

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



**Vliv aplikace 1-methyl-3-oktylimidazolium
bromidu v různých médiích na permeabilitu
lidské kůže**

Diplomová práce

Tereza Stehlíková

V Hradci Králové 2024

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

„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 Stehlíková

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce panu Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. za všechny čas, pomoc, odborné informace, rady a vřelý přístup při vypracovávání mé diplomové práce.

Děkuji také za finanční podporu Karlově Univerzitě. (GAUK 1156120, SVV 260 661).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Tereza Stehlíková

Název diplomové práce: Vliv aplikace 1-methyl-3-oktylimidazolium bromidu v různých médiích na permeabilitu lidské kůže

V této diplomové práci byl zkoumán účinek iontových kapalin (IL) na permeabilitu lidské kůže. IL představují potencionální skupinu látek, které mohou usnadňovat přenos léčiv kůží. V pokusu byla použita amfifilní IL 1-methyl-3-oktylimidazolium bromid (C_8MIM). Jako modelové sloučeniny byly využity theofylin (TH), hydrofilní molekula a diklofenak sodný (DIC), více lipofilní a větší molekula. Byla vybrána tři různá média pro aplikaci modelových látek (voda (H_2O), 60% propylenglykol (PG) v H_2O a ethanol (EtOH) 96%). Připravené vzorky byly využity pro permeační experimenty na lidské kůži.

Výsledky ukazují zvýšené pronikání TH lidskou kůží v přítomnosti C_8MIM při aplikaci v H_2O a EtOH 96%, u 60% PG nikoli. Zadržetí TH v kůži bylo významné při použití EtOH 96% (s vysokou variabilitou mezi vzorky) a u ostatních rozpouštědel nebyly výsledky statisticky významné. U vzorků s DIC a C_8MIM se v žádném z případů nezvýšilo pronikání kůží (při aplikaci v H_2O došlo dokonce ke snížení množství DIC v akceptoru oproti vzorku bez C_8MIM). Retence DIC v kůži byla zvýšena při použití H_2O , trend byl patrný i u EtOH 96%. Získaná data ukázala, že výsledky permeace jsou závislé nejen na použitém médiu, ale také na vlastnostech permeantu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Tereza Stehlíková

Title of the thesis: Effect of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide to the permeability of human skin when applied in different media

In this thesis, the effect of ionic liquids (IL) on the permeability of human skin was investigated. IL represent a potential group of substances that can facilitate the transfer of drugs through the skin. The amphiphilic IL 1-methyl-3-octylimidazolium bromide (C₈MIM) was used in the experiment. Theophylline (TH), a hydrophilic molecule, and diclofenac sodium (DIC), a more lipophilic and larger molecule, were used as model compounds. Three different media were chosen for the application of the model substances (water (H₂O), 60% propylene glycol (PG) in H₂O and Ethanol (EtOH) 96%). The prepared samples were used for permeation experiments on human skin.

The results showed increased penetration of TH through human skin in the presence of C₈MIM when applied in H₂O and EtOH 96%, but not by 60% PG in H₂O. Skin retention of TH was significant using EtOH 96% (with high variability between samples) and results were not statistically significant for the other solvents. Skin penetration did not increase in any of the samples with DIC and C₈MIM (when applied in H₂O, the amount of DIC in the acceptor was even reduced compared to the sample without C₈MIM). The retention of DIC in the skin was increased with the use of H₂O, the trend was also evident with EtOH 96%. The obtained data showed that the permeation results are depended not only on the used medium but also on the properties of the permeant.

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. Lidská kůže.....	10
3.1.1. Struktura lidské kůže	10
3.1.2. Hypodermis	11
3.1.3. Dermis	11
3.1.4. Epidermis.....	11
3.1.4.1. Stratum basale (bazální vrstva).....	12
3.1.4.2. Stratum spinosum (dlaždicová vrstva).....	12
3.1.4.3. Stratum granulosum (granulární vrstva).....	12
3.1.4.4. Stratum lucidum (jasná vrstva)	13
3.1.4.5. Stratum corneum (rohová vrstva)	13
3.2. Prostup látek přes lidskou kůži	15
3.3. Akceleranty kožní permeace	16
3.3.1. Obecné vlastnosti akceleraantů	16
3.3.2. Mechanismus účinku akceleraantů	16
3.3.3. Příklady akceleraantů	17
3.4. Iontové kapaliny	20
3.4.1. Vlastnosti IL	21
3.4.2. Klasifikace IL.....	21
3.4.3. Využití IL jako součást léčiv	21
3.4.4. Možnosti inovativního využití IL:	22
3.4.4.1. IL jako zesilovače permeace léčiv.	22
3.4.4.2. IL zlepšující rozpustnost léčiv.....	23
3.4.4.3. IL jako účinné farmaceutické látky – API.....	23
3.4.5. Toxicita IL.....	24
4. Experimentální část	25

4.1.	Chemikálie, materiály a přístroje.....	25
4.2.	Příprava donorových vzorků.....	26
4.3.	Permeace a retence za použití lidské kůže.....	27
4.3.1.	Příprava Franzových cel a kůže.....	27
4.3.2.	Aplikace donorových vzorků.....	28
4.3.3.	Odběr akceptorových vzorků a měření permeace látek kůží pomocí HPLC....	29
4.3.4.	Příprava vzorků kůže a měření retence látek v kůži pomocí HPLC.....	29
4.4.	Výsledky a diskuze.....	30
4.4.1.	Vliv 180 mM C ₈ MIM na retenci TH v lidské kůži.....	31
4.4.2.	Vliv 180 mM C ₈ MIM na permeabilitu TH lidskou kůží.....	32
4.4.3.	Vliv 180 mM C ₈ MIM na retenci DIC v lidské kůži.....	34
4.4.4.	Vliv 180 mM C ₈ MIM na permeabilitu DIC lidskou kůží.....	35
4.4.5.	Celkové zhodnocení výsledků permeačních pokusů.....	36
5.	Závěr.....	37
6.	Reference.....	38

1. Seznam zkratek

API	Účinná látka (<i>Active pharmaceutical ingredient</i>)
Cer	Ceramidy
Chol	Cholesterol
C ₈ MIM	1-methyl-3-oktylimidazolium bromid
DIC	Sodná sůl diklofenaku
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Koncentrace způsobující určitý efekt u 50 % organismů
EtOH	Ethanol
FFA	Volné mastné kyseliny
H ₂ O	Voda
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL	Iontová(é) kapalina(y)
MeOH	Methanol
NaH ₂ PO ₄	Dihydrogenfosforečnan sodný
NMR	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie
PBS	Fosfátový pufr
PG	Propylenglykol
SC	<i>Stratum corneum</i>
TH	Teofylin

2. Úvod a cíl práce

Lidská kůže je impozantní bariéra, která představuje problém při transdermálním a topickém podávání léčivých přípravků. Nejsvrchnější část kůže *epidermis* a její vrstva *stratum corneum* (SC) jsou při pronikání léčiva problémem. Vrstva SC je velmi uspořádaný systém. Základní stavební složku představují *korneocyty* a lipidová matrix, která vyplňuje prostor mezi nimi. Lipidová fáze se skládá ze směsi ceramidů (Cer), volných mastných kyselin (FFA) a sterolů. [1–4]

Pro usnadnění průchodu léčiva kůží se často používají zesilovače transdermální permeace. Tyto látky mají schopnost narušit vysoce uspořádanou strukturu SC. [5] Novou skupinu látek, možnou pro využití jako akceleranty, se jeví iontové kapaliny (IL). Jedná se o soli tvořené objemným organickým kationtem a menším organickým nebo anorganickým aniontem. [6] IL se vyznačují vynikajícími fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Jejich bod tání je nižší než 100 °C. Při pokojové teplotě se tedy většina IL nachází v kapalném stavu. Tím se odlišují od běžných solí. Díky vhodným vlastnostem jsou IL nyní zkoumány jako akceleranty kožní permeace. [7]

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak IL ovlivňují prostup či zadržování látek v lidské kůži *in vitro*. V pokusu byla využita amfifilní imidazoliová IL C₈MIM. Jako modelové látky pro prostup kůží byly použity teofylin (TH) a diklofenak sodný (DIC). Modelové látky byly navíc aplikovány v různých médiích a dalším cílem bylo zjistit účinky těchto médií na permeaci a retenci léčiva v kůži. Konkrétně byly použity – H₂O, 60% PG v H₂O a EtOH 96%. Vzorčky byly zkoumány za využití permeačních pokusů s lidskou kůží a měřily se konečné hodnoty prošlého a zadržného léčiva v kůži.

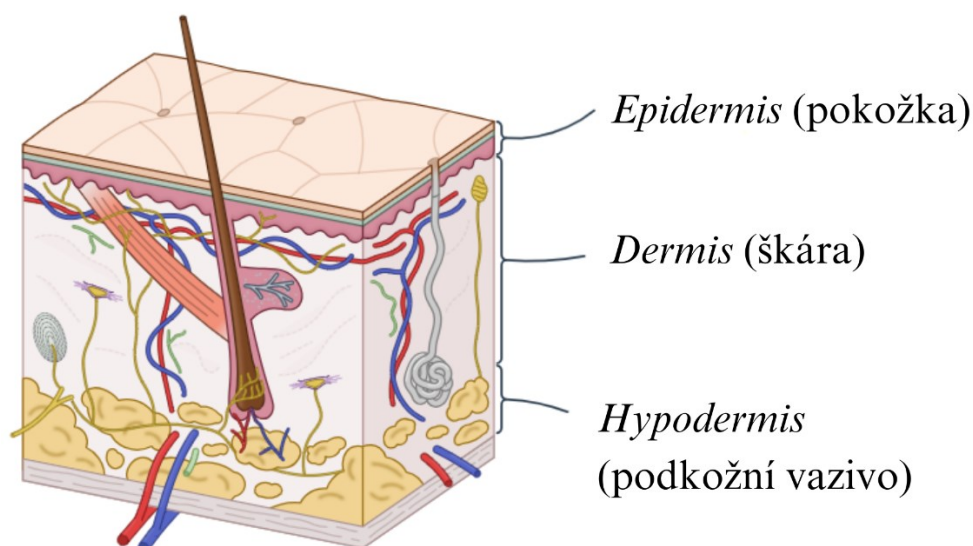
3. Teoretická část

3.1. Lidská kůže

Kůže tvoří ucelený povrch a je největším orgánem lidského těla. Její hmotnost dosahuje až 15 % z celkové hmotnosti člověka a plocha u dospělého jedince činí asi 1,6 až 1,8 m². Kůže zastává mnoho životních funkcí. Je ochrannou bariérou před vnějšími vlivy, zabraňuje unikání vody z těla a také naopak zabraňuje vstupu škodlivin do lidského těla. Podílí se tedy na udržování vnitřního prostředí organismu. Funguje jako termoregulátor, pomáhá udržet potřebnou teplotu lidského těla. Kůže ukrývá smyslové receptory, díky kterým může člověk vnímat dotyk, teplo i bolestivé podněty. Důležitou funkcí je uchovávání tuků, vody, minerálů a vitamínů. [8–11] V kůži je přítomen provitamin vitamínu D 7-dehydrocholesterol, který se účinkem slunečního ultrafialového záření proměňuje na již zmíněný vitamin D. [12] Přes kůži se také vylučují nepotřebné látky z organismu a na druhé straně dochází ke vstřebávání látek. Přes lidskou kůži mohou procházet látky rozpustné v tucích a plyny. [8]

3.1.1. Struktura lidské kůže

Kůže se skládá ze tří hlavních vrstev (Obr. 1). Svrchní vrstvou je *epidermis* tedy pokožka, ta nasedá na prostřední vrstvu *dermis* neboli škára. Pod nimi se nachází třetí vrstva zvaná *hypodermis*, která je tvořena vazivovou a tukovou tkání. [13]



Obrázek 1 Struktura lidské kůže [14]

3.1.2. Hypodermis

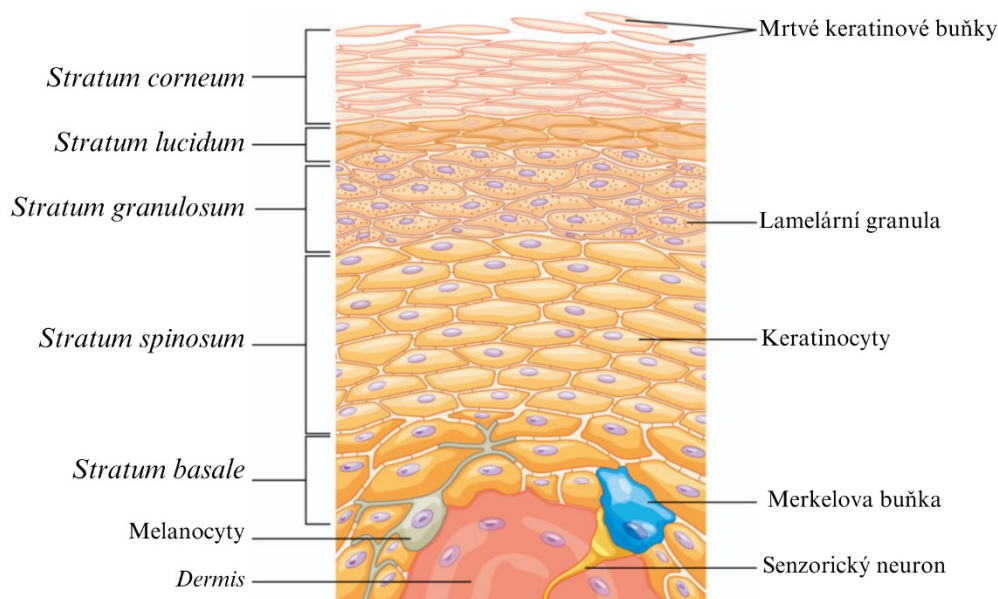
Jedná se o vrstvu kůže, která se nachází nejhluběji. V podkoží najdeme tukovou tkáň a pojivovou tkáň (kolagen a elastin). Nacházejí se zde také krevní cévy a nervy. [13] *Hypodermis* má několik funkcí. Slouží jako izolace před chladem, ale také k produkci potu, který naopak upravuje tělesnou teplotu při horku. Další součástí jsou spojení se svalovou tkání a kostmi. Ukládá se zde energie v tukových buňkách (*adipocytech*). A v neposlední řadě chrání orgány, svaly a kosti před poškozením a umožňuje hladký pohyb kůže po tkáních a svalech nacházejících se pod ní. Tloušťka podkoží je v různých částech lidského těla různá. [15]

3.1.3. Dermis

Střední vrstva kůže *dermis* neboli škůra je silná vrstva kůže, skládající se ze dvou vrstev. [10] První je *stratum reticulare*, tedy hlubší vrstva škáry. Je širší a obsahuje krevní a lymfatické cévy, žlázy, vlasové folikuly a nervy. Je zde také síťovitá struktura z elastinových a kolagenových vláken, která umožňuje pohyb a podporuje celkovou strukturu pokožky. Druhou vrstvou je *stratum papillare*, tedy povrchová tenká vrstva *dermis*, přiléhající k *epidermis*. Její součástí jsou kolagenová vlákna, fibroblastové buňky, krevní cévy a nervová vlákna. [16] Ve škáře se nachází i smyslové receptory, jako jsou *Meissnerova tělíska* (rozeznání jemného dotyku) a *Ruffiniho tělíska* (vnímání tlaku, tahu a napětí), ale i další nervová zakončení důležitá pro smyslové vnímání. [13] Mezi funkce *dermis* patří kromě smyslového vnímání také produkce potu, udržování vlhkosti pokožky, tvorba chloupků a vlasů a také poskytuje pevnost a pružnost *epidermis*. [16]

3.1.4. Epidermis

Pokožka neboli *epidermis* je vrstvou kůže, která se nachází na jejím povrchu. [10] Jedná se o nejtenčí vrstvu kůže a skládá se z pěti dalších vlastních vrstev – *stratum basale* (nejhlubší vrstva *epidermis*), *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (nejsvrchnější vrstva *epidermis*). Hlavní funkcí *epidermis* je ochrana před vnějšími vlivy na lidskou kůži. [1] Struktura *epidermis* a její jednotlivé složky jsou zobrazeny na Obr. 2.



Obrázek 2 Vrstvy epidermis [17]

3.1.4.1. Stratum basale (bazální vrstva)

Nejhlubší vrstva epidermis nazývaná také *stratum germinativum*. Nasedá přímo na vrstvu *dermis* a je s ní propojená *hemidesmozomy*. Dochází zde k tvorbě nových buněk kůže. Tato vrstva obsahuje kmenové buňky, které neustále produkují *keratinocyty* – tvorba *keratinu* (součást vlasů, nehtů, vnější vrstvy pokožky). Dále se zde nacházejí *melanocyty* – tvorba *melaninu* (pigment pokožky). [1, 18]

3.1.4.2. Stratum spinosum (dlaždicová vrstva)

Tato vrstva se skládá z nepravidelných polyedrických buněk s výběžky (ostny). Tyto buňky drží pohromadě pomocí *desmosomů* (lepivé proteiny). Součástí vrstvy jsou také *dendritické* buňky. Obsahuje 8–10 buněčných vrstev. [18] *Stratum spinosum* díky pevným spojením mezi buňkami dodává pokožce sílu a pružnost. [1]

3.1.4.3. Stratum granulosum (granulární vrstva)

Skládá se ze 3-5 vrstev plochých buněk. [18] Buňky v této vrstvě obsahují *kerathohyalinové* a *lamelární granula*, způsobující typický vzhled pod mikroskopem.

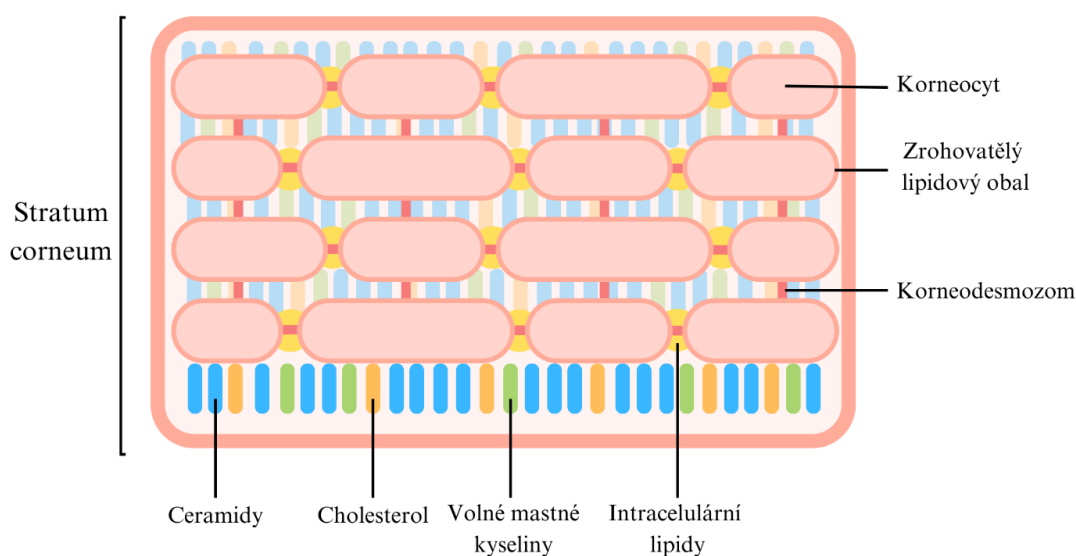
[19] První zmíněné produkují protein *keratohyalin* obsahující prekurzory *keratinu* (udržení pevnosti a neprůchodnosti pro vodu). Lamelární buňky vylučují na povrch prekurzory bariérových lipidů, které pomáhají vytvořit bariéru mezi pokožkou a okolím a drží buňky pohromadě. [18]

3.1.4.4. Stratum lucidum (jasná vrstva)

Tenká a průhledná vrstva mrtvých *keratinocytů* sestávající ze 2-3 buněčných vrstev. Nachází se v oblasti dlaní a chodidel. [18] Vrstva *stratum lucidum* obsahuje *eleidin* – protein, díky kterému mají buňky typický průhledný vzhled. [20]

3.1.4.5. Stratum corneum (rohová vrstva)

SC je nejsvrchnější vrstvou *epidermis*. Skládá se z 20–30 buněčných vrstev. [18] Tvoří ochranou bariéru před vnějšími vlivy, jako jsou toxiny a bakterie. Také napomáhá udržovat pokožku hydratovanou, tím že zabraňuje odpařování vody z kůže. [2] Ve struktuře SC se nachází *keratinocyty*, které jsou již v konečné fázi svého vývoje a podléhají destrukci. V této fázi se již nazývají *korneocyty*. Jejich obal se mění z plazmatické membrány na zrohovatělý lipidový obal, zplošťují se a jsou navzájem spojeny *korneodesmozomy*. Vše dohromady je spojeno do vrstev tvořící samotné SC. Jedná se o dvousložkový systém, kde hydrofobní *korneocyty*, bohaté na proteiny jsou uzavřeny v matici obohacené o lipidy (Obr. 3). Extracelulární lipidová matrix se organizuje do lamelární struktury. [2] Zjednodušeně lze strukturu SC přirovnat k cihlové zdi. [3]



Obrázek 3 Struktura stratum corneum

Korneocyty plní několik klíčových funkcí ve SC. Vytváří ochrannou bariéru, poskytují pevnost a odolnost pokožky proti vnějším vlivům. Dále chrání mitoticky aktivní buňky od poškození ultrafialovým zářením. Fungují při regulaci cytokinů (zánětlivé buňky). Udržují pokožku hydratovanou. Extracelulární lipidová matrix má na starosti udržení struktury SC a důležitou funkcí je regulace permeability. Umožňuje tedy průchod nebo naopak brání průchodu látek do kůže a do lidského těla. Dále podporuje deskvamaci *korneocytů* (odstranění odumřelých buněk z povrchu kůže), má antimikrobiální aktivitu, vylučuje toxiny a umožňuje selektivní chemickou absorpci určitých látek, například léčiv. [2]

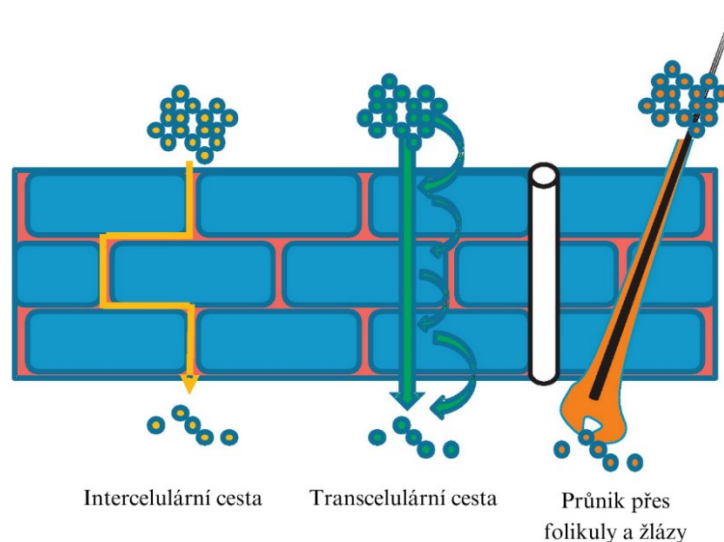
Lipidová fáze SC se skládá z Cer, FFA a sterolů, převážně cholesterolu (Chol) přibližně v ekvimolárním poměru 1:1:1. Nacházejí se ve velmi hustém a přesném uspořádání, minimálně hydratované. [4] Fosfolipidy se naopak v lipidové fázi nenacházejí. [21]

3.2. Prostup látek přes lidskou kůži

Absorpce látek přes kůži je pasivní proces. Látky mohou přes kůži do lidského těla pronikat několika různými mechanismy. [22] Nejčastěji léčivo přechází přes SC, což je nejméně propustná vrstva kůže díky jejímu uspořádání. [2]

První možností prostupu látky je její průnik přes vlasové folikuly, mazové žlázy nebo potní žlázy (Obr. 4). Tato cesta přenosu není velmi významná z důvodu malého pokrytí lidského těla folikuly a žlázami (0,1 %). Výhodou tohoto přenosu je možnost prostupu vysokomolekulárních látek (nanočástice) nebo nabitých molekul. [23]

Dalšími způsoby jsou transcelulární cesta, kdy látka prochází skrz buňky SC *korneocyty* a intercelulární cesta s penetrací látky mezibuněčnými prostory. Většina látek preferuje vstup přes mezibuněčné prostory, tedy intercelulární cestu. Důvodem je složité překonávání korneocytů při transcelulárním přenosu. [22, 23]



Obrázek 4 Cesty transportu látky přes SC [23]

Po aplikaci látky na lidskou kůži nejprve dochází k uvolnění molekuly z vehikula a následuje vstup přes SC jedním ze výše uvedených mechanismů. Dochází k pasivní difuzi. Látka buď prochází dále přes *epidermis* a *dermis* do lidského těla, nebo dochází k interakcím s vrstvami kůže. V kůži se již může látka metabolizovat, být farmakologicky aktivní i toxická, případně způsobit alergické reakce. [22, 23]

3.3. Akceleranty kožní permeace

Lidská kůže je fascinující bariéra schopna udržovat látky uvnitř, a naopak jiné do těla nepropouštět. To představuje výzvu v oblasti transdermálního podávání léčiv. Jedna z možností k rozšíření spektra léčiv, která mohou procházet kožní bariérou, je použití zesilovačů permeace. Tyto chemické látky interagují se složkami kůže a podporují jejich prostup. V současné době je k dispozici široká škála látek, které se mohou použít jako akceleranty pro prostup léčiva kůží. [24]

Většina látek používaných jako zesilovače transdermální permeace se soustředí na prostup léčiva přes SC. Tato vrstva díky své vysoce uspořádané struktuře představuje největší překážku v prostupu léčiva. Účinné akceleranty většinou interagují s intercelulárními lipidy SC. [5]

3.3.1. Obecné vlastnosti akceleraantů

Zesilovače transdermální permeace by měly splňovat několik vlastností. V první řadě by neměly být toxické, dráždivé a neměly by způsobovat alergie po aplikaci. Důležitá je i rychlost účinku a doba jeho trvání musí být předvídatelná. Samotný účinek by měl působit jen jednosměrně, tedy pouze propouštět látky do těla a po odstranění akceleraantu z povrchu kůže by se její bariérové vlastnosti měly rychle a v plném rozsahu vrátit. Vlastní farmakologická aktivita je nežádoucí. Vhodný zesilovač permeace je kompatibilní s ostatními látkami, které chceme přes nebo do kůže aplikovat. Výhodná by byla také jeho nízká cena. Nicméně žádný z přípravků používaných v praxi nesplňuje všechny výše zmíněné požadavky. [24, 25]

3.3.2. Mechanismus účinku akceleraantů

Při působení akceleraantů dochází ke změně vlastností složek SC, přes které musí léčivo pronikat. Dochází tedy k úpravě lipidní a polární dráhy permeace. [5] Úplný mechanismus účinku akceleraantů není plně objasněn, ale předpokládá se působení jedním z následujících mechanismů.

V prvním případě urychlovač kožní permeace způsobí narušení uspořádané struktury intercelulárních lipidů SC. [25] To způsobí zvýšení difúzního koeficientu léčiva. Molekuly urychlovačů prostupují do lipidové vrstvy, kde zvětšují volný objem,

který je dostupný pro difúzi léčiva. [26] Tímto způsobem působí většina akceleraantů kožní permeace. [5]

Dále může dojít k interakci s intracelulárními proteiny, kdy látky mají schopnost dobře interagovat s *keratinem* nacházejícím se v *korneocytech*. Tyto látky narušují hustou proteinovou strukturu *keratinu*, a tím zvyšují její propustnost a zároveň difúzní koeficient léčiva. Některé akceleraanty dokážou ovlivňovat i proteiny v desmozomech. [26]

V posledním případě akceleraanty dokážou ovlivňovat a zlepšovat rozdělovací koeficient mezi aplikovanou látkou a membránou kůže. [25]

3.3.3. Příklady akceleraantů

Transdermální urychlovače permeace jsou látky, které pomáhají léčivým složkám pronikat kůží. I když se tyto látky chemicky odlišují, mají společné strukturální rysy. Často obsahují části, které jsou podobné přirozeným hydratačním faktorům v pokožce. Typickým znakem těchto látek je strukturální fragment X-CO-N=, kde X může být -CH₂, -NH₂ nebo -NH-. Molekuly obvykle také obsahují dlouhé řetězce atomů uhlíku (alkyl nebo alkenyl), které mohou být přímé nebo rozvětvené a mohou obsahovat různé izosterické varianty. Tento řetězec může mít délku od 8 do 20 atomů uhlíku. [25, 27]

Urychlovače transdermální permeace lze klasifikovat z různých pohledů. Jedná se o přírodní, syntetické nebo polosyntetické látky. Dle jejich obecných chemických vlastností je můžeme dělit na rozpouštědla, amfifilní látky a peptidy. Dalším dělením zesilovačů permeace je rozdělení dle jejich hlavní funkční skupiny. [28]

Vybrané příklady akceleraantů transdermální permeace:

- Voda (H₂O) – předpokládá se, že polární povaha umožňuje interagovat s polárními konci lipidové dvojvrstvy, tím narušuje její strukturu. Vzniká tekutější struktura a zvyšuje se schopnost difúze. Procházejí tak hlavně polární látky. Nicméně mechanismus, jak H₂O urychluje permeaci není stále plně objasněn. Nová pozorování naznačují, že většina absorbované vody se nachází v *korneocytech*, případně nevázané v intercelulárním prostoru. [5, 24]

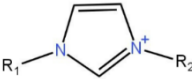
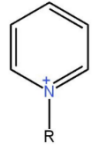
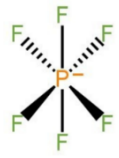


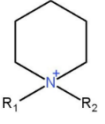
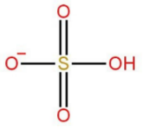
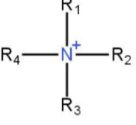
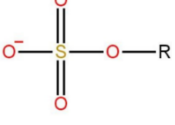
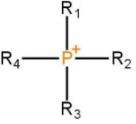
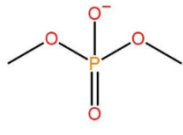
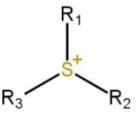
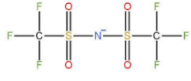
- Alkoholy – typickým příkladem této skupiny je ethanol (EtOH). Alkoholy jsou velmi účinné i jako rozpouštědla léčiv. EtOH je často používán právě pro tuto vlastnost. Jako akcelerant dosahuje nejvyšší aktivity při 40–60% koncentraci. Mechanismus účinku urychlování transdermálního přednosu je pravděpodobně založen na zvyšování tekutosti lipidů ve SC. Ve vysokých koncentracích dochází k denaturaci bílkovin a struktura kůže se stane porézní. Jako rozpouštědlo může zvýšit rozpustnost léčiva ve vehikulu, a tím zlepšit prostupnost přes kůži. Další alkoholy jako akceleranty lze použít mastné alkoholy (dekanol). Hydrofilní molekuly působí hlavně přes zvyšování rozpustnosti léčiva, což zvýší koncentrační spád. Lipofilní vyšší alkoholy interagují s lipidy a proteiny ve SC. Koncové větvení řetězce vede k vyšší permeační aktivitě. [5, 24, 25]
- Dioly a acetaly – tato skupina látek je hlavně využívána jako rozpouštědla. Při jejich použití jako akceleračních nepůsobí velmi výrazně, ale společně s jinými urychlovači působí jako koakcelerační, a tedy zvyšují jejich aktivitu. Jejich mechanismus účinku spočívá ve zvýšení koncentrace léčiva na kůži nebo v kůži a následném zvýšení koncentračního spádu. Typickým a nejpoužívanějším příkladem je propylenglykol (PG). [24, 25]
- Alkylsulfoxidy – jsou látky, které jsou velmi dobrými rozpouštědly léčiv. Nejtypičtějším příkladem je dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO je polární molekula a díky tomu interaguje s hydrofilními skupinami lipidů ve SC. Dochází k vytvoření vodíkových vazeb a k rozvolnění struktury lipidů v intercelulárním prostoru SC. Navíc způsobuje denaturaci *keratinu*, a tím narušuje proteinovou matici a usnadňuje permeaci. Nicméně pro jeho účinnost je potřeba vysoká koncentrace nad 60 % a v této vysoké koncentraci může být dráždivý. [24, 25]
- Amidy kyselin – používají se jako velmi dobrá rozpouštědla léčiv. Interagují s proteiny v *korneocytech*, ze kterých vytlačují vodu. Vytváří se depo léčiva v kůži, a tím je umožněn silnější transdermální průnik. Ve vyšších koncentracích interagují také s intercelulárními lipidy SC. Používání těchto látek jako akceleračních se snižuje. Příkladem je dipropyldodekanamid. [25]

- Azony (cyklické amidy) – zvyšují kožní prostup u široké škály léčivých přípravků. Azony se dají zařadit do skupiny laktamů (ϵ -laktamy) Nejvyšších účinků se dosahuje při nízkých koncentracích (0,1 – 5 %). Stabilní konformace Azonu připomíná tvar polévkové lžice. Váže se přes vodíkové můstky na vnější polární stranu lipidové dvojvrstvy intercelulárních prostorů. Tedy sedmičlenný kruh leží v rovině lipidových polárních skupin a alkyl se orientuje směrem dovnitř. Tím se zvyšuje viskozita dvojvrstvy a je více hydrofilní. Proto Azon může usnadňovat pronikání jak polárních, tak nepolárních látek. [5, 24, 25]
- Pyrrolidony – jsou to sloučeniny, která jsou také dobrými rozpouštědly. Jejich účinek je pravděpodobně založen na tvorbě rezervoáru léčiva ve SC. Mají schopnost se v nejsvrchnější vrstvě kůže kumulovat. Nicméně se v klinické praxi nevyužívají pro jejich nežádoucí reakce na povrchu kůže. [24, 25]
- Močovina – je využívána jako hydratační činidlo a keratolytikum (při stavech zrohovatělé pokožky). Mechanismus účinku jako akcelerantu je založen na proteolytickém působení. Při použití vhodného koakcelerantu, jako je například PG, lze účinek mnohonásobně zvýšit. Mírná aktivita močoviny, která zvyšuje pronikání léčiva kůží, pravděpodobně vyplývá z kombinace rostoucího obsahu vody ve SC prostřednictvím keratolytické aktivity. Samotná močovina má pouze nízkou aktivitu, výhodnější jsou její deriváty (difenylmočovina, dodecylmočovina). Obvykle se kombinuje s kyselinou salicylovou pro lepší keratolýzu. [24, 25]
- Terpeny – tato skupina zahrnuje terpeny samotné i jejich směsi, tedy silice. Uhlovodíkové terpeny se jeví jako nejméně účinné. Vyšší účinnost mají terpenické alkoholy a ketony. Za nejvíce účinné jsou považovány cyklické ethery, jako je například eukalyptol. Při použití PG jako vehikula je dokázán synergický účinek. Účinek je pravděpodobně způsoben ovlivňováním struktur lipidů a interakcemi s intercelulárními proteiny. [24, 25]

3.4. Iontové kapaliny

Iontové kapaliny (IL, *ionic liquids*) jsou soli, které tvoří objemný organický kation (například amoniový, fosfoniový, sulfiniový) a menší organický nebo anorganický anion (viz Tab. 1). Typickou vlastností je jejich nízký bod tání. Jsou kapalné již při teplotách pod 100 °C. [6] Jejich výhodou, oproti jiným rozpouštědlům, je jejich netěkavost, vysoká chemická a tepelná stabilita. Navíc mají nízkou viskozitu a tlak par. [29]

Tabulka 1 Nejčastěji používané kationty a aniony v IL

Kationty	Aniony
Imidazolium 	Halogenidy Cl^- Br^- I^-
Pyridinium 	Hexafluorofosfát 
Pyrrolidinium 	Tetrafluoroborát 
Piperidinium 	Hydrogensulfát 
Ammonium 	Alkylsulfát 
Fosfonium 	Dimethylfosfát 
Sulfonium 	Bis(trifluoromethan-sulfonyl)imid 

3.4.1. Vlastnosti IL

IL mají vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti, díky tomu se hojně využívají jako rozpouštědla. Jejich hustota nabývá hodnot $0,9 - 1,7 \text{ g/cm}^3$ při $20-25 \text{ }^\circ\text{C}$. Viskozita je závislá, jak na van der Waalsových silách, tak na vodíkových vazbách. S delším alkylovým řetězcem nebo substitucí fluorem na kationtu IL se viskozita zvyšuje. Viskozita je důležitým faktorem při aplikaci na kůži. Bod tání mají IL nižší než $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Při pokojové teplotě se většina z nich nachází v kapalném stavu. Jejich polarita je ovlivňována délkou alkylového řetězce, kdy IL s dlouhými rozvětvenými řetězci mají hydrofobní charakter. [7] Struktura IL je dle novějších výzkumů tvořena mikro/nano hierarchickými strukturami. Jejich ionty jsou pak sestavovány do domén, ze kterých vznikají amfifilní nanomolekuly. Toto uspořádání může být důvodem jedinečných vlastností IL. Významnou roli v organizaci hrají také vodíkové vazby a iontové interakce. Počet možných kombinací IL (aniontů, kationtů) dosahuje čísla 10^{18} , proto lze dosáhnout téměř jakékoli z požadovaných vlastností pro IL. [30, 31]

3.4.2. Klasifikace IL

Na základě struktury, vlastností a aplikace se IL rozdělují do skupin – generací. První generace IL se dělí dle fyzikálních vlastností, jako je nízká těkavost a tepelná stabilita. Spadají sem alkyipyridiniové a dialkyimidazoliové kationty spolu s halogenidovými anionty kovů. Druhá generace IL je obecně navržena s alkyipyridiniovými, dialkyimidazoliovými, fosfoniovými a amoniovými kationty, doplněnými tetrafluorborátovými a hexafluorfosfátovými anionty. Třetí generace IL zahrnuje přirozené a biologicky odbouratelné ionty nebo ionty s biologickými aktivitami. V této kategorii se běžně používají IL na bázi cholinu s aminokyselinami. Tyto IL nacházejí uplatnění v ekologii, biologii a farmacii. Další možností klasifikace IL je rozdělení do čtyř kategorií podle kationtu. [7]

3.4.3. Využití IL jako součást léčiv

Biologická dostupnost je nejdůležitějším parametrem při účinku léčiva. Závisí na permeabilitě a rozpustnosti. Problémem pak může být omezená rozpustnost a pomalé rozpouštění. Další překážkou je častý výskyt léčivé látky v krystalické formě, která podléhá polymorfismu – může existovat jako několik polymorfů s různými vlastnostmi (stabilita, teplota tání, rozpustnost). Již existuje několik přístupů, jak

zlepšit biologickou dostupnost léčiva. Například zmenšení velikosti částic léčiva, narušení krystalové mřížky pomocí solí, použití solubilizátorů nebo aplikace proléčiva. [31]

IL se dají využít díky svým unikátním vlastnostem jako složky léčivých přípravků. Jak již bylo řečeno, jejich vlastnosti je možné potřebně přizpůsobit. Lze upravovat rozpustnost ve vodě a rychlost rozpouštění, zlepšovat absorpci a je možná i cílená distribuce. IL mají široké spektrum aplikací. Lze je využít jako emulgátory, kopolymery, rozpouštědla, korozpouštědla nebo antirrozpouštědla. Závislost rozpustnosti léčiv na struktuře IL však není jednoznačná. Jak anionty, tak kationty IL ovlivňují rozpustnost léčiv. Obecně platí, že hydrofilní léčiva se lépe rozpouštějí v hydrofilních IL, zatímco hydrofobní léčiva preferují hydrofobní rozpouštědla. IL jsou použitelné pro širokou škálu farmaceutických látek (antioxidanty, anestetika, léčba rakoviny, antivirové a antimikrobiální látky, antikoagulancia a nesteroidní protizánětlivé látky). [31]

3.4.4. Možnosti inovativního využití IL:

3.4.4.1. IL jako zesilovače permeace léčiv.

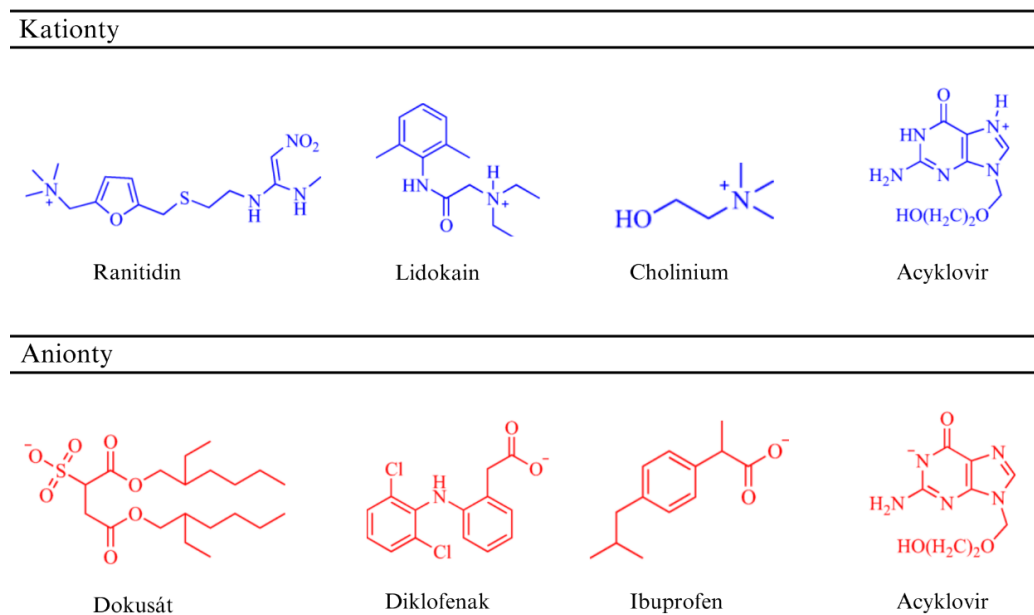
Transdermální a topické podávání léčiv má řadu výhod oproti běžnému perorálnímu podávání. Dochází ke zvýšení dostupnosti léčivých látek v cílových strukturách, často se také snižují nežádoucí účinky a navíc se může zlepšovat compliance pacienta. Proto je vhodné vyřešit problém s propustností kůže a narušení bariéry SC. IL jsou nyní zkoumány při možném využití jako zesilovače permeace. Hydrofilní IL dokáží narušit těsná spojení ve SC, a tím zvyšují propustnost v lipidových a proteinových strukturách této vrstvy kůže. Lipofilní IL vytvářejí kanály, což zvýší transcelulární transport. Stejně jako hydrofilní IL také polární zesilovače permeace se interagují do lipidových a proteinových oblastí. Naopak nepolární molekuly fungují na stejném principu jako lipofilní IL, tedy tvoří kanály pro difúzi léčiva. Velký potenciál ve zvýšení permeability mají hydrofilní IL na bázi imidazolia. Při zkoumání amfifilní IL na bázi 1-oktyl-3-methylimidazolia bylo zjištěno, že kationová hlava se vkládá do buněčné membrány a naruší její strukturu, čím se zvýší propustnost malých polárních molekul. [7, 32]

3.4.4.2. IL zlepšující rozpustnost léčiv

IL mají vynikající schopnost solvatace, tím napomáhají rozpouštění léčiv. Tento proces vede k lepší biodostupnosti v organismu. Při transdermálním podávání špatně rozpustného léčiva ve vodě lze využít hydrofilní IL při současném vytvoření mikroemulze IL/olej. Samotná hydrofilní IL by nedokázala procházet přes hydrofobní SC. Při tomto procesu dojde k zapouzdření léčivé látky do IL a díky vnější olejové fázi může celý komplex procházet přes hydrofobní membránu. Při využití mikroemulze IL/voda také dosáhneme zvýšení propustnosti pro látky špatně rozpustné ve vodě. [7, 32]

3.4.4.3. IL jako účinné farmaceutické látky – API

Účinné látky (API – *active pharmaceutical ingredient*) se často nacházejí v pevném stavu. To má omezení v rozpustnosti a na to navazující biologické dostupnosti. Jedním ze způsobů, jak tento problém vyřešit je převedení API na IL. Vznikají tak kapalné soli, které lépe prostupují membránami. Použitá API může být ve formě kationtu i aniontu, případně oba najednou. Běžně používané kationty jsou například ranitidin, lidokain nebo cholinium. Z aniontů pak dokusát, diklofenak nebo ibuprofen. Jako kationt i aniont může vystupovat acyklovir. Struktury uvedených iontů jsou shrnuty na Obr. 5. [7, 32, 33]



Obrázek 5 Příklady kationtů a aniontů při tvorbě API-IL [32]

3.4.5. Toxicita IL

Při použití IL je důležitým faktorem její toxicita. První generace IL nebyla ve farmacii a medicíně použitelná z důvodu její vysoké toxicity. Proto se výzkum zaměřil na vývoj látek se sníženou toxicitou. [7] Pro určení toxicity se používá faktor EC_{50} . Vyjadřuje koncentraci IL, při které růst buněk nebo mikroorganismů klesá na polovinu ve srovnání s růstem bez IL. Nejdůležitějším faktorem pro toxicitu IL je délka alkylového řetězce kationtu. Obecně platí, čím je řetězec delší, tím je vyšší toxicita. [34] Vliv délky alkylového řetězce na aniontu není pro toxicitu tak významný. [7] Mechanismus toxicity je založen na vmezeření alkylového řetězce kationtu do buněčné membrány a tím narušují její strukturu. Dochází k interakcím mezi kladně nabitým iontem IL a záporně nabitou fosfátovou skupinou buněčné membrány. Navíc alkylový řetězec IL interaguje s acylovou/alkylovou skupinou buněčné membrány na základě hydrofobních reakcí. [34]

Existuje několik možností, jak získat IL s nízkou toxicitou. V prvním případě lze na alkylový řetězec kationtů zavést polární funkční skupinu. Tím se zabrání hydrofobním reakcím s buněčnou membránou. Příkladem může být zavedení etherových skupin do esterového postranního řetězce kationtu nebo zavedení hydroxyskupiny na konec či střed alkylového řetězce. [7, 34, 35] Další možností je využití IL biologického původu, kdy se pro vytvoření IL používají biologické ionty. Jako kationty se využívají cholinové ionty a z aniontů to jsou chlorid, acetát nebo citrát. [34] Posledním přístupem k získání méně toxických IL je vytvoření zwitteriontů – neutrální iont nesoucí pozitivní i negativní náboj v molekule. Jsou to uměle vytvořené IL s co nejpolárnější funkční skupinou na konci kationtového řetězce. [34, 36]

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, materiály a přístroje

V experimentální části diplomové práce byly použity následující chemikálie, materiály a přístroje.

Při přípravě všech vodných roztoků byla použita ultra čištěná voda. Při čištění byl použit systém Milli-Q RG water purification system (Burlington, MA, USA). Dále byly použity modelové léčivé látky: TH zakoupen od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) a DIC o čistotě > 98,0 % zakoupena od TCI Chemicals (Tokio, Japonsko). Použitá IL C₈MIM byla syntetizována spolupracovníky z Univerzity Lipsko ze směsi 1-methylimidazolu a oktyl-bromidu podle dříve publikované metody. [37, 38] Anorganické soli použité pro přípravu isotonického fosfátového pufru (PBS) a rozpouštědla v HPLC kvalitě byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Pro přípravu suspenzí modelových léčivých látek byla použita H₂O, EtOH 96% od firmy Penta (Hostivař, ČR) a 60% PG v H₂O od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Lidská kůže, která byla použita v experimentální části diplomové práce, pocházela od žen, které podstoupily plastickou operaci v oblasti břicha. Kůže byla darována z chirurgické kliniky Sanus, Hradec Králové. Celý proces proběhl se souhlasem Etické komise Chirurgického centra Sanus (č. 19/3/2021), podle zásad Helsinské deklarace. Po operaci se následně z kůže odstranil podkožní tuk a byla omyta fyziologickým roztokem, osušena a uchovávána při teplotě -20 °C.

Pro permeační experimenty byly dále využity ručně vyrobené Franzovy difúzní cely. Permeace probíhala ve vodní lázni od výrobce Memmert (Schwabach, Německo).

Třepačka využívaná pro extrakci vzorků byla od firmy LT3 (Nedform, ČR). Centrifugace proběhla v přístroji typu MPW-260R, (MPW MED. Instruments, Polsko). Dermatome Acculan 3TI (Aesculap, Center Valley, PA, USA) byl použit k získání vzorků kůže stejné tloušťky. Analýza vzorků byla provedena pomocí HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu, Japonsko).

4.2. Příprava donorových vzorků

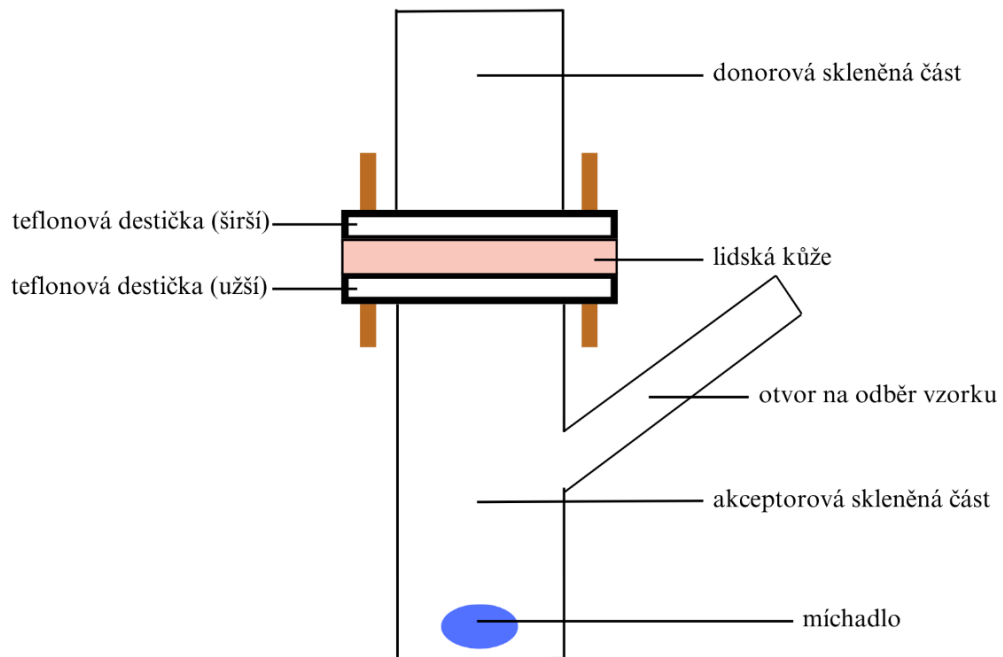
Jako donorové vzorky byly použity suspenze modelových léčivých látek TH a DIC. Bylo připraveno několik skupin vzorků. První skupina obsahovala IL C₈MIM v koncentraci 180 mM a druhá skupina nikoli. K získání suspenzí byly pro TH použity koncentrace 20 mg/ml v H₂O, 30 mg/ml v 60% PG v H₂O a 20 mg/ml v EtOH 96%. Koncentrace pro DIC byly 50 mg/ml v H₂O, 250 mg/ml v 60% PG v H₂O a 500 mg/ml v EtOH 96% (viz Tab. 2). Přípravou těchto suspenzí byly získány donorové vzorky, které následně byly aplikovány do donorových komor Franzových cel (viz dále). Připravené vzorky byly následně připevněny na třepačku a třepány po dobu 24 hodin.

Tabulka 2 Koncentrace pro získání suspenzí modelových léčivých látek

S obsahem 180 mM C ₈ MIM			Bez obsahu 180 mM C ₈ MIM		
TH	H ₂ O	20 mg/ml	DIC	H ₂ O	50 mg/ml
	60% PG v H ₂ O	30 mg/ml		60% PG v H ₂ O	250 mg/ml
	96% EtOH	20 mg/ml		96% EtOH	500 mg/ml

4.3. Permeace a retence za použití lidské kůže

Pro zjištění permeace a retence modelových léčivých látek TH a DIC kůží byly použity Franzovy difuzní cely (viz Obr. 6). Testování proběhlo metodou *in vitro*, při kterém byly použity vzorky lidské kůže.



Obrázek 6 Franzova cela

4.3.1. Příprava Franzových cel a kůže

Franzova cela se skládala ze dvou skleněných částí. Akceptorová část cely měla objem $7,0 \pm 0,2$ ml. Dále ze dvou teflonových destiček o různých šířkách s kruhovým otvorem 1 cm^2 . Před sestrojením cel byly teflonové destičky namazány silikonovým mazivem pro lepší utěsnění. Kůže byla předem pomalu rozmrazena a dermatomována na tloušťku $0,5 \text{ mm}$. Poté byla kůže nařezána podle velikosti teflonových držáků a upevněna mezi destičky tak, že dermální strana byla obrácena k akceptorové části Franzovy cely. Části cely se následně upevnily pomocí malých dřívky a gumiček.

Akceptorová část každé cely byla naplněna PBS o pH 7,4. Na přípravu 10mM PBS bylo potřeba navážit $0,312 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (156 g/mol ; 2 mM), $2,865 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ (358 g/mol ; 8 mM), 8 g NaCl ($58,4 \text{ g/mol}$; 137 mM), $0,201 \text{ g KCl}$

(74,6 g/mol; 2,7 mM). Nakonec se přidalo 50 mg gentamicinu a vše se rozpustilo v cca 900 ml vody a pak doplnilo vodou do 1000 ml.

Objem pufru byl přesně měřen pro každou celu pomocí injekční stříkačky a odměrného válce, kdy zbylý pufr byl převeden do válce a odečten jeho výsledný objem. Přesný objem pufru byl důležitý pro výpočet toku.

4.3.2. Aplikace donorových vzorků

Všechny cely byly umístěny do předem připravené vodní lázně vytemperované na 32 °C a nechaly se 12 hodin ustát. Následně se doplnil odpařený PBS z akceptorových cel a také odpařená voda z vodní lázně. Poté bylo aplikováno na povrch kůže každé cely 0,1 ml donorových vzorků. Každý vzorek byl aplikován do třech Franzových cel (viz Tab. 3).

Tabulka 3 Přehled vzorků ve Franzových celách

180 mM C₈MIM	CELA	VZOREK SUSPENZE TH	CELA	VZOREK SUSPENZE DIC
S obsahem IL	1. – 3.	20 mg/ml v H ₂ O	19. – 21.	50 mg/ml V H ₂ O
	4. – 6.	30 mg/ml v 60% PG v H ₂ O	22. – 24.	250 mg/ml v 60% PG v H ₂ O
	7. – 9.	50 mg/ml v EtOH 96%	25. – 27.	500 mg/ml v EtOH 96%
BEZ obsahu IL	10. – 12.	20 mg/ml V H ₂ O	28. – 30.	50 mg/ml V H ₂ O
	13. – 15.	30 mg/ml v 60% PG v H ₂ O	31. – 33.	250 mg/ml v 60% PG v H ₂ O
	16. – 18.	50 mg/ml v EtOH 96%	34. – 36.	500 mg/ml v EtOH 96%

4.3.3. Odběr akceptorových vzorků a měření permeace látek kůží pomocí HPLC

Po 16 hodinách od aplikace donorových vzorků se z cel začaly odebírat vzorky z akceptorové fáze. Objem těchto vzorků byl 0,3 ml a byly odebírány v předem stanovených intervalech po dobu 48 hodin. Odběry byly provedeny v časech 16, 20, 24, 28, 40, 44 a 48 hodin od aplikace donorových vzorků. Po každém odběru vzorku se stejným objemem (0,3 ml) nahradila akceptorová fáze. Odebrané vzorky byly následně přefiltrovány poloautomatickou pipetou přes špičku s vatou a přeneseny do vialek určených k HPLC. Poté bylo zjištěno množství látek, u kterých proběhla permeace přes lidskou kůži, pomocí metody HPLC. Ze zjištěných hodnot byl vytvořen graf kumulativního množství permeantů (opraveno o náhradu akceptorové fáze) proti času. Lineární směrnice grafu vyjadřovala tok TH a DIC v ustáleném stavu.

4.3.4. Příprava vzorků kůže a měření retence látek v kůži pomocí HPLC

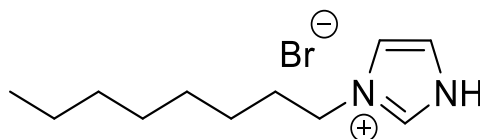
Po 48 hodinách od aplikace donorových vzorků, byly vzorky z povrchu kůže opatrně omyty. Pro očištění kůže byly použity vatové tampony namočené v destilované vodě. Následně se demontovaly všechny Franzovy cely a kůže se znovu pečlivě omyla. Část kůže, která byla vystavena donorovým vzorkům s obsahem TH a DIC byla vyražena a vložena do předem připravených vialek. Vialky se nejprve zvážily bez kůže a následně i s kůží. Díky tomu se získala přesná hmotnost kůže. Do vialek se poté přidala extrakční činidla, která byla stejná jako mobilní fáze pro HPLC. Pro vzorky s TH se jednalo o 2,0 ml mobilní fáze HPLC, tedy 100mM NaH₂PO₄/MeOH v poměru 60:40. Pro vzorky s DIC se jednalo o 1,0 ml mobilní fáze HPLC, tedy MeOH/H₂O/kyselina octová v poměru 80:20:0,5. Vialky byly připevněny na třepačku, kdy extrakce TH probíhala 24 hodin a DIC 12 hodin.

Po uplynutí stanoveného času třepání a extrakce byly extrakty přefiltrovány za pomoci poloautomatické pipety přes špičku s vatou do nově připravených vialek určených pro analýzu HPLC. Následně bylo zjištěno množství látek, které zůstaly v kůži pomocí HPLC analýzy.

4.4. Výsledky a diskuze

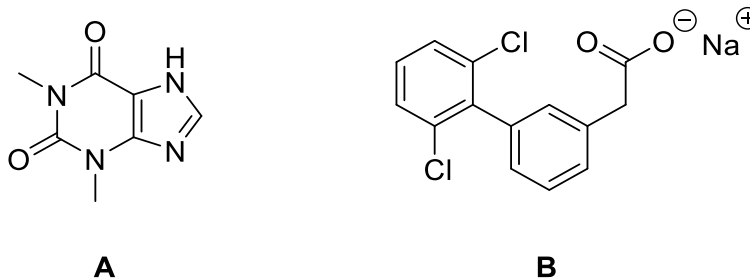
Tato diplomová práce byla předběžným experimentem s cílem zjistit, jaký je mechanismus imidazoliových IL při jejich použití, jako akceleratorů permeace pro dodávání účinných látek do a skrz lidskou kůži. Nejprve bylo hodnoceno, jaký je vliv IL na permeaci a kožní retenci u modelových sloučenin, při použití různých médií.

Pro předběžný experiment byl vybrán 1-methyl-3-oktylimidazolium bromid C_8MIM jako reprezentativní imidazoliová IL (Obr. 7). Tato amfifilní molekula je schopna modifikovat vlastnosti lipidových membrán. [38–43] Kromě toho byla také použita jako akcelerator. [44] Navíc má v porovnání s jinými imidazoliovými IL příznivou toxicitu s hodnotou EC_{50} 176,6 μM na buňkách HeLa. [38]



Obrázek 7: Struktura C_8MIM

Pro permeační experimenty byly vybrány dvě různé modelové sloučeniny s různými vlastnostmi. Konkrétně byly vybrány TH a DIC (Obr. 8).



Obrázek 8: Struktury modelových léčiv, teofylin (A) a diklofenak sodný (B)

TH je molekula malé velikosti o molekulové hmotnosti 180 g/mol. Hodnota $\log P$ TH je ~ 0 , je tedy přibližně desetkrát hydrofilnější než skopolamin, který je nejhydrofilnější transdermálně podávané léčivo v klinické praxi. [28, 45, 46] DIC je silné nesteroidní protizánětlivé léčivo běžně používané v topických formulacích. [47] Je to větší molekula než TH (296 g/mol pro jeho neionizovanou formu a 318 g/mol pro jeho sodnou sůl) a je více lipofilní. [48]

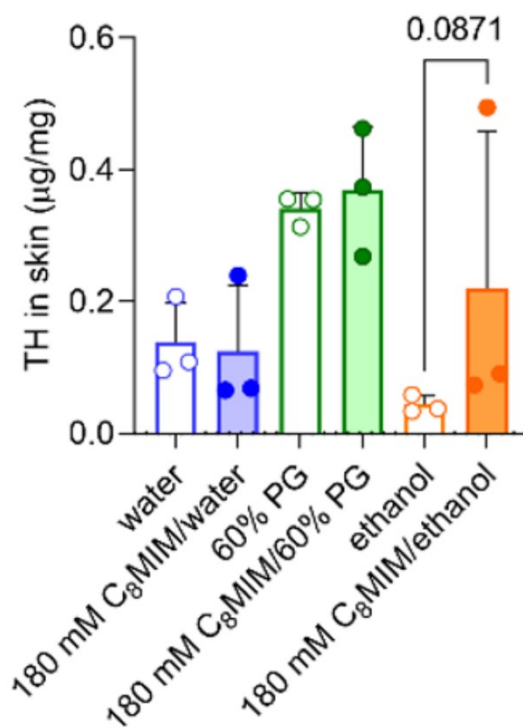
Pro přípravu formulací modelových léčiv byla vybrána tři různá média (H₂O, 60% PG v H₂O a EtOH 96%). První médium (H₂O) je nejběžněji používanou pomocnou látkou v léčivých přípravcích. Směs PG v H₂O (60% v/v) byl zvolen z důvodu jeho vlastností, jako je schopnost zvyšovat účinek zesilovačů permeace (působí synergicky) a také dokáže ovlivnit konformaci proteinových struktur v nejsvrchnější vrstvě kůže SC. Poslední zvolené médium (EtOH 96%) pak funguje jako efektivní rozpouštědlo, které dokáže modifikovat průchod léčivých látek různými mechanismy. [5, 23, 24]

Modelové molekuly byly připraveny ve formě suspenzí ve třech vybraných různých vehikulech (tj. nasycené roztoky plus nadbytek množství pro udržení maximální termodynamické aktivity). TH byl aplikován jako 20 mg/ml v H₂O, 30 mg/ml v 60% PG v H₂O a 20 mg/ml v EtOH 96% a DIC byl aplikován jako 50 mg/ml v H₂O, 250 mg/ml v 60% PG v H₂O a 500 mg/ml v EtOH 96%. Aby se zajistilo, že účinek IL bude patrný ve všech třech médiích, byla použita vysoká koncentrace IL (180 mM). Tato koncentrace je 9krát vyšší než kritická micelární koncentrace této amfifilní molekuly. [49, 50]

Teplota vodní lázně během permeačního experimentu byla udržována na 32 °C, protože to je fyziologická teplota lidské kůže. Vzorky kůže byly dermatomovány, aby bylo zajištěno, že všechny kožní membrány mají stejnou tloušťku. Jako akceptorová fáze napodobující vnitřní oběh lidského těla byl zvolen PBS s pH 7,4.

4.4.1. Vliv 180 mM C₈MIM na retenci TH v lidské kůži

Hodnoty zadrženého TH v kůži byly změřeny u každého vzorku třikrát a následně se z měření udělala průměrná hodnota (Obr. 9). Modře jsou znázorněny vzorky, kde bylo jako vehikulum použito H₂O, zelená označuje PG a oranžová EtOH. Sloupce bez výplně pak značí kontrolní vzorky (aplikace disperzí TH v samotném vehikulu) a barevně vyplněné sloupce pak označují disperze po přidání 180 mM C₈MIM.



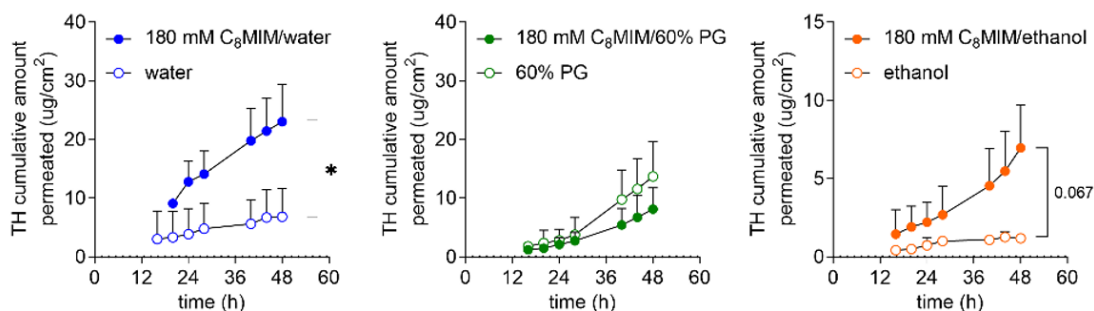
Obrázek 9 Množství zadrženého TH v kůži po 48 hodinách

Množství zadrženého TH v H₂O, v 60% PG v H₂O a v EtOH 96% bez použití 180 mM C₈MIM bylo $0,14 \pm 0,06$ µg/mg, $0,34 \pm 0,02$ µg/mg a $0,04 \pm 0,01$ µg/mg tkáně. S použitím 180 mM C₈MIM odpovídala hodnota zadrženého TH $0,13 \pm 0,10$ µg/mg, $0,37 \pm 0,10$ µg/mg a $0,22 \pm 0,24$ µg/mg.

Účinek IL 180 mM C₈MIM na množství TH zadrženého v kůži v H₂O nebyl statisticky významný. Podobných výsledků bylo dosaženo u retence TH pro 60% PG v H₂O, kdy výsledky byly opět statisticky nevýznamné. Naopak u EtOH 96% byl zjištěn určitý statisticky signifikantní význam, nicméně tento fakt byl spojený s velkou variabilitou mezi jednotlivými vzorky.

4.4.2. Vliv 180 mM C₈MIM na permeabilitu TH lidskou kůží

Měření hodnot zasazených do grafu (Obr. 10) probíhalo v časovém rozmezí 48 hodin (sedm odběrů), kdy hodnota v grafu odpovídá průměru tří vzorků. Jednotlivá vehikula jsou opět barevně odlišena a prázdná kolečka označují TH v samotném vehikulu.



Obrázek 10 Permeační profily TH

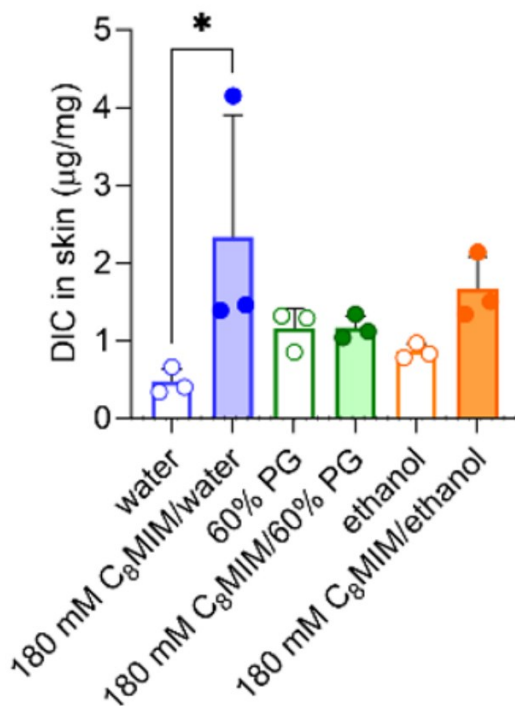
(kumulativní množství TH prostupující 1 cm² lidské kůže jako funkce času)

Konečné množství TH v akceptorové fázi za použití H₂O, 60% PG v H₂O a EtOH 96% jako média a bez aplikace 180 mM C₈MIM odpovídá hodnotám 6,86 ± 4,80 μg/cm², 13,72 ± 5,91 μg/cm² a 1,19 ± 0,18 μg/cm². S použitím 180 mM C₈MIM bylo množství TH, které permeovalo přes kůži 23,04 ± 6,34 μg/cm², 8,15 ± 3,63 μg/cm² a 6,96 ± 2,75 μg/cm².

Permeační profily TH ukazují, že C₈MIM významně zvýšil pronikání TH přes kůži při aplikaci v H₂O. Hodnoty prošlého TH jsou přibližně 3krát vyšší oproti vzorku bez IL (* v grafu označuje statisticky významný rozdíl, kde hodnota p ≤ 0.05). Zvýšené hodnoty prošlého TH kůží byly také zaznamenány při použití EtOH 96% jako média. Průnik byl asi 6krát vyšší při použití IL, avšak tyto hodnoty jsou statisticky významné s vyšší hodnotou p (0,067). Při aplikaci 60% PG není patrný trend zvyšování prostupu TH kůží, naopak u vzorků, kde byla přidána IL jsou hodnoty permeace nižší než u těch bez IL (asi 1,5krát). Tento rozdíl není statisticky významný. Běžně PG působí synergicky s amfifilními zesilovači permeace, zde ale tento jev pozorován nebyl a zdá se, že C₈MIM průnik TH kůží spíše blokoval.[24] Na druhou stranu, při použití EtOH jako média byl pozorován zvýšený průnik TH do akceptorové fáze a tento rozdíl byl po 48 hodinách od aplikace statisticky signifikantní. Lze tedy shrnout, že nejvyšší celkové množství TH v akceptorové fázi bylo zjištěno při použití H₂O jako média.

4.4.3. Vliv 180 mM C₈MIM na retenci DIC v lidské kůži

Hodnoty zadrženého DIC v kůži byly změřeny u každého vzorku třikrát a následně se z měření udělala průměrná hodnota (Obr. 11).



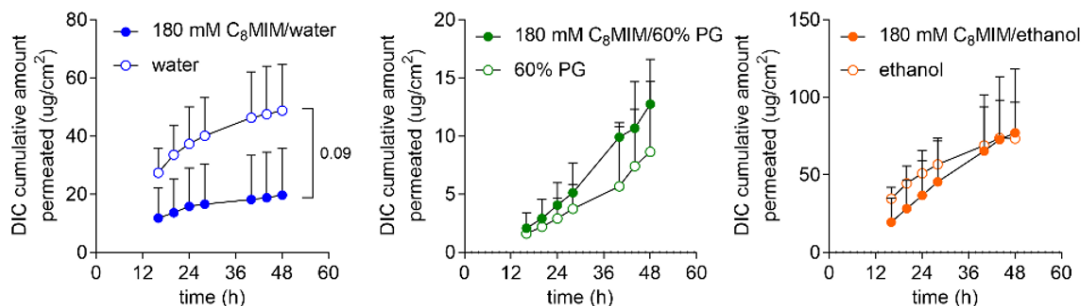
Obrázek 11 Množství zadrženého DIC v kůži po 48 hodinách

Množství zadrženého DIC v H₂O, v 60% PG v H₂O a v EtOH 96% bez použití 180 mM C₈MIM bylo $0,47 \pm 0,17$ µg/mg, $1,15 \pm 0,26$ µg/mg a $0,86 \pm 0,10$ µg/mg tkáně. S použitím 180 mM C₈MIM byla hodnota zadrženého DIC $2,33 \pm 1,57$ µg/mg, $1,17 \pm 0,16$ µg/mg a $1,66 \pm 0,42$ µg/mg.

Retence DIC v kůži při aplikaci za použití 180 mM C₈MIM byla zvýšena při aplikaci léčiva v H₂O a to přibližně 5krát oproti kontrole (* v grafu označuje statisticky významný rozdíl). Tento trend byl patrný také při použití EtOH jako média, nicméně rozdíly nebyly o tolik odlišné jako u H₂O. Při použití 60% PG byly zjištěny nevýznamné rozdíly u DIC zadrženého v kůži.

4.4.4. Vliv 180 mM C₈MIMna permeabilitu DIC lidskou kůží

Měření hodnot zasazených do grafu probíhalo v časovém rozmezí 48 hodin (sedm odběrů), kdy hodnota v grafu odpovídá průměru tří vzorků (Obr. 12).



Obrázek 12 Permeační profily DIC

(kumulativní množství DIC prostupující 1 cm² lidské kůže jako funkce času)

Konečné množství DIC v akceptorové fázi za použití H₂O, 60% PG v H₂O a EtOH 96% jako média a bez přídavku 180 mM C₈MIM odpovídá hodnotě $48,82 \pm 15,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $8,66 \pm 7,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $73,44 \pm 23,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. S použitím 180 mM C₈MIM bylo množství DIC, které permeovalo přes kůži $19,78 \pm 16,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $12,75 \pm 1,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $77,19 \pm 41,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Přidání C₈MIM ke vzorkům tedy nezvýšilo pronikání DIC přes kůži bez ohledu na použité médium. Při aplikaci DIC v H₂O s IL, dokonce došlo ke snížení množství DIC v akceptorové fázi. Tento rozdíl byl statisticky významný s hodnotou $p = 0,09$, kvůli vysoké variabilitě mezi vzorky. Použití H₂O jako média a 180 mM C₈MIM sice snížilo koncentraci DIC nacházející se v akceptorové fázi, ale na druhou stranu se zvýšily hodnoty zadržného DIC v kůži. Tento fakt by se dal vysvětlit možným iontovým párováním mezi kationtem IL a aniontem DIC. Vytvoří se tak depo léčiva v kůži, ze kterého se látka pomalu uvolňuje. Tato vlastnost IL je výhodná při léčbě různých onemocnění, kdy není vhodná vysoká koncentrace léčiva v plazmě (například karcinom). Pozitivem je také méně častá aplikace při topickém podání díky retenci léčiva v kůži a následném postupném uvolňování. [51]

4.4.5. Celkové zhodnocení výsledků permeačních pokusů

Ukázalo se, že důležitým faktorem při hodnocení výsledků není pouze IL a použité médium, ale také vlastnosti modelového léčiva. V permeačních pokusech TH představuje více hydrofilní látku a DIC naopak více lipofilní.

Při pozorování účinku IL v různých médiích se jeví H₂O jako nejvhodnější pro další pokusy. Po aplikaci 180 mM C₈MIM/H₂O se ukázaly nejvíce statisticky významné rozdíly při prostupu TH do lidské kůže a při zadržování DIC v kůži. Je tedy zřejmé, že při použití hydrofilního léčiva, H₂O jako médium a přidání IL, bude léčivo lépe procházet do kůže. Naopak za použití lipofilnější molekuly dochází k zadržování v kůži. U DIC se navíc tento jev dá vysvětlit možným iontovým párováním mezi kationtem IL a aniontem DIC, jak bylo detailně popsáno v předešlé podkapitole.

Naopak 60% PG v H₂O se jeví jako nevhodné médium. V žádném z případů se nezvýšila koncentrace léčivé látky. U léčiva nebylo pozorováno zvýšené zadržování ani prostup kůží za použití IL. Je pravděpodobné, že použití 180mM C₈MIM/60% PG neumožní léčivu více interagovat s kůží ani jí procházet. Obecně PG působí synergicky s akceleranty kožní permeace, nicméně při použití s C₈MIM se takto neprojevuje.

U EtOH 96% jako média se neobjevily významné rozdíly v zadržování léčiva v kůži ani ve zvýšeném prostupu kůží.

Pokud by se přenesly tyto výsledky do praxe záleželo by, co se od daného léčivého přípravku očekává. Výhodou by mohlo být právě zadržení účinné látky v kůži a její postupné uvolňování. Toto uplatnění by bylo vhodné u léčby různých kožních onemocnění nebo karcinomů. Dalo by se docílit nižších plazmatických koncentrací a méně častého podávání léčiva.

5. Závěr

Diplomová práce zahrnuje pokusy jak IL a různá média ovlivňují permeaci a retenci modelových léčiv v lidské kůži. IL představují poměrně neprobádanou skupinu látek, která by mohla účinně napomáhat při transdermální aplikaci léčiv. V této práci byla zkoumána jejich schopnost v komplexní lidské kožní tkáni. Vybrána byla amfifilní imidazoliová IL C₈MIM. V permeačním pokusu byl použit C₈MIM o koncentraci 180 mM. Jako modelové sloučeniny byly vybrány TH a DIC a disperzní média představovala H₂O, 60% PG v H₂O a EtOH 96%.

U TH se profily permeace lišily u každého použitého média. Při použití H₂O a EtOH 96% se průnik kůží zvýšil, oproti vzorku bez IL. U vzorků s H₂O přibližně 3krát, u EtOH asi 6krát. Tento trend však nebyl patrný u 60% PG v H₂O. Permeační profil 60% PG v H₂O ukázal nižší hodnoty permeace TH za použití IL než bez ní (statisticky nevýznamné). Při sledování zachycení léčiva v kůži za použití IL, byly patrné rozdíly pouze u EtOH, 96% avšak výsledné hodnoty nabývaly velké variability mezi vzorky. U DIC se u žádného ze vzorků nezvýšila koncentrace prošlého léčiva kůží při použití IL, avšak retence DIC v kůži se zvýšila přibližně 5krát při aplikaci v H₂O. Tento trend byl pozorován i u EtOH 96%. Možným vysvětlením je tvorba iontových párů mezi kationtem C₈MIM a aniontem DIC. Dochází pak k zadržení léčivé látky v kůži a tvorbě depa, ze kterého se léčivo postupně uvolňuje.

Závěrem je potřeba říci, že použití IL jako akcelerantů kožní permeace je stále velmi komplexním problémem. Velkou roli hraje vzájemné působení použitých látek. Interakce mezi složkami SC, IL, léčivou látkou a médiem vyžaduje další zkoumání. Nicméně IL představují velmi slibnou skupinu molekul v ohledu transdermálního podávání léčiv.

Výsledky této práce jsou součástí publikovaného článku, který se problematikou IL zabývá z více pohledů. Článek zkoumá účinky IL na propustnost a ztrátu vody přes lipidový film s lipidy nacházející se ve SC. Zajímá se o strukturu a dynamiku jednotlivých složek SC v lipidovém modelu pomocí 2H NMR spektroskopie na pevné fázi a uspořádání lipidů pomocí rentgenové difrakce. V pokusech je využita také druhá IL 3–dodecyl-1-methylimidazolium bromid (viz publikovaný článek [52]).

6. Reference

- [1] *Epidermis (Outer Layer of Skin): Layers, Function, Structure* [online]. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21901-epidermis>
- [2] MURPHREY, Morgan B., Julia H. MIAO a Patrick M. ZITO. Histology, Stratum Corneum. *StatPearls* [online]. 2022 [vid. 2024-03-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/>
- [3] VAN SMEDEN, J., M. JANSSENS, G.S. GOORIS a J.A. BOUWSTRA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2014, **1841**(3), 295–313. ISSN 13881981. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bbalip.2013.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006)
- [4] DAS, Chinmay a Peter D. OLMSTED. The physics of stratum corneum lipid membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2016, **374**(2072), 20150126. ISSN 1364-503X. Dostupné z: [doi:10.1098/rsta.2015.0126](https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0126)
- [5] MARJUKKA SUHONEN, T, Joke A. BOUWSTRA a Arto URTTI. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *Journal of Controlled Release* [online]. 1999, **59**(2), 149–161. ISSN 01683659. Dostupné z: [doi:10.1016/S0168-3659\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00187-4)
- [6] ŽITKA JAN, PIENKA ZBYNĚK. *IONTOVÉ KAPALINY A JEJICH POLYMERNÍ ANALOGY: NOVÉ MEMBRÁNOVÉ MATERIÁLY* [online]. 2017. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017_03_192-196.pdf
- [7] NAVTI, Prerana D., Abhijeet PANDEY, Ajinkya Nitin NIKAM, Bharath Singh PADYA, Guruprasad KALTHUR, Kunnatur B. KOTESHWARA a Srinivas MUTALIK. Ionic Liquids Assisted Topical Drug Delivery for Permeation Enhancement: Formulation Strategies, Biomedical Applications, and Toxicological Perspective. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2022, **23**(5), 161. ISSN 1530-9932. Dostupné z: [doi:10.1208/s12249-022-02313-w](https://doi.org/10.1208/s12249-022-02313-w)
- [8] *Anatomie lidské kůže | Široká veřejnost - Hojení ran* [online]. [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.hojeni-ran.cz/anatomie-lidske-kuze>
- [9] *Lidská kůže » Medixa.org* [online]. [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.medixa.org/nemoci/lidska-kuze>
- [10] ČIHÁK RADOMÍR. *Anatomie*. Praha: Grada, 1997.
- [11] KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2011, **3**(4), 203–213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: [doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98](https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98)

- [12] PROF. MUDR. VLADIMÍR PALIČKA, CSc. Vitamin D: skeletální a extraskelální účinky. *Medicína pro praxi*. 2013, 199–202.
- [13] *Kůže: struktura a funkce | NZIP* [online]. [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/613-kuze-struktura-a-funkce>
- [14] *Kůže – Procvičování online – Umíme fakta* [online]. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://www.umimefakta.cz/cviceni-clovek-kuze>
- [15] *Hypodermis (Subcutaneous Tissue): Function & Structure* [online]. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21902-hypodermis-subcutaneous-tissue>
- [16] *Dermis (Middle Layer of Skin): Layers, Function & Structure* [online]. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22357-dermis>
- [17] *Epidermis | Biology for Majors II* [online]. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/epidermis/>
- [18] YOUSEF, Hani, Mandy ALHAJJ a Sandeep SHARMA. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls* [online]. 2022 [vid. 2024-03-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- [19] *zrnitá vrstva pokožky | NZIP* [online]. [vid. 2024-03-15]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/6174>
- [20] *jasná vrstva pokožky | NZIP* [online]. [vid. 2024-03-15]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/6175>
- [21] ELIAS, Peter M. Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1983, **80**(1), S44–S49. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.1983.12
- [22] KOTINGOVÁ LENKA, BORSKÁ LENKA, FIALA ZDENĚK. *TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE CHEMICKÝCH LÁTEK IN VITRO* [online]. 2009. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_533-539.pdf
- [23] LANE, Majella E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **447**(1–2), 12–21. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.040
- [24] WILLIAMS, Adrian C a Brian W BARRY. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, **56**(5), 603–618. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.10.025
- [25] HRABÁLEK ALEXANDR, DOLEŽAL PAVEL, ŠKLUBALOVÁ ZDENKA, FARSA OLDŘICH, KREBS ALEŠ. *AKCELERANTY TRANSDERMALNI PENETRACE* [online]. 1999. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_107-119.pdf

- [26] BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2001, **14**(2), 101–114. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/S0928-0987(01)00167-1
- [27] *Farmacie pro praxi: Lze překonat kožní bariéru?* [online]. [vid. 2024-03-24]. Dostupné z: https://farmaciepropraxi.cz/artkey/lek-200501-0002_Lze_prekonat_kozni_barieru.php
- [28] KOVÁČIK, Andrej, Monika KOPEČNÁ a Kateřina VÁVROVÁ. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2020, **17**(2), 145–155. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1080/17425247.2020.1713087
- [29] SINGH, Sandip K. a Anthony W. SAVOY. Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2020, **297**, 112038. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2019.112038
- [30] HAYES, Robert, Gregory G. WARR a Rob ATKIN. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chemical Reviews* [online]. 2015, **115**(13), 6357–6426. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr500411q
- [31] EGOROVA, Ksenia S., Evgeniy G. GORDEEV a Valentine P. ANANIKOV. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chemical Reviews* [online]. 2017, **117**(10), 7132–7189. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00562
- [32] AGATEMOR, Christian, Kelly N. IBSEN, Eden E. L. TANNER a Samir MITRAGOTRI. Ionic liquids for addressing unmet needs in healthcare. *Bioengineering & Translational Medicine* [online]. 2018, **3**(1), 7–25. ISSN 2380-6761. Dostupné z: doi:10.1002/btm2.10083
- [33] HANDA, Mayank, Waleed H. ALMALKI, Rahul SHUKLA, Obaid AFZAL, Abdulmalik Saleh Alfawaz ALTAMIMI, Sarwar BEG a Mahfoozur RAHMAN. Active pharmaceutical ingredients (APIs) in ionic liquids: An effective approach for API physiochemical parameter optimization. *Drug Discovery Today* [online]. 2022, **27**(9), 2415–2424. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2022.06.003
- [34] KURODA, Kosuke. A simple overview of toxicity of ionic liquids and designs of biocompatible ionic liquids. *New Journal of Chemistry* [online]. 2022, **46**(42), 20047–20052. ISSN 1144-0546. Dostupné z: doi:10.1039/D2NJ02634A
- [35] MARRUCHO, I.M., L.C. BRANCO a L.P.N. REBELO. Ionic Liquids in Pharmaceutical Applications. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [online]. 2014, **5**(1), 527–546. ISSN 1947-5438. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-chembioeng-060713-040024

- [36] MAZÁK, Károly a Béla NOSZÁL. Physicochemical Properties of Zwitterionic Drugs in Therapy. *ChemMedChem* [online]. 2020, **15**(13), 1102–1110. ISSN 1860-7179. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.202000164
- [37] HALLETT, Jason P. a Tom WELTON. Room-Temperature Ionic Liquids: Solvents for Synthesis and Catalysis. 2. *Chemical Reviews* [online]. 2011, **111**(5), 3508–3576. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr1003248
- [38] KUMAR, Sandeep, Holger A. SCHEIDT, Navleen KAUR, Tejwant Singh KANG, Gagandeep Kaur GAHLAY, Daniel HUSTER a Venus S. MITHU. Effect of the Alkyl Chain Length of Amphiphilic Ionic Liquids on the Structure and Dynamics of Model Lipid Membranes. *Langmuir* [online]. 2019, **35**(37), 12215–12223. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.9b02128
- [39] BENEDETTO, Antonio. Room-temperature ionic liquids meet bio-membranes: the state-of-the-art. *Biophysical Reviews* [online]. 2017, **9**(4), 309–320. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-017-0279-1
- [40] SHARMA, V. K. a R. MUKHOPADHYAY. Deciphering interactions of ionic liquids with biomembrane. *Biophysical Reviews* [online]. 2018, **10**(3), 721–734. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-018-0410-y
- [41] KONTRO, Inkeri, Kirsi SVEDSTRÖM, Filip DUŠA, Patrik AHVENAINEN, Suvi-Katriina RUOKONEN, Joanna WITOS a Susanne K. WIEDMER. Effects of phosphonium-based ionic liquids on phospholipid membranes studied by small-angle X-ray scattering. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 2016, **201**, 59–66. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.11.003
- [42] BINGHAM, Richard J. a Pietro BALLONE. Computational Study of Room-Temperature Ionic Liquids Interacting with a POPC Phospholipid Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2012, **116**(36), 11205–11216. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp306126q
- [43] WITOS, Joanna, Giacomo RUSSO, Suvi-Katriina RUOKONEN a Susanne K. WIEDMER. Unraveling Interactions between Ionic Liquids and Phospholipid Vesicles Using Nanoplasmonic Sensing. *Langmuir* [online]. 2017, **33**(4), 1066–1076. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.6b04359
- [44] QI, Qin M., Miya DUFFY, Alex M. CURRERI, Joel P. R. BALKARAN, Eden E. L. TANNER a Samir MITRAGOTRI. Comparison of Ionic Liquids and Chemical Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Advanced Functional Materials* [online]. 2020, **30**(45). ISSN 1616-301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.202004257
- [45] *Theophylline* | C7H8N4O2 | CID 2153 - PubChem [online]. [vid. 2024-03-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2153>

- [46] *Scopolamine* | C17H21NO4 | CID 3000322 - PubChem [online]. [vid. 2024-03-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000322>
- [47] GOH, Choon Fu a Majella E. LANE. Formulation of diclofenac for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, **473**(1–2), 607–616. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.052
- [48] *Diclofenac* | C14H11Cl2NO2 | CID 3033 - PubChem [online]. [vid. 2024-03-20]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033>
- [49] BALTAZAR, Quinner Q., Janaki CHANDAWALLA, Keahna SAWYER a Jared L. ANDERSON. Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2007, **302**(1–3), 150–156. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2007.02.012
- [50] GOODCHILD, Ian, Laura COLLIER, Sarah L. MILLAR, Ivan PROKEŠ, Jason C.D. LORD, Craig P. BUTTS, James BOWERS, John R.P. WEBSTER a Richard K. HEENAN. Structural studies of the phase, aggregation and surface behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium halide + water mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2007, **307**(2), 455–468. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2006.11.034
- [51] KOPEČNÁ, Monika, Andrej KOVÁČIK, Petr NOVÁK, Mila BONCHEVA BETTEX a Kateřina VÁVROVÁ. Transdermal Permeation and Skin Retention of Diclofenac and Etofenamate/Flufenamic Acid From Over-the-Counter Pain Relief Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **110**(6), 2517–2523. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2021.01.022
- [52] PARASKEVOPOULOS, Georgios, Ferdinand FANDREI, Ajit KUMAR PRATIHAST, Anna PARASKEVOPOULOU, Eleni PANOUTSOPOULOU, Lukáš OPÁLKA, Venus SINGH MITHU, Daniel HUSTER a Kateřina VÁVROVÁ. Effects of imidazolium ionic liquids on skin barrier lipids – Perspectives for drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2024, **659**, 449–462. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2023.12.139