better accelerant of transdermal penetration.

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod a cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1. Kůže.....	10
3.1.1. Stavba kůže a její funkce.....	10
3.1.2. Stratum corneum.....	13
3.1.3. Transdermální podávání léčiv.....	15
3.1.4. Testování transdermální absorpce in vitro.....	17
3.2. Iontové kapaliny.....	20
3.2.1. Obecný úvod.....	20
3.2.2. Vlastnosti iontových kapalin.....	20
3.2.3. Příprava iontových kapalin.....	21
3.2.4. Struktura a klasifikace iontových kapalin.....	22
3.2.5. Použití iontových kapalin.....	23
3.2.5.1. Iontové kapaliny jako katalyzátory.....	23
3.2.5.2. Iontové kapaliny jako rozpouštědla.....	24
3.2.5.3. Iontové kapaliny ve farmacii.....	24
3.2.6. Biologická aktivita iontových kapalin.....	27
3.2.7. Toxicita iontových kapalin.....	28
3.3. Zjednodušené modelové membrány stratum corneum.....	30
3.3.1. Úvod.....	30
3.3.2. Modelové membrány na nelipidové bázi.....	30
3.3.3. Modelové membrány na bázi lipidů.....	31
4. Experimentální část.....	34
4.1. Chemikálie, materiál a přístroje.....	34
4.2. Příprava lipidové směsi.....	35
4.3. Příprava modelových membrán.....	36
4.4. Příprava izotonického fosfátového pufru (PBS).....	38
4.5. Příprava Franzových difúzních cel.....	38
4.6. Měření transepidermální ztráty vody.....	39

4.7.	Permeační experiment	40
4.8.	Podmínky a provedení HPLC experimentu	40
4.9.	Statistické zpracování dat	41
5.	Výsledky a diskuze	42
5.1.1.	Výsledky měření TEWL	43
5.1.2.	Výsledky měření permeability pro TH a DIC	44
6.	Závěr	47
7.	Reference	48

1. Seznam zkratek

API	aktivní farmaceutická ingredience
Cer	ceramidy
Cer [NS]	N-Lignoceroyl-D-erythro-sphingosin
CHCl ₃	chloroform
C ₈ MIM	1-oktyl-3-methylimidazolium bromid
C ₁₂ MIM	1-dodecyl-3-methylimidazolium bromid
DIC	diklofenak sodný
FFA	volné mastné kyseliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol sulfát
IL	iontové kapaliny
MeOH	methanol
PAMPA	paralelní test permeability umělých membrán
PBS	izotonický fosfátový pufr
PG	propylenglykol
PVPA	test permeace na bázi fosfolipidových vezikul
SC	stratum corneum
TEWL	transepidermální ztráta vody
TH	theofylin

2. Úvod a cíl práce

Nejsvrchnější vrstva kůže (*stratum corneum*, *SC*) zajišťuje ochranu před škodlivinami z vnějšího prostředí a před ztrátou vody. Tato kožní bariéra je téměř nepropustná. Mezi molekuly, které zvyšují permeabilitu kožní bariéry patří mimo jiné i iontové kapaliny (IL). Jejich vlastnosti umožňují využít potenciál pro usnadnění transdermálního podávání léčiv. Tento potenciál není prozatím až tolik prozkoumán, proto jsou vyžadovány další studie.

Hlavním cílem práce bylo prokázat schopnost vybraných IL ulehčit průchod modelových molekul kožní bariérou. Konkrétně IL C_8MIM a $C_{12}MIM$ na modelových lipidových membránách, které fungují jako zjednodušený model kůže. Nejprve byla připravena lipidová směs, která se následně sprejovala na modelové membrány spolu s IL. Několik membrán neobsahovalo IL, čímž sloužily jako kontrolní membrány. Schopnost permeability membrány byla zjišťována v tzv. Franzových difúzních celách, a to pomocí měření ztráty vody a kumulativního množství prošlých modelových molekul membránou za čas. Jako modelové molekuly byly použity theofylin (TH) a diklofenak sodný (DIC).

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Srovnány byly modelové membrány s IL v porovnání s kontrolními vzorky a také bylo vypracováno srovnání dvou použitých IL (C_8MIM a $C_{12}MIM$), která se projevila jako lepší zesilovač permeability kožní bariéry.

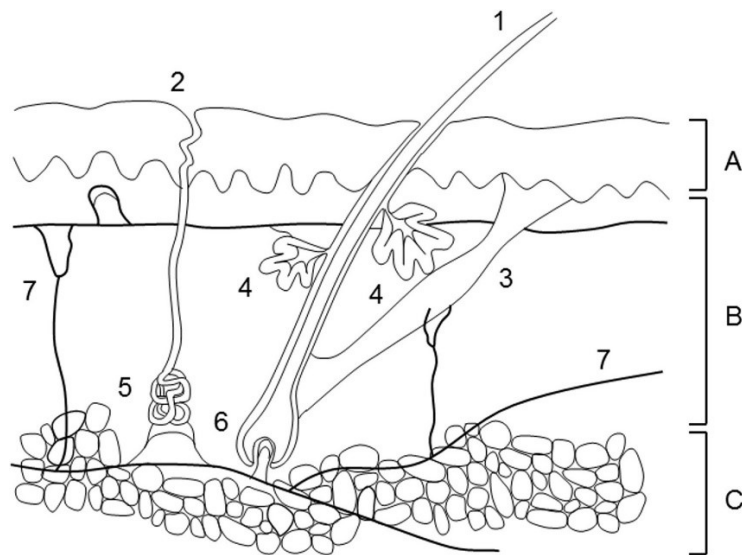
3. Teoretická část

3.1. Kůže

3.1.1. Stavba kůže a její funkce

Kůže (latinsky *cutis*, řecky *derma*) se vyznačuje jako největší orgán v lidském těle, tvořící zhruba 16 % celkové tělesné hmotnosti. [1] Do rozlohy zaujímá necelé 2 m² a svojí hmotností se díky individuálním rozdílům tukové hmoty velmi liší, může nabývat hodnot od 3 kg až do 20 kg. Lidská kůže má mnoho funkcí. Jedna z funkcí je ochranná. Kůže poskytuje ochranu před škodlivinami z okolí fyzikálního, chemického či mikrobiologického původu. Další funkce je termoregulační, kdy je teplo ovlivňováno pomocí potních žláz. Dále potní a mazové žlázy se podílejí na exkreční funkci lidské kůže. Mezi další úlohy řadíme např. účast v imunitním systému nebo látkovou výměnu. [2]

Kůže je složena z několika základních vrstev viz Obrázek 1. Každá vrstva má svůj význam, ale ve výsledku všechny části tvoří jednotný celek plnící funkce kůže.



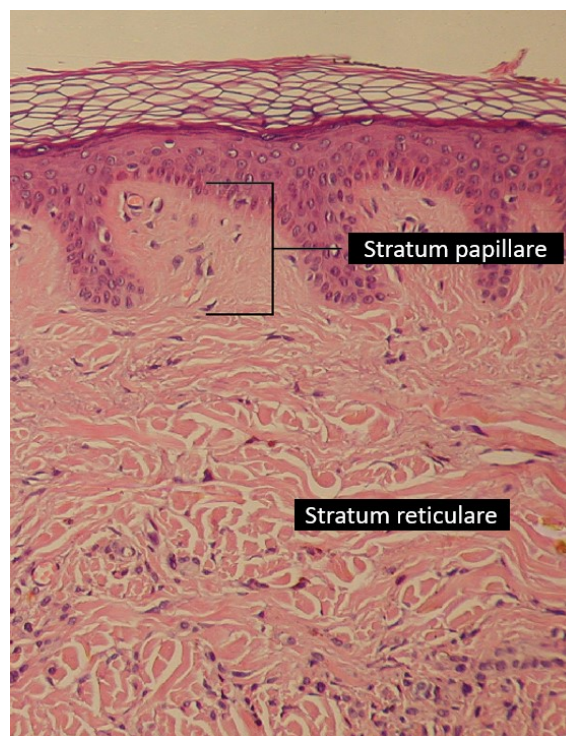
Obrázek 1: Struktura kůže: A – epidermis, B – dermis, C – hypodermis; 1 – vlasový stvol, 2 – pór, 3 – vzpřimovač chlupu, 4 – mazová žláza, 5 – potní žláza, 6 – vlasový folikul, 7 – céva [3]

Nejspodnější vrstva se nazývá *hypodermis* (podkoží, podkožní vrstva). Její funkce je napojení kůže na tkáň kostí a svalů. Tím, že je podkoží tvořeno hlavně volnou pojivovou a tukovou tkání, tak její další význam je i izolace a ochrana kůže. [4] Tato tkáň může nabývat

co do struktury podobných vlastností jako sliz, což je způsobeno proteoglykany a glykosaminoglykany, které převážně formují tkáň a mají schopnost poutat tekutiny. [5]

Jako další v pořadí se nachází *dermis* (Obrázek 2), která je silná zhruba 2 mm a dodává pokožce mechanickou pevnost. V této vrstvě se nachází krevní a lymfatické cévy, nervy a dále i potní žlázy a vlasové folikuly. *Dermis* je tvořena ze dvou vrstev:

- ***Stratum papillare*** – kolagenová a elastinová vlákna papilární vrstvy se formují do volné sítě. Tato vrstva svými výběžky přechází do *stratum reticulare* a vytváří tzv. prstovité dermální papily viz Obrázek 2. Dále se zde nachází fibroblasty, adipocyty, krevní cévy, buňky imunitního systému (fagocyty, obranné buňky) nebo např. Meissnerova tělíska (= receptory dotyku) atd.
- ***Stratum reticulare*** – tato vrstva je oproti papilární tvořena z husté nepravidelné pojivové tkáně, navíc je dobře prokrvená. Obsahuje hojné senzické a sympatické nervové zásobení. Retikulární *dermis* obsahuje převážně kolagenní vlákna velkého průměru, která zaručují pokožce strukturu a pevnost v tahu. Nicméně se zde nachází i elastinová vlákna, která tentokrát zprostředkovávají pružnost a umožňují pohyb. [4,5,6]

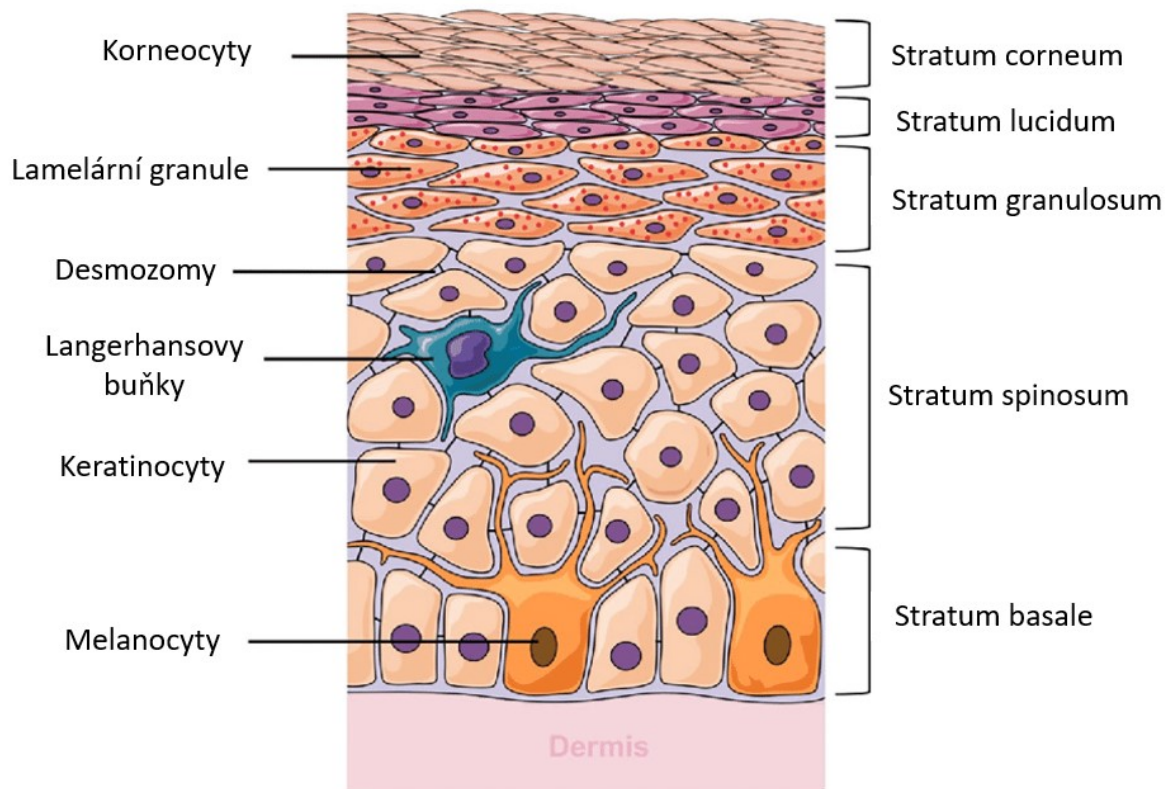


Obrázek 2: *Dermis* a její dvě vrstvy [4]

Nejsvrchnější a nejvíce biologicky aktivní vrstva je *epidermis* neboli pokožka (Obrázek 3). Tato vrstva je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Kromě základních buněk (keratinocytů) se zde nachází i melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. [2] Keratinocyty vytváří a uchovávají vláknitý protein keratin, díky kterému jsou vlasy, nehty a pokožka tvrdé a voděodolné. Pokožka je tzv. avaskulární (= neobsahuje žádné krevní cévy). *Epidermis* je tvořena čtyřmi vrstvami: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum*. Typicky u chodidel a dlaní (tzv. tlustá kůže) nacházíme navíc pátou vrstvu, a to *stratum lucidum*.

- ***Stratum basale*** – vyznačuje se jako nejhlubší epidermální vrstva, která je napojena na bazální laminu, což jsou propletená kolagenová vlákna. Tato bazální membrána odděluje *epidermis* od *dermis*. Bazální vrstva je formována jednou řadou bazálních buněk. Jedná se o kmenové buňky kvádrovitého tvaru, jež jsou prekurzorem keratinocytů. Všechny keratinocyty podstupují mitózou (= buněčné dělení), čímž jsou postupně vytlačovány směrem k povrchu. Mimo jiné zde můžeme nalézt i tzv. Merkelovy buňky, které dráždí sensorické nervy a mozek tyto signály následně vysílá jako dotyk. Tyto buňky se v hojnějším zastoupení nacházejí na povrchu rukou a nohou. Dále se ve *stratum basale* nachází melanocyty, produkující pigment melanin. Melanin uděluje vlasům a pokožce barvu, a navíc poskytuje pokožce ochranu před poškozením v důsledku ultrafialového záření.
- ***Stratum spinosum*** – tato vrstva je tvořena osmi až deseti vrstvami keratinocytů, které mají počátek již ve *stratum basale*. Keratinocyty syntetizují keratin a uvolňují vodu odpuzující glykolipid, s jejichž zásluhou je pokožka vcelku vodotěsná, jelikož nedochází k tak velkým ztrátám vody. Buňky nacházející se v této vrstvě obsahují desmozomy, díky kterým mají buňky ostnitý vzhled (odtud odvozen název vrstvy) a celkově je vrstva díky těmto buněčným spojům propletená a mnohem pevnější. Ovšem nacházejí se zde i Langerhansovy buňky, což jsou buňky na bázi makrofágů, které zneškodňují jakékoliv cizí částice, poškozené buňky či bakterie vyskytující se v této vrstvě.
- ***Stratum granulosum*** – jak již bylo zmíněno, keratinocyty jsou postupně vytlačovány k povrchu a tím je i měněn jejich tvar. V této části *epidermis* mají keratinocyty zrnitý vzhled, z čehož je opět odvozen název vrstvy. Jedná se o buňky ve třech až pěti vrstvách, které jsou typické přítomností keratohyalinu. Keratohyalin se v buňkách kumuluje jako granule a spolu s keratinem dávají zrnitý vzhled *stratum granulosum*.

- **Stratum lucidum** – typicky se nachází pouze na dlaních, prstech a chodidlech. Keratinocyty nacházející se ve *stratum lucidum* jsou mrtvé a zploštělé. Tato vrstva je zdánlivě průsvitná, což je způsobeno eleidenem. Eleiden je čirý protein odvozený od keratohyalinu a je bohatý na lipidy. Právě tento protein způsobuje průsvitný vzhled vrstvy a také slouží jako bariéra pro vodu.
- **Stratum corneum** – této vrstvě je věnována samostatná podkapitola. [4,6,7]

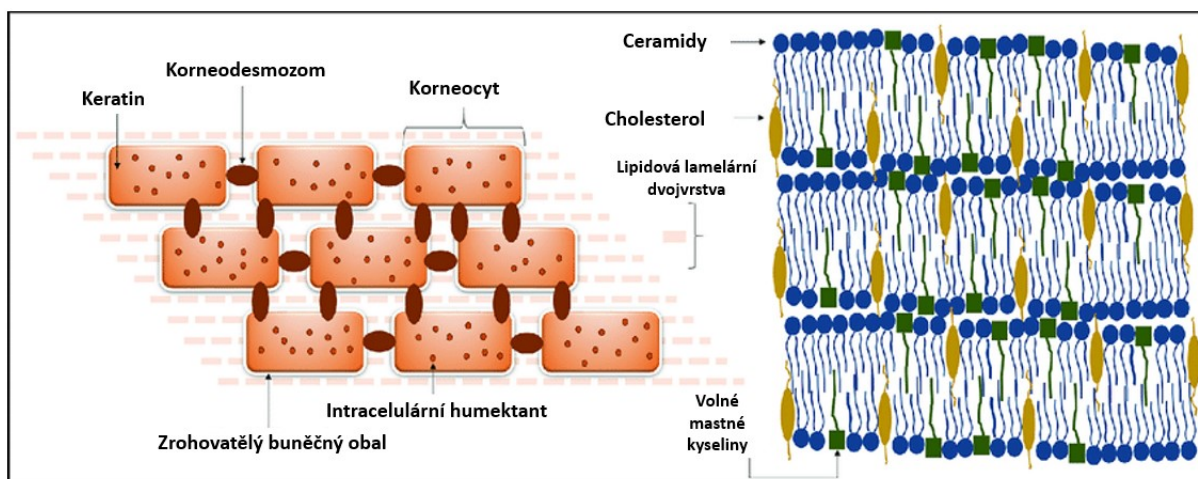


Obrázek 3: Jednotlivé vrstvy a složení *epidermis* [8]

3.1.2. Stratum corneum

Jedná se o nejsvrchnější vrstvu kůže, která chrání tělo před nebezpečnými vlivy okolního prostředí. Co se týče její struktury, *stratum corneum* (SC) byla dlouhou dobu považována za homogenní neaktivní tkáň. Buňky, které se nacházejí ve SC, se nazývají korneocyty. Korneocyty mají tloušťku zhruba 1 μm a jejich velikost se s věkem zvětšuje, což pak ovlivňuje i rychlost průchodu látek touto vrstvou v pokročilejším věku. Počet vrstev korneocytů se může v závislosti na oblasti těla lišit, ale zpravidla jsou tyto buňky ve 12–16

vrstvách. Struktura SC byla pro jednodušší představu připodobněna k cihlové zdi. Korneocyty (cihly) jsou vestavěny ve spojité matici specializovaných lipidů (malta) viz Obrázek 4.



Obrázek 4: Znáornění struktury SC [9]

Z celkového objemu lipidová matrice formuje asi 20 %. SC je zcela unikátní co se týče složení, typické organizace či fyzikálních vlastností. Lipidová dvojvrstva se skládá ze 3 hlavních lipidových skupin. První skupinou jsou ceramidy (Cer), které tvoří asi 50 % hmotnosti. Další skupinou jsou mastné kyseliny, které tvoří asi 10–20 % celkové hmotnosti. [10,11] Nejčastější mastné kyseliny, které se ve SC objevují, jsou kyselina behenová (C22), kyselina lignocerová (C24), kyselina palmitová (C16) a kyselina stearová (C18). [12] Poslední skupinou je cholesterol (Chol) tvořící zhruba 25 % hmotnosti. Ovšem v menšině jsou zde zastoupeny i estery cholesterolu, jako je cholesterol-sulfát (CholS). [13] Cer, které jsou zde nejvíce zastoupené (celkem 9 typů), mají obecnou strukturu polární hlavy a dvou hydrofobních řetězců. Délka mastné kyseliny je zhruba kolem 16–34 uhlíků, ovšem nejčastější délka řetězce je 24 uhlíků. Obvykle se v buněčné membráně lidských buněk nacházejí fosfolipidy. Tyto fosfolipidy jsou však ve SC nahrazeny právě Cer, které mají mnohem menší polární hlavu a tím umožňují těsnější uspořádání v lamele. Dalším rozdílem jsou výrazně delší hydrofobní řetězce, které poskytují vzájemně propojenou lamelární strukturu. To vše je důsledkem toho, že SC má mnohem nižší propustnost než fosfolipidové dvojvrstvy. [10]

Tato vrstva poskytuje bariéru proti vodě, a to průchod vody jak ve směru dovnitř, tak i ve směru z těla ven. Zdravá SC je nepropustná kromě malého množství vody, které kůži udržuje hydratovanou a pružnou. Denně se vypaří něco okolo 0,5 l vody v důsledku

transepidermální ztráty vody (TEWL), což je velmi důležité k udržení života z důvodu již zmíněné hydratace. U různých druhů poruch (atopická dermatitida, psoriáza, ichtyóza atd.) je bariéra narušena a dochází k nadměrným ztrátám vody, což následně vede k suchosti pokožky, podráždění či svědění. Ovšem bariéra může být narušena při malých poraněních. Poté se bariéra obnoví po zhruba 7–10 dnech. Tento proces obnovení může být zrychlen pomocí změkčovadel.

Další funkce SC je zemezení průniku xenobiotik kůží. To je jeden z hlavních důvodů, proč se při transdermálním podávání léčiv zkoumá právě tato vrstva. Existuje několik principů, které usnadňují tuto cestu podání léčiv, viz kapitola 3.1.3. Poskytuje i ochranu před všelijakými škodlivými patogeny (bakterie, houby, viry). Jedním z mechanismů, ze kterého vyplývá obrana, je nepřetržitý chod korneocytů směrem ven a proces deskvamace, čímž patogeny tzv. „ztrácí půdu pod nohama“. Navíc epidermis pravděpodobně obsahuje jakousi chemickou obranu proti mikrobům, která spolu s peptidy zvanými „defensiny“ a s toll receptory slouží jako velká opora bariéry kůže. Tato ochrana není 100%, ale když se vezme v potaz celkové množství patogenů působících na lidské tělo, tak přesto vrstva působí jako velmi dobrý štít. Další velmi důležitou vlastností SC je schopnost pohlcovat sluneční ultrafialové záření, které je pro biologické makromolekuly ničivé. Ovšem největší ochranu před ultrafialovým zářením umožňuje melanin, jak již bylo zmíněno. A v neposlední řadě je důležité neopomenout schopnost SC natahovat se, a tím umožňovat pohyb. Tato vlastnost ale může být narušena. Typicky u dermatitidy, kdy se při abnormální keratinizaci tvoří křehký a neohebný SC a v důsledku toho se pak na kůži tvoří vážné praskliny s mnohem horší schopností hojit se. [11,14]

3.1.3. Transdermální podávání léčiv

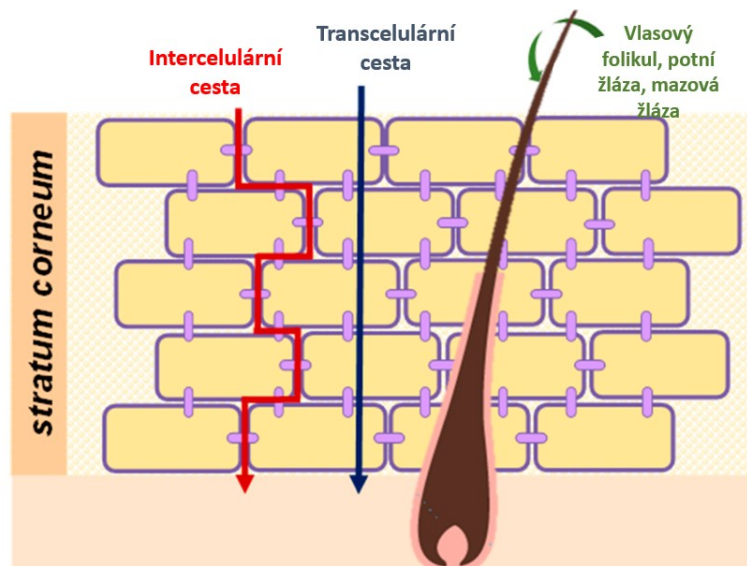
Jednou z možných variant podání léku s cílem dosáhnout systémového účinku je aplikace přes kůži neboli transdermální podání. Průběh vstřebání lze popsat třemi kroky:

1. Penetrace – vstup látky do určité vrstvy (např. vstup léčiva do SC)
2. Permeace – průnik z jedné vrstvy do druhé, strukturálně i funkčně odlišné
3. Resorpce – příjem látky do vaskulárního systému (krev, lymfa) [15]

Při výběru vhodného léčiva pro tuto formu podání existuje několik kritérií (fyzikálně-chemické a farmakokinetické vlastnosti a interakce léčiv s membránou), které látka musí splňovat. Jedná se o následující body:

- Nízká molekulová hmotnost (<600 Da)
- Rozpustnost ve vodě i v olejích – pro dosažení vysokého koncentračního gradientu a zvýšení difúzní síly na kůži
- Zvýšený, ale vyvážený rozdělovací koeficient (velmi vysoké hodnoty způsobí retenci léčiva v kůži)
- Nízký bod tání (<200 °C) v souvislosti s rozpustností [16]

Jak již bylo zmíněno, kůže je velmi účinná nepropustná bariéra. Ovšem není 100% a existuje 5 různých cest, kterými se chemické látky dostanou do vnitřního prostředí (Obrázek 5). První cestou je průnik potní žlázou, tato varianta přichází v úvahu pouze u hydrofilních léčiv, kterých je málo, a i tak se musí vytvořit velký koncentrační spád pro dosažení absorpce. Druhou možností je průnik mazovou žlázou, kde se naskýtá podobný problém, ovšem opačného rázu. Jelikož je jedním z požadavků na léčiva nepříliš vysoká lipofilita, tak při proniknutí se látka začne hromadit v okolí tukové žlázy a následný přechod do organismu je velmi ztížen, jako je tomu u třetí cesty průniku transfolikulárně (přes vlasový folikul). Častějšími cestami průniku jsou transcelulární (tzn. přes těla buněk – korneocytů) a intercelulární (tzn. mezibuněčnými prostory – přes lipidové lamely). Varianta skrz korneocyty je ovšem také vcelku obtížná. Usnadnění je umožněno zvýšením množství vody v SC, a to díky tomu, že korneocyty obsahují hydrofilní skupiny, které vážou vodu, tím nabobtnají, navážou vodu do intercelulárního prostoru, který se rozvolní a naruší se soudržnost lipidových lamel. Ovšem nejčastější cestou průniku je průnik intercelulární. Díky poznatkům o SC se vytvořily sloučeniny, které usnadňují průnik přes kůži, tzv. akceleranty transdermální permeace (např. substituované amidy karboxylových kyselin, laktamy, estery ω -aminokyselin a jejich deriváty atd.). [12,17]



Obrázek 5: Cesty průniku látek přes SC [18]

I tato forma podání má své výhody a nevýhody. V porovnání s perorálním podáním je velkou výhodou transdermálního podání vyšší biologická dostupnost tím, že obchází gastrointestinální trakt (kyselost, motilita apod.) a první průchod játry, čímž se snižuje degradace molekuly, což umožňuje snížení dávek léku. Dalším benefitem je zabránění interakcí léku jak s potravou, tak i s ostatními léčivy a do jisté míry i snížení jeho nežádoucích účinků. Díky stabilnějším plazmatickým hladinám je možná aplikace látek s nízkým terapeutickým indexem. V neposlední řadě oproti injekčnímu podání je v případě aplikace formou náplasti i ukončení podání velmi jednoduché, neinvazivní a nebolestivé. Na druhou stranu asi největší nevýhodou je kožní bariéra, která zamezuje průchodu většině léčiv. [12,19]

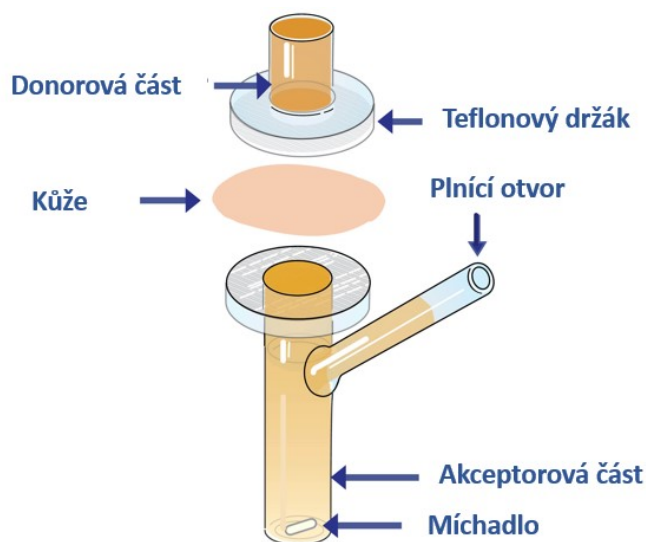
3.1.4. Testování transdermální absorpce *in vitro*

Následující metody slouží k hodnocení látek, které proniknou (penetrují) do pokožky s následnou permeací do rezervoárové tekutiny. Dále jsou tyto pokusy *in vitro* využívány k odhadu dermální penetrace u člověka. K měření se využívá nejen čerstvá, metabolicky aktivní kůže, ale také i neživotaschopná kůže (tzn. není čerstvě vyříznutá) různého původu, a to lidského, prasečího či krysího. Kůži lze uchovávat několik měsíců v teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, nedoporučuje se ji však opakovaně zmrazovat a rozmrazovat, jelikož by to mohlo zvýšit propustnost kožní bariéry. Také není doporučováno kůži uchovávat při velmi nízkých teplotách ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) ze stejného důvodu. Metody *in vitro* poskytují řadu výhod oproti metodám *in vivo*,

jedná se o časovou úsporu, nižší náklady, lepší reprodukovatelnost a méně proměnných, které by mohly zkreslovat výsledky. Další výhodou v porovnání s metodami *in vivo* je možnost provedení opakovaných měření ze stejného či z různých subjektů, které jsou rozsáhle metabolizovány. Tento typ metod je již v dnešní době běžný, přesto je potřeba pečlivou úvahu při výběru techniky. [15]

Při testování se primárně využívají difúzní cely (Obrázek 6). Tyto difúzní cely jsou dvojího typu - statické, u kterých je tekutina ustavičně promíchávána a v předem stanovených časových intervalech ručně odebírána a ihned nahrazena novou čerstvou tekutinou, kdy akceptorová část se obvykle plní objemem v rozmezí 2–20 ml, a průtokové, kde průchod tekutiny je zajišťován pomocí čerpadla (pumpy). Průtokové cely jsou nastaveny na objem cca 1–5 ml a jsou vhodné k měření metabolismu látek v kůži. Dále lze statické cely rozdělit na dva typy na základě toho, jakým směrem je kůže (membrána) orientovaná, a to horizontální a vertikální. [15,20]

Difúzní cely jsou vyráběny z inertních materiálů, např. ze skla nebo teflonu, a jsou tvořeny ze dvou částí: horní (donorová) a spodní (akceptorová). Mezi tyto dvě části se umísťuje absorpční membrána (kůže) tak, aby pokožka směřovala nahoru. Velikost difúzní plochy může být různá, ovšem zpravidla se jedná o rozlohu 0,3 – 5 cm². Poté se nanáší testovaná látka buď ve formě „konečné dávky“ (finite dose), kdy může docházet k částečnému odpaření látky stejně jako v praxi, anebo ve formě „nekonečné dávky“ (infinite dose), kdy je testovaná látka aplikována v nadbytku. [20]



Obrázek 6: Difúzní cely Franzova typu [21]

Spodní část cely je vyplněna akceptorovou tekutinou, která musí být v kontaktu se spodní stranou kůže (s celou její plochou), a to již od samého začátku experimentu až do konce. V této části se zde nesmí nacházet bubliny, které by mohly mít za následek zvýšenou propustnost kožní bariéry. U tekutiny by měla být zajištěna rozpustnost a stabilita testované látky v tekutině. Při testování látek hydrofilního charakteru se nejvíce používá fyziologický roztok či pufrované fyziologické roztoky a pro lipofilní látky se často používá sérový albumin. Dále tekutina nesmí nijak ovlivňovat experiment, měla by mít fyziologické pH 7,4 a během celého experimentu musí být míchána, jako je tomu u statických cel, a u průtokových cel musí být tekutina plynule vyměňována. Jiným důležitým aspektem je teplota povrchu kůže, která odpovídá průměrné běžné teplotě povrchu kůže člověka 32 ± 1 °C. Vlhkost okolního prostředí by měla být něco mezi 30–70 %. [15,20]

Délka pokusu se může lišit. Doporučená doba je 24 h, přijatelná je však doba i 48 h. Celkem je zapotřebí alespoň 6 vzorků kůže, která je odebrána ze stejného místa na těle a k tomu minimálně od 3 odlišných dárců. Analýza vzorků je nejčastěji realizována pomocí HPLC. [20]

3.2. Iontové kapaliny

3.2.1. Obecný úvod

Iontové kapaliny (IL), známé také jako zelená rozpouštědla, designová rozpouštědla, tavené soli, kapalně elektrolyty, iontové taveniny apod., jsou kapaliny, které jsou tvořeny z větší části či úplně z iontů (z organických kationtů a anorganických nebo i organických aniontů). Obecnou definicí lze IL popsat jako kapaliny, které mají teplotu tání nebo teplotu skelného přechodu pod 100 °C. IL jsou sdružovány s tzv. „zelenou chemií“. Zelená chemie se orientuje na nahrazení škodlivých látek bezpečnějšími molekulami. Do budoucna by mohly být postupně organická těkavá rozpouštědla nahrazena IL, které jsou bezpečnější jak pro lidské zdraví, tak i pro ovzduší a vodu. [22,23,24]

3.2.2. Vlastnosti iontových kapalin

IL disponují vcelku širokými proměnlivými znaky. Co se týče mísitelnosti s vodou, některé jsou hydrofilní, jiné hydrofobní. To platí i u pH, mohou být kyselé, zásadité, ale i neutrální. Pokud jde o toxicitu, některé IL jsou toxické, jiné ale toxické být nemusí. Tato rozmanitost vlastností nabízí rozsáhlou škálu modifikací, přičemž tyto sloučeniny mají určité typické vlastnosti, například vysoká tepelná stabilita, vysoká rozpouštěcí schopnost, v porovnání s organickými molekulárními rozpouštědly nízký tlak par. Dále jsou nehořlavé a dosahují širokého rozsahu rozpustností a mísitelností. [22,24]

Trendem je tendence snižování teploty tání se zvyšující se velikostí aniontu či kationtu. Tato tendence platí analogicky i u délky alkylového řetězce u kationtu. Dalším faktorem ovlivňujícím teplotu tání je i symetrie molekuly. Čím více je iont symetrický, tím se teplota tání kapaliny zvyšuje. Jak již bylo zmíněno, IL mají minimální tlak par, tudíž se během reakcí neevaporují a nevedou k následným zdravotním problémům a neznečišťují ovzduší.

Obecně platí, že IL mají vyšší viskozitu oproti molekulárním rozpouštědlům. Co se týče porovnání mezi jednotlivými IL, platí vztah: čím větší iont (popřípadě délka alkylového řetězce), tím vyšší viskozita. Dalším trendem je, že anionty, které mají slabě koordinační vazby, mají menší viskozitu v porovnání s anionty obsahujícími silně koordinační vazby. A posledním faktorem ovlivňujícím viskozitu je teplota. Viskozita s rostoucí teplotou klesá, a to v poměrně velkém měřítku.

Co se týče hustoty, v porovnání s vodou mají IL vyšší hustotu. Opět platí vztah: IL obsahující kratší alkylový řetězec či méně objemný iont dosahují vyšších hustot než tekutiny

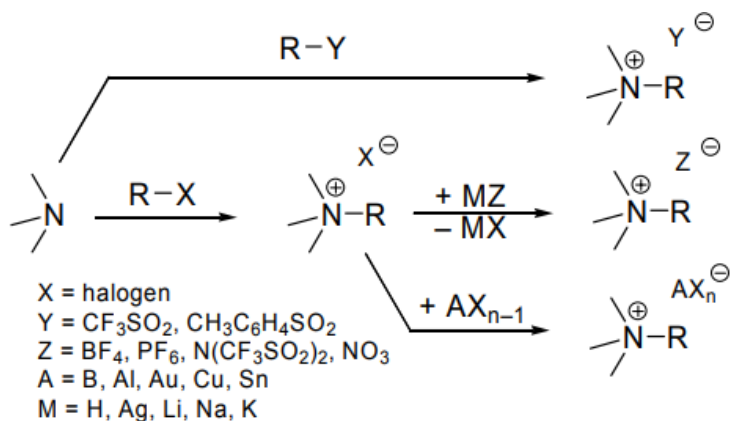
s delšími alkylovými řetězci a více objemnými ionty. V porovnání s viskozitou, teplota nemá téměř žádný vliv na změnu hustoty. [24]

Dalšími vlastnostmi je například vodivost (schopnost vést elektrický proud), možnost recyklace, netěkavost.

Přítomnost následujících aniontů v molekule IL: $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ a $[\text{BF}_4]^-$ je činí bezbarvými. V případě oranžového či žlutého zabarvení IL se často jedná o přítomnost nečistot. Také podstatným důvodem zabarvení je nadměrné zahřívání nebo přítomnost barevných surovin. [25]

3.2.3. Příprava iontových kapalin

Připravit IL lze různými způsoby, viz Obrázek 7. Nejčastěji se jedná o 3 základní přístupy. Společným krokem všech třech postupů je kvarternizace nukleofilního atomu (ve většině případů dusíku). Reakce může být jednokroková v případě, že aniont, který je součástí IL, má i dobrou odstupující skupinu při nukleofilních substitucích (triflát, tosylát). Dvoukrokové metody se používají v přítomnosti nekoordinačních anorganických aniontů. Během prvního kroku se realizuje kvarternizace alkyhalogenidem a v druhém kroku se pouze provede záměna halogenidového aniontu. K záměně dojde díky nerozpustnosti jednoho z produktů v daném rozpouštědle nebo pomocí Lewisovy neutralizace. Popřípadě záměnu aniontu lze uskutečnit na iontoměničích (nejméně používaný způsob). [23]

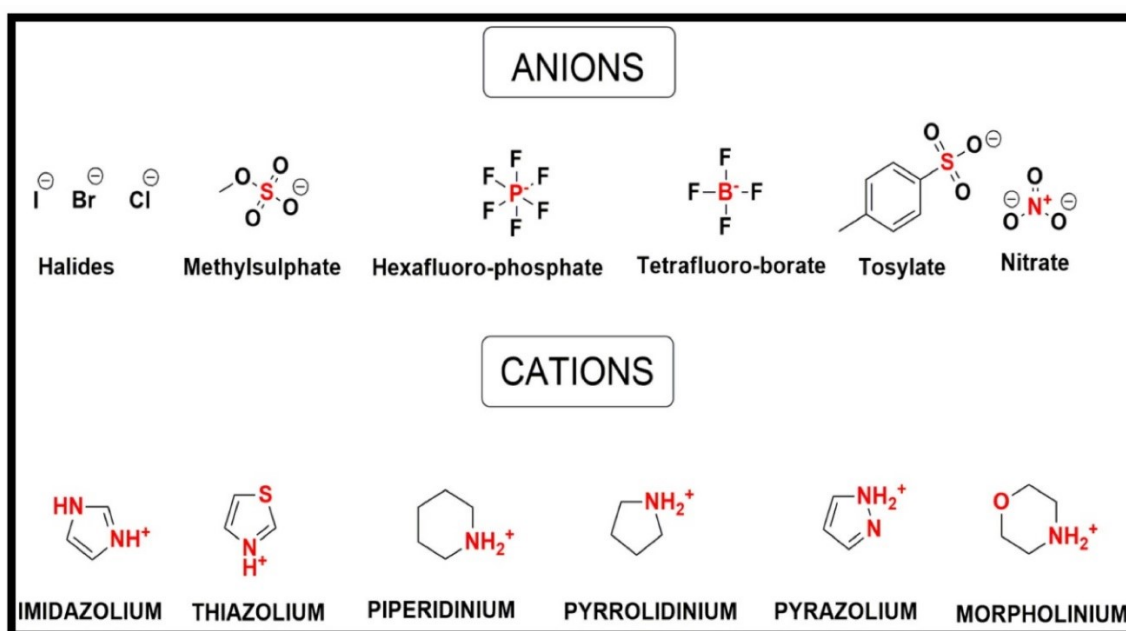


Obrázek 7: Schéma syntézy IL [23]

3.2.4. Struktura a klasifikace iontových kapalin

Jak již bylo zmíněno, IL jsou molekuly ve formě solí, které se při teplotách do 100 °C nacházejí v kapalně fázi. Tento jev je způsobený objemností asymetrických kationtů a slabě koordinačními anionty, které destabilizují krystalovou mřížku. Jednak množství potenciálních kombinací IL je obrovské a také možnost drobných modifikací v rámci jedné molekuly umožňuje dosáhnout požadovaných vlastností látky. [26]

Základní struktura IL je ve formě kationtů. Jedná se o velkou organickou strukturu, která obsahuje kladný náboj. Ve valné většině organické kationty obsahují dusík nebo fosfor. Ovšem se IL mohou nacházet i ve formě aniontů (malé anorganické struktury se záporným nábojem) (Obrázek 8). [25]



Obrázek 8: Příklady aniontů a kationtů běžně používaných v IL [25]

Z historického hlediska můžeme IL rozdělit do 3 generací:

1. Jako první generace byly popsány halogenalumináty. Konkrétně byl zkoumán tetrachloroaluminát a jeho elektrochemické, rozpouštěcí a katalytické vlastnosti. Jelikož byla zjištěna nestálost na vzduchu a velká náchylnost k vlhkosti (musely být uchovávány v boxech za nepřístupu vlhka), byla zkoumána další generace.

2. Druhou generací představují nehalogenaluminátové IL. Při přípravě jsou využívány nekoordináční anionty, které jsou rezistentní vůči hydrolyze a oxidaci. Tato generace byla nejvíce využita ve funkci rozpouštědel.
3. Takřka současně byly studovány IL třetí generace. Cílem bylo nepoužívat IL pouze jako rozpouštědla, ale také například jako katalyzátory či chelatační činidla. Jeden z nejnovějších typů jsou chirální IL, které se dají využít jako chirální náplň chromatografické kolony nebo při asymetrické syntéze. [23,24]

Na základě struktury můžeme IL rozdělit na 3 základní skupiny:

- **Protické IL** – tento typ IL vzniká díky přenosu protonu z kyseliny, která je schopná darovat proton (= Brønstedova kyselina) na bázi, která daný proton přijímá (= Brønstedova báze). Reakce nezahrnuje jakékoliv vedlejší produkty, proto je příprava obecně jednodušší a levnější. Protické IL jsou brány jako čisté směsi iontů, jelikož většina molekul dosahuje „dobrého“ iontového chování.
- **Aprotické IL** – jedná se o skupinu kationtových a aniontových struktur, které na rozdíl od protických IL některé poskytují proton a jiné zase ne. Reakce přípravy je často několikasupňový proces, z toho důvodu je příprava dražší a komplikovanější. Zde ionty vznikají mezi dvěma funkčními skupinami, kde se vytváří kovalentní vazba. Tyto IL jsou stabilnější (tepelně i elektrochemicky) než dané protické IL.
- **Ostatní IL** – sem řadíme zbývající IL, například IL s chirálním centrem, magnetické IL (obsahující paramagnetický atom), divalentní IL (= s dvojmocným iontem), polymerní IL (obsahující polymerní nebo polymerizovatelný iont) a další. [27]

3.2.5. Použití iontových kapalin

3.2.5.1. Iontové kapaliny jako katalyzátory

Velkou výhodou IL je využití k urychlení různých typů reakcí, tzn. IL zastává funkci katalyzátoru. Reakce jsou tedy mnohem rychlejší a zaručují vysokou konverzi (přes 90 %). Takto se využívá například ethylaluminiumchloridový katalyzátor (díky jeho vysoké kyselosti) při oligomeraci butenu. Benefit lze spatřovat v možnosti použití katalyzátoru znovu v jiné reakci, jelikož organický produkt není mísitelný s IL. Dalším pozitivem je, že nedochází

k tvorbě vedlejších produktů a není zapotřebí následné promývání vodou. Oligomerací butenu mohou vznikat látky s molekulovou hmotností v rozmezí 600 – 100 000. Tyto produkty mají následně využití jako mazací oleje. Dále se chloraluminiové IL mohou využívat ve funkci katalyzátorů například v tzv. Friedel – Craftsových reakcích. [28]

3.2.5.2. Iontové kapaliny jako rozpouštědla

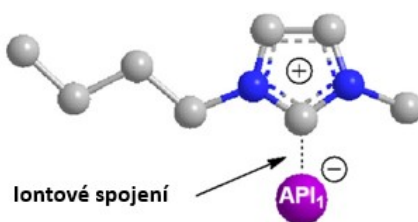
Dalším benefitem IL je možnost využití jako rozpouštědel. Za tímto účelem se využívají IL, které jsou méně citlivé na vzduch a vlhkost. Mnohem příznivější alternativou jsou IL při vícefázových extrakčních procesech oproti běžným organickým rozpouštědlům, které mají potíže z hlediska recyklace a znečištění životního prostředí. IL jsou tedy ekologičtější, méně hořlavé, méně těkavé a mají nízký tlak par. A díky možnosti nesčetných kombinací kationtů a aniontů mají IL schopnost rozpouštět látky, které jsou běžně složitě rozpustné (například aktivní farmaceutické složky a jejich prekurzory). Dále je IL možné také využít při hydrogenacích, homogenních, heterogenních katalytických reakcích a mnoho dalších. [22,28]

3.2.5.3. Iontové kapaliny ve farmacii

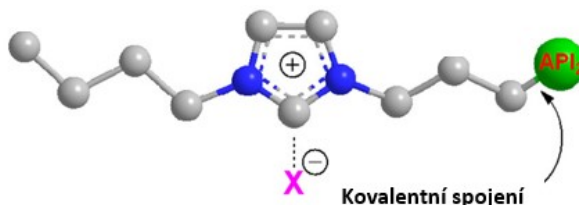
Při posuzování účinnosti léčiva je jedním z hlavních faktorů biologická dostupnost, což odráží permeabilitu a rozpustnost léčiva. V těchto veličinách tkví hlavní problémy při výzkumu léčiv. Léčivo se musí rozpouštět v tělesných tekutinách a musí být dostatečně rozpustné, aby bylo schopné se rychleji rozpouštět a absorbovat. Další častou komplikací je polymorfismus. Farmaceutické látky jsou ve velkém procentu případů získávány v krystalické formě. Tudíž se jedna látka může nacházet v několika různých formách (= polymorfy). Tyto formy se od sebe mohou lišit různými vlastnostmi, jako je stabilita, teplota tání, rozpustnost, biologická dostupnost apod. Může také docházet k záměnám jednotlivých polymorfů a tvorba těchto záměn je těžko kontrolovatelná. Existuje spousta metod, kterými se tyto potíže řeší. Jedná se například o tvorbu proléčiv, řízenou krystalizaci, rozmělnování, příprava hydrátů a mnoho dalších. Tím, že IL mají rozsáhlou schopnost vytvářet nespočet možných kombinací, jsou skvělými adepty na zvyšování biodostupnosti léčiv, zlepšování absorpce, poskytování požadované rychlosti rozpouštění, dobré rozpustnosti ve vodě, popřípadě způsobnosti zacílit na určité struktury. [26]

Podobné obtížnosti se řeší i u transdermálního podání léčiv. Jak již bylo zmíněno, kůže je velmi účinná nepropustná bariéra. Nicméně existují tzv. zesilovače kožní permeace, které ulehčují (umožňují) vstup kožní bariérou. Mezi ně se řadí i IL. Jejich schopnost zvyšovat permeaci léčiv kůží je vysvětlována řadou mechanismů. Pravděpodobně jsou hlavním faktorem fyzikálně-chemické vlastnosti a struktura IL. Obecně z hlediska permeačních akceleratorů můžeme IL rozdělit na hydrofilní a hydrofobní. Hydrofilní IL podporují paracelulární transport tím, že jsou schopny otevírat těsná spojení ve SC. Ke zvýšení fluidizace membrány dochází převážně v proteinových a lipidových oblastech. Tato schopnost fluidizovat buněčnou membránu je pozorována například u imidazoliových IL. Hydrofobní IL naopak podporují transcelulární transport tvorbou kanálů v epiteliální membráně. Dále například 1-oktyl-3-methylimidazolium je velmi dobře zdokumentovaná IL, která zesiluje permeaci tím, že narušuje strukturální integritu membrány. Díky těmto faktům mají molekuly, které byly doteď naprosto vyloučené pro transdermální podání, možnost prosadit se i v této formě podání. Jedná se například o metotrexát, aciklovir či proteinové molekuly. [29,30]

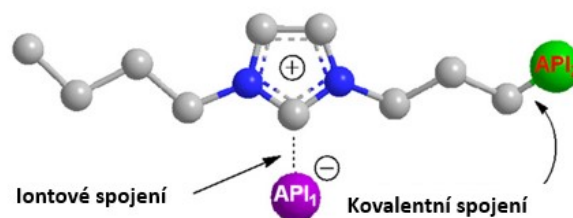
V důsledku nízké biologické dostupnosti selže až 40–70 % potenciálních nových léčiv. Existuje další možnost využití IL ve farmacii, a to navázání IL na aktivní farmaceutickou přísadu (API-IL). Tento systém slouží k dodávání léčiv, ve kterém má IL funkci nosiče i léčiva, a to díky schopnosti IL doladit fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti dané API jako je lipofilita nebo toxicita. Tento způsob jednak řeší problémy týkající se biologické dostupnosti a zároveň má i potenciál dosáhnout větší účinnosti. Celkem jsou 3 možnosti, jak zainkorporovat API do IL systémů (Obrázek 9, 10, 11): [26]



Obrázek 9: Typ 1 - spojení pomocí iontové vazby [26]



Obrázek 10: Typ 2 – spojení pomocí kovalentní vazby [26]



Obrázek 11: Typ 3 – spojení kombinací obou způsobů [26]

Příklad využití API-IL je s léčivem zvaným lidokain, který se používá typicky jako anestetikum. Při spojení lidokainu s IL vzniká molekula lidokain dokusát, u kterého je na myším modelu dosaženo lepšího a prodlouženého účinku v porovnání s lidokainem. Touto strategií dochází ke změně mechanismu účinku na buněčné úrovni, nebo například vlivem změny ranitidinu na tekutý rantidin dokusát vymizí problém spojený s polymorfismem. Nicméně API-IL neřeší všechny problémy u všech léčiv, protože již byly zaznamenány i polymorfy API-IL. [22,26]

V neposlední řadě se dají IL využít i při syntéze léčiv, a to v roli katalyzátoru a transformačního média, díky čemuž se sníží objem těžkých rozpouštědel a sníží se téměř na nulu množství kovových katalyzátorů. V biotechnologických procesech IL mohou zlepšovat výtěžky tím, že mají schopnost působit i jako selektivní aktivátory enzymů. Rozpuštěním léčiva v IL může docházet k úplně novému chování látky, což je vysvětlováno tvorbou nanostruktur, které vznikají intermolekulárními interakcemi mezi IL a danou látkou. Aplikace IL stála například při syntéze několika nesteroidních antiflogistik, antivirotik, antimalarik a dalších. Také jsou IL využívány v doručovacích systémech pro zvýšení efektivity dodání léčiva. Tyto IL působí jako dispergační činidla, nanočástice, nanonosiče a aktivátory substrátu. Dalším nadějným objevem je využití IL jakožto „chaperonů“. Dochází k interakcím jak s vodou, tak i proteinovým povrchem a díky tomu je možná kontrola nad skládáním, rozkládáním proteinů a nad agregací proteinů. Navíc použitím IL se zaručuje stabilizace a zvýšená aktivita enzymů. Tyto účinky s proteinovými strukturami jsou dané díky vodnému prostředí proteinu a hydratovaným IL, které mají schopnost dále absorbovat vodu a tím stabilizovat tyto makromolekuly. [26,29]

3.2.6. Biologická aktivita iontových kapalin

Je prokázáno, že IL mají vliv na různé formy života. Jejich biologická aktivita sahá již od jednoduchých proteinů až po vyšší mnohobuněčné organismy. Způsob, jakým dochází k dané biologické aktivitě se může lišit u jednotlivých organismů, avšak spojovacím článkem všech těchto mechanismů je voda. Díky tomu rozpustnost a interakce s vodou vymezuje biologickou aktivitu IL. Byly studovány následující kationty, jejichž rozpustnost ve vodě klesá v pořadí: imidazoliové IL > pyrrolidiniové IL > pyridiniové IL > piperidiniové IL. Z daných výsledků je vyvozován závěr, že závisí na velikosti kationtu a do určité míry i na aromaticitě IL. U rozpustnosti ve vodě nezáleží pouze na kationtu, ale i na aniontu. U chloridových $[\text{Cl}]^-$ a bromidových $[\text{Br}]^-$ aniontů docházelo k významným interakcím s vodou, v porovnání s hexafluorofosfátovým aniontem $[\text{PF}_6]^-$, který s vodou nijak neinteragoval. Je dokázáno, že biologická aktivita se odvíjí od hydratačního stavu IL. Následně bylo vymezeno hydratační číslo sedm molekul vody na iontový pár (nezávisí na povaze iontu), které má velký vliv na biologickou aktivitu směsi IL-voda. Při simulaci vodných roztoků IL s fosfolipidovou dvojvrstvou je opět dokázána závislost biologického účinku na účasti vody. Od interakce s molekulami vody se odvíjí chování aniontu IL. Chloridové anionty $[\text{Cl}]^-$, povahou malých hydrofilních aniontů setrvaly v roztoku, v porovnání s hydrofobnějšími a objemnějšími $[\text{PF}_6]^-$ anionty, které zůstaly na rozhraní lipid/voda. A nakonec hydrofobní aniont $[\text{NTf}_2]^-$, který se vmezeřil mezi polárními hlavami fosfolipidu a uhlovodíkovými konci. [25]

3.2.6.1. Antibakteriální a antifungální účinky iontových kapalin

Bylo dokázáno, že určité IL mají schopnost inhibovat růst patogenních a nepatogenních bakterií a hub. Jedná se například o imidazolium, pyridinium a pyrrolidinium IL. Tyto účinky mají tzv. povrchově aktivní IL, jejichž účinku je dosaženo připojením delšího alkylového řetězce. [25,26]

Předpokládaný mechanismus antimikrobiálního účinku IL je způsoben elektrostatickými silami, které nahromadí kladně nabitě části IL do oblasti buněčné membrány/stěny s negativním nábojem. V okamžiku blízkého kontaktu kationtu s membránou dojde vlivem hydrofobních interakcí postranního řetězce kationtu s buněčnými lipidy k přesunu molekuly do membrány, čímž se ztenčí a způsobí destabilizaci struktury. [31,32] Co se týče samotné buněčné smrti, teorie se již rozbíhají. První teorie popisuje smrt buněk v důsledku uvolnění cytoplazmatického obsahu (DNA, RNA, draselné ionty). V druhé teorii dochází k buněčné smrti vlivem kladně nabitých molekul, které přivodí neutralizaci negativního zeta

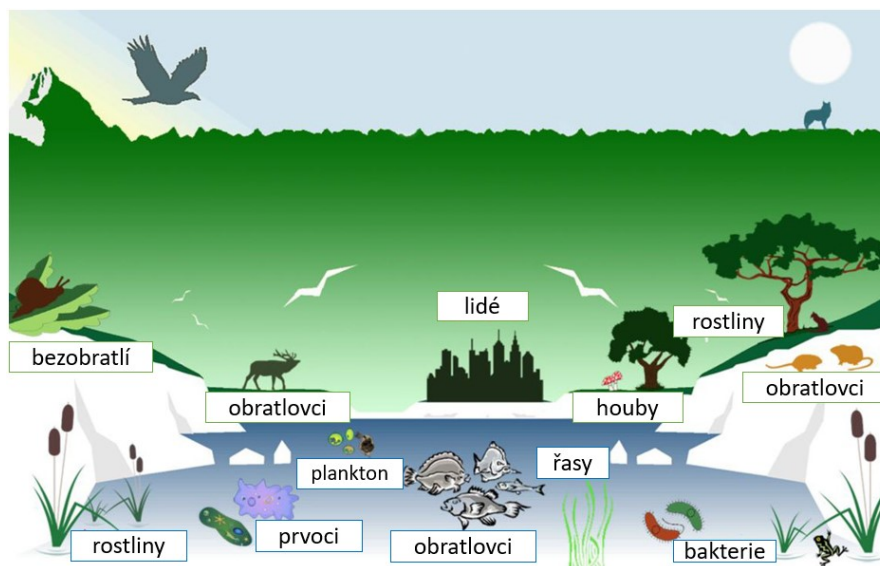
potenciálu buněčného povrchu. Tento efekt zastaví správný růst buněk a následně vyvolá agregaci buněk. Druhá teorie má mnohem pomalejší nástup antimikrobiálního účinku v porovnání s první teorií. [31]

3.2.6.2. Cytotoxické účinky iontových kapalin

Díky specializovaným testům apoptózy a fluorescenční mikroskopii byl zjištěn cytotoxický účinek IL. Tento efekt vzniká v důsledku oxidačního stresu, poškození DNA a apoptózy, kterou IL indukují. Protirakovinné účinky IL závisí nejen na struktuře, ale také na vnějších faktorech jako je například typ buňky. Přesný mechanismus působení není stanovený, ale z dosavadních údajů lze vyvodit, že opět dochází k narušení lipidové dvojvrstvy buněčné membrány. Interakce s vodou, konkrétně hydrofobnost a lipofilita kationtu koreluje s protirakovinným účinkem. Celkové znalosti o využití IL jako protinádorových látek jsou prozatím neucelené, proto se zatím běžně nepoužívají. [26]

3.2.7. Toxicita iontových kapalin

Pojetí IL jakožto „zelených rozpouštědel“ vznikl díky jejich vlastnostem, a to nehořlavosti a netěkavosti. Záměna běžných těkavých organických rozpouštědel s IL, jež jsou netěkavé, vede k výraznému zmenšení rizika proniknutí do dýchacích cest a kontaminace životního prostředí. Odtud jsou IL chápány jako látky zdraví neškodné. Ovšem studie dokazují nebezpečný vliv IL na všelijaké biologické formy, dokonce i na nukleové kyseliny a další mnohobuněčné tvory (Obrázek 12). [22]



Obrázek 12: Ekosystémy náchylné ke kontaminaci IL [26]

Co se týče škodlivosti IL, tak není žádná ucelenost v jednotlivých toxických aktivitách. Existují IL s relativně nízkou, ale i relativně vysokou toxicitou. Nicméně je tendence IL, které jsou více rozpustné ve vodě, dosahovat i vyššího nebezpečí pronikání do životního prostředí (díky snadnějšímu prostupu do vody). Přestože zatím nebyly dokázány závislosti mezi strukturou a toxicitou IL, je toxicita podmíněna povahou kationtu a aniontu, délkou alkylového postranního řetězce kationtu, prezencí a charakterem funkčních skupin v kationtu, interakcemi mezi kationtem a aniontem. Nejvhodnějším objektem pro posouzení ekologického dopadu látky jsou mnohobuněčné organismy. Zkoumání probíhalo již na několika organismech, byly to například ryby, hlodavci, měkkýši, červi, korýši anebo rostliny. Jeden druh planktonního korýše projevil citlivost vůči imidazoliovým a fosfoniovým IL, které způsobily vývojová poškození. Naproti tomu akutní a subakutní toxicitu u myši a potkanů zapříčinily amonné IL. Z důvodu problematické a časové náročnosti testů na mnohobuněčných organismech byly následně realizovány studie na jednodušších organismech jakými jsou bakterie a houby. IL vyvolávaly antimikrobiální, antifungální a cytotoxickou aktivitu. Tyto účinky jsou objasňovány díky interakci postranního alkylového řetězce kationtu s membránou buňky. Vniknutím do fosfolipidové dvojvrstvy dochází k následným strukturálním poškozením. Toxické působení vzniká jednak nespecifickými mechanismy, jako tomu bylo u příkladu pronikání buněčnou membránou, ale dochází k tomu i specifitějšími mechanismy. Kupříkladu 1-alkyl-3-methylimidazolium bromid/hydroxid s různě dlouhými postranními alkylovými řetězci interagoval s fenylovými kruhy β -tubulinového receptoru. Zde platil vztah: čím delší postranní řetězec, tím vyšší vermucidní působení. [26,33]

3.3. Zjednodušené modelové membrány stratum corneum

3.3.1. Úvod

Jak již bylo probíráno v kapitole č. 3.1.1., kůže má několik funkcí. Například chrání lidské tělo proti chemikáliím, proti mikroorganismům, dále má funkci termoregulační a také zamezuje odpařování vody. Za bariérovou funkci kůže je zodpovědná nejsvrchnější vrstva SC. V této vrstvě se z lipidů nacházejí Cer, které obsahují 1 a 2 uhlíkové řetězce, celkově se jedná o 15 typů Cer, dále Chol, FFA počtem uhlíků nejčastěji v rozmezí 18–36 a nakonec s malým podílem CholS a ostatních lipidů. [34,35,36]

Kůže je využívána pro penetrační a permeační pokusy pro zkoumání nepropustnosti kůže pro různé chemikálie a dráždivé látky a na testování schopnosti léčiva proniknout přes bariéru. Často se hodnotí zesilovače prostupu bariérou. Využívá se kůže lidského, ale i zvířecího původu. Lidská kůže je získávána často z plastických chirurgií, z amputovaných částí těla, popřípadě z mrtvých těl. Kůže zvířecího původu se nejčastěji získává z prasat, jelikož prasečí kůže má největší anatomické, fyziologické a histologické podobnosti v porovnání s lidskou kůží z hlediska tloušťky epidermis, hustoty krevních cév, množství Cer, elastinu, kolagenu a dalších. Opět i tyto dvě varianty mají své výhody a nevýhody. Mezi hlavními důvody, proč se využívají zjednodušené modelové membrány, patří ten, že zdroje lidské a zvířecí kůže jsou nákladné. Klasická kůže je velmi rozmanitá a mezidruhové rozdíly mohou způsobit velké odlišnosti v permeabilitě, tudíž další nevýhoda je otázka těžké reprodukovatelnosti. Lidská kůže je také komplikovanější z hlediska dostupnosti a v neposlední řadě permeační pokusy s kůží trvají dlouhou dobu a často dochází k prodloužení doby permeace. To vše přispívá k experimentům prováděným na modelových membránách. Mimo modelové membrány je zde možnost využití komerčně dostupných modelů lidské epidermis, a to například EpiSkin®, EpiDerm®, SkinEthic®. [34,37]

3.3.2. Modelové membrány na nelipidové bázi

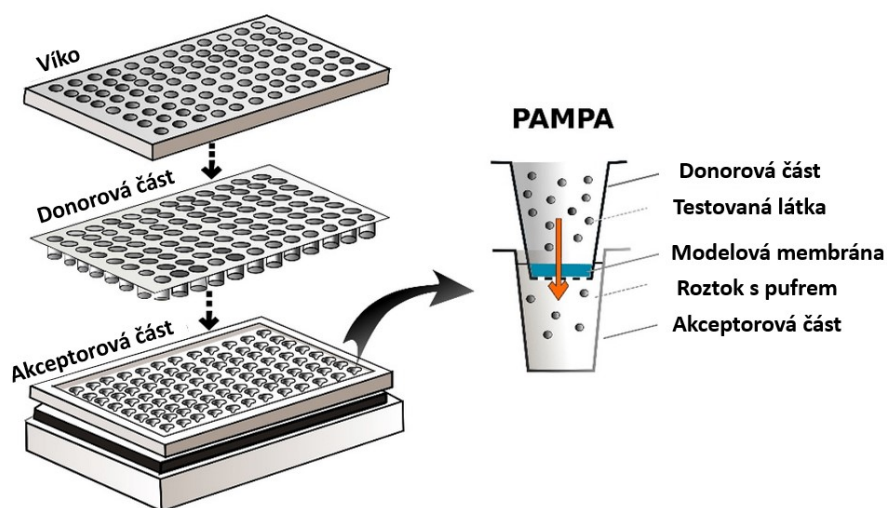
Existuje více typů modelových membrán, kterými se stanovuje permeabilita kůže. Mezi nejjednodušší typy se řadí silikonové modelové membrány nebo poly(dimethylsiloxanové) membrány. Využívají se pro hodnocení účinku různých vehikul a jejich dopadu na transport kůží. Již v roce 1970 byly silikonové membrány použity k hodnocení uvolňování kyseliny salicylové z pěti různých mast'ových základů. Výsledky *in vitro* odpovídaly hodnotám uváděným v literatuře *in vivo*. Taktéž byly provedeny i studie mechanismu interakcí mezi

modelovými membránami a vehikuly (ethanol, isopropylmyristát, ...). Byla vytvořena predikce o použití těchto membrán pouze pro lipofilní sloučeniny, na tento popud se vytvořila membrána impregnovaná kopolymerem polydimethylsiloxanem a polyethylenglykolem 6000. Vylepšený model je stále ve fázi výzkumu. [34,37,38]

Dalším typem modelových membrán na nelipidové bázi je smíšený typ modelové membrány. Jedná se o membránu čistého rozpouštědla tvořenou ze 70 % silikonovým olejem a ze 30 % isopropylmyristátem na hydrofobním polyvinylidenfluoridovém filtru. I tento model se shoduje s výsledky hodnocení permeace lidské kůže pro modelová léčiva v literatuře. Existuje zde možnost rozlišení schopnosti vysoce permeabilních sloučenin zadržet se v bariéře, popřípadě nezachytit se v bariéře. [38]

3.3.3. Modelové membrány na bázi lipidů

Kromě používání difúzních cel Franzova typu k hodnocení permeace se využívá k měření pasivní membránové permeability molekul další metoda, a to paralelní test permeability umělých membrán (PAMPA), který se mimo jiné využívá i ke stanovení gastrointestinální absorpce anebo pro modelování hematoencefalické bariéry. Model pro odhad penetrace kůží se nazývá Skin PAMPA. Tato metoda in vitro obsahuje 96 jamek s umělou (modelovou) membránou, které taktéž napodobuje SC (Obrázek 13).

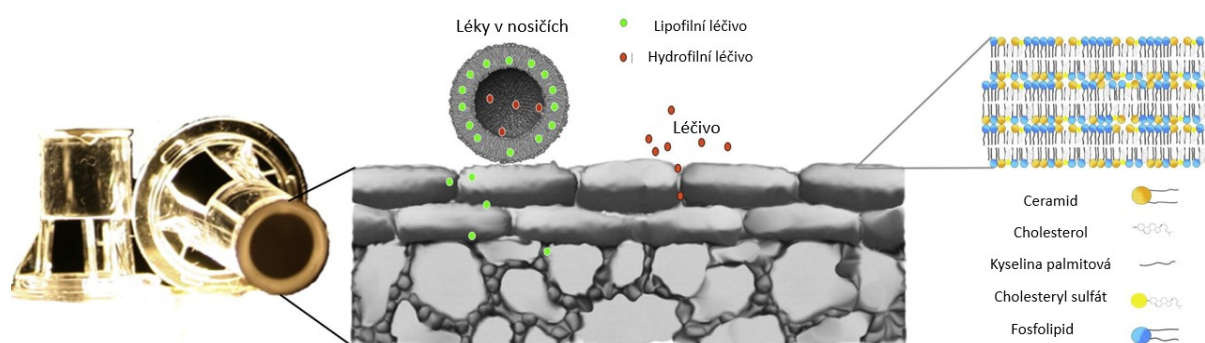


Obrázek 13: Schématické znázornění testu PAMPA [39]

Existuje několik modelů pro hodnocení. Tyto membrány jsou často založeny na fosfolipidech a cholesterolu. Existuje například modelová membrána tzv. Skin PAMPA, která

je tvořena syntetickým Cer. Tato syntetická forma je analogem k přirozeně se vyskytujícímu Cer ve SC. Spolu s cholesterolem, kyselinou stearovou a silikonovým olejem umožňují Cer v membráně PAMPA vystupovat jako lipidová složka díky podobné molekulové hmotnosti a kapacitě akceptoru/donoru vodíku, jako je tomu u přírodního Cer. Byla zde dokázána vysoká predikční schopnost, čímž se zájem o tuto metodu značně zvýšil a další modelové membrány jsou ve fázi výzkumu. [38,40,41]

Další možností je test permeace na bázi fosfolipidových vezikul (PVPA). Je složen z vrstev lipozomů, které k sobě těsně přiléhají na filtrační podložce (z esteru celulózy), viz Obrázek 14. K hodnocení penetrace pokožkou byly vyvinuty 2 varianty kožního PVPA modelu. Tyto dvě modifikace se od sebe vzájemně liší lipidovým složením. U prvního modelu (PVPA c) jsou lipozomy na bázi Chol (22,9 %, w/w) a vaječného fosfatidylcholinu (77,1 %, w/w). Lipozomy druhého modelu (PVPA s) jsou vytvořeny za použití opět vaječného fosfatidylcholinu (50 % w/w) a základních tříd lipidů v kůži – Chol (12,5 %, w/w), Cer (27,5 %, w/w), volná mastná kyselina (7,5 %, w/w) a cholesterylsulfát (2,5 %, w/w). Díky poznatkům o SC byl PVPA model upraven, aby se více podobal lidskému SC, které je velmi bohaté na Cer a také na Chol, jakožto druhý nejrozšířenější lipid ve SC. Lepším napodobením SC se zvýší kvalita hodnocení permeace. [37,38]



Obrázek 14: Schématické znázornění PVPA modelu [38]

Posledním typem modelové membrány na bázi lipidů je opět smíšený typ, což je napodobnění SC, která je tvořena syntetickými SC lipidy na porézním materiálu. Uměle vytvořené lipidy téměř kopírují lipidovou strukturu ve SC. Při zkoumání středně hydrofobních až středně lipofilních molekul byly výsledky těchto modelů v porovnání s lidskou SC velmi podobné, čímž se model osvědčil jako spolehlivý model perkutánní penetrace. U syntetických

SC lipidových směsí je vcelku snadná možnost modifikace, což umožňuje studování vztahů mezi složením, organizací lipidů a bariérovou funkcí. [38]

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, materiál a přístroje

Voda použitá pro přípravu vodných roztoků, fosfátového pufru (PBS) a vodné mobilní fáze pro HPLC byla ultračistá voda, čištěná pomocí systému milli-Q RG (Millipore, Burlington, MA, USA) na Katedře biochemie, FaF, UK. Methanol (MeOH) použitý pro HPLC byl HPLC kvality a byl zakoupený od firmy Merck (Darmstadt, Německo). cholesterol (Chol), cholesterol sulfát (CholS) a volné mastné kyseliny (FFA) - konkrétně kyselina stearová, kyselina palmitová, kyselina arachidonová, kyselina behenová a kyselina lignocerová – použité na přípravu lipidové směsi byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Od stejné firmy byl zakoupen dále theofylin (TH) a propylenglykol (PG). N-Lignoceroyl-D-erythro-sphingosin (Cer [NS]), rovněž používaný při přípravě lipidové směsi, byl zakoupen od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Sodná sůl diklofenaku (DIC) byla získána od TCI Chemicals (Tokyo, Japan). Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), dodekahydrát hydrogenufosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), kyselina octová (CH_3COOH), hydroxid sodný (NaOH), MeOH (pro analysis kavalita), chloroform (CHCl_3) (pro analysis kavalita), hexan (pro analysis kavalita) a ethanol 96% byly pořízeny z PENTA (Hostivař, ČR). IL, a to 1-oktyl-3-methylimidazolium bromid (C_8MIM) a 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromid (C_{12}MIM), byly syntetizovány a poskytnuty našimi spolupracovníky z Univerzity Lipsko (Německo).

Na sprejování lipidů byl využit Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švýcarsko) a lipidové směsi byly nastříkány na nukleoporové polykarbonátové membrány s velikostí pórů $0,015 \mu\text{m}$ (Whatman, Kent, Maidstone, Velká Británie). Na měření transepidermální ztráty vody byl používán přístroj Aquaflux AF200 (Biox Systems, Londýn, Velká Británie). HPLC analýza byla provedena přístrojem Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybaveným DGU-20A3 degasserem, LC-20AD pumpami, CTO-20AC termostatem pro kolonu, SIL-20A HT autosampler, SPD-M20A diode array detektorem a LCsolutions 1.22 softwarem. Na vyhodnocování dat byl používán GraphPad Prism software verze 9.0.0 (GraphPad Software, Boston, USA).

4.2. Příprava lipidové směsi

V první části experimentu byla vytvořena směs lipidů. Jedná se o směs tvořenou z Cer [NS], FFA, Chol a CholS. Nejprve byla připravena směs FFA v poměru viz Tabulka 1.

Tabulka 1 Složení směsi volných mastných kyselin

Kyselina a délka acylového řetězce	Molární poměr [%]	Molekulová hmotnost Mr (g/mol)
Kyselina palmitová C16	1,80	256,42
Kyselina stearová C18	3,90	284,48
Kyselina arachidová C20	7,50	312,54
Kyselina behenová C22	47,80	340,58
Kyselina lignocerová C24	39,00	368,63

Jednotlivé FFA byly naváženy a rozpuštěny ve směsi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1), po smíchání se rozpouštědlo odpařilo pod proudem dusíku a následně byla směs ponechána 24 hodin v exsíkátoru do úplného vysušení za použití parafinu a oxidu fosforečného. Výsledná směs FFA měla průměrnou molekulovou hmotnost 345,58 g/mol.

Pro každou skupinu modelových membrán bylo připraveno 12 membrán. Na každou membránu bylo nastříkáno 0,25 mg lipidů. Membrány, které obsahovaly IL, měly stejné množství lipidů jako kontrolní membrány a navíc specifické množství IL, jak je specifikováno později.

Molární poměr lipidových směsí pro přípravu kontrolních membrán (bez IL) spolu s hmotností každého lipidu potřebného k přípravě požadovaných membrán, je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2 Složení kontrolních membrán

Složky	Molární poměr	Molekulová hmotnost Mr (g/mol)	Látkové množství n (nmol)	Hmotnost m (mg)
Cer [NS]	1,00	650,13	2,68	1,74
FFA	1,00	345,58	2,68	0,93
Chol	0,85	386,65	2,28	0,88
CholS	0,15	488,70	0,40	0,20
				3,75

Príslušná množství jednotlivých složek byla rozpuštěna ve směsi hexan:ethanol 96% (2:1), aby byl získán roztok s koncovou koncentrací 1 mg/ml. Poté byly dané složky

v příslušných objemech smíchány do výše uvedeného množství. Konečný roztok byl opět sušen pod proudem dusíku a následně umístěn do exsikátoru ve vakuu v přítomnosti oxidu fosforečného a parafinu přes noc. K vysušené lipidické směsi byly přidány 3 ml směsi hexan:ethanol 96% (2:1) (konečná koncentrace lipidů byla 1,25 mg/ml) a po úplném rozpuštění (5 minut v sonikátoru) byl konečný roztok použit pro sprejování membrán.

Molární poměr lipidových směsí pro přípravu modelových membrán, které obsahovaly IL spolu s hmotností každé složky potřebné k přípravě požadovaných membrán, je uveden v Tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3 Složení membrán s IL C₈MIM

Složky v C ₈ MIM membránách	Molární poměr	Molekulová hmotnost Mr (g/mol)	Látkové množství n (nmol)	Hmotnost m (mg)
Cer [NS]	1,00	650,13	2,68	1,74
FFA	1,00	345,58	2,68	0,93
Chol	0,85	386,65	2,28	0,88
CholS	0,15	488,70	0,40	0,20
				3,75
C₈MIM	1,00	275,23	2,68	0,74

Tabulka 4 Složení membrán s IL C₁₂MIM

Složky pro C ₁₂ MIM membrány	Molární poměr	Molekulová hmotnost Mr (g/mol)	Látkové množství n (nmol)	Hmotnost m (mg)
Cer [NS]	1,00	650,13	0,002683	1,74
FFAs	1,00	345,58	0,002683	0,93
Chol	0,85	386,65	0,002281	0,88
CholS	0,15	488,70	0,000402	0,20
				3,75
C₁₂MIM	1,00	330,17	0,002683	0,89

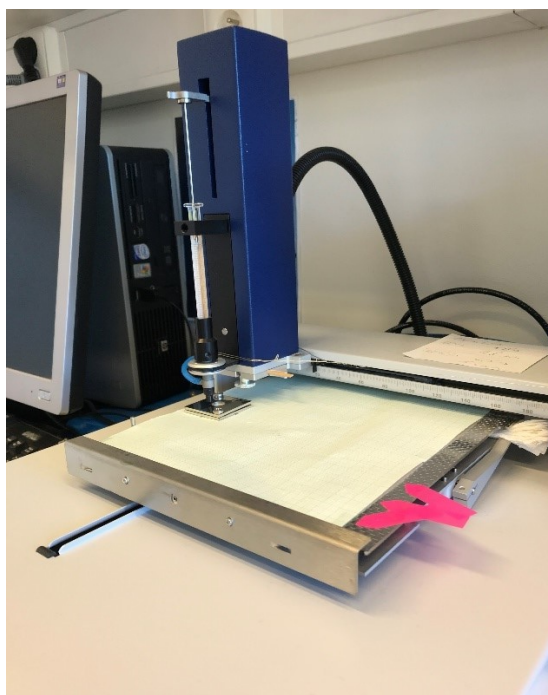
4.3. Příprava modelových membrán

Na přípravu lipidových membrán byly použity již zmíněné polykarbonátové membrány. Velikost jedné membrány byla 1,5 × 1,5 cm a každá membrána byla stabilizována v kovovém držáku s plochou k nastříknutí 1 cm² (Obrázek 15).



Obrázek 15: Kovový držák s membránou

Kovový držák byl složen ze dvou částí, které byly k sobě připevněny šroubky. Šroubováním byla membrána různě natahována. Cílem bylo dosažení dokonalého napnutí membrány. Membrána byla vkládána lesklejší stranou nahoru. Na sprejování lipidů byl použit přístroj Linomat 5, kam byly upevněny připravené držáky (Obrázek 16). Prvních 10 minut bylo nastříkáváno 100 μ l směsi v jednom směru a dalších 10 minut opět 100 μ l v jiném směru. Tudíž celkem bylo na polykarbonátové membráně 200 μ l směsi (0,25 mg lipidů na každé kontrolní membráně a na ostatních 0,25 mg lipidů + IL).



Obrázek 16: Sprejování membrán

Poté byly membrány opět ponechány v exsikátoru 24 hodin, aby byly dokonale vysušeny. Následně byl proveden annealing, což je hydrotermální úprava, která určitým způsobem mění vlastnosti materiálu. Podstatou je zahřátí a následné ochlazení materiálu za přítomnosti výparů vody. Kovové držáky s membránami byly umístěny do kovových nádob spolu s 2 ml vody. Membrány byly zahřáty na 70 °C v troubě po dobu 20 minut a ponechány v zařízení další 4 hodiny, čímž byly membrány postupně ochlazeny. Po annealingu byly membrány vloženy do lednice až do další fáze experimentu. Celkem bylo tímto způsobem připraveno 36 membrán (12 kontrolních membrán bez IL, 12 membrán obsahujících lipidy a C₈MIM a 12 membrán obsahujících lipidy a C₁₂MIM).

4.4. Příprava izotonického fosfátového pufru (PBS)

Pro přípravu PBS bylo naváženo 0,312 g NaH₂PO₄·2 H₂O, (156 g/mol; 2 mM), 2,865 g Na₂HPO₄·12 H₂O (358 g/mol; 8 mM), 8 g NaCl (58,4 g/mol; 137 mM) a 0,201 g KCl (74,6 g/mol; 2,7 mM). Poté byly tyto látky rozpuštěny v ultračisté vodě. Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 7,40 koncentrovaným roztokem NaOH a finální roztok byl zfiltrován. Tento roztok byl ponechán v lednici do použití.

4.5. Příprava Franzových difúzních cel

Připravené membrány byly vyndány z kovových držáků. Pro pokus byly používány Franzovy difúzní cely, viz teoretická část. Každá membrána byla vložena mezi dvě části teflonového držáku, tyto byly namazány silikonovou vazelínou, aby držely u sebe. Byly použity držáky s velikostí difúzní plochy 0,5 cm². Následně byly držáky upevněny do Franzovy difúzní cely. Kapalina musela být naplněna tak, aby se dotýkala celé plochy spodní části membrány. Roztok byl plněn pomocí stříkačky a velký důraz byl kladen na absenci bublin. Protože cely neměly všechny stejný objem, byl vždy zapsán objem roztoku naplněný do cely, který se pak zohlednil ve zpracování výsledků. Nakonec byly všechny vzorky vloženy do lázně vyhřáté na 32 °C po dobu 12 hodin za stálého míchání, viz Obrázek 17. Následující tabulka (Tabulka 5) ukazuje číslování připravených Franzových difúzních cel spolu se složením lipidové směsi každé skupiny.

Tabulka 5 Složky jednotlivých cel

Franzovy difuzní cely	Cer [NS]/FFA/Chol/ChoIS/IL	IL
č.1-6	1/1/0.85/0.15/0	×
č.7-12	1/1/0.85/0.15/1	C ₈ MIM
č.13-18	1/1/0.85/0.15/1	C ₁₂ MIM
č.19-24	1/1/0.85/0.15/0	×
č.25-30	1/1/0.85/0.15/1	C ₈ MIM
č.31-36	1/1/0.85/0.15/1	C ₁₂ MIM



Obrázek 17: Zhotovené Franzovy difúzní cely

4.6. Měření transepidermální ztráty vody

Po 12 hodinách byla jako první měřena transepidermální ztráta vody (TEWL). Pro měření TEWL byly odstraněny horní části cel. Jak již bylo zmíněno, pro hodnocení byl uplatněn přístroj Aquaflux AF200, který byl přidržován u každé jednotlivé membrány v držáku po dobu 80-100 s (do té doby, než byla hodnota stabilní při 30-36% relativní vlhkosti vzduchu a za

teploty vzduchu v rozmezí 24-26 °C). Pro zachycení nepřesností v měření byly pro každou membránu stanoveny 2 hodnoty.

4.7. Permeační experiment

Po měření TEWL byly na cely aplikovány vodné formulace modelových molekul. TH byl aplikován jako suspenze 20 mg/ml a DIC jako suspenze 100 mg/ml. 0,1 ml každé formulace bylo aplikováno na specifické cely, jak je uvedeno v tabulce (Tabulka 6). Každé dvě hodiny po aplikaci (po dobu až deseti hodin) bylo stříkačkou z akceptorové části každé difuzní cely odebráno 0,3 ml a nahrazeno čistým PBS. U kontrolních cel s TH bez IL (cely č.1-6) musela být doba permeace prodloužena na 36 hodin, aby hodnota fluxu pro TH byla nenulová. Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC.

Tabulka 6 Znárodnění složení membrán a aplikovaných látek v jednotlivých celách

Franzovy difuzní cely	Cer [NS]/FFA/Chol/CholS/IL	IL	Modelová molekula (mg/ml)
č.1-6	1/1/0.85/0.15/0	×	TH (20)
č.7-12	1/1/0.85/0.15/1	C ₈ MIM	TH (20)
č.13-18	1/1/0.85/0.15/1	C ₁₂ MIM	TH (20)
č.19-24	1/1/0.85/0.15/0	×	DIC Na (100)
č.25-30	1/1/0.85/0.15/1	C ₈ MIM	DIC Na (100)
č.31-36	1/1/0.85/0.15/1	C ₁₂ MIM	DIC Na (100)

4.8. Podmínky a provedení HPLC experimentu

Pro analýzu akceptorové fáze byla používána kolona LiChroCART 250-4 naplněná LiChrospher 100 RP-18 částicemi o velikosti 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany). Mobilní fáze pro TH byla 100 mM NaH₂PO₄/MeOH 60:40 (v/v). Byla připravena navážením 18,7 g NaH₂PO₄·2 H₂O a následným rozpuštěním v 1200 ml vody pro HPLC. Poté byl roztok přefiltrován přes filtr s porozitou 0,45 µm a nakonec bylo přidáno 800 ml MeOH pro HPLC s následným odplyněním v ultrazvuku. Průtok analýzy byl 1,20 ml/min (tlak okolo 20 MPa) a teplota kolony 35°C. Objem vzorku nastříknutý na kolonu byl 20 µl. Detekční vlnová délka byla 272 nm a retenční čas TH 3 min (celková délka analýzy byla 4 min). Mobilní fáze pro DIC byla směs MeOH:H₂O:CH₃COOH v poměru 80:20:0,5 (v/v). Průtok analýzy byl 1,35 ml/min (tlak okolo 22 MPa) a teplota kolony 25°C. Objem vzorku nastříknutý na kolonu byl 20 µl. Detekční vlnová délka byla 275 nm a retenční čas 4 min (celková délka analýzy byla 6 min).

4.9. Statistické zpracování dat

K vyhodnocování byl používán Microsoft Excel a GraphPad Prism verze 9.0.0 (GraphPad Software, USA). Při srovnávání tří a více skupin byla používána one-way ANOVA s Tukeyho vícenásobným srovnávacím testem (Tukey's multiple comparisons test). V případě porovnávání dvou skupin byl využit nepárový t-test s $p < 0.05$ (statisticky významný rozdíl). Výsledné hodnoty jsou uváděny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou značenou znaménkem \pm .

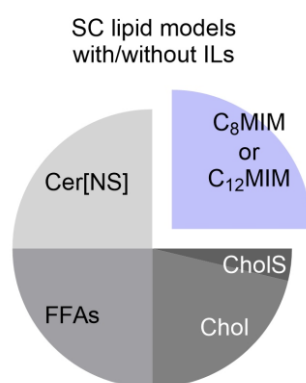
5. Výsledky a diskuze

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jakým způsobem dokáží dvě různé IL (C_8MIM a $C_{12}MIM$) ovlivnit propustnost kožní bariéry, a to pomocí permeačních pokusů se dvěma modelovými molekulami (TH a DIC) na lipidových modelových membránách.

Transdermální podávání léčiv je bezesporu výhodná léková formulace. Jednu z největších nevýhod (nepropustnost kožní bariéry) pomáhají překonat tzv. enhancery (zesilovače, akceleranty) kožní permeace, které usnadňují přechod kožní bariérou. Mezi ně patří právě zkoumané IL. [42] Obecně velkou schopnost vmezeřit se mezi lipidovou dvojvrstvou mají IL ve formě imidazoliových kationtů, které byly v tomto experimentu testovány. Dále byl zjištěn kladný vztah narůstajícího alkylového řetězce a míry průniku do dvojvrstvy. IL s delším alkylovým řetězcem (např. C_8MIM a $C_{12}MIM$) mají schopnost vniknout hlouběji mezi lipidy ve dvojvrstvě než IL s kratším alkylovým řetězcem. Tento trend se ovšem pojí i s cytotoxicitou a membránovou afinitou. Proto je potřeba věnovat pozornost i studiu toxicity IL. [26,43,44]

Biologické membrány mají široce rozsáhlou a rozmanitou strukturu. I to byl jeden z důvodů, proč byly v experimentu používány modelové lipidové membrány, které nám poskytly jednodušší model k pochopení efektů IL než komplexnější biologické membrány. Samozřejmě dané výsledky je nutno brát s rezervou, protože v případě stejného pokusu, ale s využitím kůže ať už lidského či zvířecího původu, by se mohly výsledky pozměnit. [45]

Jako první modelové léčivo byl použit TH. TH je malá molekula ($M_w = 180$ g/mol) s vyváženou hydrofilně-lipofilní konstantou ($\log P \sim 0$). Jedná se o hodně hydrofilní léčivo na poměry transdermální cesty podání. Jako druhé modelové léčivo byl využit DIC ($M_w = 302$ g/mol) ($\log P = 4,51$). DIC byl vybrán, protože se jedná o typické nesteroidní antiflogistikum, které se velmi často používá v topických formulacích.



Obrázek 18: Rozložení lipidů a IL

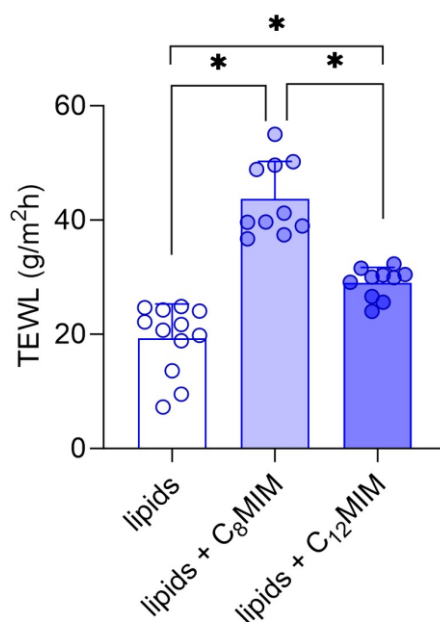
Na Obrázku 18 můžeme vidět rozložení jednotlivých lipidů, kterými byly napodobeny hlavní skupiny lipidů kožní bariéry – Cer [NS], FFA, Chol a CholS v molárním poměru 1:1:0,85:0,15 a v poměru IL/lipid 1:3. Aby byl detailně pochopen potenciál IL, byly použity velmi vysoké koncentrace, jak C₈MIM, tak i C₁₂MIM. Na přípravu směsi FFA byly použity FFA nejčastěji se vyskytující v lidském SC, a to v poměru, který reflektuje složení daných kyselin v dané vrstvě kůže, což je poměr kyseliny palmitové C₁₆:kyseliny sterové C₁₈:kyseliny arachidonové C₂₀:kyseliny behenové C₂₂:kyseliny lignocerové C₂₄ (1,8:3,9:7,5:47,8:39,0). [46]

5.1.1. Výsledky měření TEWL

Jako první byly naměřeny hodnoty TEWL. Obecně se jedná o velmi častou techniku měření, kterou se zjistí míra bariérové funkce kůže jak u zdravých jedinců, tak u jedinců s poškozenou integritou kožní bariéry, typicky u atopické dermatitidy, kde je hodnota TEWL zvýšená. Touto metodou se zjišťuje množství vody, které pronikne ze SC do kůže za jednotku času [g/h/m²]. Vypařenou vodu z kůže zachycuje sonda se senzory, které měří změnu hustoty vodní páry. TEWL ovlivňují různé faktory, například bylo dokázáno, že se tato hodnota liší v závislosti na anatomických lokalitách. V oblasti s vyšší činností potních žláz (dlaně, podpaží) je výsledek měření značně vyšší než například na předloktí. Mezi další faktory ovlivňující měření TEWL patří například mikroklima, teplota sondy atd. [47,48]

Pro každou celu byla vždy provedena 2 měření, z nichž se následně vypočítal průměr. Na Obrázku 19 lze vidět výsledky kontrolních cel ve srovnání s celami obsahujícími buď C₈MIM, nebo C₁₂MIM. Výsledky TEWL u kontrolních cel (bez IL) byly $19,3 \pm 6,0$ g/h/m², což je hodnota podobná lidské SC. [49] Průměrná hodnota ztráty vody pro cely obsahující C₈MIM je $43,7 \pm 6,5$ g/h/m². A výsledná průměrná hodnota pro cely s C₁₂MIM je $29,0 \pm 2,7$ g/h/m².

Ve srovnání s kontrolními vzorky byly vcelku významně zvýšené hodnoty ztráty vody u cel obsahujících IL, konkrétně u cel s C₈MIM byl zaznamenán 2,3× vyšší nárůst a u cel s C₁₂MIM byl pozorován 1,5× vyšší nárůst hodnot oproti kontrolním celám.

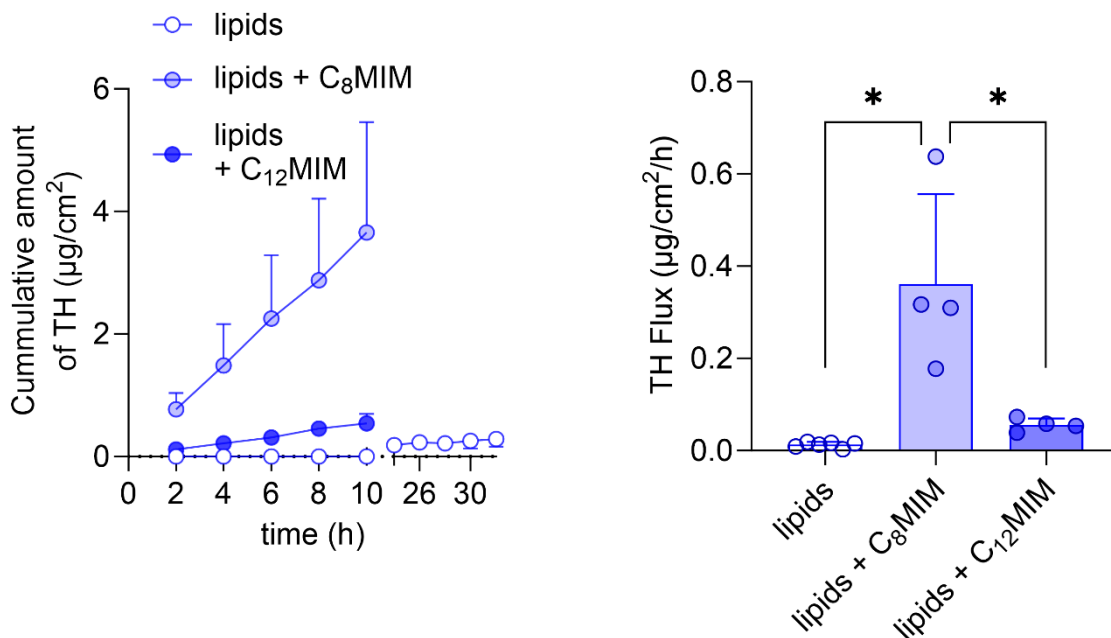


Obrázek 19: Výsledky měření TEWL

5.1.2. Výsledky měření permeability pro TH a DIC

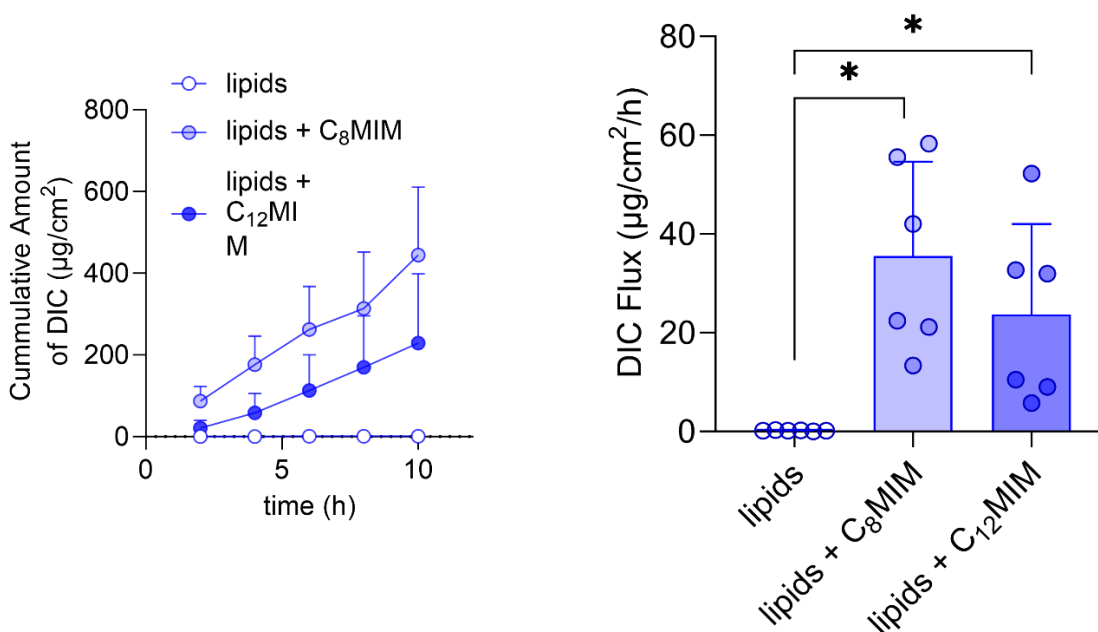
Analýza probíhala pomocí HPLC metody, která umožnila stanovit propustnost modelových membrán pro modelová léčiva (TH a DIC). Díky tomuto způsobu analýzy byla zjištěna koncentrace léčiva, které prošlo přes membránu za daný čas.

Obrázek 20 představuje 2 grafy zobrazující permeační profily TH. Graf vlevo znázorňuje tzv. kumulativní množství léčiva, prošlého přes 1 cm² modelové membrány do akceptorové části v závislosti na čase (μg/cm²). Z tohoto grafu vychází zřetelný růst TH v čase u membrán s C₈MIM oproti kontrolním membránám, a i narozdíl od membrán obsahujících C₁₂MIM, které vykazují pouze malý nárůst v porovnání s kontrolními membránami. Pravý graf vyobrazuje další veličinu popisující permeabilitu membrány pro léčiva, a to tzv. flux léčiva. Flux je kumulativní množství léčiva prošlé přes jednotku plochy kůže za čas (μg/cm²/h). Tuto hodnotu lze odečíst z grafu jako směrnici přímky. Membrány obsahující C₈MIM vyšly značně propustnější než kontrolní cely, a to 28× více. Větší účinek na permeabilitu membrán byl rovněž zaznamenán u membrán s C₁₂MIM v porovnání s celami bez IL. Tento flux byl zvýšen 4,4×.



Obrázek 20: Výsledky měření permeability pro TH

Obrázek 21 ukazuje výsledky experimentu při použití DIC jako modelové molekuly. Na grafu vlevo je analogicky opět možné vidět kumulativní množství léčiva v závislosti na čase. Zde rozdíl mezi jednotlivými IL již není tolik markantní. Ovšem v porovnání s kontrolními celami je zvýšená propustnost membrán obsahující IL značná. V pravé části obrázku 21 je znázorněn flux DIC, kde obě IL významně přispěly k vyšší propustnosti membrán. C₁₂MIM zvýšila permeabilitu 132× oproti celám bez IL a C₈MIM způsobila nárůst fluxu léčiva dokonce 225× ve srovnání s kontrolními celami.



Obrázek 21: Výsledky měření permeability pro DIC

Z těchto všech hodnot, které byly naměřeny během experimentu, jednoznačně vyplývá, že C₈MIM zvyšuje permeaci 1,5-, 6,4, a 1,7× více v porovnání s C₁₂MIM pro vodu, TH a DIC.

Lze tedy shrnout, že efektivnějším zesilovačem permeace je IL C₈MIM v porovnání s C₁₂MIM, a to jak v pokusu TEWL, kde byla hodnocena ztráta vody zevnitř ven, tak i v testování bariéry zvenčí dovnitř, kde byla měřena hladina modelových léčiv DIC a TH. Zvýšený účinek na ztrátu vody je očekávaný a bohužel nevyhnutelný při zacházení s lipidy, kterými je napodobována SC. Ovšem jedná se o efekt prozatímni a celkové benefity, které se pojí s usnadněným podáním léčiva, převyšují nevýhody. Jako další plus můžeme vnímat to, že bariéra zevnitř ven byla mnohem méně ovlivněna (až 23krát) než bariéra zvenčí dovnitř, kdy byl průnik zvýšen 28krát pro TH a 225krát pro DIC. Experimentů zkoumajících efekt IL na propustnost kůže bylo provedeno již více, ale tato práce je unikátní ve využití lipidových modelových membrán místo klasické kůže ať už lidského či zvířecího původu. Díky tomu může dojít k lepšímu porozumění působení IL.

Všechny výsledky prezentované v této diplomové práci byly publikovány ve vědeckém článku dohromady s doplňujícími permeačními pokusy na lidské kůži. [50]

6. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit efekt dvou IL pomocí permeačních pokusů. Aby se zjistil detailní potenciál a rozdíl mezi dvěma IL, byly použity vysoké koncentrace jednotlivých IL a místo složité komplexní lidské kůže byla permeace prováděna na modelových lipidových membránách.

Měření TEWL ukázalo, že inkorporace IL do lipidových membrán signifikantně ovlivnilo jejich propustnost pro vodu. Při porovnání dvou vybraných IL, a to C₈MIM a C₁₂MIM byl prokazatelně lepším enhancerem C₈MIM, jehož lepší účinek byl také potvrzen při permeaci obou modelových léčiv, TH a DIC.

IL mají velký potenciál v transdermálním podávání léčiv. Ovšem rozšíření použití zesilovačů permeace v praxi je stále omezeno prozatímním nedostatečným porozuměním jejich účinku a trvajícimi obavami ohledně vysoké toxicity.

7. Reference

1. TORIYAMA, Manami a ISHII, Ken J. Primary Cilia in the Skin: Functions in Immunity and Therapeutic Potential. Online. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621318>. [cit. 2023-12-14].
2. Čihák, Radomír; Grim, Miloš; Druga, Rastislav; Med, Milan. Helekal Ivan. 2004. Kůže a kožní orgány z Anatomie. (pp. 571-587). Praha: Grada. ISBN: 80-247-1132-X. [cit. 2023-12-14]
3. TSAKOVSKA, Ivanka; PAJEVA, Ilza; AL SHARIF, Merilin; ALOV, Petko; FIORAVANZO, Elena et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. Online. *Toxicology*. 2017, roč. 387, s. 27-42. ISSN 0300483X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>. [cit. 2023-12-14].
4. Structure and Function of Skin | Biology for Majors II. Online. [2020-04-26]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wmopen-biology2/chapter/structureand-function-of-skin>. [cit. 2023-12-14]
5. WONG, Richard; GEYER, Stefan; WENINGER, Wolfgang; GUIMBERTEAU, Jean-Claude a WONG, Jason K. The dynamic anatomy and patterning of skin. Online. *Experimental Dermatology*. 2016, roč. 25, č. 2, s. 92-98. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/exd.12832>. [cit. 2023-12-14].
6. Layers of the skin. OpenStax-CNX. Online. 2013 [cit. 2023-12-14]. Dostupné z: <http://legacy.cnx.org/content/m46060/latest/?collection=col11496/1.8>. [cit. 2023-12-14]
7. KOLARSICK, Paul A. J.; KOLARSICK, Maria Ann a GOODWIN, Carolyn. Anatomy and Physiology of the Skin. Online. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. 2011, roč. 3, č. 4, s. 203-213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>. [cit. 2023-12-14].
8. RAMADON, Delly; MCCRUDDEN, Maeliosa T. C.; COURTENAY, Aaron J. a DONNELLY, Ryan F. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. Online. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022, roč. 12, č. 4, s. 758-791. ISSN 2190-393X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6>. [cit. 2023-12-14].
9. ABDO, Joseph M.; SOPKO, Nikolai A. a MILNER, Stephen M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. Online. *Wound Medicine*. 2020, roč. 28. ISSN 22139095. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>. [cit. 2023-12-14].
10. HRABÁLEK, Alexandr; VÁVROVÁ, Kateřina. Role ceramidů v kůži. Online. *Praktické lékařství*. 2006. 2(2):55-58. ISSN 18012434, 18035329. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/lek-200602-0001_Role_ceramidu_v_kuzi.php [cit. 2023-12-14]
11. MARKS, Ronald; LEVEQUE, Jean-Luc a VOEGELI, Rainer. The Essential Stratum Corneum. Online. CRC Press, 2001. ISBN 9780367804008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9780367804008>. [cit. 2023-12-14].
12. HRABÁLEK, Alexandr; VÁVROVÁ, Kateřina. Lze překonat kožní bariéru?. Online. *Praktické lékařství*. 2005, 1(1): 8-11. ISSN 18012434, 18035329. Dostupné z: https://farmaciepropraxi.cz/artkey/lek-200501-0002_Lze_prekonat_kozni_barieru.php [cit. 2023-12-14]

13. HARDING, Clive R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. Online. *Dermatologic Therapy*. 2004, roč. 17, č. s1, s. 6-15. ISSN 1396-0296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1001.x>. [cit. 2023-12-14].
14. MARKS, R. The Stratum Corneum Barrier: The Final Frontier. Online. *The Journal of Nutrition*. 2004, roč. 134, č. 8, s. 2017S-2021S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/134.8.2017S>. [cit. 2023-12-14].
15. BARTOSOVA, Lucie; BAJGAR, Jiří. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, roč. 19, č. 27, s. 4671-4677. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/092986712803306358>. [cit. 2023-12-12].
16. RUELA, André Luís Morais; PERISSINATO, Aline Gravinez; LINO, Mônica Esselin de Sousa; MUDRIK, Paula Silva a PEREIRA, Gislaïne Ribeiro. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. Online. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, roč. 52, č. 3, s. 527-544. ISSN 1984-8250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/s1984-82502016000300018>. [cit. 2023-12-12].
17. MARJUKKA SUHONEN, T; A. BOUWSTRA, Joke a URTTI, Arto. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. Online. *Journal of Controlled Release*. 1999, roč. 59, č. 2, s. 149-161. ISSN 01683659. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00187-4). [cit. 2023-12-12].
18. PEREIRA, Rui; SILVA, Sandra G.; PINHEIRO, Marina; REIS, Salette a VALE, M. Luísa do. Current Status of Amino Acid-Based Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery. Online. *Membranes*. 2021, roč. 11, č. 5. ISSN 2077-0375. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes11050343>. [cit. 2023-12-14].
19. SHAW, Jane E. [33] Transdermal dosage forms. Online. In: *Drug and Enzyme Targeting. Methods in Enzymology*. Elsevier, 1985, s. 448-461. ISBN 9780121820121. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)12035-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)12035-5). [cit. 2023-12-14].
20. KOTINGOVÁ Lenka, BORSKÁ Lenka, FIALA Zdeněk. Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. Online. *Chem. Listy* 103, 2009, s. 533–539. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/issue/view/99> [cit. 2023-12-12].
21. Franz Cell - The Original - PermeGear. Dostupné z: <https://permegear.com/franz-cells/> [cit. 2023-12-12].
22. SHUKLA, Monu Kumar; TIWARI, Harshita; VERMA, Rachna; DONG, Wen-Liang; AZIZOV, Shavkatjon et al. Role and Recent Advancements of Ionic Liquids in Drug Delivery Systems. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 2. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020702>. [cit. 2023-12-12].
23. HANUSEK, Jiří. Iontové kapaliny - nový směr v "zelené" chemii. Online. *Chem. Listy* 99, 2005, s. 263-294 ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/issue/view/148> [cit. 2023-12-12].
24. FREEMANTLE Michael. An Introduction to Ionic Liquids. Royal Society of Chemistry. 2010. s. 1-43. ISBN: 9781847551610. [cit. 2023-12-12].
25. SHARMA, Pooja; SHARMA, Shubham a KUMAR, Harsh. Introduction to ionic liquids, applications and micellization behaviour in presence of different additives. Online. *Journal of*

Molecular Liquids. 2024, roč. 393. ISSN 01677322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123447>. [cit. 2023-12-12].

26. EGOROVA, Ksenia S.; GORDEEV, Evgeniy G. a ANANIKOV, Valentine P. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. Online. Chemical Reviews. 2017, roč. 117, č. 10, s. 7132-7189. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>. [cit. 2023-12-14].

27. HAYES, Robert; WARR, Gregory G. a ATKIN, Rob. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. Online. Chemical Reviews. 2015, roč. 115, č. 13, s. 6357-6426. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr500411q>. [cit. 2023-12-12].

28. LANCASTER Mike. Ionic Liquids, z Green Chemistry: An Introductory Text. Royal Society of Chemistry (Great Britain). 2002. s. 154-161, ISBN: 9780854046201. [cit. 2023-12-12].

29. SIDAT, Zainul; MARIMUTHU, Thashree; KUMAR, Pradeep; DU TOIT, Lisa C.; KONDAH, Pierre P.D. et al. Ionic Liquids as Potential and Synergistic Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. Online. Pharmaceutics. 2019, roč. 11, č. 2. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020096>. [cit. 2023-12-12].

30. ZHANG, Luyu; DONG, Zirong; LIU, Wenjuan; WU, Xiying; HE, Haisheng et al. Novel Pharmaceutical Strategies for Enhancing Skin Penetration of Biomacromolecules. Online. Pharmaceutics. 2022, roč. 15, č. 7. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15070877>. [cit. 2023-12-12].

31. CURRERI, Alexander M.; MITRAGOTRI, Samir a TANNER, Eden E. L. Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine. Online. Advanced Science. 2021, roč. 8, č. 17. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adv.202004819>. [cit. 2023-12-12].

32. FANG, Zhezheng; ZHENG, Xianzi; LI, Lu; QI, Jianping; WU, Wei et al. Ionic Liquids: Emerging Antimicrobial Agents. Online. Pharmaceutical Research. 2022, roč. 39, č. 10, s. 2391-2404. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03336-5>. [cit. 2023-12-12].

33. YAN, Jiachen; LIU, Guohong; CHEN, Hanle; HU, Song; WANG, Xiaohong et al. ILTox: A Curated Toxicity Database for Machine Learning and Design of Environmentally Friendly Ionic Liquids. Online. Environmental Science & Technology Letters. 2023, roč. 10, č. 11, s. 983-988. ISSN 2328-8930. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.3c00106>. [cit. 2023-12-12].

34. ČUŘÍKOVÁ, Barbora Amélie; PROCHÁZKOVÁ, Kamila; FILKOVÁ, Barbora; DIBLÍKOVÁ, Petra; SVOBODA, Jan et al. Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers. Online. International Journal of Pharmaceutics. 2017, roč. 534, č. 1-2, s. 287-296. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.038>. [cit. 2023-12-12].

35. VAN SMEDEN, J.; JANSSENS, M.; GOORIS, G.S. a BOUWSTRA, J.A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. Online. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2014, roč. 1841, č. 3, s. 295-313. ISSN 13881981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>. [cit. 2023-12-12].

36. VÁVROVÁ, Kateřina; KOVÁČIK, Andrej a OPÁLKA, Lukáš. Ceramides in the skin barrier. Online. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, roč. 64, č. 2, s. 28-35. ISSN 2453-6725. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0004>. [cit. 2023-12-12].
37. SHAKEL, Zinaida; NUNES, Cláudia; COSTA LIMA, Sofia A a REIS, Salette. Development of a novel human stratum corneum model, as a tool in the optimization of drug formulations. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, roč. 569. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118571>. [cit. 2023-12-12].
38. FLATEN, Gøril Eide; PALAC, Zora; ENGESLAND, André; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, Jelena; VANIĆ, Željka et al. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, roč. 75, s. 10-24. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.018>. [cit. 2023-12-12].
39. PONMOZHI, Jeyaraj; DHINAKARAN, Shanmugam; VARGA-MEDVECZKY, Zsófia; FÓNAGY, Katalin; BORS, Luca Anna et al. Development of Skin-On-A-Chip Platforms for Different Utilizations: Factors to Be Considered. Online. *Micromachines*. 2021, roč. 12, č. 3. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi12030294>. [cit. 2023-12-15].
40. SINKÓ, Bálint; GARRIGUES, Teresa M.; BALOGH, György T.; NAGY, Zsombor K.; TSINMAN, Oksana et al. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, roč. 45, č. 5, s. 698-707. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.011>. [cit. 2023-12-12].
41. VIZSERÁLEK, Gábor; BERKÓ, Szilvia; TÓTH, Gergő; BALOGH, Réka; BUDAISZÚCS, Mária et al. Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, roč. 76, s. 165-172. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.004>. [cit. 2023-12-12].
42. KARANDE, Pankaj a MITRAGOTRI, Samir. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2009, roč. 1788, č. 11, s. 2362-2373. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.015>. [cit. 2023-12-14].
43. KUMAR, Sandeep; SCHEIDT, Holger A.; KAUR, Navleen; KANG, Tejwant Singh; GAHLAY, Gagandeep Kaur et al. Effect of the Alkyl Chain Length of Amphiphilic Ionic Liquids on the Structure and Dynamics of Model Lipid Membranes. Online. *Langmuir*. 2019, roč. 35, č. 37, s. 12215-12223. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02128>. [cit. 2023-12-14].
44. VILAS-BOAS, Sérgio M.; MARTINS, Mónia A. R.; TENTOR, Fábio R.; TEIXEIRA, Gabriel; SGORLON, Juliana G. et al. Imidazolium Chloride Ionic Liquid Mixtures as Separating Agents: Fuel Processing and Azeotrope Breaking. Online. *Energy & Fuels*. 2022, roč. 36, č. 15, s. 8552-8561. ISSN 0887-0624. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.2c01724>. [cit. 2023-12-14].
45. EEMAN, Marc. MAGALI, Deleu. From biological membranes to biomimetic model membranes. Online. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010 14(4), 719-736. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/49593541_From_biological_membranes_to_biomimetic_model_membranes [cit. 2023-12-14].

46. OGURI, Masashi; GOORIS, Gert S.; BITO, Kotatsu a BOUWSTRA, Joke A. The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014, roč. 1838, č. 7, s. 1851-1861. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.02.009>. [cit. 2023-12-14].
47. ALEXANDER, Helen; BROWN, Sara; DANBY, Simon a FLOHR, Carsten. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018, roč. 138, č. 11, s. 2295-2300.e1. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.001>. [cit. 2023-12-14].
48. GREEN, Maxwell; KASHETSKY, Nadia; FESCHUK, Aileen a MAIBACH, Howard I. Transepidermal water loss (TEWL): Environment and pollution—A systematic review. Online. *Skin Health and Disease*. 2022, roč. 2, č. 2. ISSN 2690-442X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ski2.104>. [cit. 2023-12-14].
49. NOVÁČKOVÁ, Anna; SAGRAFENA, Irene; PULLMANNOVÁ, Petra; PARASKEVOPOULOS, Georgios; DWIVEDI, Anupma et al. Acidic pH Is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids In Vitro. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021, roč. 141, č. 8, s. 1915-1921.e4. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.02.014>. [cit. 2023-12-14].
50. PARASKEVOPOULOS, Georgios; FANDREI, Ferdinand; KUMAR PRATIHAST, Ajit; PARASKEVOPOULOU, Anna; PANOUTSOPOULOU, Eleni et al. Effects of imidazolium ionic liquids on skin barrier lipids – Perspectives for drug delivery. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2024, roč. 659, s. 449-462. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.12.139>. [cit. 2024-04-15].