

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA**  
**V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

**Formulace a (trans)dermální podání**  
**lipozomů s obsahem imiquimodu**

Vedoucí práce: PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Petr Tírala

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

Hradec Králové

Petr Tírala

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval především své školitelce PharmDr. Barboře Švecové, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady a podporu při vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu laboratoře prof. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D., dále mým přátelům a rodině za podporu a poskytnuté zázemí.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: *Petr Tírala*

Školitel: *PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.*

Název diplomové práce: *Formulace a (trans)dermální podání lipozomů s obsahem imiquimodu*

Imiquimod (IMQ), látka patřící do třídy heterocyklických imidazochinolinů, vykazuje po topickém podání významné imunomodulační účinky, čehož se využívá při léčbě různých virových a nádorových onemocnění kůže. V současnosti je v klinické praxi používán krém Aldara® s obsahem 5 % účinné látky IMQ, který je nestabilní, dráždí a po odstranění z pokožky představuje ekologickou zátěž pro životní prostředí.

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit lipozomy pro dermální podání IMQ s nižším - 1 % obsahem IMQ a pozorovat míru penetrace IMQ do lidské kůže in vitro. Byly použity různé přísady pro zlepšení vlastností lipozomů a přísady podporující průchodnost účinné látky přes kožní bariéru do hlubších vrstev kůže.

Permeační pokusy byly prováděny ve Franzových difuzních celách na lidské kůži, aby se vytvořily podmínky co nejvíce podobné fyziologickým. Množství IMQ bylo stanoveno v nejsvrchnější části kůže, v epidermis, dermis, akceptorové fázi simulující krevní oběh a okolní tkáni metodou HPLC.

Hodnocení míry penetrace IMQ do kůže probíhalo ve třech aplikačních schématech. Nejprve po osmi hodinách aplikace, dále po nanesení dvojnásobného množství lipozomů a po čtyřadvaceti hodinách působení. U všech připravovaných vzorků byly koncentrace IMQ v epidermis, jako v cílovém místě působení, vždy nižší ve srovnání s komerčně dostupným přípravkem Aldara. Koncentrace IMQ uvolněné z lipozomů však byly zároveň nižší v ostatních testovaných segmentech kůže, což je pozitivní z hlediska nežádoucích účinků.

## **Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: *Petr Tírala*

Supervisor: *PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.*

Title of thesis: *Formulation and (trans)dermal application of liposomes containing imiquimod*

Imiquimod (IMQ), a substance belonging to the class of heterocyclic imidazoquinolines, shows significant immunomodulatory effects after topical administration, which is used to treat a variety of viral and malignant diseases of the skin. IMQ is currently used in clinical practice in the form of cream Aldara® containing 5% of active substance, which is unstable and irritating and after removal from the skin IMQ poses an ecological load for the environment.

The aim of this thesis was preparation of liposomes for topical administration containing lower - 1% amount of IMQ and evaluation of penetration of IMQ into human skin in vitro. To improve the properties of liposomes and promote patency of the active ingredient through the skin barrier to the deeper skin layers various additives were used.

Permeation experiments were carried out in Franz diffusion cells on the human skin in order to create the conditions that are as physiological as possible. Amount of IMQ was determined in the uppermost layer of the skin, epidermis, dermis, acceptor phase simulating blood flow and surrounding tissue by HPLC.

The evaluation of penetration of IMQ into the skin was conducted in three application schemes. Firstly, after eight hours of application, then after use of a double amount of liposomes, and then after twenty four hours running administration. In all cases the concentrations of IMQ in epidermis as the target site of action was always lower compared with the effect of the commercially available Aldara. The concentrations of IMQ released from the liposomes, however, were also lower in other segments of the skin, which is positive from the point of view of side effects.

## Obsah

1	Úvod a cíl práce.....	8
2	Seznam zkratk.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Kožní systém.....	10
3.2	Nemelanomové kožní nádory.....	12
3.3	(Trans)dermální podání.....	14
3.4	Akceleranty transdermální penetrace.....	15
3.4.1	DDAK.....	16
3.4.2	Pro-2.....	16
3.4.3	OA.....	17
3.5	Lipozomy.....	17
3.5.1	Složení lipozomů.....	17
3.5.2	Klasifikace lipozomů.....	19
3.5.3	Postup přípravy lipozómů.....	20
3.5.4	Metody přípravy lipozomů.....	21
3.5.5	Charakterizační metody lipozomů.....	24
3.5.6	Enkapsulace léčiva do lipozomů.....	24
3.5.7	Využití lipozomů – podání na kůži.....	25
3.5.8	Zánik lipozomů.....	26
3.6	Imiquimod (IMQ).....	26
3.6.1	Využití v léčebné praxi.....	28
3.6.2	Nežádoucí účinky.....	28
4	Experimentální část.....	30
4.1	Chemikálie a rozpouštědla.....	30
4.2	Přístrojové vybavení.....	30
4.3	Příprava pufrů a extrakčního činidla.....	31
4.3.1	Příprava acetátového pufru (AcB).....	31
4.3.2	Příprava fosfátového pufru (akceptorové fáze).....	31
4.3.3	Příprava extrakčního činidla.....	32
4.4	Příprava lipozomů.....	32
4.4.1	Hledání metody.....	32
4.4.2	Hledání koncentrací.....	33
4.4.3	Efekt přídavek.....	33
4.4.4	Finálně zvolené vzorky.....	34
4.4.5	Příprava donorových vzorků pro permeační pokusy na kůži.....	34

4.4.6	Hodnocení lipozomů a vlastností donorových vzorků .....	35
4.5	Permeační pokusy .....	36
4.5.1	Kůže a Franzovy difúzní cely .....	36
4.5.2	Průběh permeace .....	37
4.5.3	Zpracování permeačních pokusů .....	37
4.6	HPLC analýza .....	40
4.6.1	Přístrojové vybavení .....	40
4.6.2	HPLC metoda .....	40
4.6.3	Mobilní fáze (HPLC) .....	40
4.6.4	Kalibrace .....	41
4.7	Analýza dat .....	41
5	Výsledky a diskuze .....	42
5.1	Hodnocení lipozomů mikroskopem a měření částic pomocí Zeta Sizeru ...	42
5.2	Permeační pokusy na kůži .....	46
5.3	Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách (100 µl vzorku) .....	47
5.3.1	Stripy SC .....	47
5.3.2	Epidermis .....	51
5.3.3	Dermis .....	53
5.3.4	Okolní tkáň .....	54
5.3.5	Akceptor .....	55
5.4	Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách (200 µl vzorku) .....	57
5.4.1	Součet stripů SC .....	57
5.4.2	Epidermis .....	58
5.4.3	Dermis .....	59
5.4.4	Okolní tkáň .....	60
5.4.5	Akceptor .....	62
5.5	Obsah IMQ v kůži po 24 hodinách (100 µl vzorku) .....	63
5.5.1	Součet stripů SC .....	63
5.5.2	Epidermis .....	64
5.5.3	Dermis .....	65
5.5.4	Okolní tkáň .....	66
5.5.5	Akceptor .....	67
6	Závěr .....	69
7	Literatura .....	70

# 1 Úvod a cíl práce

Celá řada nemocí kůže může pro daného pacienta znamenat problémy nejen zdravotní, ale i do určité míry estetické. Jedná se zvláště o různé druhy kožních novotvarů nebo výrůstků, které mohou být virového původu, nebo vzniknou následkem nádorového procesu. Tyto kožní defekty mohou být odstraněny invazivními metodami, jako je chirurgické vyříznutí, vypalování laserem či leptání. Tento typ léčby není zcela jistě pro pacienta příjemný, obzvláště pokud se tyto onemocnění nacházejí na citlivých místech, jako je třeba obličej.

Přínosem v terapii zmíněných onemocnění se stalo objevení topických imunomodulátorů, které po zformulování do vhodné lékové formy zajišťují optimální dermální aplikaci na postižená místa. Největší zastoupení a potenciál má třída heterocyklických imidazochinolinů, v čele s imiquimodem (IMQ) a jeho dalšími homology, jako jsou resiquimod a gardiquimod. Tyto nově vyvinuté způsoby topické imunoterapie poskytují pro pacienty pohodlnější a přijatelnější způsob terapie kožních virových infekcí a nemelanomových kožních novotvarů.

Kůže tvoří přirozenou bariéru proti vstupu cizorodých látek do těla, tudíž je potřebné najít vhodnou formulaci léčiva určenou k dermálnímu podání, aby byla zajištěna přítomnost optimálního množství imunomodulátoru v místě jeho účinku, která přinese co největší užitek z léčby a zároveň co nejmenší výskyt nežádoucích účinků.

Cílem této práce bylo připravit nové lipozomy k topickému podání s nižším (1 %) obsahem IMQ, než na trhu dostupný krém Aldara® (5 % IMQ), a porovnat pomocí permeačních pokusů na lidské kůži míru průniku IMQ do jednotlivých segmentů kůže. Příprava lipozomů zahrnovala hledání jejich optimálního složení zahrnující mj. akceleranty transdermální penetrace, dále nalezení vhodné metody a také hodnocení vlastností lipozomů. V permeačních pokusech na kůži byl sledován vliv dávky a délky aplikace připravených lipozomů ve srovnání s přípravkem Aldara.



## 2 Seznam zkratek

AcB	acetátový pufr
AFM	mikroskopie atomárních sil
CLSM	konfokální laserovou skenovací mikroskopie
DDAIP	dodecylester kyseliny <i>N, N</i> -dimethyl-2-aminopropanové
DDAK	dodecylester kyseliny <i>N, N</i> -dimethyl-6-aminohexanové
ESEM	environmentální rastrovací elektronové mikroskopie
CHS	cholesteryl-hemisukcinát
IMQ	imiquimod
LUV	velké unilamelární vesikuly
MLV	multilamelární vesikuly
MVV	multivesikulární vesikuly
OA	kyselina olejová
Pro-2	dodecylester <i>N</i> -acetylprolinu
SC	stratum corneum
SUV	malé unilamelární vesikuly
TEM	transmisní elektronové mikroskopie
UV	ultrafialové záření

## 3 Teoretická část

### 3.1 Kožní systém

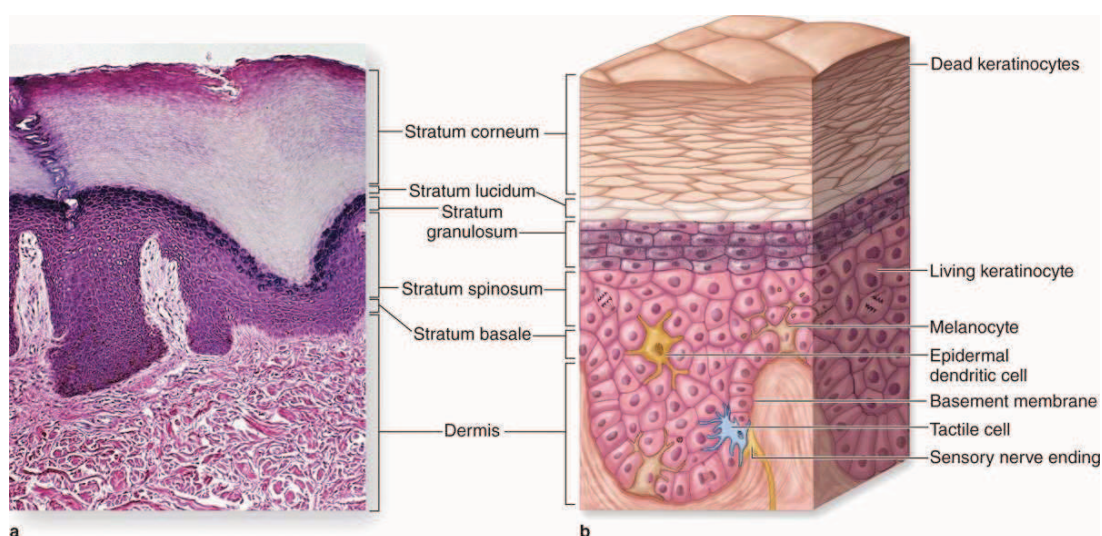
Kůže je rozsáhlý plošný orgán tvořící vnější část lidského organismu a chrání ho před vnějším prostředím. Jde o největší orgán těla, jeho plocha má rozsah okolo 2 m<sup>2</sup> (1,6-2,2 m<sup>2</sup>). Tloušťka naší kůže se odvíjí od toho, na jaké části těla je lokalizovaná, a vzhledem k tomu se pohybuje v rozmezí 1,5 – 4 mm. Tloušťka kůže také závisí na stáří člověka a jeho stravovacích zvyklostech.<sup>1,2</sup>

Kůže má mimo jiné funkci ochrannou a senzickou. Chrání nás jako mechanická bariéra vůči vnějším fyzikálním vlivům, jako např. teplota, záření a vlhkost, tvoří chemickou ochranu před cizorodými sloučeninami, a brání nás proti působení biologických vlivů, tj. mikroby, viry, houby. Díky senzické schopnosti můžeme vnímat bolest, tlak, změnu teploty. Má termoregulační schopnost, kdy reaguje na změny teploty pocením či změnou průtoku krve v řečišti. Další funkce jsou resorpční, regenerační, termoizolační, tvorba vitamínu D, exkreační a reakce na vnější vlivy prostředí např. imunologickými pochody či emočními projevy (zčervenání).<sup>1,2</sup>

Kůže je složena ze tří hlavních vrstev. Nejsvrchnější částí je pokožka (epidermis), pod ní je škára (dermis, corium) a nejhluběji je uloženo podkožní vazivo (tela subcutanea, hypodermis).<sup>3</sup>

Epidermis je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který směrem k povrchu rohovatí. V nejspodnější vrstvě epidermis, stratum basale, vznikají mitotickým dělením epidermální buňky - keratinocyty, které se posouvají z nejspodnější vrstvy pokožky směrem nahoru, kde rohovatí a potom odumírají a odlupují se. Tento proces se nazývá keratinizace. Díky tomuto procesu vznikají směrem nahoru na sebe další navazující vrstvy (*obr. č. 1*), jako jsou stratum spinosum, která se spolu se stratum basale označuje společným názvem stratum germinativum, dále to jsou stratum granulosum, stratum lucidum a nejsvrchnější stratum corneum (SC). Směrem nahoru se buňky postupně oplošťují, až ve SC jsou

zcela zploštělé, bez jader a vody, nazývající se korneocyty. Tyto buňky tvoří 18-20 vrstev, v závislosti na anatomické poloze na těle, a spolu s lipidovým tmelem vyplněným mezi jednotlivými korneocyty vytvářejí SC, která má rozhodující vliv na bariérové vlastnosti kůže. Strukturální uspořádání korneocytů a mezibuněčné lipidové vrstvy můžeme připodobnit k cihlám a maltě ve spárách. Korneocyty obsahují především proteiny (keratin) a jsou nerozpustné a odolné vůči chemickým vlivům. Lipidy v mezibuněčných prostorech vytvářejí lamely, které jsou složeny z několika dvojvrstev. Složkami lamel jsou zejména ceramidy, dále cholesterol a jeho deriváty a volné mastné kyseliny.<sup>1,2,4,5,6</sup>



**Obr. č. 1:** Stavba kůže s detailním zobrazením vrstev epidermis.<sup>7</sup>

Kromě keratinocytů jsou součástí epidermis i další funkčně specializované buňky. Melanocyty jsou zodpovědné za vznik melaninu, který má vliv na pigmentaci kůže. Merkelovy buňky jsou propojené s volnými nervovými zakončeními a podílí se na smyslovém vnímání kůže, jako mechanoreceptory. Langerhansovy buňky hrají velkou roli v imunitních procesech kůže.<sup>2,4,8</sup>

Prostřední vrstvou kůže je škára neboli dermis. Jedná se o pojivovou tkáň složenou z kolagenních a elastických vláken, fibroblastů a extracelulární matrix. Tloušťka dermis je 0,5 – 2,5 mm, její funkcí je zajišťovat pevnost a pružnost kůže. Škára je složena ze dvou vrstev. Svrchnější část je stratum papillare, která v papilách vybíhá do epidermis, je tvořena zejména buňkami a řídkým vazivem. Četnost

a výška papil se odvíjí od lokalizace na těle, papily slouží k výživě epidermis a jejímu ukotvení. Nachází se zde žírné buňky, fibroblasty a četné makrofágy. Žírná buňka (mastocyt) má ve svých zrnitých váčcích uložený heparin a histamin. Aktivace buňky a uvolnění těchto látek dochází při styku s antigenem nebo prostřednictvím Toll-like receptorů, svoji funkci mají při alergických a zánětlivých procesech. Hlubší vrstva škáry je stratum reticulare. Tato vrstva obsahuje vyšší hustotu kolagenních vláken tvořící trojrozměrnou síť, která je propletena elastickými vlákny. V dermis jsou přítomné krevní a lymfatické cévy a také nervy.<sup>1,2,9</sup>

Tloušťka podkožní vaziva, jako nejspodnější části kůže, dosahuje až několika centimetrů. Její základ je tvořen řídkým, tuhým vazivem, tukovými buňkami cévy a nervy. Tuhé vazivo (retinacula cutis) připojuje kůži k periostu kostí nebo k fascii svalů. Podkožní tuk tvoří zásobárnu energie. Hypodermis chrání vnitřní části těla proti teplotním výkyvům, mechanickému poškození a umožňuje pohyblivost kůže vůči vnitřním strukturám.<sup>1,2,4</sup>

Součástí kůže jsou útvary (nehty, chlupy, kožní žlázy), které označujeme jako kožní deriváty. Vlasy a chlupy, keratinované kožní adnexa, vyrůstají z vchlípenin epidermis nazývajících se vlasové folikuly, které se nacházejí ve škáře. Na ně jsou napojeny kožní žlázy produkující kožní maz, které zvláčňují kůži a chrání vlasy a kůži před vysycháním. Mimo jiné existují i potní či mléčné žlázy. Nehty je zrohovatělá ploténka nacházející se na všech konečných člancích prstů. Zlepšuje hmatovou funkci polštářku prstu a na základě neobvyklého zbarvení plochy nehtu můžeme přisoudit metabolickou poruchu nebo infekční onemocnění organismu.<sup>1</sup>

### **3.2 Nemelanomové kožní nádory**

Tyto kožní nádory vycházejí z keratinocytů v epidermis kůže. Řadíme sem aktinickou keratózu (prekancerózní stav), bazaliom (bazocelulární karcinom) a spinaliom (spinocelulární karcinom). Jedná se o semimaligní nádory, jelikož se může jednat o zhoubné nádory, avšak metastázy se objevují u těchto nádorů jen zřídka. Incidence těchto karcinomů v posledních letech narůstá. Jako rizikový faktor se považuje světlý fototyp kůže, který je málo pigmentovaný a snadněji podlehne spálení na slunci. Sluneční ultrafialové [UV resp. UVB (290-320 nm)]

záření představuje nejvyšší riziko pro vznik těchto malignit. Nežádoucí je častý výskyt na slunci a opakované spálení pokožky. Za ohrožená považujeme ta místa, která jsou vystavena slunečnímu záření nejvíce, tj. obličej, hřbet ruky a předloktí, uši a také pleš. Imunosupresivní léčba transplantovaných pacientů může mít za následek vzrůstající výskyt kožních nádorů u této skupiny nemocných. U těchto pacientů se výskyt kožních karcinomů exponenciálně zvyšuje s dobou po transplantaci, spinocelulární karcinom je až 250× častější, bazocelulární karcinom 10× a melanom je 4× častější než u netransplantovaných pacientů.<sup>10,11,12</sup>

Vzniku kožního nádorového onemocnění může předcházet ohraničená, olupující se erytematózní léze, většinou do velikosti 1 cm, nazývaná se aktinická keratóza. Tato prekancerózní, červeně až hnědě zbarvená skvrnka s drsným povrchem se zpravidla objevuje na místech, které jsou často během života vystavované slunci. Postižen bývá obvykle obličej, ušní boltce, nebo bezvlasá kůže temena bezvlasých mužů. Vzniká při dlouhodobé expozici UV záření, kdy dochází k poškození genetického materiálu a potlačení imunologického dohledu nad keratinocyty v basální vrstvě, které se přeměňují v atypické (anaplastické) buňky. Tyto cytologicky atypické buňky se projevují hyperproliferační a ztrátou apoptózy. Většina případů aktinické keratózy jsou benigní nebo nekancerózní léze, které mohou vymizet nebo zůstat několik let beze změn, avšak v 8-20% se může přeměnit v invazivní spinocelulární karcinom. Riziko progresu aktinické keratózy v spinaliom narůstá s jejich počtem. Dochází k tomu průnikem atypických keratinocytů z epidermis do škýry a oddělením samostatných hnízd keratinocytů od epidermis.<sup>13,14,15</sup>

Spinaliom je tumor keratinocytů epidermis, který vzniká expozicí UV záření výše popsaným způsobem. Může vzniknout nově, nebo transformací aktinické keratózy. Spinaliom zahrnuje celou tloušťku epidermis bez prorůstání do dermis. Léze se projevují jako růžově červené keratotické papule nebo plaky. V některých případech mohou nádorové buňky proniknout hlouběji a nádor může tvořit metastázy lymfatickými cestami do uzlin, případně do dalších orgánů, např. plíce.<sup>11,12</sup>

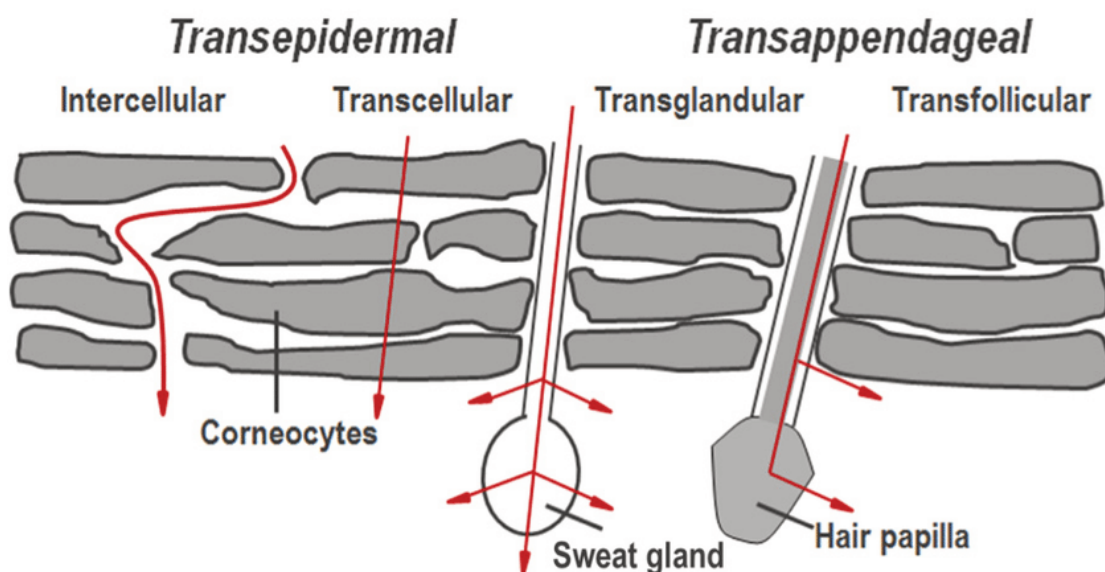
Bazalion je nádor vznikající z buněk keratinocytů umístěných ve stratum basale epidermis nebo z folikulárních struktur. K nekontrolované tvorbě

abnormálních buněk přispívá také UVB záření. Tento typ nádoru se vyznačuje pomalým lokálně invazivním a destruktivním růstem bez sklonu k metastazování. Tento nejčastěji se vyskytující kožní karcinom nejvíce postihuje kůži v oblasti hlavy a horní části trupu. Pokročilé nádory můžou destruovat okolní tkáň, což může mít za následek poškození nervů při perineurálním šíření, nebo v případě výskytu na obličeji může dojít k poškození zraku. Úmrtí na bazalion je považováno za opravdu výjimečné, prognóza je velmi nadějná, pokud je řádně léčen.<sup>11,12,16</sup>

### 3.3 (Trans)dermální podání

Kůže je významným místem pro aplikaci léčiv pro dosažení systémových či lokálních účinků. Při transdermálním podání proniká léčivo do systémové cirkulace, jedná se o permeaci léčiva přes kůži. Při dermálním podání léčivo účinkuje v kůži, nedostává se do systémové cirkulace, jde o penetraci neboli průnik léčiva do kůže. Hlavní překážkou pro přechod xenobiotik je SC v epidermis kůže, která je mimořádně odolná vůči chemickým a fyzikálním vlivům. Přesto lze tuto překážku překonat několika způsoby.<sup>17</sup>

Léčiva mohou pronikat potními žlázami, mazovými žlázami, transfolikulárně, intracelulárně (transcelulárně) nebo intercelulárně (*obr. č. 2*). Potní žlázou pronikají spíše hydrofilní léčiva, naopak mazovými žlázami a transfolikulárně zase spíše více lipofilní látky, které se mohou v blízkosti těchto žlázek kumulovat. Transcelulární přechod přes korneocyty může být usnadněn zvýšením množství vody ve SC. Korneocyty obsahují hydrofilní aminokyseliny, které umí vázat vodu. Při přestupu vody dovnitř buněk dochází k bobtnání a částečnému porušení integrity SC. Nejlépe uskutečňovaný je přechod intercelulární, u kterého léčivo proniká mezi korneocyty. Pro zlepšení průniku tímto způsobem můžou být použity ve SC působící akceleranty transdermální penetrace, které díky své lipofilitě a polaritě proniknou do prostor intercelulární lipidové matrix a způsobí dezorganizaci lipidů. Díky tomuto jsou náchylnější na hydrataci a tímto se poruší uspořádaná struktura lipidů, která je potom lépe prostupnější pro cizorodé látky.<sup>5,17,18</sup>



**Obr. č. 2:** Přechod léčiv přes SC.<sup>19</sup>

Průnik léčiva kůží ovlivňují různé faktory. Závisí to na vlastnostech, struktuře a typu kůže. Dále má vliv anatomické umístění kůže na těle, onemocnění či poškození kůže. Absorpce léčiva se odvíjí od koncentrace dané látky a plochy, na které bylo aplikováno. Fyzikálně chemické vlastnosti účinné látky mají také vliv na přechod kůží. Nejlépe pronikají spíše látky lipofilního charakteru ( $\log P$  1-3), s menší molekulou a nízkým bodem tání.<sup>18,20</sup>

### 3.4 Akceleranty transdermální penetrace

Tyto látky způsobují reverzibilní snížení bariérových vlastností kůže bez poškození životaschopných buněk a umožňují lepší průnik léčiv do kůže nebo přechod přes kůži. Akcelerant (neboli enhancer) by měl být kompatibilní s účinnou látkou a s dalšími složkami léčivého přípravku. Neměl by být toxický, dráždivý a nesmí vyvíjet vlastní farmakologický účinek. Účinky enhancerů by měly být dočasné, jednosměrné, tzn., měly by propouštět látky jen do těla, ne obráceně, neměly být náročné na výrobu a moc nákladné.<sup>17</sup>

Jelikož se jedná o chemicky velmi různorodou skupinu látek, tak se soudí, že jejich účinek je založen na nespecifických interakcích se strukturami kůže. Předpokládá se, že jejich působení může probíhat následujícími způsoby. Jejich

účinek může být založený na rozrušení intercelulární lipidové hmoty ve SC, tím se poruší její integrita a pro xenobiotika se stane lépe průchodnější. Některé akceleranty interagují s proteinem keratinem obsaženým v koreocytech, kdy dochází k ovlivnění jeho konformace či jeho denaturace a následuje nabobtnání buněk a tím se poruší struktura SC a stane se snadněji průchozí pro cizorodé látky. Mezi zástupce akceleraantů patří alkoholy, alkylsulfoxidy, azony, dioly, acetaly, estery mastných kyselin, amidy kyselin, aminokyseliny a jejich deriváty.<sup>17,18</sup>

#### **3.4.1 Dodecylester kyseliny *N, N*-dimethyl-6-aminohexanové (DDAK)**

Jedná se o účinný a biologicky odbouratelný akceleraant, který byl syntetizován kombinací dvou známých akceleraantů. Jedná se o dodecyl ester kyseliny 2-(dimethylamino)propanové (DDAIP), ze kterého převzal ionizovatelnou dimethylamino polární hlavu a Transkarbam 12, ze kterého byl převzat spojovací řetězec s 5 atomy uhlíku nacházející se mezi atomem dusíku a esterovým karbonylem. Rozdíl mezi DDAK a DDAIP se nachází ve spojovací skupině, kterou má DDAK nerozvětvenou o počtu pěti uhlíkových atomů, zatímco DDAIP má rozvětvenou spojovací skupinu. Při srovnání aktivity těchto dvou enhancerů bylo zjištěno, že DDAK vykazuje lepší účinnost pro theofylin, hydrokortison a adefovir než DDAIP. Bylo vysledováno, že DDAK je celkem rychle štěpen esterázou ( $t_{1/2} = 17$  min) a jeho účinek je reverzibilní (4 hodiny po ukončení aplikace DDAK se elektrická impedance kůže vrátila na hodnoty pozorované u kontroly). Při zkouškách toxicity nebyly zaznamenány žádné kožní alergické reakce ani jiné projevy akutní kožní toxicity, pokud byly dodrženy terapeutické dávky (1%).<sup>21,22</sup>

#### **3.4.2 Dodecylester *N*-acetylprolinu (Pro-2)**

Tento typ akceleraantu z kategorie derivátů aminokyselin (prolinu) v 1% koncentraci dosáhl až 40 krát zvýšení propustnosti než standardní enhancery. Je vhodný pro látky hydrofilního i lipofilního typu. Prolin jedná synergicky s propylenglykolem. Na základě infračervených studií bylo prokázáno, že působí na lipidy ve SC a nemá žádné významnější účinky na proteiny. Metodou elektrické impedance kůže bylo změřeno, že jeho účinek je částečně reverzibilní. Toxicita



v keratinocytech a fibroblastech, při porovnání s ostatními standardními akceleranty nevykazovala výrazně odlišné hodnoty. Prolin se díky biologické degradovatelnosti esterové vazby v plazmě rychle rozkládá, tudíž riziko systémové expozice je velmi nízké.<sup>23</sup>

### 3.4.3 Kyselina olejová (OA)

Akcelerant ze skupiny mastných kyselin dokáže díky své *cis*-konfiguraci interagovat se strukturou lipidových domén ve SC a rozrušovat jejich strukturu. Díky tomuto se u těchto lipidových struktur zvyšuje fluidita.<sup>17,18</sup>

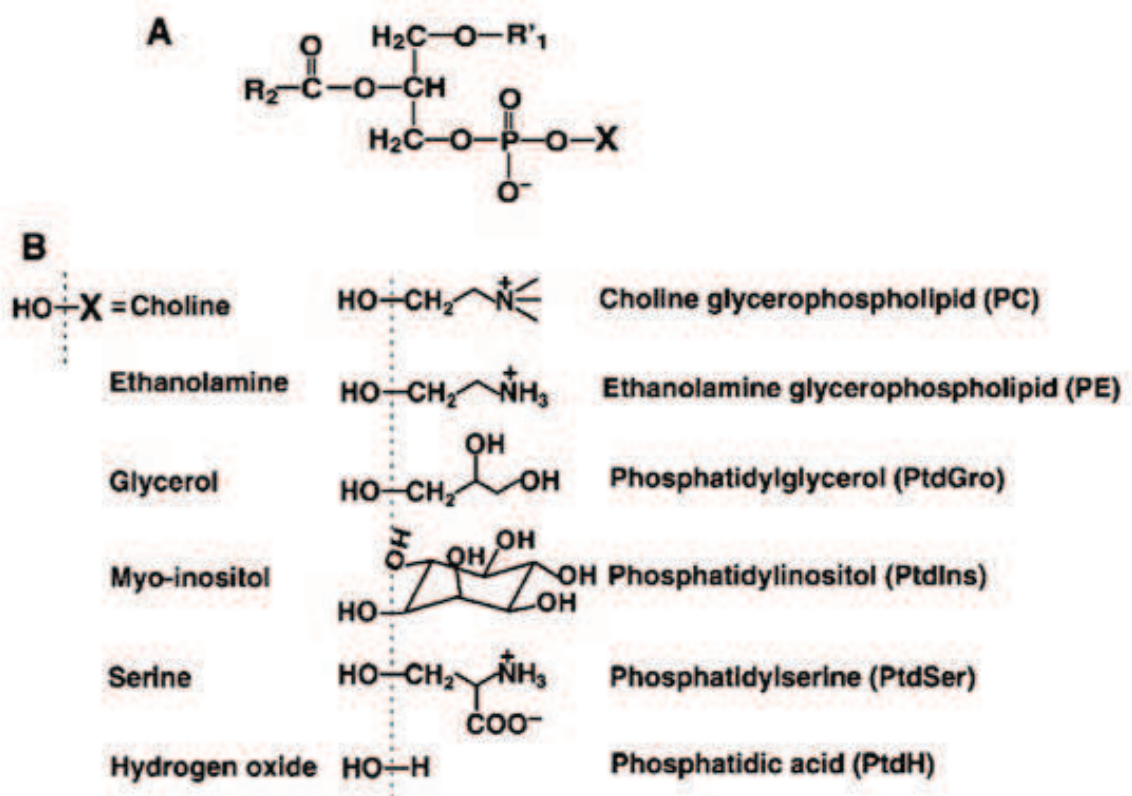
## 3.5 Lipozomy

Lipozomy jsou sférické lipidové vezikuly tvořené nejčastěji dvojvrstvou fosfolipidů, kdy hydrofobní konce směřují proti sobě a hydrofilní směrem ven a dovnitř lipozomu. K tomuto uspořádání dochází na základě amfifilních vlastností fosfolipidů a jejich samoagregační schopnosti ve vodném prostředí. Fosfolipidová dvojvrstva o tloušťce 5 nm tak odděluje vnitřní hydrofilní prostor od vnější vodné fáze. Velikost lipozomu se pohybuje od 30 nm do několika mikrometrů.<sup>24</sup>

### 3.5.1 Složení lipozomů

Mimo fosfolipidů mohou lipozomové membrány obsahovat také sfingolipidy, cholesterol a membránové proteiny. Fosfolipidy jsou z hlediska chemické struktury odvozené od triacylglycerolů. Základ tvoří glycerol, na kterém jsou navázané pomocí esterové vazby dva řetězce mastných kyselin tvořící hydrofobní „ocásek“ a hydrofilní „hlavička“ je tvořena fosfátovou skupinou navázanou na zbylé hydroxylové skupině glycerolu, na které může být v případě fosfatidylcholinu navázaný ještě cholin. Fosfatidylcholin může být jak přírodního, tak syntetického původu. Přírodní se získává ze sojových bobů nebo vaječného žloutku. Mezi základní typy fosfolipidů patří fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglycerol, kyselina fosfatidová, fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin (*obr. č. 3*). Pro přípravu lipozomů jsou nejvíce využívány poslední dva zmíněné. Přírodní fosfolipidy jsou méně stabilní než syntetické, které mohou být připraveny právě z těchto přírodních. Díky modifikaci struktury můžeme získat fosfolipidy

optimálních vlastností. Jako příklady syntetických fosfolipidů jsou dipalmitoylfosfatidylcholinu, dimyristoylfosfatidylcholinu, distearoylfosfatidylcholinofosfatidylcholinu.<sup>24,25</sup>

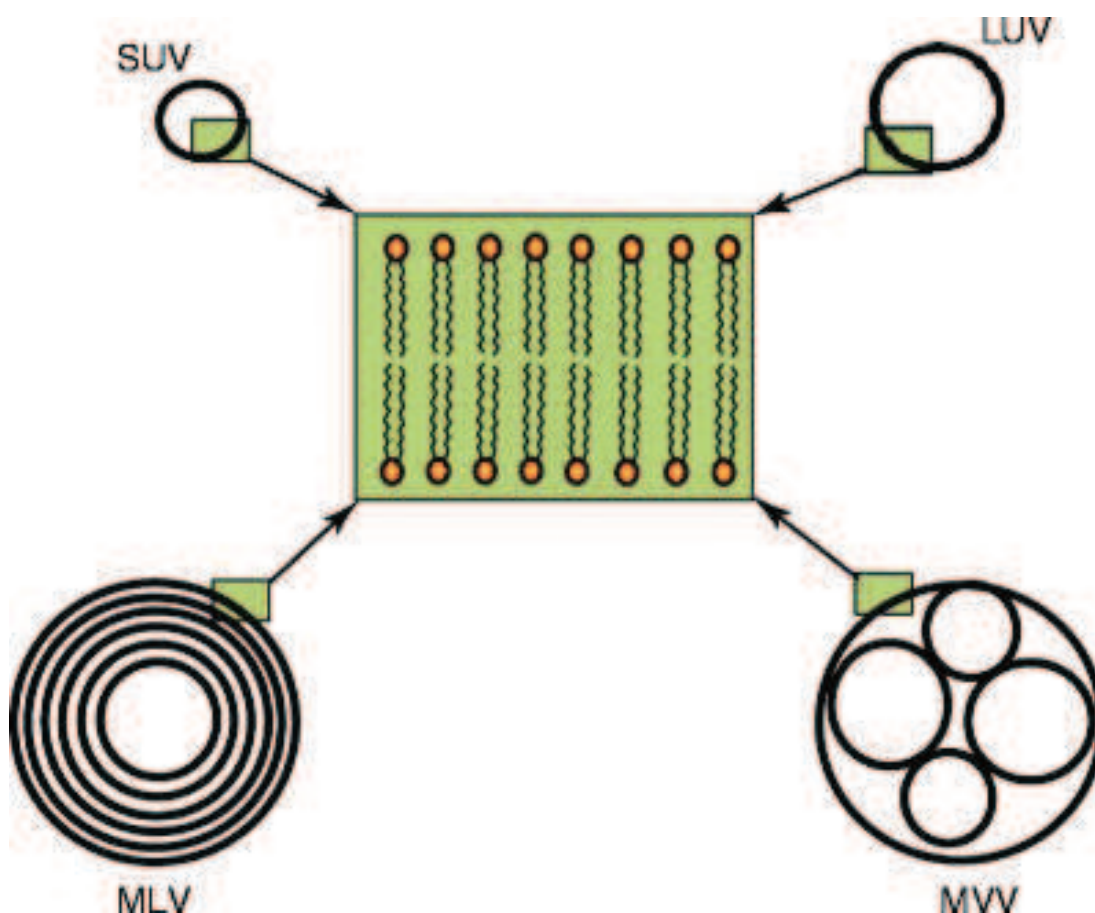


*Obr. č. 3: Glycerolfosfolipidy.*<sup>26</sup>

Cholesterol se běžně používá v kombinaci s fosfolipidy, protože může vytvořit lipozomové membrány pevnější. Stabilizuje strukturu fosfolipidových dvojvrstev, a tudíž se sníží permeabilita těchto membrán. Je vhodný pro stabilizaci a udržení bioaktivní látky uvnitř lipozomů, tento účinek může klesat s rostoucí teplotou. Bylo experimentálně zjištěno, že protonová forma cholesteryl-hemisukcinátu (CHS), který je komerčně dostupným detergentem, napodobuje svými vlastnostmi membránový cholesterol. Jeho užitečnost se projevuje jako významný stabilizátor membrán při přípravě lipozomů. Mechanismus stabilizace není zcela objasněn, předpokládá se, že snižuje pohyblivost acylových řetězců a tím pádem i fluiditu membrány.<sup>25,27</sup> Potážením lipozomů s hydrofilními polymery, jako je polyethylenglykol, změní své povrchové vlastnosti. Polyethylenglykolové řetězce na povrchu lipidových membrán poskytují stericou bariéru, která zabraňuje adsorpci bílkovin na povrch lipozomu.<sup>25</sup>

### 3.5.2 Klasifikace lipozomů

Lipozomy rozdělujeme podle velikosti a počtu dvojvrstev do následujících kategorií (obr. č. 4). Na základě počtu fosfolipidových dvojvrstev je dělíme na multilamelární vesikuly (MLV, multilamellar vesicles) a unilamelární vesikuly, které se dělí dále podle velikosti na malé unilamelární vesikuly (SUV, small unilamellar vesicles) a velké unilamelární vesikuly (LUV, large unilamellar vesicles). Už podle názvu lze soudit, že MLV se skládají z více soustředných fosfolipidových dvojvrstev separovaných od sebe malým množstvím vody, kdežto unilamelární vesikuly mají jednu lipidovou dvojvrstvu. Existuje ještě jeden typ, který se označuje jako multivesikulární vesikuly (MVV), kde je v jedné větší vezikule zapouzdřeno více menších.<sup>24,25</sup>



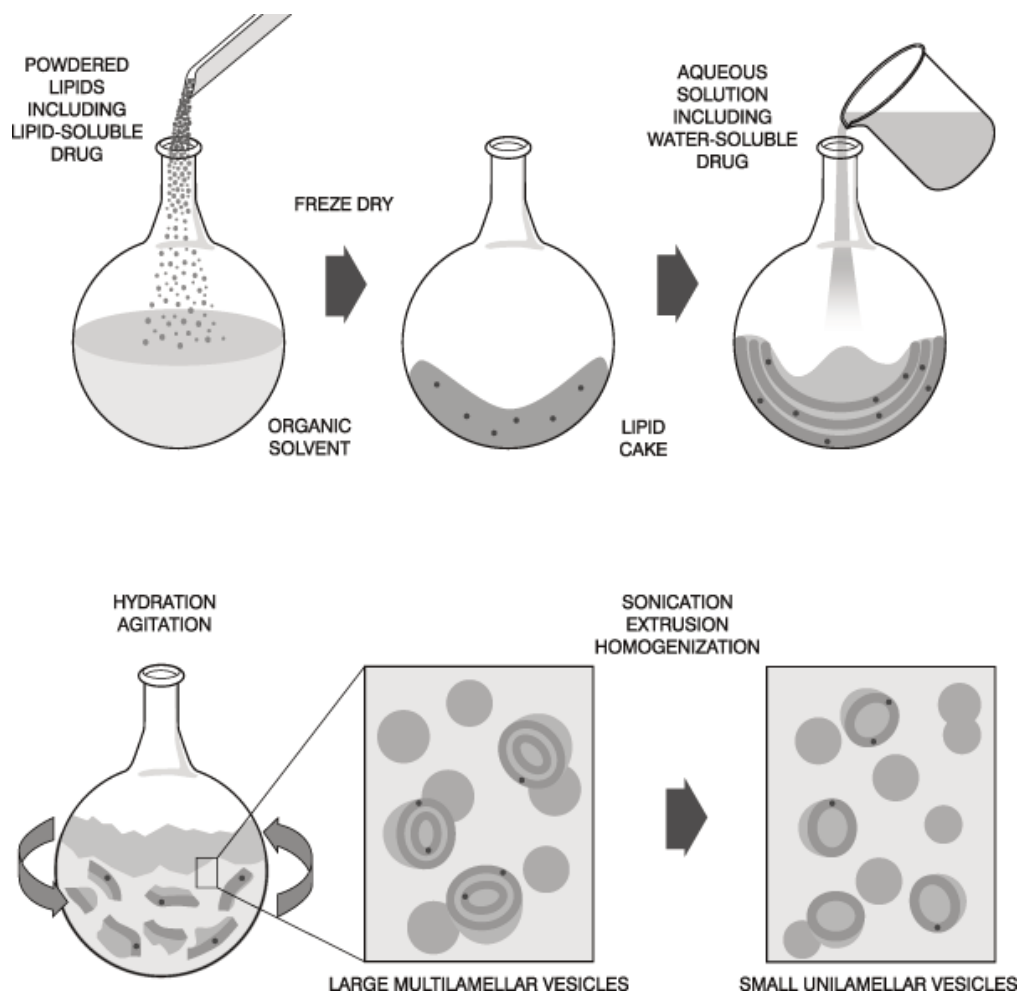
*Obr. č. 4: Schematické znázornění struktury lipozomů.<sup>28</sup>*

Velikostně se MLV pohybují v rozmezí 100–1000 nm a díky tomu, že hydrofilní léčivo zapouzdřené do tohoto typu lipozomu se nachází mezi jednotlivými dvojvrstevy ve vodné fázi, může dojít k postupnému, či zpožděnému uvolnění léčiva z vezikuly. SUV mají velké zakřivení membrány, ze kterého plyne vysoké membránové napětí. Jejich průměrná velikost je < 50nm a mají malý vnitřní vodný prostor, tudíž je zde omezena enkapsulace hydrofilních léčiv. LUV se vyznačují větší velikostí (> 50 nm) a tím pádem větším obsahem vody ve vnitřním prostoru lipozomu, proto jsou výhodným nosičem pro hydrofilní látky.<sup>24,25,29</sup>

### 3.5.3 Postup přípravy lipozómů

Posup přípravy lipozomů zahrnují tyto základní fáze (*obr. č. 5*): příprava lipidů (I), hydratace lipidů (II), vlastní proces vytváření lipozomů (III) a jejich velikostní charakterizace (IV). Existuje mnoho metod přípravy lipozomů, můžou být různě časově a finančně náročné.<sup>25</sup>

V prvním kroku (I) se vytvoří tenký lipidový film. Lipidy se rozpustí a smísí v organickém rozpouštědle, kde získáme roztok homogenní směsi lipidů. Jako rozpouštědla se mohou použít chloroform, směs chloroformu a methanolu, ether, cyklohexan nebo terciární butanol. Po důkladném promíchání a homogenizaci lipidů se odstraní organické rozpouštědlo. Při menších objemech rozpouštědla může být použit na odpaření rozpouštědla argon či suchý dusík. Při větších objemech rozpouštědla se odpaří za sníženého tlaku pomocí rotační odparky. Vzniklý lipidový film se dále hydratuje vhodným médiem (II). Jako hydratační média může být použita destilovaná voda, pufr, nebo fyziologický roztok. Nahydratováním vzniknou multilamelární lipozomy (MLV), jejichž velikost může být následnou sonikací nebo extruzí (III) snížena.<sup>30</sup>



**Obr. č. 5: Příprava lipozomů.<sup>31</sup>**

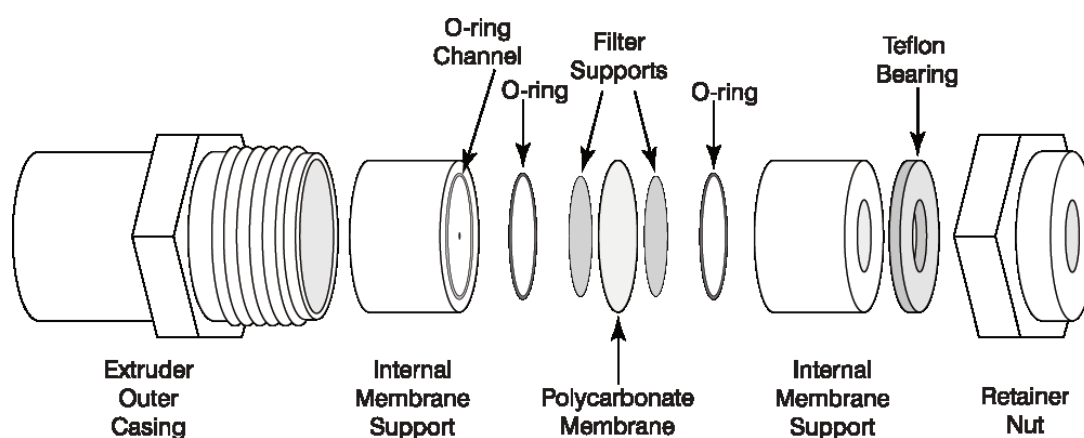
### 3.5.4 Metody přípravy lipozomů

#### 3.5.4.1 Sonikace

Pro doclení SUV lipozomů můžeme zvolit metodu sonikace, kdy rozrušíme suspenzi MLV lipozomů pomocí zvukové energie. Ultrazvukové vlny mohou být příslušnými zařízeními vysílány různými způsoby. Jednou z možností je ponoření hrotu sondy sonikátoru do lipidové suspenze. Tento způsob přináší řadu nevýhod, jako například zvýšený vstup energie do lipidové suspenze způsobí její zahřívání, tudíž je potřeba tuto teplotu regulovat. Přehřívání se lipidové směsi může zapříčinit degradaci lipozomů či jejich složek. Dále může dojít k znečištění vlivem uvolňování se částic titanu ze sondy ultrazvuku, které je pak obtížné odstranit. Proto je lepší zvolit ultrazvukovou vodní lázeň, v níž je lipidová disperze chráněna sklem baňky.<sup>30,32</sup>

### 3.5.4.2 Extruze

SUV lipozomy lze získat dalším způsobem nazývaným se extruze. Jedná se o techniku, kdy dochází ke vzniku lipozomů určité velikosti protlačením hydratované lipidové směsi přes polykarbonátový filtr, který má definovanou velikost pórů. Používám se k tomu nástroj zvaný extruder (*obr. č. 6*). Pro lepší účinnost může být MLV suspenze rozrušena střídáním několika cyklů zamražení a rozmražení. Dle toho jaký byl zvolen filtr, můžou být připraveny lipozomy o různé velikosti, avšak při zhotovování SUV lipozomů je příprava limitována tlakem, který musí být použit, aby byl materiál protlačen membránou.<sup>25,28,32</sup>



*Obr. č. 6: Schematické znázornění extruderu.<sup>33</sup>*

### 3.5.4.3 Metoda ethanolové injekce

Lipidy se nejprve rozpustí v ethanolu, který se pak vpraví do přebytku roztoku pufru. Vytváří se nejčastěji SUV, ale mohou vzniknout i větší lipozomy, obvykle vznikne heterogenní směs lipozomů. Nevýhodou této metody je obtížné odstranění ethanolu.<sup>25</sup>

### 3.5.4.4 Metoda etherové injekce

Roztok lipidů vzniklý jejich rozpuštěním v diethyletheru, nebo ve směsi etheru s methanolem se postupně vstříkuje do vodného roztoku, který obsahuje materiál, který má být zapouzdřen. Tento děj se odehrává při teplotě 55 °C až 65 °C, nebo za sníženého tlaku. Následným odstraněním etheru ve vakuu dojde k vytvoření lipozomů. Nevýhoda této techniky je, že vede ke vzniku poměrně heterogenní skupiny lipozomů (70 až 200 nm).<sup>29</sup>

#### **3.5.4.5 Odpařování reverzní fáze**

V této metodě se lipozomy vytvoří v emulzi voda v oleji na principu vzniku obrácených micel. Fosfolipidy se nejprve rozpustí v nadbytku organické fáze, která se v dalším kroku odpaří a vznikne tenký lipidový film. Tento film se znovu resuspenduje přidáním diethyleteru a následným přidáním vodné fáze, do které jsou přidány molekuly, které mají být zapouzdřeny. Pomocí ultrazvuku se vytvoří homogenní fáze a pomalým odpařováním organického rozpouštědla na rotační vakuové odparce vznikne gelová fáze s LUV. Přebytek fosfolipidů v prostředí zajistí dotvoření dvojvrstvy kolem invertních micel a vzniknou lipozomy. Výhodou této metody je vysoká enkapsulační účinnost, dokáže se zapouzdřit až 80% makromolekul.<sup>25,28,34</sup>

#### **3.5.4.6 Elektroformace lipozomů**

Při tomto způsobu se fosfolipidový film uloží pod elektrody a následně je hydratován několik hodin v přítomnosti elektrického pole. Bylo zjištěno, že použití střídavého proudu je pro tuto metodu výhodnější. Až 80% vzniklých lipidových váčků je unilamelární a bez vad.<sup>32</sup>

#### **3.5.4.7 Hydratace prolipozomů**

Prolipozomy jsou ve formě stabilního, suchého, volně tekoucího granulátu obsahující fosfolipid a léčivo. Vytvoří se odstraněním organického roztoku, ve kterém je rozpuštěno léčivo a fosfolipidy. Odstranění tohoto rozpouštědla může být provedeno v rotační vakuové odparce, nebo v rozprašovací sušárně. Pokud se tyto prolipozomy dispergují ve vodné fázi, vzniknou MLV.<sup>32</sup>

#### **3.5.4.8 Detergentová metoda**

Detergenty při jejich kritické micelární koncentraci se použijí k solubilizaci lipidového filmu ve vodné fázi za vzniku micel. Tento detergent může být potom odstraněn pomocí dialýzy, gelové filtrace, gelové ultrafiltrace za konstantního objemu, nebo adsorbci na vhodný nosič. Vzniklé micely se začnou postupně zvětšovat a tvořit vesikuly.<sup>29,35</sup>

### 3.5.5 Charakterizační metody lipozomů

Jedná se o proces, který zajišťuje stanovení adekvátní kvality lipozomů. Mezi hlavní vlastnosti, které se hodnotí u lipozomů patří střední průměr, index polydisperzity, účinnost zapouzdření, poměr fosfolipidů na koncentraci léčiva a stanovení lamelarity.<sup>25</sup>

Pro potenciální terapeutickou aplikaci lipozomů patří mezi důležité parametry jejich průměrná velikost a distribuční velikost. Malé lipozomy mohou v těle obíhat delší dobu, naopak velké jsou hned zlikvidovány makrofágy. Používají se mikroskopické techniky, jako je například mikroskopie atomárních sil (AFM), environmentální rastrovací elektronové mikroskopie (ESEM), transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a konfokální laserovou skenovací mikroskopie (CLSM). Tyto techniky poskytují informace o tvaru a morfologii (AFM a TEM), rozměrech (AFM, ESEM, TEM a CLSM), povrchových vlastnostech (AFM) a vnitřní struktuře (CLSM). Metoda dynamického rozptylu světla umožňuje měření velikosti částic v rozmezí submikrometrovém.<sup>25,32</sup>

Zeta potenciál se používá k měření intenzity odpudivé elektrostatické interakce mezi přirozeně nabitými částicemi koloidního média. Pro předpoklad stability koloidních systémů se používá měření zeta potenciálu. Pokud se částice projevují velkými negativní nebo pozitivními hodnotami zeta potenciálu, budou mít tendenci se navzájem odpuzovat, a nebude docházet k agregaci. Částice s zeta potenciály pozitivnější než +30 mV nebo negativnější než -30 mV jsou považovány za stabilní. Pokud by byly tyto hodnoty nižší, docházelo by k flokulaci částic. Nejrozšířenější technikou měření zeta potenciálu je Laserová Dopplerova elektroforéza.<sup>25,32</sup>

### 3.5.6 Enkapsulace léčiva do lipozomů

Díky amfifilním vlastnostem můžou být do lipidových vezikul začleněny látky rozpustné i nerozpustné ve vodě. Hydrofilní látky jsou vpraveny do vnitřního prostoru lipidového vezikula a hydrofobní látky jsou začleněny do dvojvrstevné lipidové membrány. Lipozomy mohou díky těmto vlastnostem fungovat jako nosiče léčiv ve farmaceutickém průmyslu.<sup>25</sup>



Můžeme najít různé výhody, které tyto lipozomální lékové formy přinášejí. Jedná se například o zvýšenou stabilitu a sníženou toxicitu enkapsulovaného léčiva, kdy se toto léčivo nedostane do kontaktu s tkáněmi citlivými na expozici tohoto léčiva. Lipozomy jako lékové formy jsou netoxické, biokompatibilní a zcela degradovatelné. Menší stabilita, nižší rozpustnost, krátká životnost a dražší produkce patří mezi nevýhody těchto lékových forem. Dále mohou fosfolipidy přítomné v membráně podléhat oxidačním a hydrolytickým reakcím nebo může dojít k úniku zapouzdřeného léčiva.<sup>25,29</sup>

Inkorporace agens do lipozomů může probíhat dvěma odlišnými způsoby. Léčivo může být vpraveno do lipidového vezikula buďto pasivním způsobem, kdy se látka zapouzdří do lipozomů při jejich přípravě, nebo tím může být docíleno aktivním způsobem. To znamená, že určitá látka bude vpravena do lipozomů až po jejich vytvoření. Pasivní zapouzdření lipofilních léčiv je závislé na lipofilních vlastnostech daného léčiva a schopnosti interagovat a zakomponovat se do lipidové membrány. Lipofilní agens se smísí s lipidy a po odpaření rozpouštědla vznikne lipidový film, který se potom hydratuje. Při pasivní enkapsulaci hydrofilních léčiv se postupuje zprvu tak, že se vytvoří lipidový film, který je následně nahydratován pufrem, ve kterém je rozpuštěné léčivo. Množství léčiva, které se zapouzdří je závislé na rozpustnosti ve vodě a objem lipozomů. U léčiv, která mají protonizovatelné funkční skupiny, může dojít k aktivnímu přenosu na základně pH gradientu.<sup>25,29</sup>

### **3.5.7 Využití lipozomů – podání na kůži**

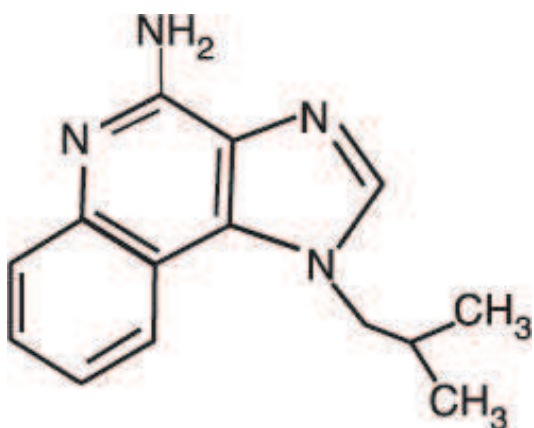
Léčiva lipofilního charakteru, která jsou zabudována do membrány lipozomů se ve zvýšené míře ukládají v epidermis a zůstávají delší časový úsek ve SC, z čeho vyplývá jejich delší a intenzivnější působení. Léčiva hydrofilního charakteru enkapsulovaná uvnitř lipozomů se dostávají díky obsahu fosfatidylcholinu v membráně do hlubších vrstev kůže jako je například dermis. Ve studiích bylo zjištěno, že fosfatidylcholin přítomný v topických přípravcích zlepšuje penetraci léčiva do hlubších vrstev kůže, usnadňuje přestup přes SC. Do systémové cirkulace se tyto lipozomální lékové formy dostávají opravdu omezeně.<sup>24,32</sup>

### 3.5.8 Zánik lipozomů

Degradace lipozomů může probíhat různými způsoby, žádný z nich není stále přesně objasněn. Můžeme předpokládat, že k tomu dochází následujícími způsoby. Může dojít ke splynutí s buněčnou membránou, kde může lipozom zůstat adsorbovaný delší dobu a bude docházet k výměně látek mezi lipozomem a buněčnou membránou. Dále může dojít k fagocytóze lipozomu, kde lipozom je obalen plazmatickou membránou za vzniku endosomu, který je poté fúzuje s lysozomy. Díky lysozomálním enzymům dojde k hydrolýze fosfolipidů a obsah lipozomu se poté uvolňuje a difunduje ven. Jiným způsobem může dojít k fúzi, kdy dochází ke smísení lipidů lipozomů s lipidy v plasmatické membráně buněk. Dalším způsobem může být zvýšení permeability membrány způsobenou kontaktem lipozomu s buněk a následné uvolnění vnitřních látek lipozomu.<sup>35</sup>

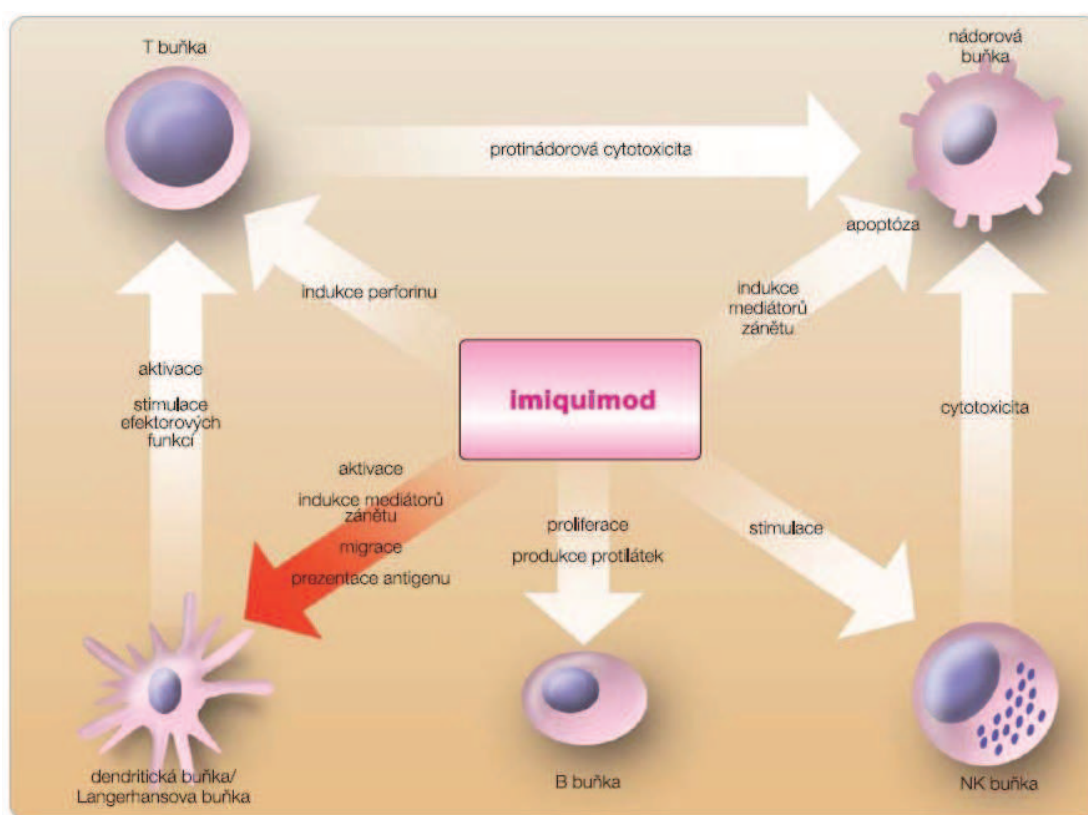
### 3.6 Imiquimod (IMQ)

IMQ (chemicky 1-isobutyl-1*H*-imidazo[4,5-*c*]chinolin-4-amin) (*obr. č. 7*) řadíme mezi imunostimulátory. Ovlivňuje expresi velkého množství genů, které mají vliv na imunitní odpověď organismu. IMQ zvyšuje expresi genů podněcujících interferon  $\alpha$ , což má za následek zvýšení antivirové, imunomodulační a antiproliferativní aktivity. Bylo zjištěno, že topická aplikace má vliv na stimulaci sekrece cytokinů a chemokinů navozujících zánětlivou reakci v místě aplikace a následnou apoptózu buněk v místě patologické léze.<sup>36</sup>



*Obr. č. 7: Imiquimod.*<sup>37</sup>

V kůži IMQ agonisticky působí na Toll-like receptory (TLR-7 a TLR-8) přítomných na Langerhansových buňkách epidermis, což vede k jejich aktivaci. Dojde ke spuštění kaskády imunitního systému, která zahrnuje uvolnění imunomodulačních a protizánětlivých cytokinů, jako například TNF- $\alpha$  (tumor-nekrotizující faktor  $\alpha$ ), INF- $\alpha$  (interferon  $\alpha$ ), IL-1 (interleukin 1). Langerhansovy buňky putují do místních uzlin, kde dochází k prezentaci antigenu. Díky tomuto imunitnímu působení dochází k zastavení růstu nádoru, k indukci apoptózy nádoru a destrukci nádoru pomocí NK (natural killer) buněk a T-lymfocytů (obr. č. 8).<sup>38</sup>



**Obr. č. 8:** Schematické znázornění mechanismu účinku IMQ.<sup>39</sup>

IMQ byl schválen FDA (Food and Drug Administration) roku 1997 s indikací léčby genitálních a perianálních bradavic. Díky svému protinádorovému a protivirovému působení je využíván k léčbě různých dermatologických onemocnění. Komerčně dostupný přípravek obsahující IMQ se nazývá Aldara 5% krém. Jedná se o bílý až nažloutlý krém, který je balen do sáčků z polyester-aluminiové folie. Jedno balení Aldary obsahuje 12, nebo 24 sáčků. Jeden sáček obsahuje 250 mg krému, v kterém je obsaženo 12,5 mg IMQ (5%), který stačí

na ošetření přibližně 20 cm<sup>2</sup>, po otevření už ho nelze znovu použít. K pomocným látkám patří kyselina isostearová, benzylalkohol, cetylalkohol, stearylalkohol, bílá vazelína, polysorbát 60 sorbitan-stearát, glycerol, methylparaben, propylparaben, xanthanová klovatina, čištěná voda.<sup>36,40,41</sup>

### **3.6.1 Využití v léčebné praxi**

V současnosti je schváleno použití lokálního IMQ k léčbě aktinické keratózy, malých povrchových bazocelulárních karcinomů a genitálních akuminátních kondylomat (zevních genitálních a perianálních bradavic). Před aplikací IMQ je potřeba, aby byla kůže omytá a osušená, vtírá se do kůže, dokud se nevstřebá. Po dobu terapie je potřeba, aby léčené oblasti byly chráněny před sluncem, a je nutné zajistit, aby léčivá látka nepřišla do kontaktu se sliznicí. U bazaliomu je potřeba, aby byl IMQ aplikován ještě do okolí 1 cm od léze, u ostatních indikací pouze na postižené místo. Po stanovené době nanesení se ložiska s aplikovaným IMQ omyjí vodou s jemným mýdlem.<sup>36,38</sup>

Krém se nemá aplikovat častěji než jedenkrát denně, obvykle se nanáší na noc, během této doby se postižené místo nesmí dostat do kontaktu s vodou. U jednotlivých onemocnění se liší doba léčby a frekvence aplikace IMQ. U bazaliomu se aplikuje pětkrát týdně po dobu 6 týdnů, ponechá se na kůži 8 hodin. Zhodnocení úspěšnosti léčeného nádoru se může uskutečnit po 12 týdnech od ukončení terapie. Aktinické keratózy se léčí IMQ po dobu 4 týdnů, kdy se aplikuje třikrát týdně na dobu 8 hodin. Efekt léčby se hodnotí po 4 týdnech od ukončení terapie. Pokud zůstaly ještě nějaké léze, terapie se opakuje. Na akuminátní kondylomata se aplikuje třikrát týdně a ponechává se na kůži 10 hodin. Léčba trvá až do úplného klinického vyhojení, nejdéle však 16 týdnů.<sup>36,38</sup>

### **3.6.2 Nežádoucí účinky**

Při použití IMQ se objevovali převážně místní nežádoucí účinky, tj. šupinatění, eroze, erytém, exkoriace, otok, změny pigmentace. Jedná se většinou o reakce mírné až střední závažnosti, pokud se některá s těchto reakcí u pacientů projevila, vymizela vždy do dvou týdnů po přerušení aplikace. Pokud by pacientovi nějaké lokální nežádoucí reakce dělaly nějaké větší obtíže, je možné terapii

na několik dní přerušit. Aplikace IMQ se nedoporučuje v blízkosti v těsné blízkosti očí, nosních dírek a ústního otvoru. Některé změny jako jsou mokvání, chrásky či svědění se mohou objevovat jen přechodně, znamenají dobrou odpověď na léčbu. V menší míře byly nahlášeny i některé systémové reakce, jako jsou bolesti hlavy, myalgie, chřipkové příznaky. Riziko výskytu těchto systémových nežádoucích účinků může být zvýšeno při dlouhodobé terapii, aplikaci větší dávky krému, zvětšení frekvence aplikace, prodloužení doby působení nebo aplikace IMQ na poškozenou kůži.<sup>15,36,38</sup>

## **4 Experimentální část**

### **4.1 Chemikálie a rozpouštědla**

Imiquimod byl pořízen od firmy TCI (Tokio, Japonsko). Ultračistá rozpouštědla, cholesteryl hemisukcinát, kyselina olejová, L- $\alpha$ -fosfatidylcholin, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, methanol, kyselina ortho-fosforečná a gentamicin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Ostatní komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla, jako například chloroform, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, chlorid sodný a ethanol byly pořízeny od firmy Penta (Chrudim, Česká republika), chlorid draselný byl opatřen od firmy Chemapol (Praha, Česká republika).

Akceleranty Pro-2 a DDAK byly syntetizovány na katedře organické a bioorganické chemie (FaF UK HK). Totožnost a čistota obou látek byla potvrzena infračervenou spektroskopií, nukleární magnetickou rezonancí a hmotnostní spektrometrií. Ultračistá voda byla získána pomocí systému Millipore Q na Katedře biochemických věd (FaF UK HK).

Přípravek Aldara<sup>TM</sup>, vázaný na lékařský předpis, byl opatřen prostřednictvím Nemocniční lékárny Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

### **4.2 Přístrojové vybavení**

Pro navažování vzorků a měření hmotnosti částí kůže byly použity analytické váhy KERN ABJ 220-4M od firmy Kern & Sohn GmbH (Balingen, Německo) a analytické váhy DISCOVERY DV215CD s interní kalibrací od firmy OHAUS (Greifensee, Švýcarsko).

Pro měření pH pufrů byl využit pH metr 210 od firmy Hanna Instruments (Woonsocket, USA) a pro jejich následnou filtraci byla použita jednodílná standardní membránová vývěva KNF od firmy KNF Neuberger (Freiburg, Německo).

Pro přípravu lipozomů byla použita rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-114, s vodní lázní Waterbath B-480, od firmy BÜCHI Laborortechnik

AG (Flawil, Švýcarsko), dvoustupňová membránová vývěva Vacuubrand MZ 2C od firmy VACUUBRAND (Wertheim, Německo), magnetická míchačka s ohřevem Heidolph MR Hei-standard od firmy Heidolph (Schwabach, Německo), laboratorní nerezová ultrazvuková vana K-12 LM s mechanickým ovládním od firmy KRAINTEK (Hradec Králové, Česká republika) a třepačka na zkumavky MS 3 DIGITAL od firmy IKA (Staufen, Německo).

Permeační pokusy byly provedeny v temperovatelné vodní lázni Grant JB 5 series od firmy Grant Instruments (Royston, Velká Británie), ve které se nacházela vícemístná magnetická míchačka VARIOMAG TELESYSTEM od firmy Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA).

Pro potřeby extrakce byla využita laboratorní třepačka LT3 od firmy NEDFORM s.r.o. (Valašské Meziříčí, Česká republika). Dále byla použita horkovzdušná trouba UN 55 a termostat od firmy Memmert GmbH+Co.Kg (Schwabach, Německo).

Připravené vzorky lipozomů byly hodnoceny pomocí laboratorního mikroskopu Olympus BX51, software AnalySIS auto 5.1, OLYMPUS (Tokio, Japonsko) a Zeta Sizeru Malvern NanoZS, software Malvern Zetasizer, od firmy Malvern Instruments Ltd (Malvern, Velká Británie).

### **4.3 Příprava pufrů a extrakčního činidla**

#### **4.3.1 Příprava acetátového pufru (AcB)**

Pufr o pH 4,0 byl připraven rozpuštěním 8,9 g chloridu sodného a 0,6 g kyseliny octové v 1 litru vody. Hodnota pH pufru byla ověřena pomocí pH-metru se skleněnou elektrodou a v případě potřeby bylo pH upraveno. Pufr byl zfiltrován a uchováván v ledničce pro možné další použití.

#### **4.3.2 Příprava fosfátového pufru (akceptorové fáze)**

Pro přípravu 10 mM fosfátového pufru o pH 7,4 byly použity následující látky (*tab. č. 1*). Bylo naváženo 0,312 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného

(156 g/mol), 2,865 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (358 g/mol), 8 g chloridu sodného (58,4 g/mol) a 0,201 g chloridu draselného (74,55 g/mol). Vše bylo rozpuštěno v 1 litru vody. Hodnota pH pufru byla ověřena pomocí pH-metru se skleněnou elektrodou a v případě potřeby bylo pH pomocí hydroxidu sodného nebo kyseliny fosforečné upraveno.

**Tab. č. 1:** Složení fosfátového pufru.

sloučenina	molární hmotnost	molární koncentrace	množství
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	156 g/mol	2 mmol/l	0,312 g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	358 g/mol	8 mmol/l	2,865 g/l
$\text{NaCl}$	58,4 g/mol	137 mmol/l	8,0 g/l
$\text{KCl}$	74,55 g/mol	2,7 mmol/l	0,201 g/l

K 1 litru 10 mM fosfátového pufru o pH 7,4 bylo přidáno 50 mg gentamicinu a 100 ml absolutního ethanolu. Následně bylo vše přefiltrováno a skladováno v lednici pro další použití.

### 4.3.3 Příprava extrakčního činidla

Pro přípravu extrakčního činidla byl použit methanol a AcB o pH 4,0. Tyto dvě složky byly spolu smíchány v poměru 7:3.

## 4.4 Příprava lipozomů

### 4.4.1 Hledání metody

#### 4.4.1.1 Příprava lipozomů pomocí extrudéru

Vzorky na přípravu prvních lipozomů byly naváženy a připraveny dle koncentrací a údajů uvedených v tab. č. 2. IMQ s fosfolipidy byl rozpuštěn v baňkách s kulatým dnem pomocí směsi organických rozpouštědel chloroform:methanol (3:1). Po rozpuštění navážených látek bylo odpařeno rozpouštědlo pomocí rotační vakuové odparky, zbytky rozpouštědla byly odpařeny ještě pomocí exsikátoru. Množství pufru bylo přidáno dle tab. č. 2. Byla odebrána část z nahydratovaných vzorků, která byla poté protlačena přes tenkou membránu



extrudéru. Pro vznik správných lipozómů musela být tato část vzorku protlačena přes membránu několikrát, avšak to se podařilo jen jednou. Lidská síla nebyla dostatečná, aby byly tyto mikropóry mebrány překonány několikrát, i když bylo přidáno více pufru a vzorky byly více zředěné (viz množství pufru dle *tab. č. 2*). Tato metoda byla hned zpočátku zavrhnuta.

**Tab. č. 2:** Složení vzorků pro extrudér  
(% udávají zastoupení IMQ v 1 g lipidové směsi).

0,01 % IMQ	0,5 % IMQ	1% IMQ
0,0001 g IMQ + 0,9999g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	0,005 g IMQ + 0,795 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	0,01 g IMQ + 0,99 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin
2 ml AcB	1,5 ml AcB	1 ml AcB

#### 4.4.1.2 Příprava lipozomů střídáním teplotních cyklů a sonifikace

Pro přípravu lipozomů byla použita metoda, při které se nahydratované lipidy v baňkách střídaly ve vodní lázni o teplotě 60 °C, v misce s ledem a vodní lázni s ultrazvukem. Na každém stanovišti byla baňka se vzorkem v intervalu osmi minut 5-10 cyklů. Tato metoda se osvědčila, proto byla použita pro přípravu níže uvedených lipozomů.

#### 4.4.2 Hledání koncentrací

První pokusy byly prováděny jen s IMQ s fosfolipidy, kde u menších koncentrací (0,01%-1% IMQ) bylo prováděno 5 cyklů. Při vyšších koncentracích IMQ (5-10%) byly vzorky ponechány 10 cyklů, po následné analýze byla zjištěna velikostní nerovnoměrnost a zvýšená hustota velkých krystalků. Na základě zkoušek různých koncentrací a následném vyhodnocování pomocí mikroskopu a Zeta Sizeru byly zvoleny do dalších pokusů vzorky s IMQ o koncentraci 0,5% - 1%.

#### 4.4.3 Efekt přísadků

K vybraným koncentracím IMQ byly přidávány další látky. Nejprve byly zkoušeny akceleranty transdermální penetrace, jako jsou DDAK, OA, Pro-2. Vždy

byly přidávány ke vzorkům s IMQ a fosfolipidy v koncentraci 1%. K těmto vzorkům byly navíc v dalším kroku jednotlivě přidávány látky upravující vlastnosti lipozomů, tj. cholesterol hemisukcinát (CHS) a deoxycholát sodný, v 5-20% koncentraci. Byly zkoušeny různé kombinace akcelerantů s přísadky a určité počty cyklů.

#### 4.4.4 Finálně zvolené vzorky

Na základě předešlých pokusů a kombinací byly pro permeační pokusy na kůži zvoleny následující vzorky (*tab. č. 3*).

**Tab. č. 3:** *Finálně zvolené vzorky*  
(% vyjadřují zastoupení látek v lipidové směsi).

vzorek č.				
1	1 % IMQ (0,01 g)	+ 0,99 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin		
2	1 % IMQ (0,01 g)	+ 0,98 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	+ 1 % DDAK (0,01 g)	
3	1 % IMQ (0,01 g)	+ 0,93 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	+ 1 % Pro-2 (0,01 g)	+ 5 % CHS (0,05 g)
4	1 % IMQ (0,01 g)	+ 0,93 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	+ 1 % DDAK (0,01 g)	+ 5 % CHS (0,05 g)
5	1 % IMQ (0,01 g)	+ 0,98 g L- $\alpha$ -fosfatidylcholin	+ 1 % OA (0,01 g)	

#### 4.4.5 Příprava donorových vzorků pro permeační pokusy na kůži

Pro přípravu lipozomů byly na analytických vahách naváženy jejich složky a jednotlivě přidány do očíslovaných baněk dle *tab. č. 3*. Dále byly tyto vzorky rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v), tak aby byla zajištěna jejich homogenita. V dalším kroku bylo organické rozpouštědlo odstraněno pomocí rotační vakuové odparky za vzniku lipidového filmu, který se vytvořil na stěně baňky. Aby byly odstraněny poslední zbytky rozpouštědla, byly vzorky alespoň na 5 hodin uloženy ve vakuovaném exsikátoru (sušidlem byl parafin a oxid fosforečný). Utěsněné vzorky byly skladovány v mrazáku, až do chvíle jejich hydratace.

Den před permečním pokusem byly lipidové směsi vyndány z mrazáku a ponechány stát, aby vzorky dosáhly pokojové teploty. Dále bylo ke všem vzorkům přidáno 2 ml AcB (pH 4,0) a vzorky byly ponechány se hydratovat přibližně 20 minut.

Pro vytvoření lipidových vezikul se jednotlivé vzorky v označených kulatých baňkách střídaly na určitých stanovištích v pravidelných intervalech. Mezi stanoviště, kde byla baňka se vzorky vždy v časovém intervalu 8 minut, patřily vodní lázeň o teplotě 60 °C, teplota pod 0 °C a ultrazvuk. První v pořadí byla vodní lázeň o teplotě 60 °C, kde byl vzorek i promícháván pomocí vloženého magnetického míchadla, následovala miska s ledem, kde byla teplota pod 0 °C a nakonec vodní lázeň s ultrazvukem. Díky předchozím pokusům bylo zjištěno, že pro správné utvoření lipozomů je potřeba 10 cyklů na každém stanovišti ve výše popsaném pořadí. Pro permeční pokusy na kůži byly lipozomy připravovány vždy den předem a do druhého dne byly ponechány v termostatu při teplotě 32 °C.

#### **4.4.6 Hodnocení lipozomů a vlastností donorových vzorků**

Velikost a velikostní rovnoměrnost lipozomů byla hodnocena pomocí ZetaSizeru. Vždy bylo odebráno 200 µl vzorků lipozomů pomocí automatické pipety, které byly naředěny pomocí 1 ml AcB. Tato naředěná část byla po důkladném protřepání v okamžiku měření přelita do plastové kyvety a dána do ZetaSizeru, kde pak proběhlo měření pomocí zavedené metody.

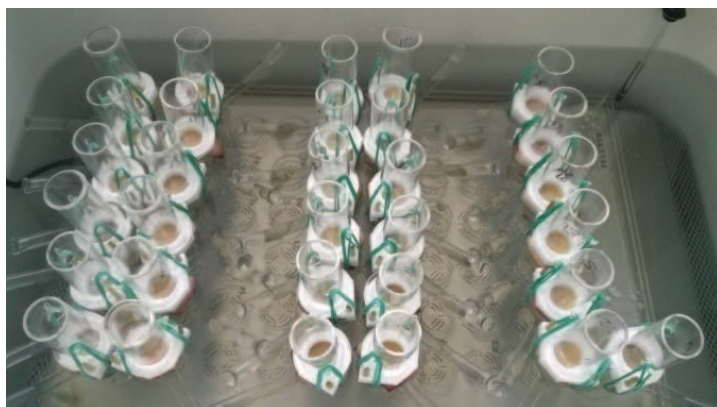
Hodnocení přítomnosti krystalů IMQ bylo hodnoceno pomocí optického mikroskopu. Vzorek pro mikroskop byl odebrán po protřepání pomocí plastové špičky a byl aplikován na podložní sklíčko, poté byla tato malá část odebraného vzorku zakryta krycím sklíčkem. Vzorky byly postupně pozorovány při zvětšení 100, 200 a 400 násobném, pokaždé bylo pořízeno několik snímků z každého vzorku.

## 4.5 Permeační pokusy

### 4.5.1 Kůže a Franzovy difúzní cely

Kůže pro permeační pokusy byla získána z oddělení plastické chirurgie Sanatoria Sanus (První privátní chirurgické centrum s.r.o.) v Hradci Králové. Kůže pocházela z břicha a prsou pacientů po plastických a estetických operacích. Proces jejího odběru probíhal v souladu s pravidly schválenými místní Etickou komisí a dle principů Helsinské deklarace. Po převozu byla kůže zbavena tukové tkáně, omytá vodou a po usušení uchovávána v mrazáku (- 20 °C).

Před permeačním pokusem byla kůže vytažená z mrazáku ponechána při pokojové teplotě. Následně byla kůže nakrájena na stejné části tak, aby přilnula mezi teflonové držáky, cca 2 x 2 cm. Obě teflonové části držáku byly namazány silikonovým tukem, aby dobře přilnuly ke kůži a k oběma skleněným částem difúzních cel, aby nedocházelo k úniku akceptorové fáze. Horní i dolní skleněné části cely byly smontovány pomocí gumiček a dřevěných párátek s kůží v teflonových držácích umístěnou mezi nimi (*obr. č. 10*) Do spodní části cely bylo vloženo magnetické míchadlo a spodní díl cely byl naplněn akceptorovou fází. Její množství bylo odměřeno pro každou celu individuálně. Byla zkontrolována těsnost cel a byly dány do vodní lázně vytemperované na 32 °C přes noc (*obr. č. 9*).



*Obr. č. 9: Difúzní cely ve vodní lázni.*



*Obr. č. 10: Smontovaná Franzova difuzní cela.*

#### **4.5.2 Průběh permeace**

Ráno byla zkontrolována těsnost cel a byla doplněna odpařená akceptorová fáze po okraj ramínka spodní části cely. Na kůži byly naneseny lipozomy o objemu 100, příp. 200  $\mu$ l a Aldara o objemu 25  $\mu$ l pomocí mikropipet tak, aby obsah IMQ v donorových vzorcích (včetně Aldary) odpovídal 0,5, příp. 1 mg. Bylo sestaveno celkem 31 cel, Aldara byla nanesena 3x všechny ostatní vzorky 5x a další 3 cely sloužily jako kontrolní, kde na kůži nebylo naneseno nic. Nanesené látky byly ponechány na kůži 8 hodin a poté z kůže pomocí vatové tyčinky setřeny a opláchnuty vodou a dány zpět do lázně do druhého dne (tj. 24 hod. od aplikace vzorku), kdy došlo k rozebrání cel. V jednom z pokusů byla doba aplikace vzorků prodloužena na 24 hod., jejich odstranění tedy proběhlo těsně před rozmontováním cel.

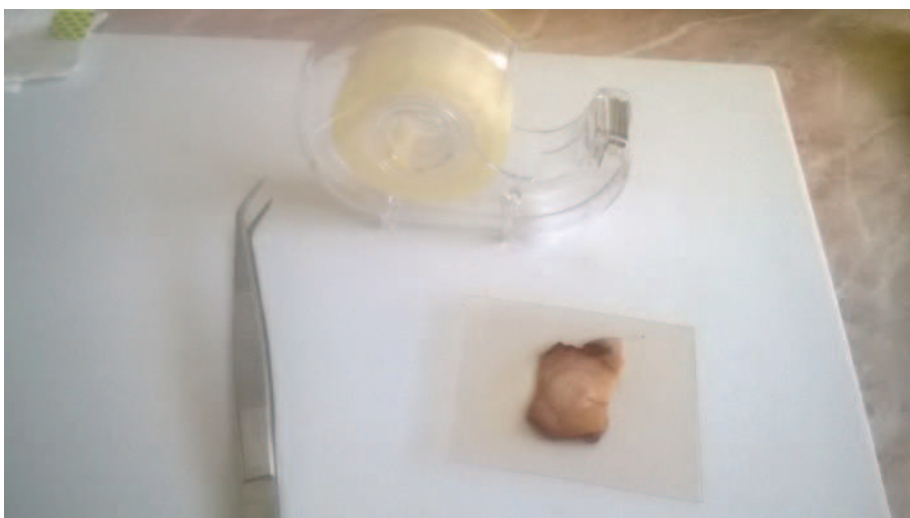
#### **4.5.3 Zpracování permeačních pokusů**

Před rozebráním cel bylo odebráno 0,5 – 1 ml akceptorové fáze do vialek pro následnou analýzu pomocí HPLC. Po rozmontování cel byl každý kousek kůže opláchnut vodou, otřen tampónem napuštěným ethanolem a položen na očíslovaný alobal (*obr. č. 11*).



**Obr. č. 11:** Části kůže na očíslovaném alobalu.

Každá kůže byla ostripována, to znamená, že byl přiložen kousek lepicí pásky na povrch kůže a odtrhnut. První strip byl zlikvidován a poté bylo přiloženo plastové okénko, aby byla ostripována ta část kůže, kde byly nanесeny vzorky (*obr. č. 12*). Každý kousek kůže byl ostripován postupně v počtu 2, 2, 3, 3, 5, 5 stripů, čímž bylo pro analýzu obsahu IMQ v nejsvrchnější vrstvě kůže získáno celkem 6 vzorků.



**Obr. č. 12:** Stripování kůže.

Použitá lepicí páska byla vložena do vialky, kam byl následně přidán 1 ml extrakční činidla methanol:AcB (7:3). Byla vysekaná ta část kůže, kde byl nanесen vzorek, pomocí korkovrtu (*obr. č. 13*).



**Obr. č. 13:** Vyseknuté části kůže na očíslovaném alobalu.

Byla získána vyseknutá část kůže a zbytek. Zbytek kůže byl vložen do vialek a zvážen. Výsek kůže byl zakápnut vodou a výseky ponechány přibližně 5 min v sušárně při 65 °C. Díky tomuto bylo možné oddělit epidermis od dermis (obr. č. 14).



**Obr. č. 14:** Oddělování epidermis od dermis.

Epidermis i dermis byla dána do vialek a zvážena (po odstranění kapky vody vatovou tyčinkou). Bylo přidáno 1 ml extrakčního činidla do vialek s epidermis a 2 ml extrakčního činidla ke zbytku kůže a dermis. Všechny vialky byly dány na třepačku a ponechány třepat 24 hodin. Po 24 hodinách byly všechny vialky sundány z třepačky a extrakt z tkání zfiltrován přes vatu do 2 ml vialek (obr. č. 15) a koncentrace IMQ v něm byla změřena na HPLC.



*Obr. č. 15: Filtrace extraktu.*

## **4.6 HPLC analýza**

### **4.6.1 Přístrojové vybavení**

System vysokoúčinné kapalinové chromatografie zahrnoval vysokotlaké čerpadlo LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, automatický dávkovač vzorků SIL-20A HT, kolonový termostat CTO-20AC, UV detektor SPD-M20A, komunikační modul CBM-20A a integrační software LCsolutions verze 1.22 (vše Shimadzu Kyoto, Japonsko).

### **4.6.2 HPLC metoda**

IMQ byl separován na koloně Supleco Discovery<sup>®</sup> HS C18 (15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) při teplotě kolony 40°C. Nástřik: 10  $\mu$ l; průtok: 1 ml/min; detekce: UV, 242 nm; retenční čas 3,2 min, délka analýzy 5,0 min.

### **4.6.3 Mobilní fáze (HPLC)**

Mobilní fáze byla připravena smísením acetonitrilu, vody a kyseliny fosforečné v poměru 30:70:1 (v/v) o pH 2,7. Hodnota pH mobilní fáze byla ověřena pomocí pH-metru se skleněnou elektrodou a v případě potřeby bylo pH upraveno.



#### 4.6.4 Kalibrace

Validace metody byla provedena pomocí kalibrační křivky. Kalibrační standardy byly připraveny naředěním čerstvě připraveného roztoku IMQ v extrakční kapalině (methanol:acetátový pufr 7:3, v/v) o koncentraci 0,5 µg/ml. Koncentrace standardů kalibrační řady byly 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 a 600 ng/ml. Odezva po jejich nástřiku byla odečtena jako plocha pod píkem a kalibrační křivka byla stanovena metodou lineární regrese,  $r^2 = 0,9998$ .

#### 4.7 Analýza dat

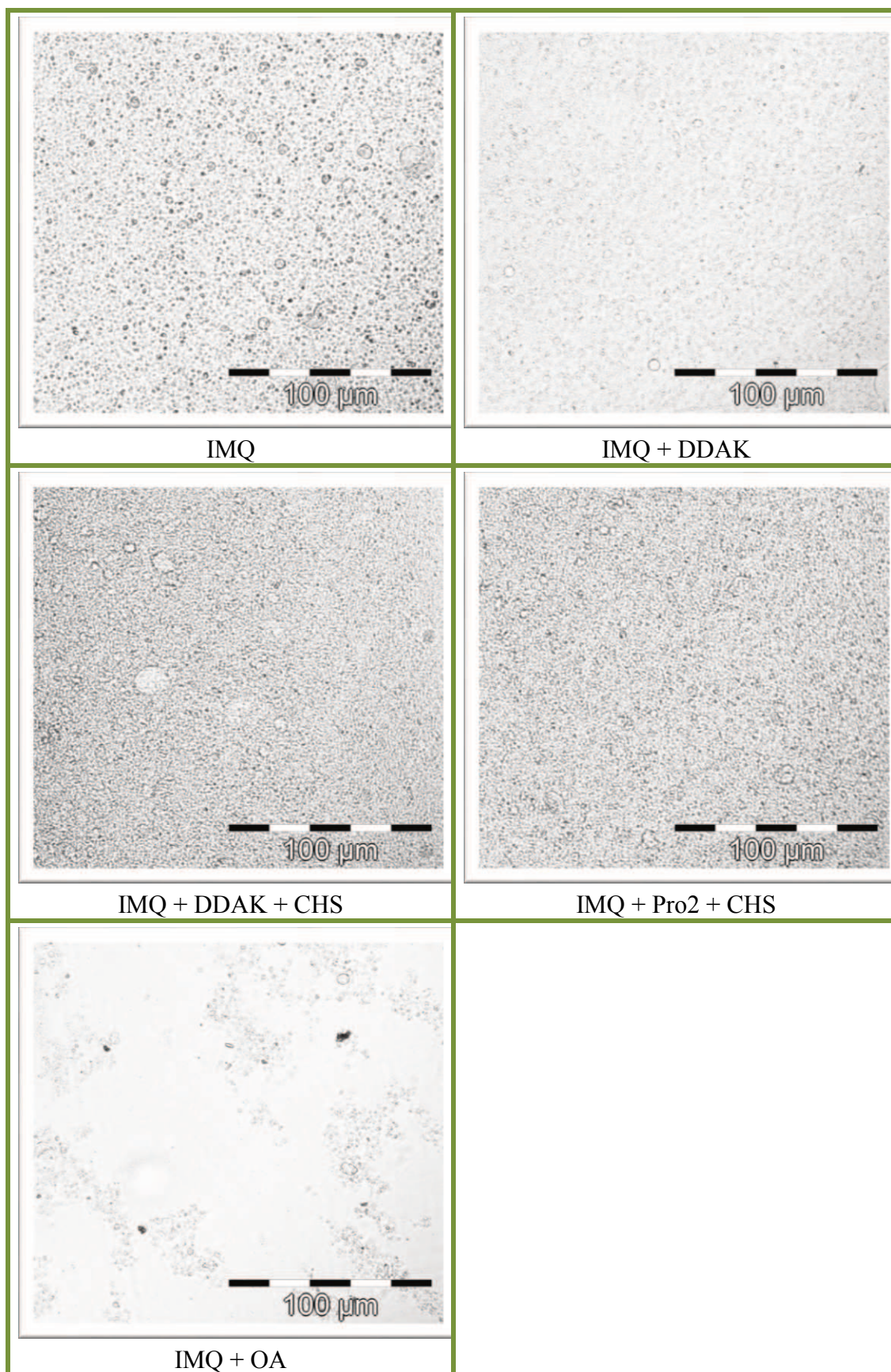
Množství léčiva v jednotlivých vrstvách kůže je vyjádřena buď jako a) koncentrace IMQ v objemu extrakčního činidla (µg/ml) – akceptorová fáze a stripy nebo jako b) koncentrace IMQ přepočtena na hmotnost tkáně (µg/mg) – epidermis, dermis, okolí permeční plochy po jejím vyseknutí. Ke statistickému zpracování dat byl použit test jednofaktorová (one-way) ANOVA s Dunnettovým post testem. Výsledky jsou prezentovány jako průměry ± SEM (standardní chyba průměru).

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Hodnocení lipozomů optickou mikroskopií a měření velikosti částic pomocí Zeta Sizeru

Na *obr. č. 16* lze vidět srovnání jednotlivých lipozomálních vzorků při 100 násobném zvětšení. Optická mikroskopie je pro hodnocení lipozomů doplňkovou metodou, která měla odhalit přítomnost velkých krystalů IMQ, které se vyskytovaly ve vzorcích s jeho vyššími koncentracemi. Vzorky krystaly IMQ neobsahovaly nebo jen jejich nepatrné množství (IMQ + OA) a mezi jednotlivými lipozomy nebyly patrné další významné rozdíly. Jakožto slabá báze se IMQ dobře rozpouští v použitém AcB a přítomnost OA by jeho rozpustnost ve vodném prostředí měla zvýšit.<sup>42</sup>

Pomocí Zeta Sizeru byla měřena velikost a velikostní rovnoměrnost vzniklých lipozomů. Průměrná velikost lipozomů s obsahem IMQ byla 40,4 nm. Lipozomy obsahující IMQ + DDAK dosahovaly průměrné velikosti 39,8 nm. Velikosti 39,5 nm dosahovaly lipozomy s obsahem IMQ + DDAK + CHS. Největší průměrné velikosti 57,7 nm dosahovaly lipozomy, které obsahovaly IMQ + Pro-2 + CHS. Poslední hodnocený lipozomální vzorek (IMQ + OA) nabýval průměrné velikosti částic 42,8 nm. Měření na Zeta Sizeru probíhalo vždy u každého lipozomálního vzorku, který byl připraven k danému permeačnímu pokusu. Přístroj provedl vždy u jednoho vzorku tři měření. Naměřené hodnoty s jednotlivými odchylkami a procentuálním zastoupení lze vidět v *tab. č. 4*.



**Obr. č. 16:** Přehled jednotlivých aplikačních forem lipozomů při 100 x zvětšení.

Tab. č. 4: Přehled hodnot naměřených na Zeta Sizeru.

<b>IMQ (1%)</b>		<b>nm</b>	<b>±</b>	<b>%</b>
	<b>1. perm.</b>	46,1	9,0	98,5
		39,8	7,1	99,2
		42,7	7,8	99,0
	<b>2. perm.</b>	36,2	13,2	100,0
		41,5	16,8	100,0
		46,4	16,7	100,0
	<b>3. perm.</b>	37,5	12,1	100,0
		34,3	10,7	100,0
		39,0	12,5	100,0
<b>IMQ (1%) + DDAK (1%)</b>	<b>1. perm.</b>	36,1	11,9	100,0
		38,1	12,4	100,0
		36,5	11,9	100,0
	<b>2. perm.</b>	47,8	18,2	100,0
		36,6	14,2	100,0
		43,7	16,1	100,0
	<b>3. perm.</b>	37,6	15,2	100,0
		43,9	15,4	100,0
		37,7	18,5	100,0
	<b>IMQ (1%) + DDAK (1%) + CHS (5%)</b>	<b>1. perm.</b>	54,6	17,7
		43,6	14,3	100,0
		42,1	13,2	100,0
<b>2. perm.</b>		20,5	3,3	93,3
		45,6	17,6	100,0
		45,6	17,0	100,0
<b>3. perm.</b>		35,0	4,8	98,9
		34,3	5,3	99,3
		34,4	5,2	99,0

<b>IMQ (1%) + Pro2 (1%) + CHS (5%)</b>			
	<b>nm</b>	<b>±</b>	<b>%</b>
<b>1. perm.</b>	54,9	17,7	100,0
	39,0	6,7	98,6
	40,4	7,4	98,4
<b>2. perm.</b>	58,1	27,0	100,0
	62,8	27,7	100,0
	70,5	32,0	100,0
<b>3. perm.</b>	60,1	20,8	100,0
	65,0	20,4	100,0
	69,0	24,5	100,0
<b>IMQ (1%) + OA (1%)</b>			
<b>1. perm.</b>	43,0	14,3	100,0
	43,9	15,6	100,0
	25,1	12,1	100,0
<b>2. perm.</b>	42,1	18,2	100,0
	63,4	13,9	98,4
	62,9	12,1	98,7
<b>3. perm.</b>	35,7	10,5	100,0
	35,4	1,8	100,0
	33,9	10,8	100,0

## 5.2 Permeační pokusy na kůži

Výsledky byly vyhodnocovány ze tří permeačních schémat. Míra penetrace IMQ do kůže z připravených lipozomů byla vždy srovnávána s komerčně dostupným přípravkem Aldara, který byl ve všech permeačních pokusech nanesen ve stejném množství, tj 25  $\mu$ l. V prvním schématu byla hodnocena koncentrace IMQ v kůži po osmi hodinách aplikace 100  $\mu$ l lipozomů. V druhém případě bylo naneseo 200  $\mu$ l lipozomů. Vyhodnocování probíhalo tím způsobem, že byly srovnány mezi sebou konkrétní vzorky po nanesení 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l lipozomů. Bylo vždy uvedeno, kolikanásobně se daná hodnota koncentrace IMQ změnila vůči první permeaci. Ve třetí, poslední, permeaci byla analyzována kůže, na které Aldara a lipozomy setrvaly čtyřicet hodin. V tomto případě bylo naneseo stejné množství lipozomů, jako v první permeaci. Byly vyhodnocovány mezi sebou vždy hodnoty koncentrací IMQ u daných vzorků z první (po osmi hodinách) a třetí permeace (po čtyřiceti hodinách).

V každé permeaci bylo množství IMQ v kůži vždy vyhodnocováno následujícím způsobem. Nejprve byly zanalyzovány stripy. Tím bylo zjištěno, jak velká část neprošla přes SC a zůstala na nejsvrchnější části pokožky. Hodnoty byly udávány v množství IMQ ( $\mu$ g) naměřené v 1 ml extrakčního média ( $\mu$ g/ml). Dále byla vyhodnocována epidermis. V této vrstvě, jako hlavním místem působení IMQ, bylo množství IMQ pro naše pokusy nejdůležitější. Hodnoty IMQ jsou uváděny v  $\mu$ g v přepočtu na mg dané tkáně ( $\mu$ g/mg). Ve stejných jednotkách byly koncentrace IMQ vyjádřeny i u dermis a okolní tkáni. Vyšší hodnoty IMQ v dermis nejsou vítány, jelikož by mohlo dojít k systémové expozici léčiva. Jako poslední byla analyzována akceptorové fáze. Díky tomuto vyhodnocení byla možnost zjistit, u jakých vzorků bude IMQ permeovat přes kůži do systémové cirkulace. Jak už bylo zmíněno, tento jev je nežádoucí, jelikož hlavním místem působení IMQ je epidermis a mohlo by dojít k nechtěnému systémovému účinku. Hodnoty jsou vyjádřené jako množství IMQ v  $\mu$ g na celý objem akceptoru, který vykazoval hodnoty kolem 18,4 ml.

Statistická signifikance byla ve všech třech permeacích vyjadřována vůči

přípravku Aldara. Statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ) jsou označovány hvězdičkou nad daným sloupcem vzorku v grafu.

### 5.3 Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách (100 $\mu$ l vzorku)

V tomto permeačním schématu bylo aplikováno vždy 100  $\mu$ l vzorků (1% IMQ) a 25  $\mu$ l Aldary® (5% IMQ), tedy stejné množství IMQ – 0,5 mg.

#### 5.3.1 Stripy SC

U všech stripů, kromě 1. stripu po aplikaci vzorku IMQ + Pro-2 + CHS, byly ve všech hodnotách koncentrací IMQ v jednotlivých stripech oproti přípravku Aldara zaznamenány statisticky významné rozdíly. Z *obr. č. 17* je zřejmé, že nejvyšší koncentrace IMQ v prvním stripu byla v kůži, na kterou byl aplikován přípravek Aldara ( $1,622 \pm 0,429 \mu\text{g/ml}$ ), což je 2,1, resp. 2,3 násobné množství ve srovnání s koncentrací IMQ v prvním stripu kůži, na které byly aplikovány lipozomy s obsahem IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,781 \pm 0,305 \mu\text{g/ml}$ ) a s obsahem IMQ ( $0,691 \pm 0,226 \mu\text{g/ml}$ ). Lze vyvodit dle *obr. č. 17*, že koncentrace IMQ ve SC převažovala vždy u přípravku Aldara, v ostatních stripech byla koncentrace u připravovaných vzorků 3 násobně a v některých případech až 20 násobně nižší. Nejvíce IMQ procházelo přes SC u připravovaného lipozomálního vzorku IMQ + DDAK a nejméně u samostatného IMQ a vzorku IMQ + Pro-2 + CHS. Můžeme zhodnotit, že přidavek akcelerační pozitivně ovlivnil přechod vzorků přes SC.

Při srovnání prvního a posledního stripu bylo zjištěno, že koncentrace IMQ se snížila. U Aldary byla hodnota u prvního stripu  $1,622 \pm 0,429 \mu\text{g/ml}$  a u posledního stripu  $0,522 \pm 0,483 \mu\text{g/ml}$ , tj. 3,1 násobně nižší, u vzorku IMQ byla u prvního stripu hodnota  $0,691 \pm 0,226 \mu\text{g/ml}$  a u posledního  $0,183 \pm 0,534 \mu\text{g/ml}$ , tj. 2,9 násobně méně, u vzorku IMQ + DDAK byla hodnota u prvního  $0,179 \pm 0,049 \mu\text{g/ml}$  a u posledního  $0,061 \pm 0,025 \mu\text{g/ml}$ , tj. 2,9 násobně méně, u vzorku IMQ + DDAK + CHS byla hodnota u prvního  $0,550 \pm 0,151 \mu\text{g/ml}$  a u posledního  $0,060 \pm 0,022 \mu\text{g/ml}$ , tj. 9,2 násobně méně, u vzorku IMQ + Pro-2 + CHS byla hodnota u prvního  $0,781 \pm 0,305 \mu\text{g/ml}$  a u posledního  $0,123 \pm 0,030 \mu\text{g/ml}$ , tj. 6,3 násobně méně, u vzorku IMQ + OA byla hodnota

koncentrace u prvního stripu  $0,411 \pm 0,159 \mu\text{g/ml}$  a u posledního  $0,093 \pm 0,032 \mu\text{g/ml}$ , tj. 4,4 násobně méně.

IMQ je látka, která je špatně rozpustná ve vodném prostředí, tudíž jde o látku lipofilního charakteru ( $\log P \sim 3,5$ ). Bylo zjištěno, že většina lipofilních léčiv enkapsulovaných do lipozomálních struktur je ukládána v epidermis, ale zároveň může vytvářet vysoké koncentrace ve SC, což mohou naznačovat zvýšené hodnoty vzorku IMQ bez přídavku akceleraantů ve stripech.<sup>42,43,44</sup>

Na základě studií mechanismu bylo dokázáno, že kontakt lipozomu s kožním povrchem by měl vyvolat pučení fosfolipidové membrány lipozomů, jedná se o tzv. „budding“. Díky této dezorganizaci lipozomální membrány by mělo dojít ke smísení molekul membrány s intercelulárními lipidy ve SC. Tento děj může způsobit rozrušení lipidových lamel mezi korneocyty a zvýšit permeaci lipofilních léčiv přes SC.<sup>44</sup>

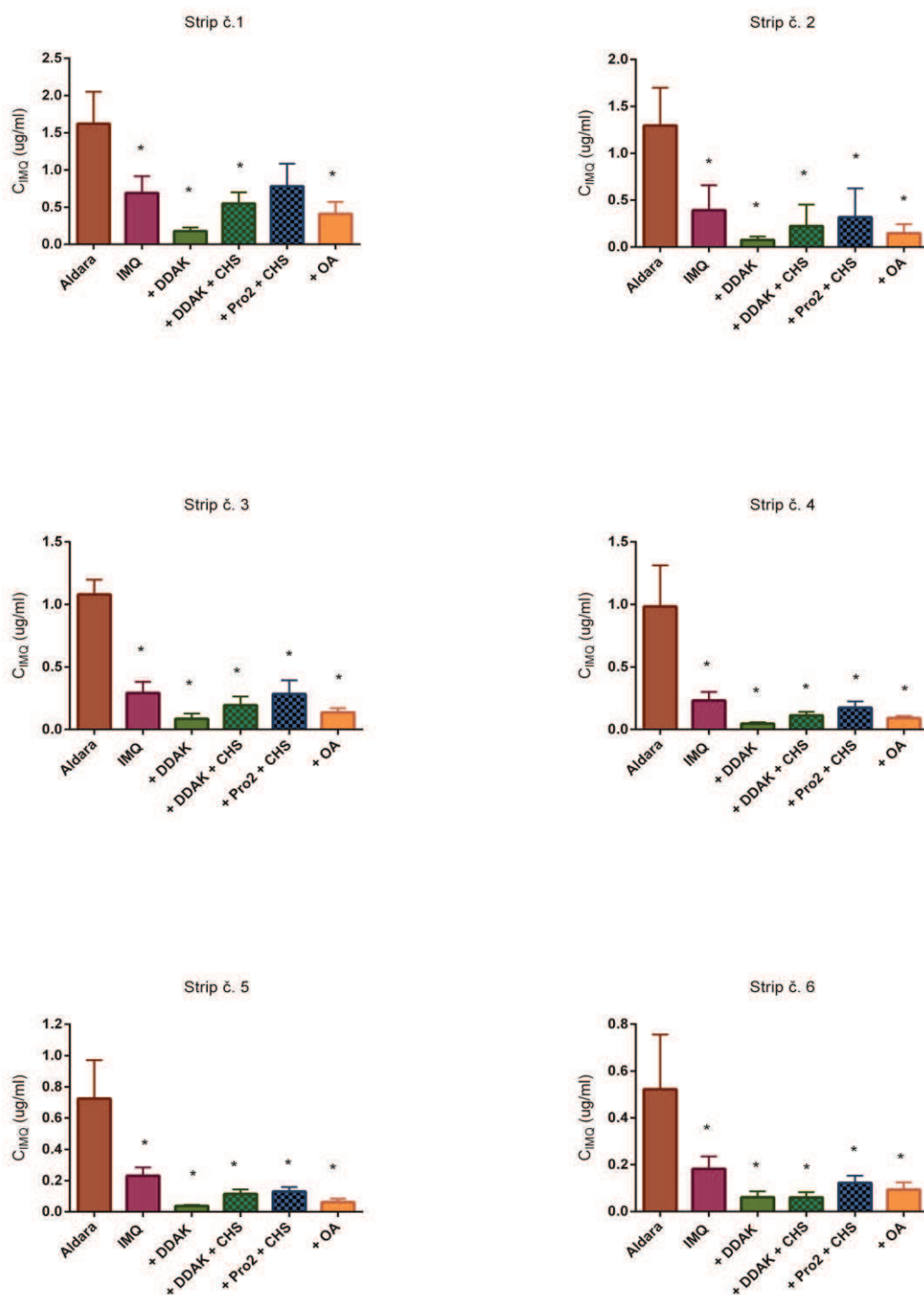
Cholesterol je látka modifikující fluiditu, zlepšující rigiditu a stabilitu fosfolipidové membrány. Díky této funkci je membrána méně fluidní a její rozrušení a deformace je obtížnější a tím pádem dochází k horší prostupnosti lipozomů přes SC. Tento jev byl pozorován u lipozomálních vzorků IMQ + DDAK + CHS a IMQ + Pro-2 + CHS, kde běžný cholesterol byl nahrazen cholesterylem-hemisukcinátem, který je svými vlastnostmi schopný napodobit membránový cholesterol. Tato domněnka byla potvrzena u hodnot koncentrací IMQ u zmíněných lipozomálních vzorků, které svými hodnotami převyšují ostatní vzorky s akceleraanty. Bylo dokázáno, že pokles obsahu cholesterolu v lipidové dvojvrstvě zvyšuje tekutost membrány, což vede k nárůstu transportu léčiva přes SC. Vlivem CHS mohli být také zapříčiněny vyšší hodnoty IMQ + DDAK + CHS ve srovnání se vzorkem IMQ + DDAK, který díky nepřítomnosti CHS a zároveň pomoci akceleraantu pronikal nejlépe přes SC a jeho hodnoty koncentrací IMQ byly ze všech lipozomů ve všech stripech nejnižší.<sup>45,46</sup>

Na základě permeačních studií bylo dokázáno, že fyzikálně-chemické vlastnosti lipozomů, jako je flexibilita, elasticita a deformovatelnost, významně ovlivňují průnik léčiva přes SC do hlubších vrstev kůže. Tyto vlastnosti je možné



modulovat pomocí fluidizačního činidla, které je schopné poskytnout vyšší pružnost vezikul. Pro tento účel se dají použít povrchově aktivní látky, jako jsou cholát sodný, deoxycholát sodný, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80 a glycyrrhizinát draselný, které díky jejich řetězci s vysokým poloměrem zakřivení dokážou zvýšit deformovatelnost lipozomů prostřednictvím destabilizace fosfolipidové dvojvrstvy lipozomů. Jak bylo uvedené výše, tyto vlastnosti mají důležitý vliv na průchod lipozomů s enkapsulovaným léčivem přes SC. Při studiích průniku estradiolu kůží bylo potvrzeno, že lipozomální lékové formy při porovnání s nasyceným vodným roztokem léčiva zlepšovaly ukládání estradiolu do epidermis, tak i jeho průnik kůží. Pokud však byly porovnány standardní lipozomy a deformovatelné lipozomy s obsahem povrchově aktivních látek, byly výsledky příznivější na straně flexibilních lipozomů. Lze konstatovat, že zvýšením pružnosti lipozomů se dokáže zvýšit jejich průchod spolu s léčivem do kůže.<sup>47,48</sup>

Zvýšené koncentrace IMQ ve stripech po aplikaci emulzního přípravku Aldara může být způsobeno precipitací krystalků IMQ, který spolu s kyselinou isostearovou přítomnou v přípravku zapříčiní také podráždění kůže. Tato nestabilita může být způsobena špatnou rozpustností IMQ.<sup>43,49,50</sup>



**Obr. č. 17:** Přehled koncentrací IMQ ve stripech po osmihodinové aplikaci přípravku Aldara a lipozomů v množství 100  $\mu$ l. Symbol \* značí statisticky významný rozdíl v koncentraci IMQ po aplikaci lipozomů ve srovnání s přípravkem Aldara.

### 5.3.2 Epidermis

V epidermis, jako v hlavním místě působení IMQ, byla koncentrace IMQ po podání Aldary  $0,1860 \pm 0,0130 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Statisticky signifikantní rozdíly oproti přípravku Aldara byly zjištěny u lipozomů s IMQ + DDAK ( $0,0815 \pm 0,0152 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) a s IMQ + DDAK + CHS ( $0,0896 \pm 0,0064 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), jež vykazovaly 2,3 násobně, resp. 2,1 násobně nižší hodnoty. Největší koncentrace IMQ z připravovaných lipozomů byla po aplikaci IMQ bez přísad ( $0,1521 \pm 0,0348 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), což je asi 1,2 násobně méně než u Aldary. Druhá a třetí nejvyšší hodnota koncentrace IMQ byla u lipozomů s IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,1141 \pm 0,0255 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) a IMQ + OA ( $0,1115 \pm 0,0217 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), což je přibližně 1,6, resp. 1,7 násobně méně vůči přípravku Aldara. Tyto poslední tři zmíněné lipozomové vzorky se nejvíce (z 80, resp. 60 %) přibližovaly hodnotou koncentrace IMQ v epidermis přípravku Aldara, což ukazuje graf na *obr. č. 18*.

IMQ je slabá báze ( $\text{pK}_a = 7,3$ ), tudíž se lépe bude rozpouštět v kyselějším prostředí. Lipozomy byly připravovány v hydrofilním prostředí AcB ( $\text{pH} 4,0$ ), kde se IMQ nacházel v ionizovaném stavu. Do kůže přestupují látky pouze v nedisociovaném stavu, tudíž zainkorporováním disociovaného IMQ do lipozomu byla zlepšena jeho prostupnost přes kůži. Jelikož kůže má  $\text{pH}$  v rozmezí 4-6, mohlo se stát, že nějaká část ionizovaného IMQ nepřestoupila přes kůži.<sup>42</sup>

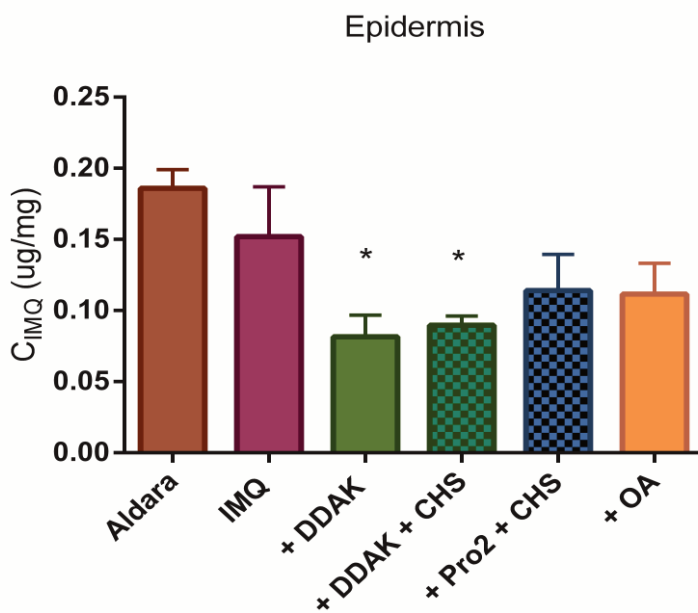
Podle grafu na *obr. č. 18* můžeme pozorovat, že IMQ bez akceleračních činidel měl z připravovaných lipozomů nejvyšší koncentrace v epidermis, tento fakt byl způsoben fosfolipidy, které jako hlavní stavební složka lipozomů dokáží zvýšit transport enkapsulovaných léčiv přes SC. Je obecně předpokládáno, že fosfolipidy zvýšením kontinuity lipidové matrice ve SC usnadňují přestup lipofilních molekul. Naproti tomu akcelerační činidla mohly u ostatních lipozomů zapříčinit zvýšený průnik do hlubších vrstev kůže.<sup>48,51</sup>

Pro přechod lipozomů přes SC a penetraci do hlubších vrstev kůže nehraje jejich velikost příliš zásadní roli. Problém s penetrací může nastat paradoxně u vezikul menších velikostí ( $< 200 \text{ nm}$ ). Příčinou je jejich rychlá degradace při kontaktu s kůží a vytvoření lipidového filmu, který spíše omezuje průchod

hydrofilních látek do kůže.<sup>52</sup>

Akceleranty transdermální penetrace Pro-2, OA a DDAK reverzibilně rozrušují mezibuněčnou lipidovou hmotu ve SC. Při studiích akceleraantů ze skupiny aminokyselin bylo zjištěno, že Pro-2 v 1% koncentraci dosáhl lepších výsledků, než standardní zesilovače jako jsou Azon, DDAIP a Transkarbam 12. Tento akceleraant má vysokou aktivitu, nízkou toxicitu a změny ve SC, které vyvolává, jsou reverzibilní. Při studii účinku DDAK na adefoviru, bylo prokázáno, že 1% DDAK zvýšil koncentrace adefoviru v epidermis a dermis 33 – 61 násobně, jeho největší účinnost byla zaznamenána při pH 5,8. Díky synergickému působení s lipozomy, které narušují SC stejným mechanismem, by mohly zvyšovat průnik léčiva do epidermis. Tento předpoklad se zde příliš nepotvrdil.<sup>23,53</sup>

Použitelnost lipozomů v penetraci enkapsulovaných léčiv nemusí být vždy jednoznačné. Na základě experimentálních studií bylo zjištěno, že hodnoty léčiva triamcinolon acetonidu inkorporovaného do lipozomů byla až 17 násobně vyšší ve srovnání s kontrolním nelipozomálním vzorkem, zatímco progesteron aplikovaný v lipozomální formě vykazoval nižší hodnoty permeace ve srovnání s nelipozomální formou.<sup>54,55</sup>



**Obr. č. 18:** Koncentrace IMQ v epidermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul vzorku a jeho osmihodinové aplikaci.

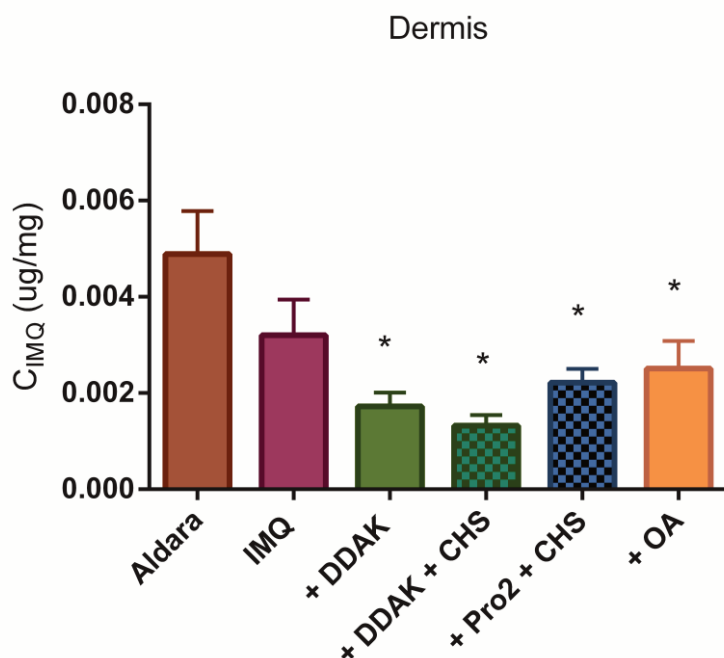
### 5.3.3 Dermis

Hodnota koncentrace IMQ v dermis byla nejvyšší po aplikaci přípravku Aldara, dosahovala hodnoty  $0,0049 \pm 0,0008 \mu\text{g/mg}$ . Druhou nejvyšší hodnotu zastával vzorek s IMQ bez přísad (  $0,0032 \pm 0,0007 \mu\text{g/mg}$  ), což je 1,7 násobně méně. U ostatních vzorků byly statisticky významné rozdíly ve srovnání s Aldarou. Z lipozomů obsahujících IMQ + DDAK ( $0,0017 \pm 0,0003 \mu\text{g/mg}$ ), IMQ + DDAK + CHS ( $0,0013 \pm 0,0002 \mu\text{g/mg}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0022 \pm 0,0003 \mu\text{g/mg}$ ), IMQ + OA ( $0,0025 \pm 0,0006 \mu\text{g/mg}$ ) do dermis proniklo 2,9, resp. 3,8, resp. 2,2, resp. 2 násobně nižší množství IMQ než z krému Aldara. Koncentrace IMQ v dermis je možné vidět na *obr. č. 19*.

Při srovnání koncentrací IMQ v epidermis a dermis, bylo zjištěno, že tyto hodnoty klesly o několik desítek násobků méně. U Aldary byla koncentrace v dermis přibližně 38 násobně menší než v epidermis. U připravovaných vzorků

IMQ a IMQ + DDAK byl pokles koncentrace přibližně 47 násobný. U další lipozomů s obsahem IMQ + OA přibližně 44 násobný, s IMQ + Pro-2 + CHS 51 násobný a s IMQ + DDAK + CHS byl pokles koncentrace IMQ v hlubší vrstvě kůže až skoro 68 násobný.

Jak je patrné z grafu na *obr. č. 19* přítomnost akcelerantu DDAK v lipozomech nezvyšuje množství IMQ v dermis, což bylo k vidění i u epidermis. DDAK zřejmě v tomto případě podporuje nejen přechod přes SC, ale i průnik IMQ do částí kůže nacházející se hlouběji než dermis. Lipozomy s obsahem IMQ + Pro-2 + CHS a IMQ + OA vykazují ve srovnání s přípravkem Aldara podobný trend jako v případě epidermis.

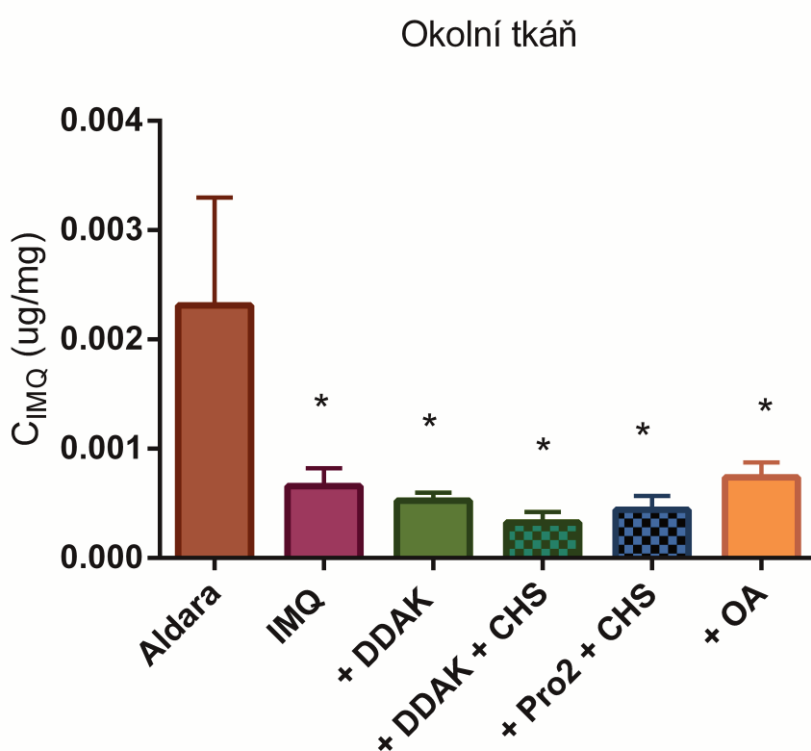


**Obr. č. 19:** Koncentrace IMQ v dermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul vzorku a jeho osmihodinové aplikaci.

### 5.3.4 Okolní tkáň

Plocha, kde nebyly nanášeny vzorky, byla také podrobena analýze, aby bylo zjištěno, zda IMQ pronikal do tkání i horizontálním směrem. Vysoká expozice léčiva v této okolní tkáni není pro nás také žádoucí. Jak můžeme vidět na grafu (*obr. č. 20*),

tak největší koncentrace IMQ v okolní tkáni byla po podání Aldary ( $0,0023 \pm 0,0010 \mu\text{g}/\text{mg}$ ). Ostatní připravované lipozomy měly po aplikaci nižší, statisticky významné rozdíly v koncentracích vzhledem k přípravku Aldara, konkrétně IMQ ( $0,0007 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ , tj. 3,3 násobně méně, IMQ + DDAK ( $0,0005 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ , tj. 4,6 násobně méně, IMQ + DDAK + CHS ( $0,0003 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), tj. 7,7 násobně méně, IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0004 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), tj. 5,8 násobně méně, IMQ + OA ( $0,0007 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), tj. 3,3 násobně méně.



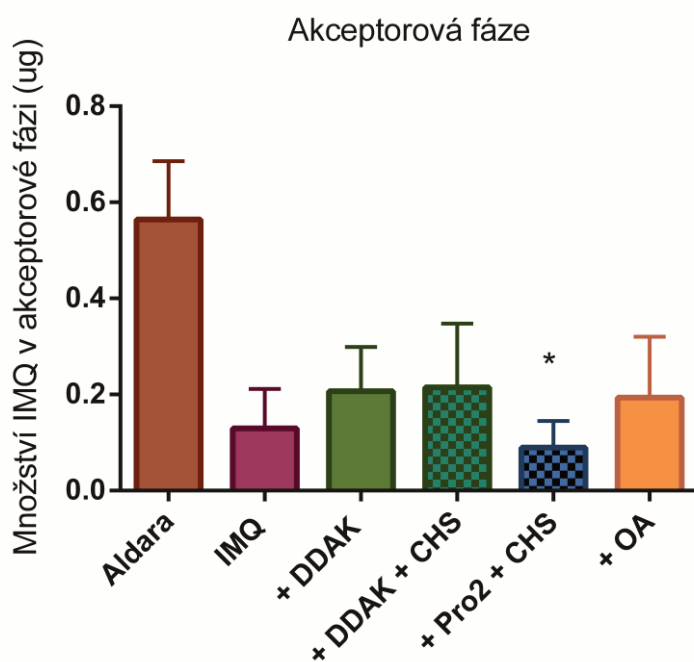
**Obr. č. 20:** Koncentrace IMQ v okolní tkáni přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul vzorku a jeho osmihodinové aplikaci.

### 5.3.5 Akceptor

Největší množství IMQ proniklo do akceptorové fáze po aplikaci komerčně dostupné Aldary, průměrná hodnota koncentrace IMQ byla  $0,5644 \pm 0,1215 \mu\text{g}$  v celém jejím objemu. Statisticky signifikantní rozdíl vykazoval vzorek IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0895 \pm 0,0557 \mu\text{g}$ ), jehož hodnota byla přibližně 7 násobně

menší oproti přípravku Aldara. Lipozomy obsahující IMQ + DDAK ( $0,2069 \pm 0,0918 \mu\text{g}$ ) a IMQ + DDAK + CHS ( $0,2153 \pm 0,1323 \mu\text{g}$ ) udávaly přibližně 2,7, resp. 2,6 násobně nižší koncentraci vůči přípravku Aldara. Hodnota koncentrace po nanesení vzorku IMQ + OA byla ( $0,1934 \pm 0,1271 \mu\text{g}$ , což je 2,9 méně než u Aldary, a po lipozomu s IMQ ( $0,1295 \pm 0,0824 \mu\text{g}$ ), to bylo 4,4 násobně méně.

Z tohoto porovnání v grafu (*obr. č. 21*) vyplývá, že připravované lipozomální vzorky s IMQ vykazovaly menší, tudíž lepší hodnoty ve srovnání s Aldarou. Při porovnání lipozomů mezi sebou bylo zjištěno, že vzorek s IMQ bez přísad a vzorek obsahující CHS vykazují nižší hodnoty koncentrace IMQ v akceptorové fázi ve srovnání s lipozomy obsahující akceleranty. Tyto nižší koncentrace IMQ mohou být způsobeny zvýšenou deponací v předchozích vrstvách, ale jak bylo uvedeno výše, především sníženým přestupem přes SC.



**Obr. č. 21:** Koncentrace IMQ v akceptoru přepočtena na celý objem akceptorové fáze po nanesení 100 ul vzorku a jeho osmihodinové aplikaci.



## 5.4 Obsah IMQ v kůži po 8 hodinách (200 µl vzorku)

Ve druhém permeačním pokusu bylo nanášeno 200 µl vzorku, což je dvojnásobná koncentrace IMQ, Aldara byla nanášena ve stejném množství, jako v předchozím permeačním pokusu. Cílem bylo zjistit, zda má dvojnásobné zvýšení koncentrace IMQ vliv na množství penetrovaného IMQ v různých vrstvách kůže.

### 5.4.1 Součet stripů SC

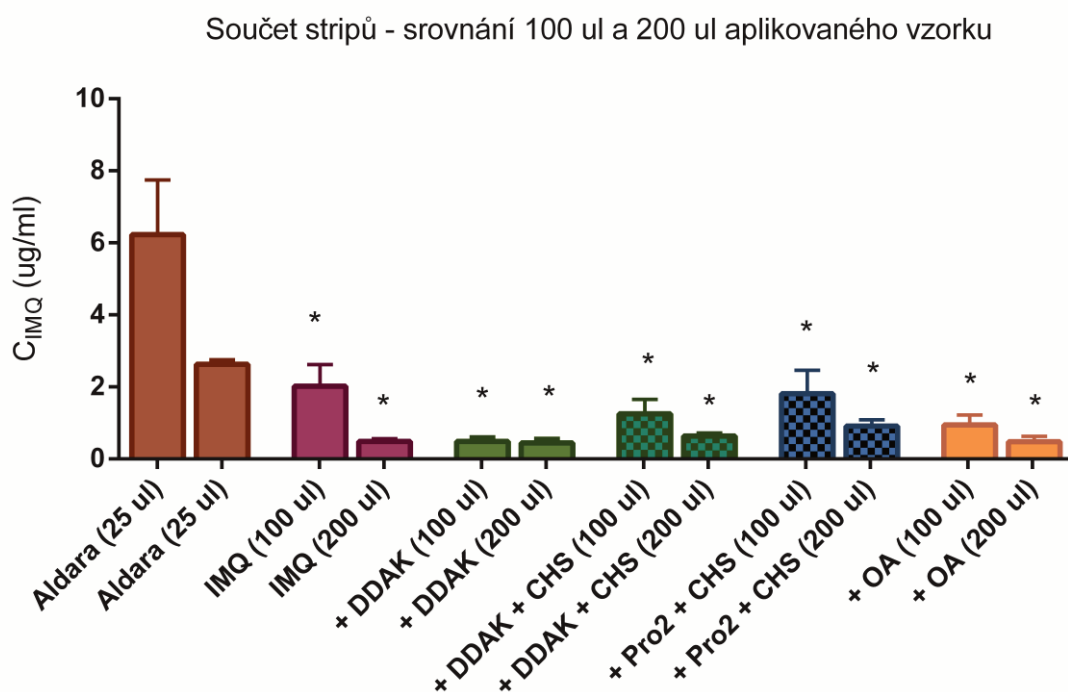
Při porovnání součtu množství IMQ ve všech stripech po aplikaci 100 µl a 200 µl lipozomových vzorků, vidíme, že přestože bylo na kůži nanášeno dvojnásobné množství IMQ, jeho koncentrace klesla a to i v případě Aldary, jejíž množství nebylo změněno. V prvním případě byla hodnota IMQ ve SC po podání Aldary  $6,2260 \pm 1,5170$  µg/ml a v druhém  $2,632 \pm 0,1233$  µg/ml, což je 2,4 násobně méně. Výsledky jsou tedy značně ovlivněny vlastnostmi kůže, která byla použita k permeačnímu pokusu.

Nejvíce se lišily hodnoty u IMQ bez přísad, kde byla koncentrace IMQ po aplikaci 100 µl vzorku  $2,021 \pm 0,5967$  µg/ml a po aplikaci 200 µl byla hodnota 4,1 násobně nižší ( $0,4911 \pm 0,0756$  µg/ml). Po aplikaci 100 µl lipozomů IMQ + DDAK + CHS, IMQ + Pro-2 + CHS a IMQ + OA byly naměřeny hodnoty koncentrace IMQ ve SC  $1,255 \pm 0,3974$  µg/ml, resp.  $1,809 \pm 0,6498$  µg/ml, resp.  $0,9419 \pm 0,2766$  µg/ml, což je u všech zmíněných vzorků 2 násobně více, než po aplikaci 200 µl lipozomálních vzorků. Na obr. č. 22 můžeme vidět, že nejvíce shodné z hlediska koncentrace IMQ jsou vzorky IMQ + DDAK. Po aplikaci 100 µl připravovaného vzorku činila koncentrace IMQ  $0,4853 \pm 1,279$  µg/ml a po 200 µl byla hodnota  $0,4422 \pm 1,277$  µg/ml, což je 1,1 násobně méně.

Všechny hodnoty koncentrací IMQ v nejsvrchnější vrstvě kůže po aplikaci dvojnásobného množství lipozomů vykazují statisticky významný pokles ve srovnání s přípravkem Aldara (v rámci druhého permeačního pokusu).

V případě lipozomálních vzorků mohlo dvojnásobné množství aplikovaných lipozomů ve větší míře interagovat s lipidy ve SC a tím pádem ji způsobit

prostupnější pro přechod do hlubších vrstev kůže, ale také do okolní tkáně (viz kap. 5.4.4 a 5.4.5), což může způsobit snížené koncentrace IMQ ve SC.



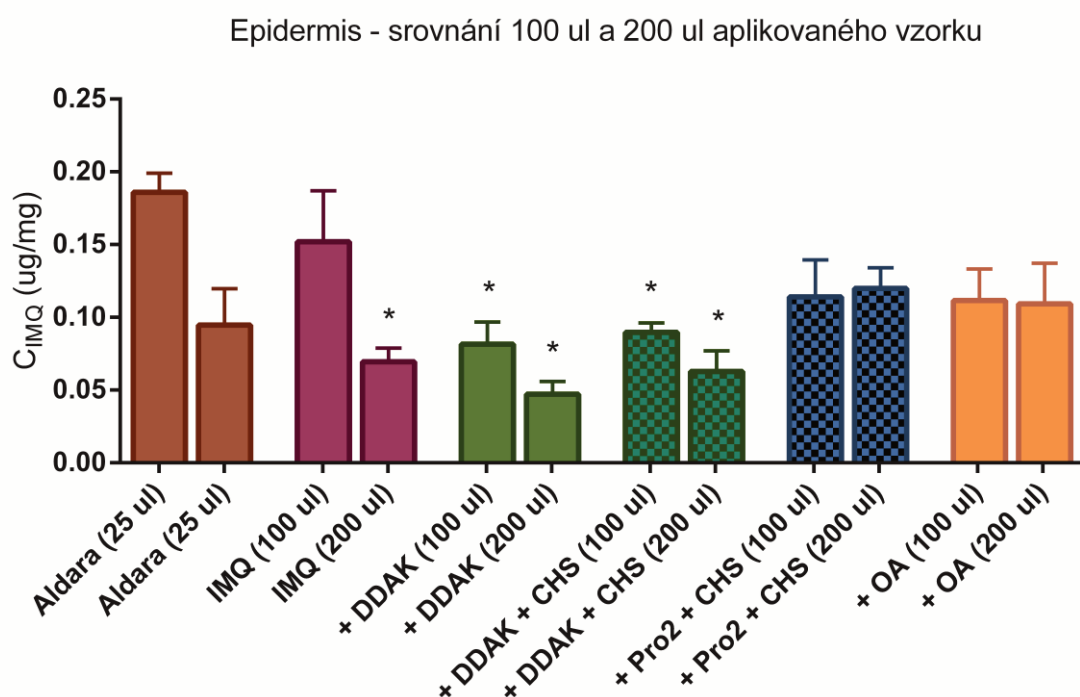
**Obr. č. 22:** Koncentrace IMQ v součtech stripů po nanesení 100 ul a 200 ul vzorku a jejich osmihodinové aplikaci.

## 5.4.2 Epidermis

Při aplikaci stejného množství krému Aldara byla naměřena hodnota koncentrace IMQ v epidermis  $0,0946 \pm 0,0251 \mu\text{g}/\text{mg}$ , což je 2 krát méně než při předchozím permeačním pokusu. Při aplikaci 200  $\mu\text{l}$  vykazovala většina připravovaných vzorků menší hodnoty koncentrace IMQ oproti 100  $\mu\text{l}$  aplikovaným vzorkům. Lipozomy s IMQ ( $0,0695 \pm 0,0093 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK + CHS ( $0,0627 \pm 0,0142 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK ( $0,0472 \pm 0,0087 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), což vykazovalo 1,4, resp. 1,7, nižší hodnoty, než po aplikaci 100  $\mu\text{l}$  vzorku. Po aplikaci lipozomů s obsahem IMQ + OA ( $0,1092 \pm 0,0279 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) a s IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,1199 \pm 0,0142 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) byly hodnoty koncentrací velmi podobné, lišily se jen v rámci SEM. Koncentrace IMQ u lipozomů s obsahem IMQ (200  $\mu\text{l}$ ), IMQ + DDAK (100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ ), IMQ + DDAK + CHS (100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ ) vykazovala statisticky signifikantní rozdíly vůči krému Aldara. Tímto můžeme vyvrátit, že při podání

dvojnásobně většího množství připravovaných vzorků lipozomů, nedosáhneme přímo úměrně vyšší koncentrace IMQ v cílovém místě účinku IMQ – epidermis.

Podle grafu (*obr. č. 23*) vidíme, že hodnoty koncentrací jsou zase nižší než v prvním permeačním pokusu. Výjimkou jsou lipozomy obsahující IMQ + DDAK + CHS a IMQ + OA, kde jsou hodnoty koncentrace IMQ po aplikaci dvojnásobného množství srovnatelné s první permeací. Lipozomy s obsahem OA vykazují pozitivní hodnoty, jelikož bylo zjištěno, že IMQ se rozpouští dobře v přítomnosti OA, se kterou utváří vodíkové můstky.<sup>49</sup>



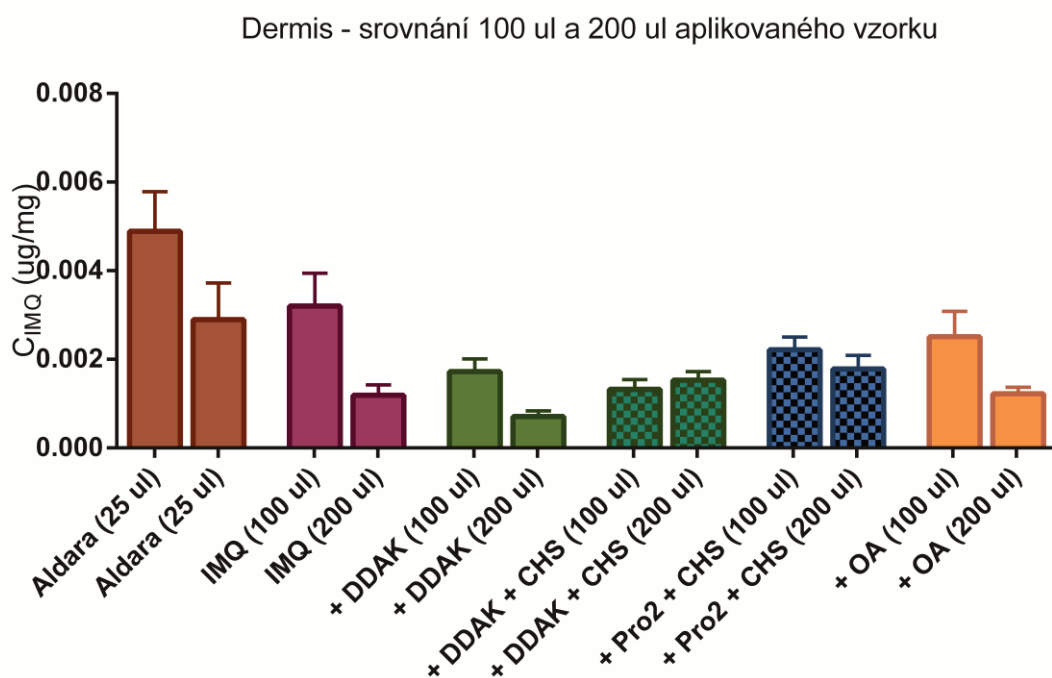
**Obr. č. 23:** Koncentrace IMQ v epidermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul a 200 ul vzorku a jejich osmihodinové aplikaci.

### 5.4.3 Dermis

Koncentrace IMQ v dermis po aplikaci stejného množství Aldary v druhém permeačním pokusu byla  $0,0029 \pm 0,0014$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , tj. 1,7 násobně nižší. Žádná z hodnot koncentrací IMQ uvolněného z lipozomů nevykazovala vůči přípravku Aldara statisticky signifikantní rozdíly. Koncentrace IMQ po aplikaci 200  $\mu\text{l}$  lipozomů vykazovala pouze v jednom případě vyšší hodnoty, než při aplikaci 100  $\mu\text{l}$  vzorku. Jednalo se o vzorek IMQ + DDAK + CHS ( $0,0015 \pm 0,0002$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), který

měl 1,2 násobně vyšší koncentraci IMQ. Ostatní lipozomy s IMQ ( $0,0012 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK ( $0,0007 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0018 \pm 0,0003 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + OA ( $0,0012 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) vykazovaly 2,7, resp. 2,4, resp. 1,2, resp. 2,1 násobný pokles. Výše popsané hodnoty vidíme v grafu (obr. č. 24).

Trend nižších koncentrací IMQ po aplikaci dvojnásobného množství lipozomů pokračuje i v tomto případě, kde všechny látky, s výjimkou IMQ + DDAK + CHS, vykazují nižší hodnoty než v první permeaci.



**Obr. č. 24:** Koncentrace IMQ v dermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul a 200 ul vzorku a jejich osmihodinové aplikaci.

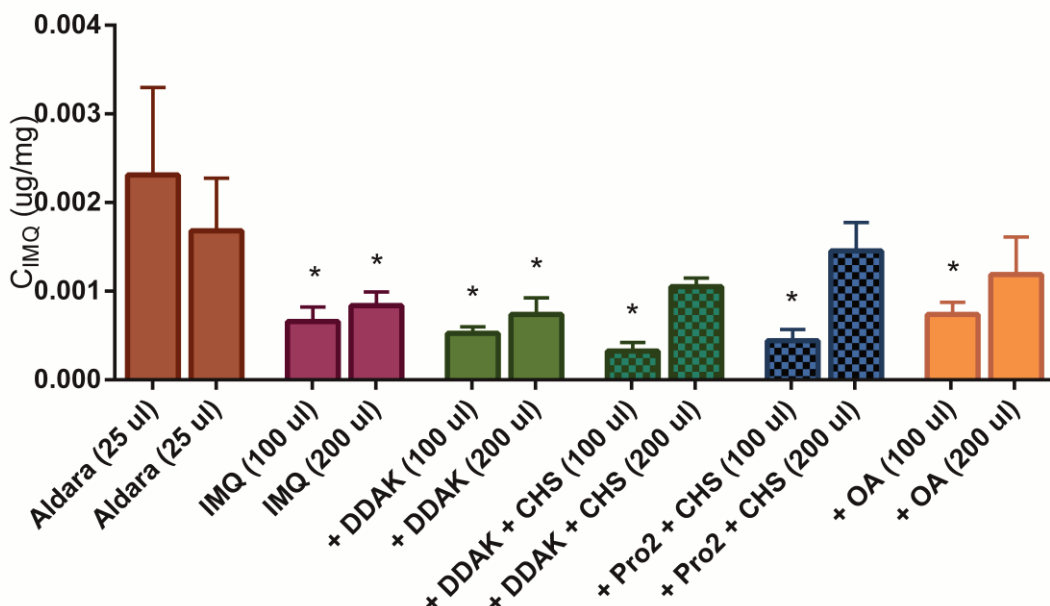
#### 5.4.4 Okolní tkáň

Po aplikaci 200  $\mu\text{l}$  lipozomů bylo zjištěno, že ve všech případech byly naměřeny vyšší hodnoty koncentrace IMQ v okolní tkáni, než tomu bylo po podání polovičního množství. Po nanesení přípravku Aldara byl opět sledován pokles koncentrace IMQ ( $0,0017 \pm 0,0006$ ), tentokrát však pouze 1,4 násobný. Po nanesení

lipozomů obsahujících IMQ ( $0,0008 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) a IMQ + DDAK ( $0,0007 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) byly nalezeny menší rozdíly než u ostatních vzorků, jsou to 1,3, resp. 1,4 násobky hodnot koncentrací jejich 100  $\mu\text{l}$  vzorků, viz obr. č. 25. U ostatních lipozomů byly naměřeny o trochu vyšší rozdíly, u vzorku IMQ + OA ( $0,0012 \pm 0,0004 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK + CHS ( $0,0011 \pm 0,0003 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0015 \pm 0,0003 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), tj. 1,7, resp. 3,2, resp. 3,3 násobně vyšší koncentrace při srovnání se 100  $\mu\text{l}$  vzorky. Lipozomy s IMQ (100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ ), IMQ + DDAK (100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ ), IMQ + DDAK + CHS (100  $\mu\text{l}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS (100  $\mu\text{l}$ ) a IMQ + OA (100  $\mu\text{l}$ ) vykazovaly statisticky signifikantní rozdíly ve srovnání s koncentracemi IMQ mimo permeační plochu po podání přípravku Aldara.

Jelikož aplikační plocha na kůži zůstala stejná – 2  $\text{cm}^2$  a kůže byla po dobu pokusu pevně uchycena v držácích, zdá se, že zvýšené množství IMQ v okolní tkáni může potvrdit domněnku, že pro prostup IMQ do kůže je zajištěn dostatečný koncentrační spád. Problémem tedy zůstává překonání kožní bariéry a cílená distribuce do epidermis.

Okolní tkáň - srovnání 100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$  aplikovaného vzorku

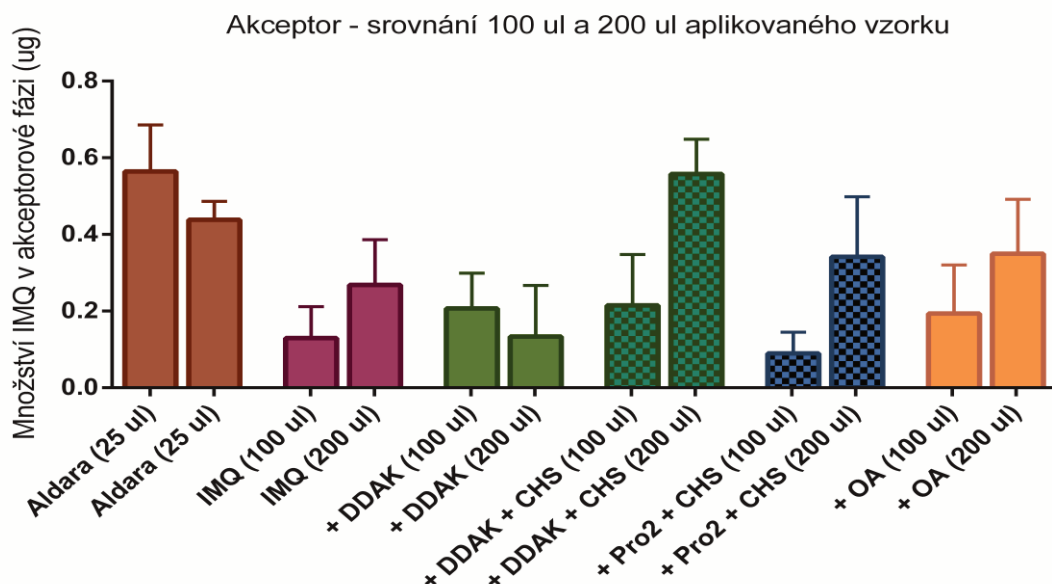


**Obr. č. 25:** Koncentrace IMQ v okolní tkáni přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$  vzorku a jejich osmihodinové aplikaci.

### 5.4.5 Akceptor

U těchto lipozomů nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v hodnotách ve srovnání s přípravkem Aldara, viz *obr. č. 26*. U vzorku IMQ + DDAK byly naměřeny hodnoty koncentrace IMQ v akceptoru ( $0,1335 \pm 0,1335 \mu\text{g}$ ) po aplikaci 200  $\mu\text{l}$  vzorku 1,5 násobně nižší oproti aplikovanému 100  $\mu\text{l}$  vzorku, nicméně i tak je tento rozdíl přibližně v rámci SEM. Ostatní 200  $\mu\text{l}$  lipozomy nabývaly vyšších hodnot. Lipozomy obsahující IMQ, IMQ + DDAK + CHS, IMQ + Pro-2 + CHS, IMQ + OA s množstvím  $0,2680 \pm 0,1185 \mu\text{g}$ , resp.  $0,5579 \pm 0,2153 \mu\text{g}$ , resp.  $0,3418 \pm 0,1568 \mu\text{g}$ , resp.  $0,3495 \pm 0,1422 \mu\text{g}$  IMQ v akceptorové fázi vykazovaly 2,1, resp. 2,6, resp. 3,8, resp. 1,8 násobně vyšší hodnoty, než tomu bylo u 100  $\mu\text{l}$  vzorků.

Jak lze vypočítat z grafu, tak se trend obrátil. Po aplikaci dvojnásobného množství lipozomů došlo k průniku většího množství léčiva do akceptorové fáze, tudíž se zvýšila systémová expozice IMQ. Výjimkou je lipozom s IMQ + DDAK, který ve všech částech kůže, kromě dermis, vykazuje nižší hodnoty koncentrace IMQ ve srovnání se 100  $\mu\text{l}$  vzorkem. Dvojnásobným množstvím lipozomů nebyly docíleny zvýšené koncentrace IMQ v epidermis, ale došlo k průniku léčiva do krve.



**Obr. č. 26:** Koncentrace IMQ v akceptoru přepočtena na celý objem akceptorové fáze po nanesení 100 ul a 200 ul vzorku a jejich osmihodinové aplikaci.

## 5.5 Obsah IMQ v kůži po 24 hodinách (100 µl vzorku)

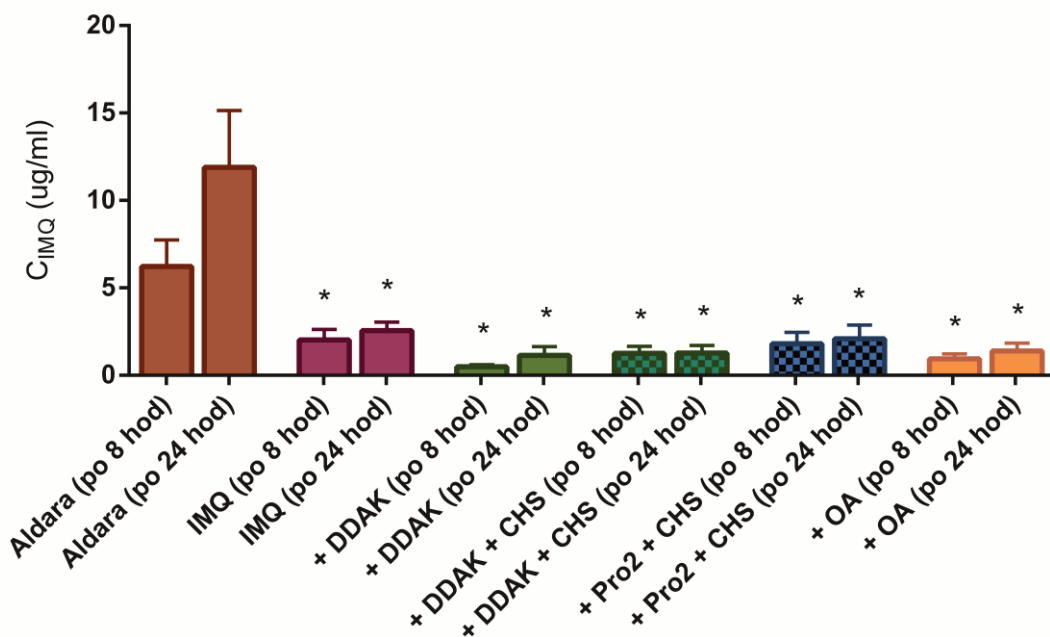
Při této permeaci bylo nanášeno stejné množství Aldary (25 µl) a lipozomů (100 µl) jako při prvním permeačním pokusu. Rozdíl byl v tom, že tyto látky byly ponechány na kůži 24 hodin. Pro lepší názornost jsou koncentrace IMQ v grafech srovnávány s výsledky permeačního pokusu se stejným množstvím nanášené látky, které byly ovšem aplikovány na kůži pouze na 8 hodin.

### 5.5.1 Součet stripů SC

Při součtu všech stripů můžeme vidět na *obr. č. 27*, že nejvyšší koncentrace IMQ ve SC byly u přípravku Aldara. Po osmi hodinách dosahovaly hodnoty  $6,2260 \pm 1,5170$  µg/ml a po 24 hodinách  $11,8900 \pm 3,2490$  µg/ml, což je 1,9 násobně víc. U všech připravovaných vzorků byly ve srovnání s přípravkem Aldara statisticky významné rozdíly. Nejvíce IMQ z nanášených lipozomů proniklo do SC po aplikaci IMQ bez přísad, kde po 8 hodinách byla koncentrace IMQ  $2,0210 \pm 0,5967$  µg/ml a po 24 hodinách byla tato koncentrace přibližně 1,3 násobně vyšší, číselně  $2,5570 \pm 0,4926$  µg/ml. Nejmenší hodnoty IMQ ve SC vycházely u přípravku IMQ + DDAK, které byly po 8 hodinách  $0,4853 \pm 0,1279$  µg/ml a po 24 hodinách  $1,1490 \pm 0,4977$  µg/ml, což vykazuje 2,4 násobný nárůst. Po aplikaci zbylých lipozomů, jako jsou IMQ + DDAK + CHS, IMQ + Pro-2 + CHS, IMQ + OA, byly koncentrace po 8 hodinách  $1,2550 \pm 0,3974$  µg/ml, resp.  $1,8090 \pm 0,6498$  µg/ml, resp.  $0,9419 \pm 0,2766$  µg/ml. Po 24 hodinách u těchto stejných vzorků byly koncentrace  $1,2680 \pm 0,4442$  µg/ml, což je o několik tisíců více, resp.  $2,0990 \pm 0,7712$  µg/ml (1,2 násobně více), resp.  $1,3910 \pm 0,4446$  µg/ml (1,5 násobně více).

Po vyhodnocení bylo zpozorováno, že nejvíce IMQ zůstávalo ve SC po aplikaci krému Aldara, což bylo nejspíše způsobeno její precipitací. Z grafu lze vypožorovat, že po 24 hodinách byly ve stripech hodnoty koncentrace IMQ vždy vyšší, avšak nijak dramaticky. Díky snížené deformovatelnosti fosfolipidové membrány způsobenou přítomností CHS, vykazoval vzorek IMQ + Pro-2 + CHS nejvyšší koncentrace IMQ z připravovaných lipozomů, které zároveň obsahovaly i akceleranty transdermální penetrace.<sup>51</sup>

Součet stripů - srovnání po 8 hod a po 24 hod



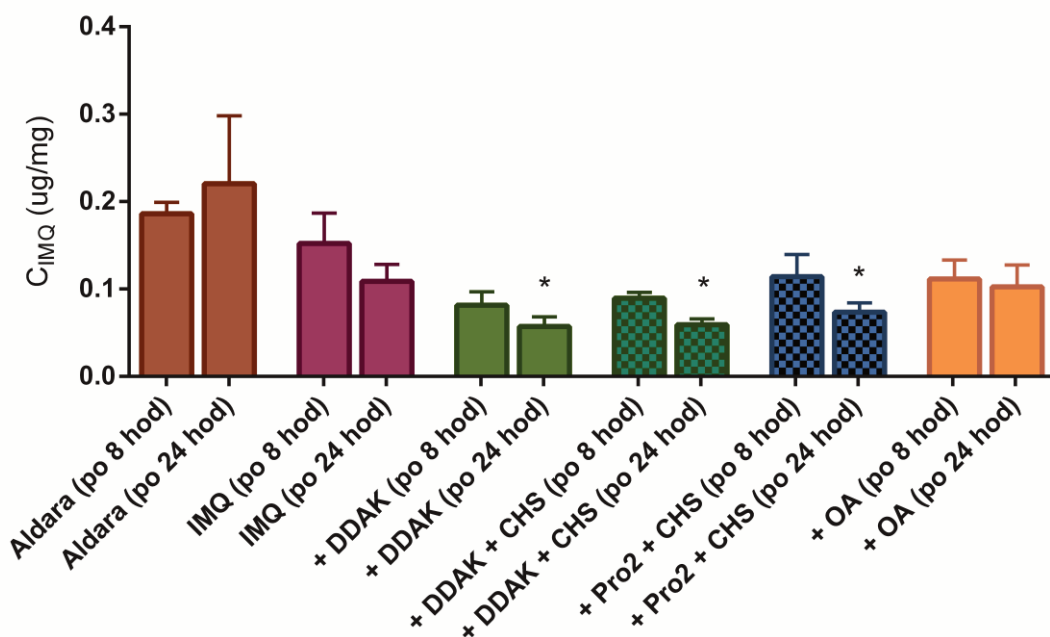
**Obr. č. 27:** Koncentrace IMQ v součtech stripů po nanesení 100 ul vzorku a jejich osmihodinové a čtyřiaadvacetihodinové aplikaci.

### 5.5.2 Epidermis

Po 24 hodinách byly hodnoty koncentrace IMQ v epidermis po aplikaci lipozomů vždy nižší, viz *obr. č. 28*. Po nanesení krému Aldara byla tato koncentrace po delším časovém intervalu 1,2 násobně vyšší s velkou chybovou úsečkou, což udává hodnota  $0,2205 \pm 0,0775 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Statisticky signifikantní rozdíly ve srovnání s přípravkem Aldara byly zjištěny u lipozomů s obsahem IMQ + DDAK ( $0,0573 \pm 0,0107 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK + CHS ( $0,0591 \pm 0,0064 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0736 \pm 0,0106 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), které vykazovaly 1,2, resp. 1,5, resp. 1,6 násobně nižší hodnoty koncentrace IMQ ve srovnání s tímto vzorky po 8 hodinové aplikační době. Po lipozomech s IMQ bez přísad byla hodnota koncentrace IMQ  $0,1088 \pm 0,0193 \mu\text{g}/\text{mg}$ , což je 1,4 krát méně. Po aplikaci vzorku IMQ + OA byla hodnota IMQ po 8 hodinách 1,1 násobně vyšší, než po 24 hodinách, tj.  $0,1025 \pm 0,0250 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Po 24 hodinách byly naměřeny vyšší koncentrace pouze u přípravku Aldara, u ostatních připravovaných vzorků byly tyto hodnoty po delším časovém intervalu nižší.



Epidermis - srovnání po 8 hod a po 24 hod



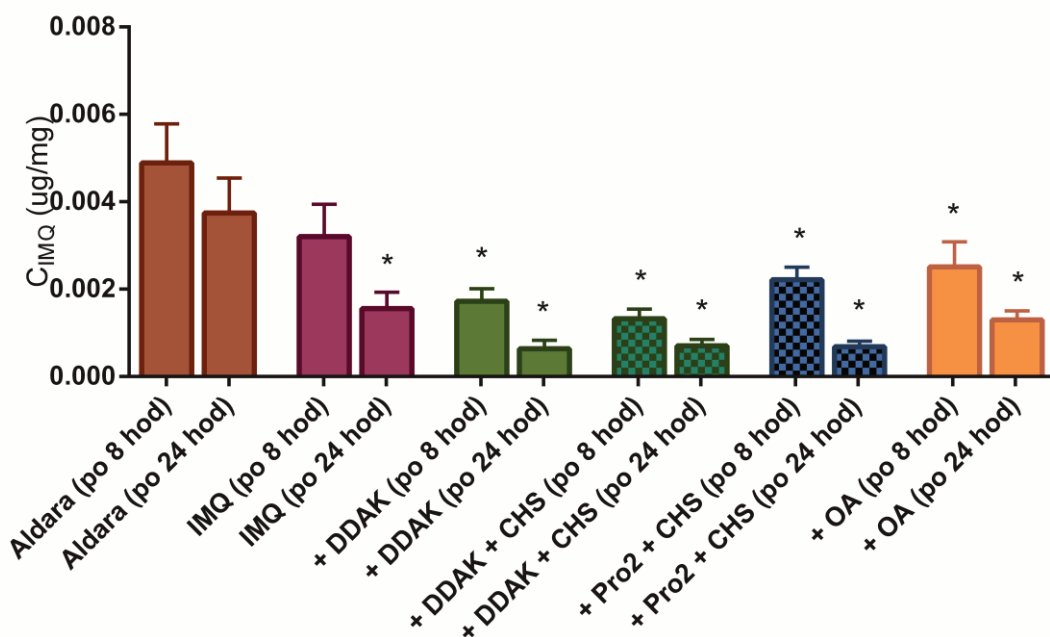
**Obr. č. 28:** Koncentrace IMQ v epidermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul vzorku a jejich osmihodinové a čtyřiaadvacetihodinové aplikaci.

### 5.5.3 Dermis

Po aplikaci přípravku Aldara byla koncentrace IMQ v dermis po 8 hodinách 1,3 násobně vyšší než po 24 hodinách, tj.  $0,0037 \pm 0,0008 \mu\text{g}/\text{mg}$ , viz obr. č. 29. Po nanesení lipozomů obsahujících IMQ bez dalších přísad po 8 hodinách koncentrace IMQ v dermis nevykazovala oproti ostatním naneseným vzorkům statisticky signifikantní rozdíl vůči přípravku Aldara a ve srovnání s 24 hodinovým aplikačním intervalem ( $0,0016 \pm 0,0004 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) nabývala 2 násobně vyšší hodnoty koncentrace IMQ. Po vyhodnocení aplikace lipozomů s obsahem IMQ + DDAK ( $0,0006 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + DDAK + CHS ( $0,0007 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + Pro-2 + CHS ( $0,0007 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), IMQ + OA ( $0,0013 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) byly tyto koncentrace IMQ po 24 hodinách 2,7, resp. 1,9, resp. 3,2, resp. 1,9 krát menší.

Z grafu můžeme poznat, že hodnoty po delším časovém intervalu byly vždy nižší ve srovnání s 8 hodinovým aplikačním časem.

### Dermis - srovnání po 8 hod a po 24 hod

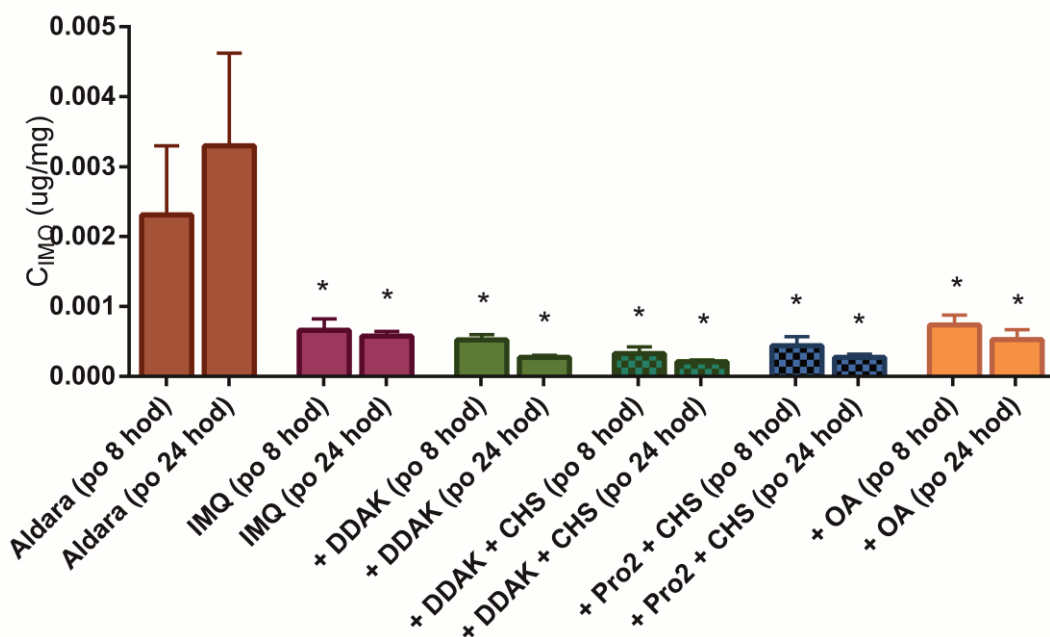


**Obr. č. 29:** Koncentrace IMQ v dermis přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 µl vzorku a jejich osmihodinové a čtyřiaadvacetihodinové aplikaci.

#### 5.5.4 Okolní tkáň

V okolní tkáni byla největší koncentrace IMQ po aplikaci přípravku Aldara, její hodnota byla po 24 hodinách  $0,0033 \pm 0,0013$  µg/mg, tj. 1,4 násobně víc. Připravované lipozomy vykazovaly ve srovnání s Aldarou statisticky významné rozdíly a jejich hodnoty byly mnohem menší, viz obr. č. 30. Nejvíce IMQ z připravovaných lipozomů prošlo do okolí ze vzorku IMQ bez přísad a vzorku IMQ + OA, kdy hodnoty koncentrací dosahovaly  $0,0006 \pm 0,0001$  µg/mg, resp.  $0,0013 \pm 0,0002$  µg/mg, tj. 1,1, resp. 1,9 krát méně než po 8 hodinách. Po nanesení lipozomů s obsahem IMQ + DDAK, IMQ + DDAK + CHS, IMQ + Pro-2 + CHS byly hodnoty koncentrací IMQ  $0,0003 \pm 0,0001$  µg/mg, resp.  $0,0007 \pm 0,0001$  µg/mg, resp.  $0,0007 \pm 0,0001$  µg/mg, což vykazuje 1,9, resp. 1,9, resp. 3,2 násobný pokles.

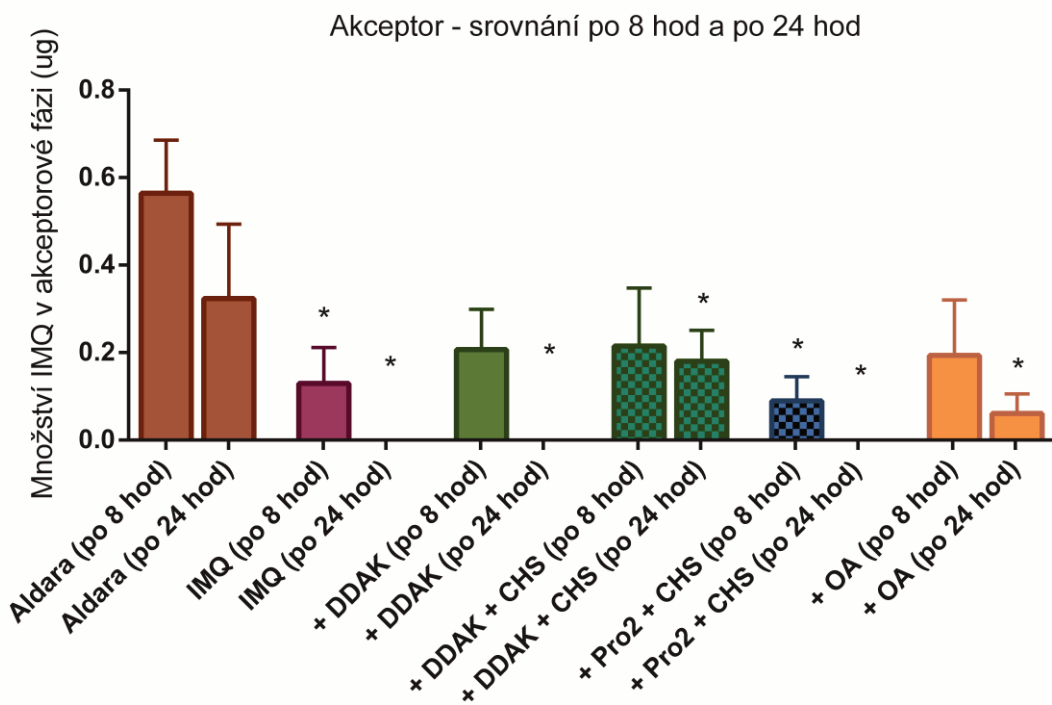
### Okolní tkáň - srovnání po 8 hod a po 24 hod



**Obr. č. 30:** Koncentrace IMQ v okolní tkáni přepočtena na hmotnost tkáně po nanesení 100 ul vzorku a jejich osmihodinové a čtyřiaadvacetihodinové aplikaci.

#### 5.5.5 Akceptor

Při porovnání přípravku Aldara (*obr. č. 31*), zjistíme, že po 8 hodinách byla koncentrace IMQ 1,7 násobně vyšší, než po 24 hodinovém intervalu, kde tato hodnota byla  $0,3238 \pm 0,1697 \mu\text{g}$ . Z připravovaných vzorků se dostaly do akceptorové fáze po 24 hodinách pouze vzorky IMQ + DDAK + CHS a IMQ + OA, kde jejich koncentrace IMQ vykazovala hodnoty  $0,1806 \pm 0,0706 \mu\text{g}$  a  $0,0611 \pm 0,0443 \mu\text{g}$ , tj. 1,2, resp. 3,2 krát méně. U ostatních lipozomálních vzorků nebyla naměřena žádná koncentrace IMQ v akceptorové fázi, což bude pravděpodobně ovlivněno kůží, která byla v pokusu použita.



**Obr. č. 31:** Koncentrace IMQ v akceptoru přepočtena na celý objem akceptorové fáze po nanesení 100 ul vzorku a jejich osmihodinové a čtyřiaadvacetihodinové aplikaci.

## 6 Závěr

Cílem práce byla příprava lipozomů s obsahem IMQ ke kožnímu podání a hodnocení průniku IMQ do kůže pomocí permeačních pokusů. Příprava lipozomů zahrnovala hledání optimální koncentrace léčivé látky a dalších složek – akceleračních transdermální penetrace a látek upravujících vlastnosti lipozomů a také vhodného postupu jejich přípravy – využití extrudéru, sonifikace, teplotní režim. Připravené lipozomové směsi byly hodnoceny pomocí optického mikroskopu a velikost částic měřena pomocí Zeta Sizeru. Permeační pokusy byly prováděny ve třech schématech lišících se dávkou a dobou aplikace.

Z výsledků vyplývá, že při srovnatelné dávce IMQ žádný z připravených lipozomů (100  $\mu$ l) nepřevýšil koncentraci IMQ v cílové tkáni (epidermis) ve srovnání s aplikací komerčně dostupného přípravku Aldara, přestože v nejsvrchnější vrstvě kůže, v dermis a také v akceptorové fázi dosahoval nižších koncentrací IMQ, což je pozitivní vzhledem k nežádoucím systémovým účinkům. Navíc se překvapivě ukázalo, že přítomnost akceleračních transdermální penetrace v připravených lipozomech nezvýšila množství IMQ v epidermis.

Aplikace dvojnásobného množství lipozomů (200  $\mu$ l) přineslo zvýšení koncentrace IMQ v epidermis pouze u lipozomů obsahující přísady Pro-2 + CHS a OA. Ve SC a dermis se koncentrace IMQ významně nezměnily, nicméně v okolní tkáni a v akceptorové fázi došlo k nárůstu koncentrace IMQ, což není žádoucí jev.

Prodloužením doby působení nanesených formulací na kůži nebylo dosaženo zvýšení koncentrace IMQ v cílové tkáni. Výsledky této práce nepřinesly zásadní průlom v topické aplikaci IMQ, avšak přinesly poznatky nápomocné pro další vývoj formulací k topickému podání IMQ.

## 7 Literatura

---

- <sup>1</sup> ČIHÁK, R. *Anatomie*, Třetí, upravené a doplněné vydání, Praha: Grada, 2016, ISBN 9788024756363, 557-571.
- <sup>2</sup> ELIŠKA, O., ELIŠKOVÁ, M. *Systematická, topografická a klinická anatomie*, Praha: Univerzita Karlova-vydavatelství Karolinum, 1996, 11-15, ISBN 80-7184-119-6.
- <sup>3</sup> ESCOBAR-CHÁVEZ, J., J., MERINO, V. *Current technologies to increase the transdermal delivery of drugs*, S.l.: Bentham e Books, 2010, ISBN 9781608051915.
- <sup>4</sup> SLOUKA, P. *Laboratorní měření kožní vodivosti*, Brno, 2015, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně.
- <sup>5</sup> HRABÁLEK, A., VÁVROVÁ, K. Lze překonat kožní bariéru?, *Praktické lékárenství*, Solen, 2005, 1, 8-11, ISSN 1803-5329
- <sup>6</sup> MENON, G., K., CLEARY, G., W., LANE M., E. The structure and function of the stratum corneum, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 435(1), 3-9, ISSN 03785173.
- <sup>7</sup> Epidermis, in: [www.basicmedicalkey.com](http://www.basicmedicalkey.com), [online], [cit. 2018-03-25], dostupné z: <https://basicmedicalkey.com/skin-6/>
- <sup>8</sup> MARSHALL EDITIONS LTD. *Lidské tělo: srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu*. Bratislava: Gemini, 1991, ISBN 80-85265-13-3, 49-53.
- <sup>9</sup> VAJNER, L., UHLÍK J., NOVOTNÝ T., KONRÁDOVÁ V. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*, Praha: Karolinum, 2017, ISBN 978-80-246-3827-0, 142-152
- <sup>10</sup> CETKOVSKÁ, P. Kožní nádory – slovo úvodem, *Onkologie*, Solen, 2010, 4(4), 224, ISSN 1803-5345.

- 
- <sup>11</sup> AMIRI, A., HERCOGOVÁ, J. Nemelanomové karcinomy kůže, *Postgraduální medicína*, Mladá fronta, 2010, 11(8), ISSN 1212-4184.
- <sup>12</sup> ČERVENÁ, L. *Kožní nádory se zaměřením na bazocelulární a spinocelulární karcinom a jejich léčbu*, Olomouc, 2014, Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci.
- <sup>13</sup> LITVIK, R., PACIOREK, M., VANTUCHOVÁ, Y. Příspěvek k léčbě aktinických keratóz, *Dermatologie pro praxi*, Solen, 2009, 3(4), 184-187, ISSN 1803-5337.
- <sup>14</sup> BAKŠIOVÁ, P. Aktinické keratózy a význam fotoprotekce, *Dermatologie pro praxi*, Solen, 2017, 11(1), 12-15, ISSN 1803-5337.
- <sup>15</sup> POLÁKOVÁ, K. Účinky topického imunomodulátoru (imiquimodu) v léčbě aktinické keratózy, *Dermatologie pro praxi*, Solen, 2010, 4(2), 83-85, ISSN 1803-5337.
- <sup>16</sup> RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, L. Nová léčba symptomatického metastazujícího bazocelulárního karcinomu či lokálně pokročilého, který není vhodný k chirurgické léčbě nebo radioterapii, *Klinická farmakologie a farmacie*, Solen, 2015, 29(2), 57-61, ISSN 1803-5353.
- <sup>17</sup> HRABÁLEK, A., DOLEŽAL, P., ŠKLUBALOVÁ, Z., FARSA, O., KREBS, A. Akceleranty transdermální penetrace, *Chemické listy*, 1999, 93(2), 107-119.
- <sup>18</sup> PATHAN, I., B., SETTY, C., M. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2009, 8(2), ISSN 1596-9827.
- <sup>19</sup> Schematic representation of the possible penetration pathways through the SC, in: *www.researchgate.net* [online], [cit. 2018-03-29], dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Fig-5-A-Schematic-representation-of-the-possible-penetration-pathways-through-the\\_fig4\\_275668661](https://www.researchgate.net/figure/Fig-5-A-Schematic-representation-of-the-possible-penetration-pathways-through-the_fig4_275668661)

- 
- <sup>20</sup> RUDECKÁ, K. *Formulace a (trans)dermální podání imiquimodu*, Hradec Králové, 2017, Rigorózní práce, Univerzita Karlova.
- <sup>21</sup> CHEN, Y., QUAN, P., LIU, X., WANG, M., FANG, L. Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9(2), 51-64, ISSN 18180876.
- <sup>22</sup> NOVOTNÝ, M. *Akceleranty transdermální permeace: studie vlivu struktury na akcelerační účinek*, Hradec Králové, 2010, Doktorská disertační práce, Univerzita Karlova.
- <sup>23</sup> JANUŠOVÁ, B., ŠKOLOVÁ, B., TÜKÖROVÁ, K. et al. Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers, *Journal of Controlled Release*, 2013, 165(2), 91-100, ISSN 01683659.
- <sup>24</sup> HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy, *Remedia*. 2006, 16(4), 433-437, ISSN 2336-3541.
- <sup>25</sup> MONTEIRO, N., MARTINS, A., REIS, R., L., NEVES, N., M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of The Royal Society Interface* 2014, 11(101), ISSN 1742-5689, 1-24.
- <sup>26</sup> Glycerophospholipids, in: *www.msr.dom.wustl.edu* [online], [cit. 2018-03-29], dostupné z: <https://msr.dom.wustl.edu/lipidomics-prior-to-2008/>.
- <sup>27</sup> KULIG, W., TYNKKYNEN, J., JAVANAINEN, M., MANNA, M., ROG, T., VATTULAINEN, I., JUNGWIRTH, P. How well does cholesteryl hemisuccinate mimic cholesterol in saturated phospholipid bilayers?, *Journal of Molecular Modeling*, 2014, 20(2), ISSN 1610-2940.
- <sup>28</sup> Schematic illustration of liposomes of different size and number of lamellae, in: *www.researchgate.net* [online], [cit. 2018-03-13], dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/0-2-Schematic-illustration-of-liposomes-of-different-size-and-number-of-lamellae-Small\\_278654572](https://www.researchgate.net/figure/0-2-Schematic-illustration-of-liposomes-of-different-size-and-number-of-lamellae-Small_278654572)



- 
- <sup>29</sup> AKBARZADEH, A. Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8(1), 1-9, ISSN 1556-276X.
- <sup>30</sup> SZOKA, F., PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1980, 9(1), 467-508, ISSN 0084-6589.
- <sup>31</sup> Lipid film hydration method, in: *www.avantilipids.com* [online], [cit. 2018-03-13], dostupné z: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>
- <sup>32</sup> PATIL, YOGITA, P., JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2014, 177, 8-18. ISSN 00093084.
- <sup>33</sup> Extruder, in: *www.avantilipids.com* [online], [cit. 2018-03-13], dostupné z: <https://avantilipids.com/divisions/equipment/>
- <sup>34</sup> RIAZ, M. Liposomes preparation methods, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 9(1), 65–77, ISSN 1011-601X.
- <sup>35</sup> KORVASOVÁ, Z. *Příprava liposomů s antivirálním účinkem*, Brno, 2006, Diplomová práce, Masarykova univerzita.
- <sup>36</sup> KORANDOVÁ, H. Imiquimod v terapii kožních onemocnění, *Dermatologie pro praxi*, SOLEN, 2007, 1(4), 188-190, ISSN 1803-5337.
- <sup>37</sup> Structural form of imiquimod, in: *www.drugs.com* [online], [cit. 2018-03-31], dostupné z: <https://www.drugs.com/pro/imiquimod-cream.html>
- <sup>38</sup> ROZEHNALOVÁ, Z., HERCOGOVÁ, J. Možnosti využití imiquimodu v dermatologii, *Remedia*, 2008, 18(3), 229-232, ISSN 2336-3541.
- <sup>39</sup> Schematické znázornění mechanismu účinku IMQ, in: *www.remédia.cz* [online], [cit. 2018-04-17], dostupné z: <http://www.remédia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20081020061120.jpg>

---

<sup>40</sup> SLADE, HB., OWENS, ML., TOMAI, MA., MILLER, RL. Imiquimod 5% cream (Aldara™), *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2005, 7(3), 437-449, ISSN 1354-3784.

<sup>41</sup> EMA, Evropská agentura pro léčivé přípravky, Souhrn údajů o přípravku – Aldara, [online] 2015, [cit. 2018-03-31], <http://www.ema.europa.eu>.

<sup>42</sup> CHOLLET, J., L., a kol. Development of a Topically Active Imiquimod Formulation, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2008, 4(1), 35-43, ISSN 1083-7450

<sup>43</sup> Imiquimod - experimental LogP, in: *www.chemspider.com* [online], [cit. 2018-05-07], dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.51809.html>

<sup>44</sup> HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy pro topické využití, *Remedia*, Brno, 2006, 16(5), 509-513, ISSN 2336-3541.

<sup>45</sup> VOCETKOVÁ, K. Liposomy, jejich charakterizace, příprava a inkorporace do nanovlákných nosičů, *Lékař a technika*, Praha, 2014, 44(2), 11-17, ISSN 2336-5552.

<sup>46</sup> ELSAYED, M., M., A., ABDALLAH, O., Y., NAGGAR, V., F., KHALAFALLAH, N., M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 332(1-2), 1-16, ISSN 03785173.

<sup>47</sup> SHARMA, V., K., SARWA, K., K., MAZUMDER, B. Fluidity enhancement: a critical factor for performance of liposomal transdermal drug delivery system, *Journal of Liposome Research*, 2013, 24(2), 83-89, ISSN 0898-2104

<sup>48</sup> EL MAGHRABY, G., M., BARRY, B., W., WILLIAMS, A., C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 34(4-5), 203-222, ISSN 09280987.

- 
- <sup>49</sup> TELÒ, I., PESCHINA, S., PADULA, C., SANTI, P., NICOLI, S. Mechanisms of imiquimod skin penetration, *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 511(1), 516-523, ISSN 03785173.
- <sup>50</sup> Winckle G., Osborne D., W. Imiquimod formulation, US20090182004 A1 US, 16. červenec 2009.
- <sup>51</sup> VERMA, D., D., VERMA, S., BLUME, G., FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 55(3), 271-277, ISSN 09396411
- <sup>52</sup> ŠENTJURC, M., VRHOVNIK, K., KRISTL, J. Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method, *Journal of Controlled Release*, 1999, 59(1), 87-97, ISSN 01683659.
- <sup>53</sup> VÁVROVÁ, K., LORENCOVÁ, K., NOVOTNÝ, J., HOLÝ, A., HRABÁLEK, A. Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: Influence of pH, ion-pairing and skin species, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 70(3), 901-907, ISSN 09396411.
- <sup>54</sup> KNEPP, V., M., Hinz, R., S., SZOKA, F., C., GUY, R., H. Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. I. Investigation of transdermal potential, *Journal of Controlled Release*, 1988, 5, 211-221, ISSN 01683659.
- <sup>55</sup> YU, H., LIAO, H. Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro, *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 127(1), 1-7, ISSN 03785173.