UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Vliv vybraných imidazoliových iontových kapalin na permeabilitu lidské kůže při jejich ko-aplikaci s modelovými sloučeninami

Effect of selected imidazolium ionic liquids on the permeability of human skin during their co-application with model compounds

Diplomová práce

Denisa Trávníčková

V Hradci Králové 2024

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

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

V Hradci Králové Denisa Trávníčková

Poděkování

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování všem, kteří mi poskytli podporu a pomoc při přípravě této diplomové práce. Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce, Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, za jeho odborné vedení, cenné rady a trpělivost během celého procesu.

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

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Autor: Denisa Trávníčková

Název diplomové práce: Vliv vybraných imidazoliových iontových kapalin na permeabilitu lidské kůže při jejich ko-aplikaci s modelovými sloučeninami

Transdermální aplikace je vzhledem ke snadné aplikaci, vyhnutí se first – pass efektu a velkému povrchu kůže vhodná cesta podání léčivé látky. Hlavní bariérou, která omezuje přístup většiny látek do hlubších vrstev kůže a do systémové cirkulace je *stratum corneum*. Permeaci léčiv kůži navíc ovlivňuje řada faktorů, zejména fyzikálně-chemické vlastnosti látky. Struktura a funkce SC je zásadní pro udržení kožní bariéry a nalézt způsob k překonání bariérových vlastností kůže, který by nepoškodil kůži, je obtížné. Použití iontových kapalin jako enhancerů kožní penetrace představuje nový směr ve vývoji dermatologických a farmaceutických přípravků. Struktura iontových kapalin umožňuje nespočetnou kombinaci kationtů a aniontů, které by teoreticky mohly vést k syntéze iontových kapalin s požadovanou vlastností či aplikací.

Tato práce přispívá k pochopení vlivu dvou imidazolových iontových kapalin na permeační profil modelových látek – theofylinu a sodné soli diklofenaku, při aplikaci na lidskou kůži za použití Franzových difúzních cel. Závěry této studie ukazují, že ko-aplikace 1-methyl-3-oktylimidazolium bromidu a 3-dodecyl-1-methylimidazolium bromidu v podobě 20mM vodné suspenze s theofylinem a sodnou solí diklofenaku, vedla k ovlivnění prostupu léčiva kůží a retenci léčiva v kůži.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Author: Denisa Trávníčková

Title of the thesis: Effect of selected imidazolium ionic liquids on the permeability of human skin during their co-application with model compounds

Transdermal application is due to the ease of application, avoiding the first-pass effect and the large surface area of the skin make it a suitable route of administration. The stratum corneum is the main barrier that limits the access of most substances to the deeper layers of the skin and to the systemic circulation. In addition, the permeation of drugs through the skin is influenced by a number of factors, particularly the physicochemical properties of the substance. The structure and function of the SC is critical to the maintenance of the skin barrier, and finding a way to overcome the barrier properties of the skin that does not damage the skin is difficult. The use of ionic liquids as skin penetration enhancers represents a new direction in the development of dermatological and pharmaceutical products. The structure of ionic liquids allows for a myriad of combinations of cations and anions that could theoretically lead to the synthesis of ionic liquids with desired properties or applications.

This work contributes to the understanding of the influence of two imidazolium ionic liquids on the permeation profile of the model compounds- theophylline and diclofenac sodium, when applied to human skin using Franz diffusion cells. The findings of this study show that the co-application of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide and 3-dodecyl-1-methylimidazolium bromide in the form of a 20 mM aqueous suspension with theophylline and diclofenac sodium resulted in an effect on skin penetration and retention of the drug in the skin.

Obsah

Poděkování 3
Abstrakt 4
Abstract 5
Obsah 6
1. Seznam zkratek 8
Úvod a cíl práce 9
2. 9
3. Teoretická část 10
3.1. Kůže 10
3.1.1. Anatomie a fyziologie kůže – Epidermis, Dermis, Hypodermis 10
3.1.2. Funkce kožní bariéry v lidském těle 14
3.1.3. Kompozice kůže 16
3.1.4. Stratum corneum a permeační procesy 20
3.2. Iontové kapaliny 21
3.2.1. Definice a struktura iontových kapalin 21
3.2.2. Generace iontových kapalin 22
3.2.3. Vlastnosti iontových kapalin 22
3.2.4. Využití iontových kapalin 24
3.2.4.1. Solubilizace léčiv 25
3.2.4.2. Aktivní farmaceutické sloučeniny – iontové kapaliny (API-IL) 26
3.2.4.3. Antimikrobiální látky 26
3.3. Vliv iontových kapalin na permeaci látek kůží 27
3.3.1. Mechanismus účinku iontových kapalin na permeaci látek kůží 27
3.3.2. Výhody a nevýhody iontových kapalin-toxicita a biodegradabilita 28
4. Experimentální část 30
4.1. Chemikálie, materiály a přístroje 30
4.2. Postup experimentální práce 30
4.2.1. Lidská kůže 30
4.2.2. Příprava donorových vzorků pro permeaci 30
4.2.3. Permeace 31
4.2.4. HPLC 32
4.2.5. Statické zpracování dat 32
5. Výsledky a diskuze 34
5.1. Rozpustnost TH a DIC v donorovém vzorku 34

5.2. Permeace 36
5.2.1. Srovnání účinku C8-MIM a C12-MIM na retenci TH a DIC v lidské kůži 36
5.2.2. Srovnání účinku C8MIM a C12MIM na průnik TH a DIC lidskou kůží 37
6. Závěr 39
7. Seznam obrázků 40
8. Reference 41

1. Seznam zkratek

API	Aktivní farmaceutické složky
Cer	Ceramidy
Chol	Cholesterol
CholS	Cholesterol sulfát
TH	Theofylin
DIC	Sodná sůl diklofenaku
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
NMF	Přirozené hydratační faktory
PBS	Izotonický fosfátový pufr
IL	Iontové kapaliny (Ionic liquids)
SC	Stratum corneum
TDDS	Systém transdermálního podávání léčiv
TEWL	Transepidermální ztráta vody

2. Úvod a cíl práce

Kůže, jako největší orgán lidského těla, plní řadu důležitých funkcí, včetně ochrany proti vnějším vlivům, regulace tělesné teploty a prevence ztráty vody. Krom základních funkcí je kůže významný prostředník pro podávání léčiv. Klíčovou roli hraje především nejsvrchnější vrstva složená z korneocytů a lipidové matrix – *stratum corneum* (SC). Zrohovatěla vrstva kůže představuje hlavní bariéru pro pronikání látek kůží a je tak hlavním omezením pro efektivní podávání léčiv.

Za účelem překonání SC a zlepšení prostupu léčiv přes kůži byly vyvinuty různé chemické a fyzikální metody. Inovativní přístup ke zlepšení (trans)dermálního podávání léčiv představují iontové kapaliny (IL). IL jsou soli tvořené z organického kationtu a organického či anorganického kationtu, které se díky svým unikátním vlastnostem (nízká teplota tání, nízký tlak par, vysoká tepelná stabilita a schopnost rozpouštět široké spektrum organických i anorganických látek) staly atraktivním a potenciálním prostředkem pro zvýšení rozpustnosti léčiv ve formulacích a následném zlepšení jejich prostupu přes SC.

Cílem práce bylo prozkoumat potenciál dvou amfifilních IL s délkou řetězce 8 a 12 uhlíků, tj. 1-methyl-3-oktylimidazolium bromid (C_8MIM) a 3-dodecyl-1-methylimidazolium bromid (C_{12}MIM). Pro permeační experimenty *in vitro* byly použity Franzovy difuzní cely. Po ko-aplikaci těchto IL s modelovými látkami na lidskou tkáň, následovala analýza vlivu IL na prostup lidskou kůži a retenci léčiv v kůži. Množství permeantu v akceptorové části a konkrétní množství látek zadržených v kůži byly vyhodnoceny za pomocí HPLC.

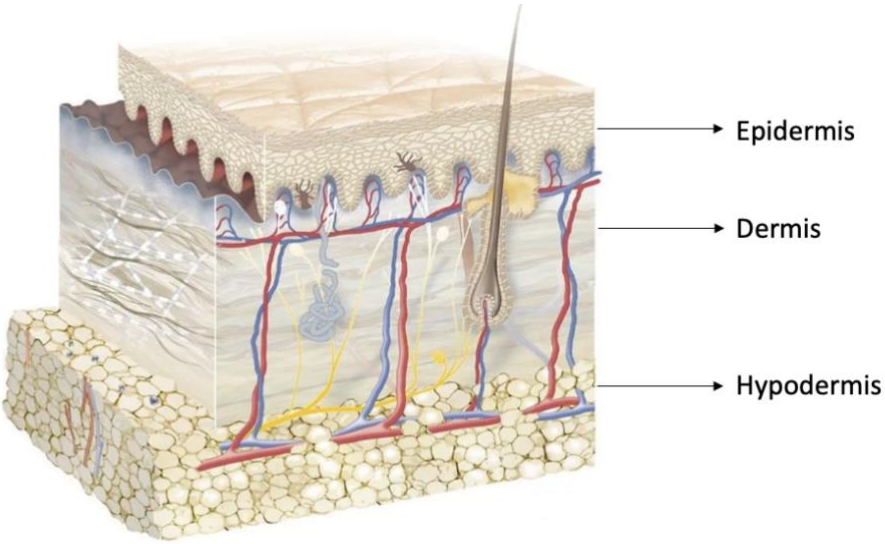
3. Teoretická část

3.1. Kůže

3.1.1. Anatomie a fyziologie kůže – Epidermis, Dermis, Hypodermis

Lidská kůže je složitý a rozsáhlý orgán o celkové ploše téměř 2 m^2, který pokrývá celý povrch těla. Struktura kůže je přizpůsobena k udržení homeostázy těla, poskytuje mu celkovou ochranu a umožňuje jedinci vnímat různé modality vjemů. Přibližně 15 % celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka představuje kůže, což z ní činí největší orgán těla. Je vysoce přizpůsobivá, má různou tloušťku a specializované funkce v lidském těle. [1]

Kůže je heterogenní orgán, který se skládá z odumřelé tkáně, epitelu, pojivové tkáně a svalů. Anatomicky je uspořádána do tří hlavních vrstev – *epidermis, dermis a hypodermis* (Obrázek 1).



Obrázek 1. Zjednodušené schéma tří vrstev, které se v kůži vyskytují. [2]

Tyto vrstvy s bohatou sítí nervového systému zajišťují dobrou komunikaci s mozkem. Důležité je zmínit, že organizace kůže vykazuje značné regionální rozdíly, které se týkají například tloušťky, hustoty melanocytů a rozmístění epidermálních přívěsků. Topografické rozdíly ve stavbě a funkci kůže jsou značné na pokožce hlavy, kůži obličeje, dlaních a chodidlech, hřbetní kůži rukou a nohou, podpaží a perineu, které mají svoji vlastní anatomii, funkci a reaktivitu. [3-5]

Nejspodnější vrstvou je **hypodermis**, také označovaná jako podkožní tkáň. Nachází se pod retikulární vrstvou dermis a skládá se z volné pojivové tkáně. V závislosti na lokalitě formuje tkáň klouzavé vrstvy nebo velké kapsy tukové tkáně, které izolují kůži, chrání ji a podílí se na termoregulaci. Tukové buňky tvoří vrstvu různé tloušťky, která závisí na umístění v těle, pohlaví a stavu výživy. Hypodermis je vysoce protkaná cévami, což umožňuje rychlé vstřebání podkožních injekcí léčiv. [6, 7]

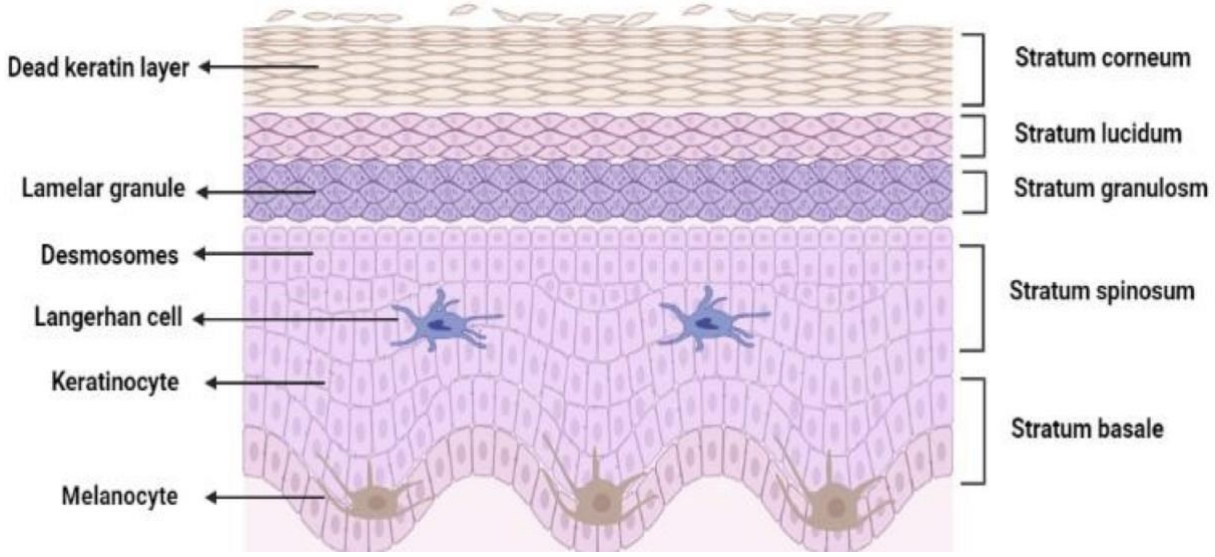
Mezi epidermis a podkožní tkání se nachází vrstva pojivové tkáně – **dermis**. Obvykle je silná <2 mm, ale u dospělých lidí na zádech může mít až 4 mm. Struktura dermis je vláknitá, složená z kolagenu, elastické tkáně a dalších extracelulárních složek jako jsou cévy, nervová zakončení, vlasové folikuly a žlázy. Síť elastinových a kolagenových vláken je navzájem propojená a spojuje dvě vrstvy pojivové tkáně dermis, tj. papilární a retikulární vrstvy. Papilární vrstva je povrchová a podstatně tenčí, zde se nacházejí fibroblasty, tukové buňky, malé krevní cévy, fagocyty (buňky, které pomáhají bojovat s bakteriemi), lymfatické kapiláry, lymfatická vlákna a dotykové receptory. Hlubší retikulární vrstva je dobře vaskularizovaná a má bohaté senzorické a sympatické nervové zásobení. Obsahuje elastin, který zajišťuje pružnost pokožky, a kolagenní vlákna, která udržují hydrataci pokožky. Jednou z funkcí dermis je zajistit mechanickou pevnost kůže. Mimo to má za úkol podporovat, vyživovat a spojovat epidermis a hypodermis. [5, 7]

Epidermis je nejsvrchnější vrstva kůže a zároveň ze všech vrstev biologicky nejaktivnější. Bazální vrstva epitelu (*stratum basale*) se totiž neustále obnovuje. Hlavní buňky nacházející se v epidermis jsou keratinocyty, které jsou nejméně z 80 % ektodermálního původu. Tyto buňky podléhají procesu diferenciace. Ten probíhá při migraci buněk z bazální vrstvy na povrch kůže a vede ke keratinizaci. Keratinizace je proces, při němž keratinocyty procházejí syntetickou a poté degradační fází. Když keratinocyty nakonec dosáhnou nejvrchnější vrstvy, jsou z povrchu odloučeny (deskvamovány). Celý proces trvá přibližně 30 až 40 dní. Výsledkem je tvorba zploštělých, anukleárních buněk (korneocytů), které se nakonec z povrchu kůže odloučí. Tyto keratinocyty vyrábějí a ukládají bílkovinu keratin. V epidermis jsou dále přítomny melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. [1, 3, 7]

Hluboký okraj epidermis je charakterizován řadou výběžků tzv. *rete pegs*, které přecházejí směrem dolů do dermis. Při pohledu na řez kůží pod mikroskopem tak spodní okraj epidermis formuje zvlněný vzhled. Narozdíl od dermis, je epidermis avaskulární, což znamená že jí neprochází žádné cévy. Epidermis lze dělit na tenkou kůži, která se skládá ze čtyř vrstev v

rámci většiny části těla, a tlustou kůži, která existuje pouze na rukou a chodidlech nohou. [1, 5, 7]

Epidermis se skládá z pěti histologických vrstev, které jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2. Schematické znázornění vrstvy epidermis. [8]

Od nejhlubší po nejpovrchnější jsou to tyto vrstvy:

1. ***Stratum basale*** – ztvárňuje jedna vrstva bazofilních keratinocytů nízkého sloupcovitého až kuboidního tvaru s velkými jádry. Buňky jsou pevně spojeny s bazální membránou pomocí hemidesmosomů a s postranními a horními sousedními buňkami pomocí desmozomů. Tato vrstva je také známá jako *stratum germinativum*, protože zde dochází k mitóze keratinocytů a tato vrstva je zdrojem keratinocytů horních vrstev. Na rozdíl od ostatních vrstev je tvořena jedinou vrstvou bazálních buněk, které produkují keratinocyty, jež budou povrchově odsunuty ze *stratum basale*. Některé z těchto proliferovaných buněk zůstávají připojeny k bazální lamině jako kmenové buňky, zatímco jiné se diferencují na spinální keratinocyty *stratum spinosum* a vytlačují nadložní buňky směrem k povrchu. Obnova epidermis trvá 15 až 30 dní a je ovlivněna věkem, oblastí těla a dalšími faktory. Mezi bazálními buňkami se nachází i buňky produkující pigment melanin – melanocyty. Jsou členy pigmentového systému kůže a druhým nejpočetnějším typem buněk epidermis. Melanin chrání DNA buněk tím, že absorbuje a rozptyluje škodlivé destruktivní ultrafialové (UV) záření. Dalším typem buněk jsou Merkelovy buňky (hmatové buňky), které jsou v malém počtu

roztroušeny v bazální vrstvě po celém těle a mají zvláštní úlohu ve smyslovém vnímání. [1, 5, 6]

2. ***Stratum spinosum*** – nejsilnější vrstva epidermis. V této vrstvě se nachází několik vrstev buněk, které vykazují podobnou mitotickou aktivitu jako bazální buňky ve *stratum basale*. Tato vrstva je známá jako Malpighova vrstva. Díky tomu, že *stratum basale* neustále produkuje nové keratinocyty dochází k migraci starých sloupcovitých keratinocytů, které při tom ztrácejí vodu, zplošťují se a získávají polyedrický tvar. Sousední keratinocyty mezi sebou vytvářejí četné mezibuněčné můstky se spinózními výběžky a pevně se spojují desmosomy. Termín "spinózní" označuje vzor uspořádání buněk. Ve *stratum spinosum* nalezneme i Langerhansovy buňky, které pocházejí z monocytů kostní dřeně a pro kůži představují vlastní mononukleární fagocytární systém. Tyto dendritické buňky jsou schopny vázat, zpracovávat a prezentovat antigeny T-lymfocytům a iniciují odpověď proti cizorodým antigenům. Hrají důležitou roli v kontaktních alergických reakcích a dalších buněčně zprostředkovaných imunitních reakcích kůže. [1, 5, 6]

3. ***Stratum granulosum*** – obsahuje čtyři vrstvy keratinocytů produkující keratin a keratohyalin, který této vrstvě dodává objemný granulární vzhled. Zploštělé polygonální buňky procházejí konečnou buněčnou diferenciací nejsvrchnějších keratinocytů *stratum spinosum* a stále mají jádra. Cytoplazmu vyplňují velká, hrubá, nepravidelně tvarovaná, intenzivně bazofilní a nepokrytá keratohyalinní granula tvořená filagrinem a dalšími proteiny. Charakteristickým znakem v cytoplazmě jsou membránově vázaná malá lamelární lipidová zrnka. Buňky vypouštějí svůj granulární obsah do mezibuněčných prostor exocytózou. Látka bohatá na lipidy se poté šíří a vyplňuje mezibuněčné prostory. [5, 6]

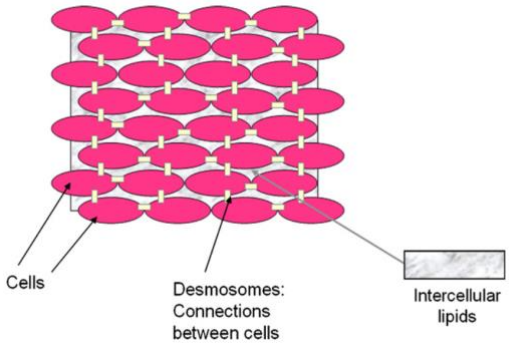
4. ***Stratum lucidum*** – průhledná vrstva, která se nachází těsně nad *stratum granulosum* a pod *stratum corneum* (SC). Tato tenká vrstva se nachází pouze na ploskách rukou a nohou. *Stratum lucidum* obsahuje odumřelé keratinocyty a eleiden, čirý protein bohatý na lipidy pocházející z keratohyalinu. To dodává vrstvě průhledný (tj. lucidní) vzhled a funguje jako bariéra pro vodu. [5, 9]

5. ***Stratum corneum*** **(SC)** – nejsvrchnější vrstva epidermis, která je vystavená vnějšímu prostředí. Její název vznikl od zvýšeného procesu keratinizace, tj. rohovatění. V této vrstvě se nachází 15-30 vrstev odumřelých keratinocytů. Funkcí této suché odumřelé vrstvy je obrana proti pronikání mikrobů, zabránění dehydrataci spodních vrstev a ochrana před dalšími poraněními. I zde dochází k pravidelnému odlučování buněk, které jsou nahrazovány buňkami

vytlačenými ze *stratum granulosum* (nebo *stratum lucidum* v případě dlaní a chodidel). Obměna celé vrstvy trvá přibližně čtyři týdny a jedná se o poslední fázi zrání a vývoje keratinocytů. Keratinocyty ve SC jsou diferencované a bezjaderné. Označující se jako korneocyty a zachovávající si pouze keratinová vlákna uložená ve filagrinové matrix. [10]

3.1.2. Funkce kožní bariéry v lidském těle

Lidská kůže je největším orgánem v těle, který funguje jako rozhraní mezi člověkem a vnějším prostředím. Formuje první obrannou linii proti potencionálně nebezpečným hrozbám prostředí, tj. infekce viry, bakteriemi a plísněmi. [11] V rohové vrstvě, SC, je umístěna fyzikální bariéra, která se skládá z buněk obohacených o proteiny a mezibuněčných domén obohacených o lipidy. K této funkci bariéry přispívá také epidermis prostřednictvím těsných, štěrbinových a adherenčních spojů, jakožto i desmosomů a cytoskeletálních prvků. Pokud dojde ke změně v epidermální diferenciaci a složení lipidů, může to mít za následek změnu bariérové funkce, což hraje klíčovou roli v onemocněních kůže. [11, 12] Narušená kožní bariéra je významně podstatná v patogenezi kožních onemocnění. Zjednodušený pohled na strukturu SC vysvětluje tzv. *hypotéza cihly a malty* (Obrázek 3).



Obrázek 3. Model cihly a malty. Obrázek ilustruje korneocyty v podobně „cihel“, mezibuněčné lipidy tvořící „maltu“ a desmosomy spojující korneocyty. [13]

V podstatě se jedná o 15-30 vrstev korneocytů (cihly), které drží pohromadě korneodesmosomy (nýty), jež jsou vloženy do hydrofobní extracelulární lipidové matrix (malta) a uzavřeny v proteinovém obalu. [14] SC zabraňuje nadměrnému úniku tělesných tekutin, což je nezbytnou podmínkou pro život. [10, 15] Důležitost kůže jako bariéry dokládá mortalita spojená s popáleninami velkého rozsahu, při kterých zvýšená transepidermální ztráta vody (TEWL) vede k dehydrataci, selhání ledvin a šoku.

Obsah vody ve SC se označuje jako hydratace SC a je nezbytná pro udržení bariérové funkce kůže. Hydratace SC ovlivňuje zrání epidermálních a dermálních buněk, proces

deskvamace a expresi keratinů a proteinů. Narušení lamelárních struktur je nepříznivým účinkem nadměrné hydratace SC. Kožní bariéra chrání před rozsáhlými ztrátami vody v jednom směru (*inside-outside* bariéra) a před vnikáním škodlivých látek z prostředí (*outside-inside* bariéra). Inverzní vztah mezi TEWL a hydratací SC je dobře znám. Vysoké hodnoty TEWL jako ukazatele narušené bariérové funkce kůže často korelují s nízkou hydratací SC. Je také dobře známo, že hydratační prostředky často zlepšují funkci kožní bariéry. Mechanismy tohoto vzájemného působení nebyly systematicky studovány. Vědci se domnívají, že narušená funkce kožní bariéry vede ke změnám v epidermální diferenciaci, zejména v expresi filagrinu, což následně ovlivňuje produkty odbourávání filagrinu vázající vodu. [12] K zadržení vody využívá SC tři hlavní mechanismy, tj. mezibuněčné lamelární lipidy, jejíž fyzikální konformace vytváří těsnou a polopropustnou bariéru pro průchod vody tkání. Další podíl na zadržení vody má přítomnost plně vyzrálých korneodesmozomů vázaných na ceramidy (Cer) a hydrofobizovaných korneocytů, které ovlivňují tortuozitu SC, a tím i délku difuzní cesty vody. Klíčová je také přítomnost intracelulárních i extracelulárních hygroskopických materiálů nazývaných "přirozené hydratační faktory" (NMF). [16]

Další funkcí kožní bariéry prostřednictvím syntézy melaninu je ochrana před škodlivým UV zářením. [17] Melanin vzniká složitou cestou v melanocytech, přesněji v membránových organelách zvaných melanosomy. Melanocyty jsou přenášeny dendritickými procesy a nachází se v bazální a suprabazální vrstvě kůže, vytváří melaninovou čepičku a tím snižují škodlivé účinky ultrafialového záření. To se děje díky komunikaci melanocytů s keratinocytem. Hlavní dva typy melatoninu jsou feomelanin a eumelanin. [14]

Poté co je epidermální vrstva lidské kůže vystavena slunečnímu záření dochází k syntéze vitaminu D, který je nezbytný pro normální vstřebávání vápníku a fosforu. Tyto minerály jsou potřebné pro zdravé kosti. Cholekalciferol, derivát steroidního cholesterolu (Chol), se syntetizuje v kůži za pomoci slunečního záření. V játrech se přemění na kalcidiol a v ledvinách následně na aktivní formu vitaminu D, tj. kalcitriol. V důsledku nedostatku vitaminu D v těle vzniká onemocnění označované jako křivice. Ten se projevuje u dětí bolestivým stavem, jelikož jsou kosti v důsledku vápníku deformované. Osteomolacie neboli měknutí kostí se projevuje zejména u starších osob, které trpí nedostatkem vitaminu D. [9]

Povrch SC má kyselé pH přibližně 4 až 5,5, tzv. kyselý plášť, který hraje ochrannou roli při kolonizaci povrchu kůže škodlivými bakteriemi. K navýšení pH pokožky může dojít při mytí pomocí kostkových mýdel, která jsou vyráběna z přírodního mýdla a jsou ze své podstaty alkalická. [13] Trobaugh a Wickett uvedli, že jednorázové mytí typickými mýdly zvýšilo pH z

normálního rozmezí 5,0 až 5,5 na přibližně 7,5. Mytí mýdlem na bázi syntetického detergentu kokoylisethionátu sodného tento účinek nemělo. Během několika následujících hodin pH pokožky umyté mýdlem postupně klesalo směrem k normálu, protože SC obsahuje složky (mastné kyseliny), které přirozeně zajišťují pufrační kapacitu. [18-20]

Nepostradatelnou funkcí, na které se kůže podílí je regulace tělesné teploty. Teplota je především regulována pomocí hypotalamu. Tato oblast mozku řídí otevírání a zavírání potních žláz a stahováním valů, čímž určuje tělesnou teplotu. Pod kůží ležící podkožní tuková tkáň izoluje a zabraňuje ztrátám tepla vedením, zatímco ke ztrátě tepla dochází aktivním odparováním potu z povrchu kůže a zvýšeným průtokem krve bohatou cévní sítí, která se nachází právě v dermis. [9, 14]

Epidermis má také senzorické funkce pro celou řadu faktorů prostředí, včetně mechanického stresu, teploty a chemických podnětů. Epidermální keratinocyty obsahují senzory těchto faktorů a mohou vnímat různé faktory a podněty prostředí. Tyto informace mohou být zpracovány v epidermis a předány prostřednictvím nervového systému do celého těla a mozku. Epidermální keratinocyty také vytvářejí mnoho poselských molekul, včetně neurotransmiterů, neuropeptidů a hormonů, které by byly potřebné pro zpracování smyslových informací a přenos zpráv do centrálního nervového systému. [21-23]

3.1.3. Kompozice stratum corneum

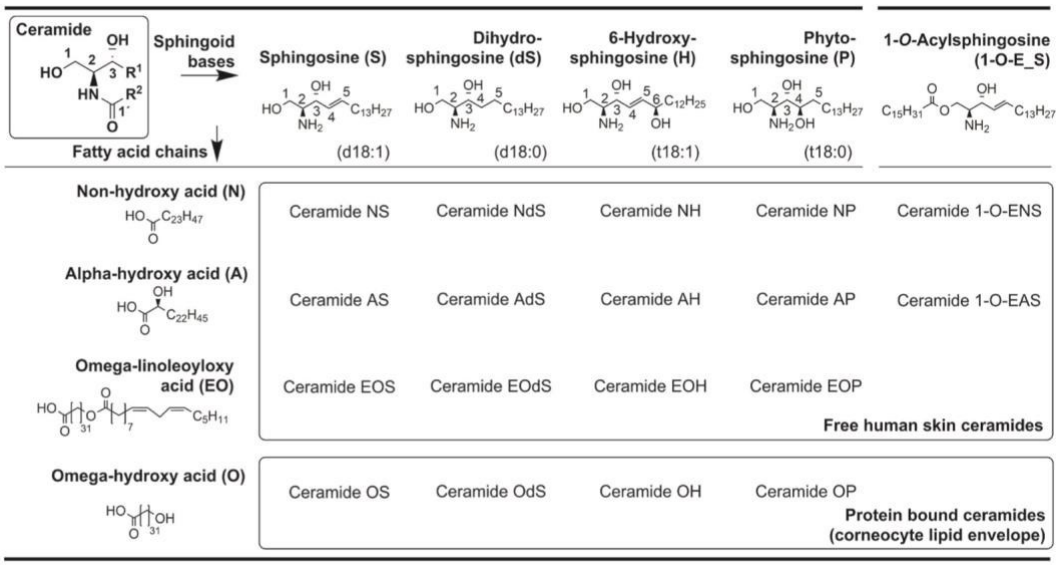
SC, svrchní vrstva kůže, je oblast bohatá na lipidy, které mají zásadní význam pro strukturu a funkci kůže. V extracelulárním prostoru SC převládají především lipidy, a to zejména Cer, Chol, estery Chol a volné mastné kyseliny. [24]

Složení mezibuněčných lipidů a nanejvýš jejich výjimečné strukturální uspořádaní má z pohledu bariérové funkce pravděpodobně největší význam. [25-27] Cer tvoří přibližně 47% hmotnosti, Chol 24 %, mastné kyseliny 11 % a estery Chol 18 %. [16] Předpokládá se, že syntéza lipidů probíhá ve *stratum granulosum* [28], kde se vytvářejí malé cytoplazmatické inkluze (lamelární tělíska), které jsou zabaleny do vícevrstevných útvarů. [29] Na rozhraní *stratum granulosum* a SC dochází k exocytóze lamelárních tělísek, která vytvářejí lipidové lamely. [30]

Molekula Cer obsahuje polární hlavu a dva hydrofobní řetězce, podobně jako fosfolipidy. Fosfolipidy tvoří běžné buněčné membrány, oproti Cer je jejich polární hlava podstatně větší. Vzhledem k tomu, že je hlava Cer menší, umožnuje to těsnější uspořádání těchto lipidů v lamele. Oproti fosfolipidům navíc Cer SC nevytvářejí dvojvrstvy, ale

několikavrstvé a vzájemně propojené lamelární struktury. Tím se vysvětluje řádové tisíckrát nižší propustnost ceramidových lamel SC oproti fosfolipidovým dvojvrstvám. [27]

Cer je kombinací mastné kyseliny a sfingoidní báze spojené amidovou vazbou mezi karboxylovou skupinou mastné kyseliny a aminoskupinou báze. [31] Sfingoidní bází může být sfingosin, fytosfingosin nebo 6-hydroxysfingosin. [27] Vzhledem k tomu, že jsou Cer nejsložitějšími lipidy ve SC, navrhli Motta a další [32] vzhledem k jejich rozmanitosti a zjednodušení identifikace novou nomenklaturu, která vychází z jejich struktury. V tomto systému jsou Cer obecně klasifikovány jako Cer FB, kde F je typ mastné kyseliny a B označuje typ báze. V případě přítomnosti mastné kyseliny vázané na ester, používá se předpona E. Běžné mastné kyseliny (nasycené nebo nenasycené), alfa-hydroxymastné kyseliny a omega-hydroxymastné kyseliny jsou označeny N, A, O, zatímco sfingosiny, fytosfingosiny a 6-hydroxysfingosin jsou označeny S, P a H. Sfinganin (dříve nezařazený) je v tomto systému nomenklatury navržen jako SP. [16, 32] Nejzajímavější vlastností kožních Cer je jejich heterogenita: do současnosti bylo popsáno 15 podtříd Cer, což spolu s různou délkou řetězců dává dohromady stovky odlišných chemických struktur (Obrázek 4.). [33]



Obrázek 4. Chemická struktura hlavních složek ceramidů SC a jejich zkrácené názvosloví. [33]

Hlavičky Cer jsou velmi malé a obsahují několik funkčních skupin, které mohou vytvářet boční vodíkové vazby se sousedními molekulami Cer. Rozložení délky acylového řetězce v Cer je bimodální s nejčastější délkou řetězce C_{24}-C_{26}. Pouze malá část Cer má délku acylového řetězce C_{16}-C_{18}. [34] Délka řetězce mastných kyselin ovlivňuje propustnost pro kůži. Dlouhé acylové řetězce v Cer jsou nezbytné pro tvorbu pevně zabalených, nepropustných

lipidových lamel. Naopak ceramidy s kratšími řetězci (zejména ty s délkou 4-6 uhlíků) zvyšují propustnost lipidových membrán ve srovnání s ceramidy s dlouhými řetězci. [35]

Cer hrají zásadní roli při strukturování a udržování bariérové funkce pokožky. Souvislost mezi změnou složení bariérových lipidů, zejména Cer, a kožními poruchami je vzhledem k množství proměnných obtížné prokázat. Většina kožních poruch, při kterých dochází ke snížení bariérové funkce, však představuje snížení celkového obsahu Cer s určitými rozdíly ve struktuře Cer. Využití fyziologických lipidů má potenciál jako nové formy lokální terapie dermatóz. [36] Cer se taky podílejí na regulaci procesů jako je proliferace, diferenciace a apoptóza. [37]

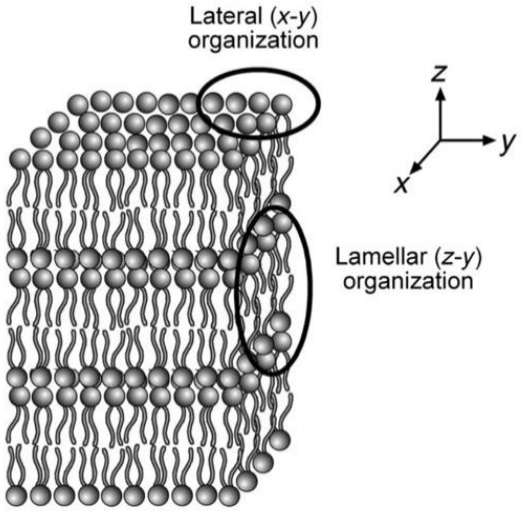
Další složkou v kožní bariéře jsou mastné kyseliny. Jejich složení v lidské rohové vrstvě je poměrně unikátní. Jedná se převážně o nasycené mastné kyseliny s délkou od 14 do 28 uhlíků. [38] Převládající mastné kyseliny mají 24 uhlíků (kyselina lignocerová) a 26 uhlíků (kyselina cerotová) - tyto dva druhy tvoří přibližně 50 % hmotnosti mastných kyselin SC. [33] Volné mastné kyseliny v rohové vrstvě nejsou obohaceny o esenciální mastné kyseliny, což naznačuje, že tyto lipidy nehrají významnou strukturální roli v mezibuněčné lipidové doméně. Hlavní úloha esenciálních mastných kyselin však pravděpodobně souvisí s jejich esterovými deriváty navázanými na Cer obsahující ω-hydroxykyseliny. Vzhledem k tomu, že složení volných mastných kyselin v rohové vrstvě neodpovídá složení nižších vrstev, naznačuje to, že existují cesty pro degradaci a/nebo recyklaci nenasycených mastných kyselin. Celkově lze říct, že složení mastných kyselin v mezibuněčné matrix hraje důležitou roli v bariéře SC a ve změnách pH v různých vrstvách SC. [38]

Hlavním sterolem s rigidní strukturou čtyř kruhů je Chol. Tvoří přibližně 24-27 % lipidů v SC a je důležitý pro tekutost a tuhost SC, jelikož přispívá k zachování správné lamelární a laterální struktury. Chol má volnou alkoholovou skupinu na pozici 3 a za pomocí enzymu Chol sulfotransferázy vzniká jeho významný ester – cholesterol sulfát (CholS). [16, 24, 36] Tento nejhojněji zastoupený ester Chol hraje v matrici pravděpodobně zvláštní roli. Nejenže vystupuje jako regulátor epidermální diferenciace, ale také je CholS desulfatován steroidní sulfatázou na jeden z klíčových bariérových lipidů – Chol. Proces desulfatace je nezbytný pro epidermální homeostázu a pro funkci rohové vrstvy. Poměr Chol a CholS je podstatný v kožním onemocnění jako je ichtyóza vázaná na chromozom X. V tomto patologickém stavu zůstává poměr CholS/Chol vysoký. Výsledky studie Fandrei a další ukázaly, že vyšší poměr CholS/Chol vyvolává vyšší fluiditu sterolů, čím dochází k vyšší propustnosti lipidových vrstev, ale dlouhé acylové řetěze volných mastných kyselin a Cer zůstávají rigidní. Tento výsledek,

selektivní fluidizace sterolů, by potencionálně mohl sloužit jako užitečný cíl pro zlepšení transdermálního podávání léčiv. [39]

3.1.4. Uspořádání lipidů ve stratum corneum

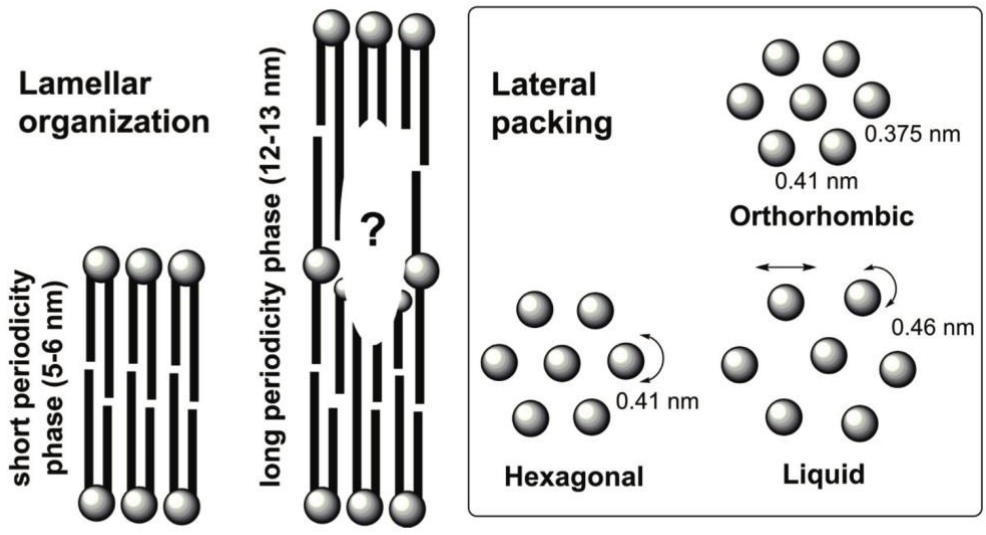
Obecně vytváří lipidové molekuly matrix SC v extracelulárním prostoru obklopujícím korneocyty lamely. [40] V trojrozměrné struktuře rozlišujeme laterální organizaci (tj. molekulární uspořádání v rovině lamel, zhruba rovnoběžné s povrchem SC) a lamelární organizaci (tj. symetrii a vzdálenost opakování ve směru normály k povrchu SC) (Obrázek 5). [41]



Obrázek 5. Schéma znázorňující trojrozměrnou strukturu lipidových lamel.[41]

Velmi těsné uspořádání se značně omezenou pohybovou volností, které označujeme jako orthorhombické, je převládajícím typem laterálního uspořádání. Mimo to jsou některé lipidy uspořádány do hexagonálních podcelků a v méně častém případě jsou tekuté. [33]

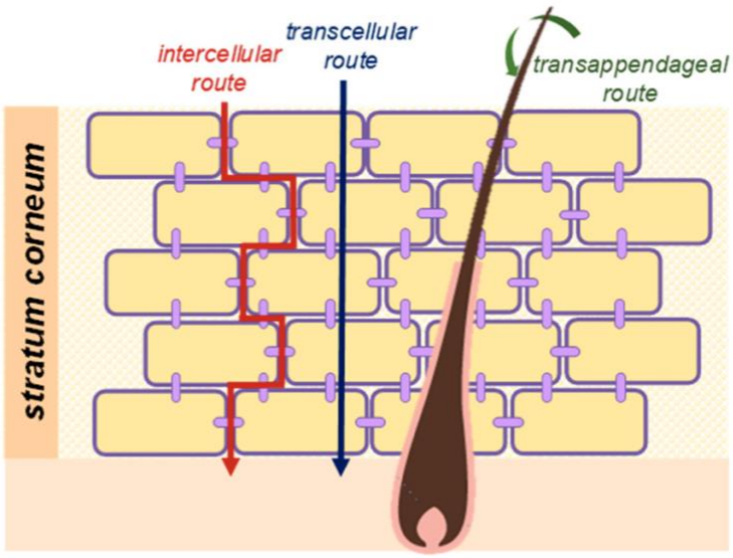
Jedinečným prvkem lamelárního uspořádání je tvorba tzv. lamelární fáze s dlouhou periodicitou a vzdáleností opakování 11,9-13,1 nm. Většina studií navíc popisuje také přítomnost fáze s krátkou periodicitou (se vzdáleností opakování 5,3-6,4 nm) a fázově odděleného Chol (Obrázek 9). [33]



Obrázek 6. Lamelární a laterální uspořádání lipidových membrán SC. [33]

3.1.5. Stratum corneum a permeační procesy

SC představuje hlavní bariéru při permeaci léčiv kůží. [42] Systém transdermálního podávání léčiv (TDDS) znamená podávání molekul léčiv přes kůži do systémového oběhu. [43] Molekuly léčiv mohou procházet kožní bariérou a vstupovat do systémového oběhu různými cestami. [44] Léčivo nebo molekula aplikovaná na povrch kůže má několik možných cest průniku přes SC: transapendageální cesta (přes vlasové folikuly a přidružené mazové žlázy) a transepidermální. Transepidermální rozlišuje transcelulární/intracelulární cestu (difúze přes korneocyty) a intercelulární/paracelulární cestu (difúze přes lipidovou matrix) (Obrázek 10). [42, 45]



Obrázek 7. Cesty průniku léčiv kůží. [42]

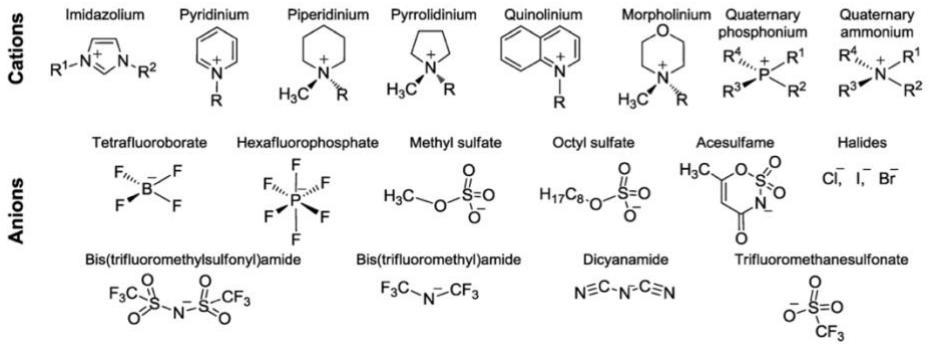
TDDS mají řadu výhod včetně zamezení *first-pass* metabolismu a lepší compliance pacienta. [46] Navzdory těmto výhodám prozatím TDDS systém nedosáhl plného potenciálu. Jeho použití je omezeno pouze na malý počet léčiv. Jsou to léčiva, která mají nízkou molekulovou hmotnost a příznivé lipofilní chování. [47] Jako největší výzva se zdá překonání bariérového efektu SC. SC představuje vynikající ochranou fyziologickou bariéru, protože brání vstupu xenobiotik do organismu a představuje tak i primární bariéru pro průnik léčiv. [48, 49] Roky výzkumu a vývoje vyústily ve dva přístupy, které by překonaly uvedené omezení TDDS – chemické a fyzikální. [50] K chemickým způsobům patří i iontové kapaliny neboli urychlovače kožní penetrace.

3.2. Iontové kapaliny

Není sporu, že se iontové kapaliny (IL) staly významným předmětem studia v oboru moderní chemie. [51] Díky svým vlastnostem poskytují IL mnoho výhod v systémech pro lokální podávání léčiv. Lze je využít například ke zvýšení rozpustnosti málo rozpustných léčiv a ke zlepšení jejich topického a transdermálního podávání. [52] Tato práce se zaměřuje na definici a typy IL, jejich význam v rámci farmacie, potenciálu do budoucnosti, ale i jejich možných nedokonalostí.

3.2.1. Definice a struktura iontových kapalin

IL jsou organické soli s nízkým bodem tání, které jsou považovány za ekologickou náhradu těkavých organických rozpouštědel nebezpečných pro životní prostředí. [53] Nejběžnější IL vznikají kombinací organického heterocyklického kationtu (např. imidazol nebo pyridinium) a anorganického či organického aniontů (např. dusičnan, octan, tetrafluoroboritan, halogeny), které jsou kapalné při teplotě ≤ 100° C. [54] IL jsou také známé jako tekuté soli, protože na rozdíl od běžných solí zůstávají při pokojové teplotě v kapalném stavu.



Obrázek 8. Příklady kationtů a aniontů běžně používaných v iontových kapalinách.[55]

Existuje široká škála možných kombinací aniontů a kationtů (Obrázek 8), které lze pro přípravu IL vzít z nabídky organických a anorganických iontů. [56] Počet možných kombinací kationtu a aniontu se odhaduje na 10^6, což teoreticky umožňuje syntetizovat IL zaměřené na konkrétní aplikaci nebo vlastnost. [57] Zrod IL nastal v roce 1914 Waldenovou syntézou dusičnanu ethyl-amonného, který se stal prototypem IL a měl teplotu tání 12°C. Walden se zajímal o vztah mezi velikostí molekuly a vodivostí. Pokrok v objevu IL byl pomalý a k dalšímu vývoji došlo až v roce 1951. Největší zájem o zkoumání IL proběhl v letech 1998-2000 a v důsledku toho došlo k exponenciálnímu nárustu výzkumných publikací. [51, 58]

3.2.2. Generace iontových kapalin

IL jsou klasifikovány do generací. Celkem existují tři generace IL v závislosti na jejich chemické struktuře a vlastnostech. První generace má unikátní fyzikální vlastnosti zahrnující snížený tlak par, vysokou tepelnou stabilitu, ale také citlivost na vodu a vzduch. Z pohledu chemické struktury se jedná o dialkylimidazolové a alkylpyridiniové kationty s halogenidovými anionty kovů. Naopak druhá generace je již stabilní vůči vodě a vzduchu. Nejčastějšími kationty jsou dialkylimidazolium, alkylpyridinium, amonium a fosfonium, zatímco nejběžnějšími anionty jsou halogenidy, tetrafluoroboritany a hexafluorofosforečnany. Poslední generace pracuje s biologicky odbouratelnými a přírodními ionty. Jedná se o cholin a aminokyseliny, nebo ionty se známými biologickými aktivitami. Využívá aktivní farmaceutické složky (API) k výrobě IL s biologickou aktivitou. Vzhledem ke svému charakteru jsou zajímavá nejen pro odvětví chemie, ale i biologie a ekologie. S objevením přínosných vlastností IL se začaly rozvíjet IL specifické pro dané úlohy (*task specific ionic liquids*), které jsou vyladěny pro konkrétní aplikaci a fungují tak lépe než tradiční reagencia. [55, 59]

3.2.3. Vlastnosti iontových kapalin

Struktura IL je klíčovým faktorem ovlivňujícím jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Kombinace kapalné fáze a iontového charakteru vazby poskytuje vynikající příležitosti k vytvoření rozmanitých fyzikálních a chemických vlastností. Kapalné skupenství těchto roztavených solí je dáno objemnými asymetrickými kationty a slabě koordinujícími anionty, které destabilizují krystalovou mřížku. [55] Nedávné studie zahrnující strukturní vlastnosti IL ukázaly, že IL obsahují mikro a nano-doménové organizační struktury [60, 61] a ionty mají tendenci se samovolně shromažďovat do subdomén a vytvářet nano-doménové amfifilní nanostruktury. Na základě těchto strukturních rysů se zdá, že se IL podobají spíše nanoheterogenním látkám, což je do značné míry jedinečná vlastnost IL, kterou se u jiných rozpouštědel a rozpouštěcích médií obvykle nevyskytuje. [60, 61]

Neschopnost uspořádat se do krystalové mřížky je důvod proč mají IL mnohem nižší teploty tání, než standartní iontové sloučeniny jako je např. NaCl, které se skládají ze sférických tvarů umožňujících úhledné a uspořádané začlenění. [61, 62] To je důsledkem objemné povahy zúčastněných iontů a přisuzuje se třem hlavním faktorům: mezimolekulovým silám mezi zúčastněnými ionty v rozpouštědle, symetrii iontů a konformačním stupňům volnosti iontů. [63] Slabší mezimolekulární síly, včetně interakcí iontové a vodíkové vazby, snižují těsnost uspořádání. [64] Podobně funguje iontová symetrie, protože asymetrické komponenty se nemohou snadno začlenit do opakujících se mřížkových struktur. [65] Konformační stupně volnosti působí proti symetrii krystalové mřížky a tvorbě konzistentních mezimolekulárních interakcí. [66] Kationt jako základní složka ovlivňuje mimo jiné faktory, jako je viskozita, vodivost, elektrostatické síly, vlastnosti povrchově aktivních látek, polarita, problémy s agregací a profily toxicity. Jednoduchá změna, jako je délka řetězce, může mít extrémní vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti výsledných IL. [61] Prodloužení délky řetězce vede ke zvýšení viskozity a zvýšené toxicitě pro bakterie a mořské ekosystémy. Naopak zkrácení řetězce vede ke zvýšení polarity, vodivosti a elektrostatických sil. [67-70]

IL mají vyšší kapalný rozsah než molekulární rozpouštědla. Teplotní rozsah mezi teplotou tání (teplotou skelného přechodu) a teplotou varu (teplotou tepelného rozkladu) se označuje jako rozsah kapaliny. Horní hranice kapalného rozmezí je určena teplotou tepelného rozkladu IL. Například 1-alkyl- 3-methylimidazolové soli mají obvykle teploty skelného přechodu v rozmezí -70 až -90 °C a teploty tepelného rozkladu v rozmezí od 250 do více než 450 °C. Mají tedy kapalný rozsah přes 300 °C. Pro srovnání, voda je při atmosférickém tlaku kapalná od 0 do 100 °C a má tedy kapalný rozsah 100 °C. [58]

Jak již bylo řečeno, teplota tání IL je nižší než 100 °C a lze ji ovlivnit rozložením náboje na iontech, schopností vodíkové vazby, symetrií iontu a van der Walsovými interakcemi. V případě IL je teplota tání nepřímo úměrná velikosti aniontů a kationtů. Například teplota tání [C_2MIM] Cl je 87 °C a [C_2 MIM] [$AlCl_4$] je 7 °C. Tedy teplota IL se snižuje přidáním další soli za vzniku tzv. eutektické směsi. [58]

Vodivost IL lze vyjádřit jako schopnost jejich iontů vést elektrický proud, a právě ionty v IL působí jako nosiče náboje. Díky tomu IL vykazují dobrou specifickou vodivost nebo iontovou vodivost. [71] Tuto vlastnost lze ovlivnit pomocí velikosti a náboje iontů. Menší kationty a anionty umožnují snadnější pohyblivost iontů, což vede k vyšší vodivosti. Naopak

použití vysoce nabitých molekul zabrání pohybu iontů z důvodu většího počtu interakcí mezi ionty, a to má za následek nižší vodivost. [72]

Zabránění pohybu iontů v důsledku mezimolekulárních interakcí je příčinou další důležité vlastnosti, tj. viskozita. [73] Při pokojové teplotě se viskozita IL pohybuje v rozmezí 10 až 500 centipoise. [74] Viskozita je podobně jako u jiných kapalin zprostředkována z velké části za pomocí mezimolekulárních sil. Jejich síla se pohybuje od interakcí mezi ionty až po disperzní síly, přičemž v biokompatibilních IL hraje klíčovou roli vodíková vazba. Tyto vazby jako jsou ion-ion nebo dipól-dipól jsou silné a brání tomu, aby se vrstvy IL mohly snadno smykovat, ale i disperzní síly mohou být podnětem viskozity. Viskozita IL se zvyšuje s rostoucí velikostí kationtu a zvyšující se délkou alkylového řetězce. [74, 75]

Další fyzikální vlastností IL je hustota, ta se pohybuje od 0,9 a 1,7 g cm^{-3} z čehož plyne, že IL jsou relativně hustší než běžná organická rozpouštědla. [61, 76] Hustota IL je nepřímo úměrná velikosti a objemnosti kationtu a aniontu- tzn. IL obsahující větší organické kationty mají nižší hustotu. Teplota má na hustotu nepatrný vliv oproti viskozitě. Dále lze hustotu ovlivnit tlakem, a především molekulovou hmotností a interakcemi mezi molekulami. [74, 77]

Polarita hraje klíčovou roli v interakcích mezi rozpouštědlem a rozpuštěným materiálem. [61] IL mají vynikající rozpustnost a mísitelnost s širokou škálou látek a mohou rozpouštět iontové i kovalentní sloučeniny: kapaliny, pevné látky i plyny. IL však mohou rozpouštět jak polární, tak nepolární rozpuštěné látky. Ukázaly se jako potencionální rozpouštědla pro chemickou syntézu, separaci a extrakci materiálů ze směsí nebo roztoků. Avšak jejich schopnost rozpouštět závisí na polaritě a koordinační schopnosti jejich iontů. [58] Hydrofilní IL obsahující anionty, které jsou silnými akceptory vodíkových vazeb, mohou rozpouštět polární molekuly léčiv ve srovnání s hydrofobními IL s nekoordinujícími anionty.[53]

3.2.4. Využití iontových kapalin

IL se staly předmětem zkoumání ve farmaceutických a biomedicinských oblastech jako rozpouštědla, ko-solventy, nosiče léčiv, antimikrobiální látky, urychlovače kožní penetrace a v mnoha dalších využitích. Díky kombinaci aniontů a kationtů se může uvažovat o modularitě jejich fyzikálně-chemických vlastnostech v závislosti na aplikaci. [78] V dohledné budoucnosti se navíc může uvažovat o zavedení účinných léčiv na bázi IL americkým úřadem FDA. [79]

3.2.4.1. Solubilizace léčiv

Mnoho molekul používaných ve farmacii vykazuje výrazně nízkou rozpustnost ve vodě a biologickém prostředí. Nedostatečná rozpustnost ovlivňuje absorpci, biologickou dostupnost, celkovou účinnost při perorálním poddání a výrazně omezuje jejich hodnotu pro terapeutické účely. [53, 63] Nezbytné je rozlišovat dvě odlišné vlastnosti léčiva, tj. rozpouštění a rozpustnost. Proces rozpouštění, který je charakterizovaný rychlostí, zahrnuje tři důležité kroky: narušení interakcí v mřížce rozpuštěné látky, vytvoření "dutiny" v rozpouštědle a interakcí a integrací rozpuštěné látky do "dutiny" vytvořené v rozpouštědle. Avšak schopnost sloučeniny rozpouštět se v určitém rozpouštědle se označuje jako rozpustnost. [55, 63]

Farmaceutické látky se často získávají v krystalické formě, přinášející problém polymorfismu. To znamená, že se může jedna krystalická chemická látka projevovat v různých polymorfních nebo pseudopolymorfních formách, které vykazují odlišné vlastnosti, jako jsou mechanické vlastnosti, stabilita, bod tání, rozpustnost a biologická dostupnost. Farmaceutické polymorfy mohou navíc podléhat nepředvídatelným transformacím a jejich tvorba je náročná na kontrolu. [55, 80]

V průběhu historie byla zkoušena řada strategií, jak řešit špatnou rozpustnost, včetně klasických přístupů, jako je tvorba solí a použití různých organických rozpouštědel/kosolventů, jako je dimethylsulfoxid a dimethylformamid. Tato organická rozpouštědla však představují problém, protože jsou těkavá, hořlavá, toxická a představují obtíže při obnově, opětovném použití a likvidaci. IL se stávají slibnou alternativou k organickým rozpouštědlům a nabízejí modifikovatelné vlastnosti, které jim umožňují rozpouštět složité molekuly, jako jsou peptidy, nukleosidy a celulóza. [53, 81]

IL se osvědčily při rozpouštění různých špatně rozpustných sloučenin, především díky své schopnosti interagovat s rozpuštěnou látkou a případně s molekulami kosolventu. Tato interakce narušuje stávající molekulární asociace a usnadňuje integraci rozpuštěné látky. Počáteční výzkumy se soustředily zejména na imidazolové a kvarterní amoniové IL. [63, 82, 83] Většina experimentů s IL se soustředí na formulaci a charakterizaci fyzikálně – chemických vlastností, přičemž některé z nich se zaměřují na stanovení toxicity *in vitro*. Je však potřeba komplexních studií, které by určily potenciální dopad přítomnosti IL ve formulacích na podmínky *in vivo*. Zásadní zůstává prozkoumat, zda interakce mezi IL a léčivy, které vedou ke zvýšené rozpustnosti, mohou ovlivnit účinnost léčiv. [63]

3.2.4.2. Aktivní farmaceutické sloučeniny – iontové kapaliny

Přeměna samotných molekul léčiv na IL, běžně známé jako aktivní farmaceutické sloučeniny – iontové kapaliny (API-IL), je řešením problému spojeného se špatnou rozpustností, tepelnou stabilitou a biologickou dostupností tradičních léčivých přípravků. Smyslem tvorby API-IL je zachování profilu léčiva a zároveň propůjčení žádoucích vlastností protiiontu a celé třídy rozpouštědel. [63, 84-86] Z hlediska API mohou být protiionty zvoleny tak, aby farmakologicky působily nezávisle nebo synergicky [85] nebo aby zlepšily farmakokinetické vlastnosti. [59, 87] S touto koncepcí původně přišli Rogers a další, kteří strategicky kombinovali různé aniontové a kationtové deriváty snadno dostupných léčivých přípravků, aby modulovali různé farmakologické vlastnosti, jako je rozpustnost, stabilita, uvolňování léčiva a biologická dostupnost. [62] Jedná se sice o slibnou cestu transformace léčiv do IL, nicméně je potřeba zvážit farmakokinetiku API-IL, interakce API-IL s buněčnými membránami a extracelulárním prostorem. [63]

3.2.4.3. Antimikrobiální látky

Nespočetná kombinace kationtů a aniontů v IL umožnuje těmto rozpouštědlům vykazovat specifické biologické aktivity. Tato oblast využití IL se teprve rozvíjí, ale už nyní byly odhaleny slibné výsledky. Specifické biologické vlastnosti IL zahrnují například antioxidační, protinádorové a antimikrobiální účinky. [88]

Antibakteriální, antimykotické a cytotoxické vlastnosti lze vysvětlit interakcemi mezi alkylovými postranními řetězci kationtu IL a buněčnou membránou. Dlouhé alkylové řetězce mohou destabilizovat membránu tím, že pronikají do lipidové dvojvrstvy a vyvolávají strukturální poškození. [55]

Lipofilita se zdá určujícím faktorem v antimikrobiálním působení podle studie, ve které se testovala antimikrobiální aktivita pěti nových skupin cholinových kvartérních amoniových chloridů IL. Jejich antimikrobiální aktivita byla hodnocena proti řadě grampozitivních a gramnegativních bakterií a výsledky antimikrobiální aktivity byly dobré. Sloučeniny se substituentem alkylového řetězce o 12 atomech uhlíku na kationtu vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu napříč všemi skupinami testovaných IL proti celé řadě testovaných mikroorganismů. [89] Délka substitučního alkylového řetězce a narušení membrány souvisí s podstatnou charakteristikou IL, protože většina IL má strukturu známou kationtovým povrchově aktivním látkám, jejichž primární způsob účinku je prostřednictvím narušení membránově vázaných proteinů. Ze studie inhibičních účinků imidazolových a pyridiniových

IL vychází, že dalším předpokládaným mechanismem toxicity a antimikrobiální aktivity je inhibice enzymu acetylcholinesterázy. [53, 90]

IL byly také kombinovány s jinými materiály (např. sulfopropyl chitosan [91]) nebo jako polymerizované (poly-IL) k vytvoření účinnějších antimikrobiálních přípravků. [63] Dalším příkladem je kombinace se standardní gázou, která vedla k vytvoření antimikrobiálního obvazu na ránu s jedinečným mechanismem účinku. Pomocí benzimidazoliového dipodálního aniontu vytvořili výzkumníci iontovou kapalinu chelatující Fe^{3+}. Kladný náboj opět umožňuje lokalizaci IL v blízkosti bakteriální buněčné stěny. Chelatační "ramena" umožňují IL zachytit Fe^{3+} v blízkosti buněčného povrchu a zabránit tak jeho vychytávání, což vede k buněčné smrti způsobené nedostatkem železa. [92]

K léčbě nemocí a jako antibiotika by mohl sloužit nový proud kombinovaných terapeutik, propojením IL s aplikacemi jako jsou API, nanonosiče a nosiče léčiv. Nezbytné bude prozkoumání mnohem širšího spektra mikrobiálních druhů, aby mohly IL prokázat antimikrobiální potenciál. [63, 93]

3.3. Vliv iontových kapalin na permeaci látek kůží

3.3.1. Mechanismus účinku iontových kapalin na permeaci látek kůží

IL vzbudily zájem jako chemické zesilovače, které podporují trans a parabuněčný transport léčiv. [78] Bylo navrženo několik mechanismů jejich účinku, které jsou do značné míry závislé na chemickém složení IL. Chemické zesilovače mohou působit změnu struktury a tekutosti SC, zlepšovat vlastnosti rozpustnosti kůži pro podávané léčivo, rozvolnit těsné uspořádání mezi alkylovými řetězci lipidů a jejich domén ve SC za účelem vytvoření hydrofilních póru nebo vytvoření rezervoáru léčiva v samotném SC. Práce provedená Montim a dalšími ukázala, že důležitý faktor ovlivňující stupeň permeace je struktura IL. [94] Fyzikálně-chemické vlastnosti IL jsou dalším klíčovým faktorem spojeným se zvýšenou permeabilitou. [61, 95]

Mechanismus působení IL je nesmírně široký. IL, zvyšující permeaci, jsou obecně hydrofilní nebo hydrofobní. Hydrofilní IL otevíráním těsných spojů (*tight junctions*) ve SC, podporují paracelulární transport. Současně zvyšují fluidizaci v závislosti na koncentraci, zejména v proteinových a lipidových oblastech, do kterých se inkorporují. Zatímco hydrofobní IL upřednostňují vstup do epiteliální membrány prostřednictvím rozdělení tím, že poskytují kanály pro molekuly a podporují tak transcelulární transport v zejména lipidových oblastech. [61, 78]

Například použití IL s amfifilní povahou obsahujících 1-oktyl-3-methylimidazolium jako kationtovou hlavu v modelové buněčné membráně narušuje strukturální integritu a zvyšuje propustnost amoniaku (stejně jako malých polárních molekul) přes membránu. Solvatace buněčné membrány s následným otevíráním kanálů, které usnadňují průchod molekul, byla pozorována u IL s hydrofilní povahou založených na bázi imidazolia. [78, 96-98]

Kromě aromatických imidazolových a pyridiniových kationtů, probíhá rozsáhlý výzkum alicyklických kationtů s cílem odhalit nové vlastnosti. Monti a další zkoumali IL na bázi 1,4-diazabicyklo [2.2.2] oktanu, alicyklického pyrrolidinia a morfolinia. Jejich účelem bylo ověřit účinek těchto IL jako zesilovačů (trans)dermální permeace a retence léčiv v kůži potkanů *in vitro*. Modelovou antihypertenzní látkou ze skupiny nedihydropyridinových blokátorů kalciových kanálů byl diltiazem. Toto léčivo má krátký biologický poločas, nízkou biologickou dostupnost po perorálním podání a významy jaterní metabolismus, která vyžaduje kontinuální podávání. Diltiazem byl testován jak ve formě hydrochloridové soli, tak ve formě volné báze, aby se zdůraznil vztah mezi vlastnostmi léčiva a účinkem IL jako zesilovačů. Studie zjistila, že iontové kapaliny mají rozdílný vliv na permeaci hydrochloridu a volné báze diltiazemu. Vliv na permeaci měla ale i struktura IL, konkrétně kationtové jádro a délka alkylového řetězce. Z pozorovaných mechanismů IL na diltiazem lze zmínit zvýšenou rozpustnost léčiva ve formulaci, která vedla ke zvýšené permeabilitě, interakci IL s komponentami kůže tím, že se inkorporovaly do lipidové dvojvrstvy a optimalizaci termodynamické aktivity jako hnací faktor pro pasivní difúzi. [94]

Zvýšení permeability je jedním z možných mechanismů, kterým IL přinášejí prospěch při transdermálním podání léčiv. Mimo to mohou působit jako surfaktanty, optimalizovat termodynamickou aktivitu molekul léčiv, zlepšovat solubilizaci léčiv, způsobovat fluidizaci lipidové dvojvrstvy či narušovat matrix působením na keratinové fibrily. [61, 95]

3.3.2. Výhody a nevýhody iontových kapalin-toxicita a biodegradabilita

Koncept "IL jako ekologických chemikálií" vznikl na základě vlastností IL, kterými se odlišují od organických rozpouštědel. V chemickém nebo biologickém procesu se nahrazením těkavého organického rozpouštědla netěkavými a nehořlavými IL snižuje riziko inhalační expozice, hořlavosti a kontaminace životního prostředí. [78] Vzhledem k rozsahu použití IL v mnoha oblastech chemického průmyslu, vedlo použití IL k rostoucí hrozbě kontaminace vodního a suchozemského prostředí těmito sloučeninami. [99]

IL nevykazují jednotnou shodu v toxicitě a dosud nebyly objeveny žádné obecné korelace, ačkoliv bylo mnoho studií zaměřeno na hledání vztahů, které spojují strukturu IL s jejich toxicitou. Některé z nich mají relativně nízkou toxicitu, zatímco jiné mají výrazné inhibiční účinky v různých biologických systémech. V úvahu je také potřeba vzít povahu biologického objektu – buněčné kultury, bezobratlí, vyšší rostliny, gram-negativní nebo gram-pozitivní bakterie a další. Pravděpodobně vyšší rozpustnost ve vodě by měla korelovat s vyšší nebezpečností pro životní prostředí v důsledku snadného pronikání ve vodě rozpustné chemické látky do různých ekosystémů. Tuto domněnku potvrzuje zřejmý vzájemný vztah mezi biologickým účinkem IL a jeho interakcemi s molekulami vody. Podle nashromážděných údajů tak toxicita IL závisí na délce alkylového postranního řetězce v kationtu (to souvisí s lipofilitou a schopností pronikat buněčnou membránou), na přítomnosti a povaze funkčních skupin v kationtu, na povaze aniontu a kationtu a na interakcích mezi aniontem a kationtem. [55, 100]

Vliv aniontu na toxicitu byl méně studován oproti vlivu kationtu. Dominantní postavení kationtu při určování toxicity vedlo výzkumné pracovníky k tomu, aby se zaměřili na jeho modifikaci za účelem dosažení požadované úrovně toxicity pro specifické aplikace, ať směrem ke zvýšení (např. antibakteriální nebo antimykotické účely) nebo snížení. [57] Vysoká biologická aktivita tudíž může být vnímána nejen jako nevýhoda, ale také jako příležitost.

Dalším otazníkem v použití IL je biodegradabilita tzn. destrukce chemické struktury na jednodušší sloučeniny s odpovídající ztrátou jejich vlastností, která je realizována bakteriálními nebo houbovými enzymy. [55, 101, 102] Biodegradabilita IL se může výrazně lišit. Testována je podle standardních metod, jako jsou testy Organizace po hospodářskou spolupráci a rozvoj, která hodnotí schopnost mikroorganismů rozkládat chemikálie za standardizovaných podmínek. [103]

Vzhledem k tomu, že značná část IL je biologický nerozložitelná a jejich interakce s životním prostředím je nevyhnutelná, zůstává biodegradabilita překážkou v aplikaci IL. Bylo navrženo několik potencionálních metod chemicky indukované degradace biologicky nerozložitelných IL. [55] I přesto je potřeba při vývoji nových IL důležité zohlednit nejen jejich funkční vlastnosti, ale hlavně najít nové biologicky odbouratelné, méně toxické "zelenější" IL. Jako racionální návod pro syntézu netoxických biologicky odbouratelných produktů se mohou zdát obnovitelné a biorozložitelné stavební bloky jako jsou aminokyseliny, cukry, cholin nebo deriváty bicyklických monoterpenových skupin atd. [99]

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a materiály

Vodné roztoky a vodné mobilní fáze pro HPLC byly připraveny za použití ultračisté vody (Milli-Q RG water purification system, Millipore, Burlington, MA, USA). Gentamicin sulfát, theofylin (TH), a rozpouštědla (HPLC kvality) byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Sodná sůl diklofenaku (DIC) byla zakoupena od společnosti TCI Chemicals (Tokyo, Japonsko). Anorganické soli – dihydrát dihydrogenforforečnanu sodného ($NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl) - které byly použity individuálně nebo pro přípravu fosfátového pufru (PBS), kyselina octová (CH_3COOH) a hydroxid sodný (NaOH) byly pořízeny z PENTA (Hostivař, ČR). Iontové kapaliny 1-oktyl-3-methylimidazolium bromid (C_8MIM) a 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromid ($C_{12}MIM$) byly syntetizovány spolupracovníky z Univerzity Lipsko (Německo) refluxací ekvimolární směsi 1-methylimidazolů a oktyl-, resp. dodecylbromidu po dobu 24 hod. [104] Produkty byly několikrát promyty diethyletherem, přes noc vysušeny ve vakuu a jejich struktura byla potvrzena, jak bylo popsáno dříve. [105]

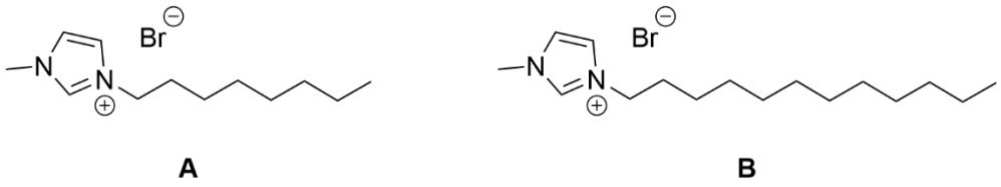
4.2. Postup experimentální práce

4.2.1. Lidská kůže

Lidská kůže byla použita se souhlasem etické komise chirurgického centra Sanus, Hradec Králové (č. 19/3/2021) v souladu se zásadami Helsinské deklarace od žen, které podstoupily plastickou operaci břicha. Písemný souhlas byl získán od všech žen. Použitá kůže byla nepoškozená a bez patologického nálezu. Podkožní tuková vrstva byla oddělena od kůže a zbývající vzorky kůže v celé tloušťce byly omyty fyziologickým roztokem, osušeny a uloženy při -20 °C. Před experimentem byla kůže pomalu rozmražena a dermatomem Acculan® 3RTI (Aesculap, Center Valley, PA, USA) nařezána na tloušťku 0,5 mm.

4.2.2. Příprava donorových vzorků pro permeaci

Pro experiment byly připraveny suspenze 20 mg/ml TH a 100 mg/ml DIC ve vodě s 20mM C_8MIM nebo $C_{12}MIM$ (Obrázek 9) a v případě kontrolních vzorku bez obsahu IL, které byly později naneseny na povrch kůže. Pro vysvětlení vlivu současně aplikovaných IL na rozpustnost modelových látek, byly donorové vzorky protřepány po dobu 24 hodin, následně odstředěny při 15 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Supernatant každého vzorku byl odebrán, naředěn vodou a analyzován pomocí HPLC.

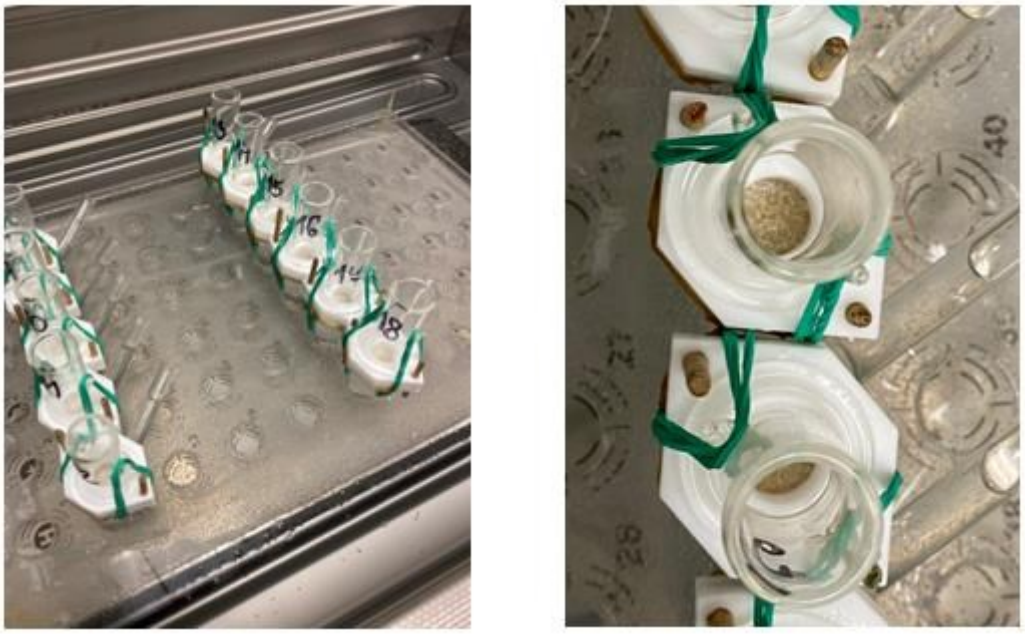


Obrázek 9. Struktura C_8MIM (A) a C_{12}MIM (B)

4.2.3. Permeace

Ke studii prostupu DIC a TH a jejich retenci v lidské kůži *in vitro*, byly použity Franzovy difuzní cely s akceptorovým objemem 7.0 ± 0.2 ml. Dermatomované fragmenty kůže byly upevněny do teflonových držáků s kruhovým otvorem o průměru 1 cm^2 a poté byly držáky upevněny do Franzových cel kožní stranou směrem k akceptorovému prostoru (pro utěsnění bylo použito silikonové mazivo). Každý akceptorový prostor byl naplněn PBS o pH 7,4 a míchán při 32° C po celou dobu experimentu. Přesný objem pufru byl změřen pro každou celu zvlášť a zahrnut do výpočtu toku. Po 12 hodinách ekvilibrace ve vodní lázni (Obrázek 10), bylo na povrch kůže naneseno 0,1 ml donorových vzorků. Vzorky akceptorové fáze (0,3 ml) byly odebírány v předem stanovených časových intervalech po dobu až 24 hodin a nahrazovány stejným objemem akceptorové fáze-fyziologickým roztokem pufru PBS. Množství každého permeantu, které proniklo kůži bylo analyzováno pomocí HPLC. Kumulativní množství každého permeantu, korigované na výměnu akceptorové fáze, bylo vyneseno do grafu v závislosti na čase.

Po 24 hodinách byly přípravky opatrně odstraněny z kůže pomocí vatových tamponků namočených ve vodě. Cely byly demontovány a kůže byla znovu pečlivě omyta. Tkáň vystavená donorovému vzorku byla vyříznuta, zvážena a extrahována mobilní fází HPLC. Pro extrakci TH bylo použito 2,0 ml mobilní fáze HPLC po dobu 24 hodin a pro extrakci DIC bylo použito 1,0 ml mobilní fáze HPLC po dobu 12 hodin.



Obrázek 10. Zobrazení permeačního pokusu s již aplikovaným donorovým vzorkem.

4.2.4. HPLC

Pro analýzu TH a DIC byl použit přístroj Shimadzu Prominence (Shimadzu, Japonsko), který se skládá z čerpadel LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, kolony CTO-20AC, detektoru SPD-M20A s diodovým polem, komunikačního modulu CBM-20A a softwaru LCsolutions 1.22 na koloně LiChroCART 250-4 naplněné částicemi LiChrospher 100 RP-18, 5 μm, (Merck, Darmstadt, Germany). Mobilní fáze pro TH byla připravena ze 100 mM NaH_2PO_4/MeOH 60:40 (v/v) při průtoku 1,20 ml/min při 35°C; objem nástřiku byl 20 μl. Detekce TH byla provedena při vlnové délce 272 nm s retenčním časem přibližně 3,0 min a celkovou dobou běhu 4,0 min. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,05-100 μg/ml a metoda byla předem validována. [106] Mobilní fáze pro DIC byla připravena z MeOH/H_2O/CH_3COOH 80:20:0,5 (v/v/v) při průtoku 1,35 ml/min při 25°C; objem nástřiku byl 20 μl. Detekce DIC byla provedena při vlnové délce 275 nm s retenčním časem přibližně 4,0 min a celkovou dobou během 6,0 min. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,05-60 μg/ml a metoda byla dříve validována. [107]

4.2.5. Statické zpracování dat

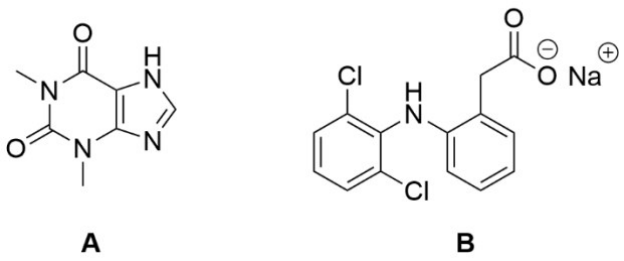
Statistická analýza dat byla u tří a více skupin provedena na základě analýzy typu jednocestná ANOVA s Tukeyho testem mnohonásobného porovnání a dvě skupiny byly

porovnány pomocí nepárového testu (hladina spolehlivostí p = 0,05) v programu GraphPad Prism verze 9.0.0. Všechna data jsou prezentovaná jako průměr ± směrodatná odchylka (SD).

5. Výsledky a diskuze

Tato práce je součástí většího projektu s cílem zjistit, jaký je mechanismus vybraných imidazoliových IL s různou alifatickou částí (C_8MIM a C_{12}MIM) při jejich použití, jako akcelerantů permeace pro dodávání účinných látek do a skrz lidskou kůži. Konkrétně v této práci, nejprve bylo hodnoceno, jaký je vliv IL na rozpustnost vybraných modelových permeantů ve vodě. Dále bylo hodnoceno, jaký je vliv vybraných IL na permeaci a kožní retenci u modelových permeantů, když byly ko-aplikovány jako vodné suspenze spolu s IL.

K experimentu byly vybrány dvě modelové látky, tj. TH a DIC (Obrázek 11). TH je těžce rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v bezvodém ethanolu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů, v amoniaku a v minerálních kyselinách. Druhá modelová látka – DIC – je slabě hygroskopická, mírně rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v methanolu, dobře rozpustná v 96% ethanolu, těžce rozpustná v acetonu a prakticky nerozpustná v etheru. [108]



Obrázek 11: Struktury TH (A) a DIC (B)

5.1. Rozpustnost TH a DIC v donorovém vzorku

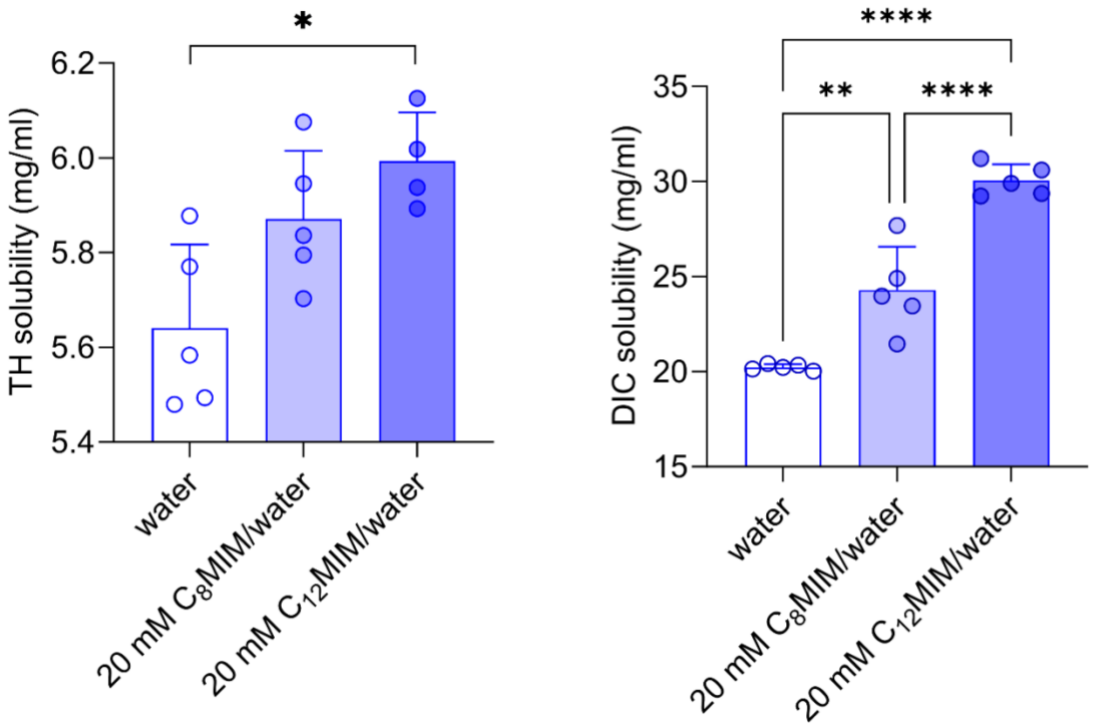
Pro lepší porozumění vlivu IL na permeaci a retenci modelových molekul v kůži, bylo nutné prozkoumat jejich vzájemné fyzikální vztahy, tedy vliv IL na rozpustnost modelových molekul ve vodném prostředí. Zlepšení prostupu léčiva kůží pomocí IL často spočívá ve zvýšení jeho rozpustnosti ve formulaci. [109]

Kvůli různé rozpustnosti/mísitelnosti dvou IL ve vodě a pro přímé srovnání jejich účinku na rozpustnost byla zvolena stejná koncentrace IL ve vodném médiu (20 mM). Tato koncentrace je pod kritickou micelární koncentrací pro C_8MIM (uváděny byly hodnoty 120–150 mM [110, 111]), ale nad ní pro C_{12}MIM (4–10 mM [112]).

Na následujícím grafu (Obrázek 12) je zobrazena rozpustnost TH a DIC v testovaných formulacích. Lze vidět, že rozpustnost TH ve vodě stanovená experimentálně je 5,64 ± 0,15 mg/ml, zatímco referenční hodnota nalezená v literatuře 5,5 mg/ml [113]. Po přidání 20 mM C_8MIM se rozpustnost TH zvýšila na 5,87 ± 0,11 mg/ml a s C_{12}MIM na 5,99 ± 0,08 mg/ml.

Rozdíly v rozpustnosti TH mezi vodou a 20 mM C_8MIM nebyly statisticky významné a totéž bylo pozorováno mezi dvěma IL. Statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze mezi vodou a 20 mM C_{12}MIM. Lze tedy říct, že rozpustnost TH po přidání IL je ovlivněna pouze mírně (o 6% vyšší rozpustnost v přítomnosti C_{12}MIM).

Druhá zkoušená molekula, tj DIC vykazovala experimentálně stanovenou rozpustnost ve vodě 20,23 ± 0,12 mg/ml (referenční hodnota podle literatury je 20,99 mg/ml [114]). V přítomnosti C_8MIM se ovšem její rozpustnost zvýšila o 20% tj. na 24,30 ± 1,60 mg/ml a v přítomnosti C_{12}MIM dokonce o 49% tj. na 30,07 ± 0,67 mg/ml. V případě DIC byly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi všemi různými médii.



Obrázek 12: Rozpustnost TH a DIC v testovaných formulacích.

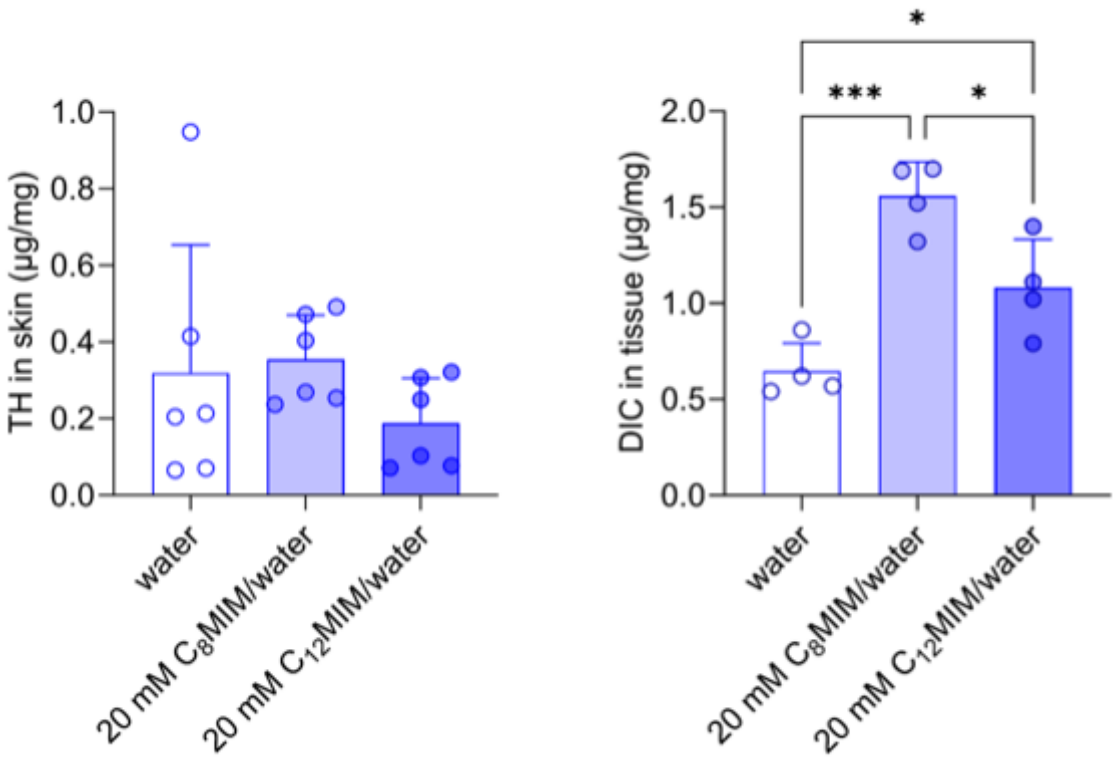
I když bylo prokázáno, že IL zvyšují rozpustnost modelových permeantů (vyšší účinek pro DIC ve srovnání s TH), nelze s jistotou říci, že by tato skutečnost vedla ke zvýšení permeace lidskou kůží nebo k vyšší retenci léčiva v lidské kůži. Proto bylo potřeba následně provést permeační pokusy.

5.2. Permeace

Lidská kůže použitá pro permeační experiment byla dermatomována, aby byla zajištěna stejná tloušťka kůže pro všechny vzorky. PBS s pH 7,4 byl zvolen jako akceptorová fáze napodobující vnitřní oběh lidského těla. Během permeačního experimentu byla teplota vodní lázně udržována na 32 °C, protože to je fyziologická teplota lidské kůže. Modelové molekuly byly aplikovány ve formě suspenzí pro udržení maximální termodynamické aktivity.

5.2.1. Srovnání účinku C8-MIM a C12-MIM na retenci TH a DIC v lidské kůži

Následující graf se zaměřuje na množství TH a DIC nalezené v kůži 24 hodin po aplikaci formulací (Obrázek 13).



Obrázek 13: Vliv C_8MIM a C_{12}MIM na retenci TH a DIC v lidské kůží.

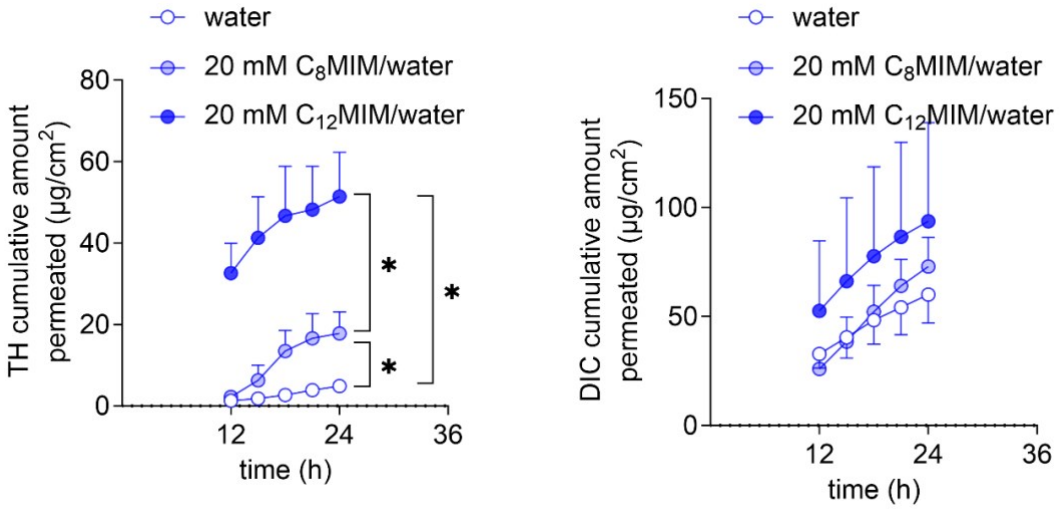
Přesné množství TH nalezené v kůži bylo pro TH/H_2O 0,32 ± 0,30 µg/mg, TH/20 mM C_8MIM 0,35 ± 0,10 µg/mg a TH/20 mM C_{12}MIM 0,19 ± 0,11 µg/mg. Přesné množství DIC nalezené v kůži po 24 hodinách bylo pro DIC/H_2O 0,65 ± 0,15 µg/mg, DIC/20 mM C_8MIM 1,56 ± 0,18 µg/mg, 20 mM C_{12}MIM 1,08 ± 0,25 µg/mg.

V porovnání s kontrolními vzorky nevedlo použití IL v koncentraci 20 mM k významně vyšší retenci TH v kůži. Naopak současná aplikace DIC s 20 mM C_8MIM vedla k 2,4násobně a s 20 mM C_{12}MIM k 1,7násobně vyššímu zadržení DIC v kůži v porovnání s kontrolou.

Právě schopnost IL zachytit léčivo v kůži může být výhodná pro léčiva určená k terapii kožních onemocnění, infekcí nebo karcinomů, u nichž by bylo výhodné vyhnout se vysokým plazmatickým koncentracím. [107]

5.2.2. Srovnání účinku C_8MIM a C_{12}MIM na průnik TH a DIC lidskou kůží

Poslední analýza ukazuje, jaké účinky mají IL na průnik modelových molekul do akceptorové části. Donorové vzorky suspenze 20 mg/ml TH a 100 ml/mg DIC ve vodě byly aplikovány na kůži společně s IL v množství 0,1 ml/cm^2. Vzhledem k nižší rozpustnosti C_{12}MIM ve vodě ve srovnání s C_8MIM, byly koncentrace obou IL stanoveny na 20mM. Z grafu je zřejmé, že profily permeace TH kůží v přítomnosti IL byly nelineární (Obrázek 14), přičemž hodnoty toku ke konci experimentu klesaly a blížily se hodnotám kontrolního toku. Proto se tedy místo toku porovnávalo kumulativní množství léčiva v akceptorové fázi po 24 hodinách.



Obrázek 14: Vliv C_8MIM a C_{12}MIM na průnik TH a DIC lidskou kůží.

Graf na Obrázek 14 ukazuje kumulativní množství TH a DIC pronikající 1 cm^2 lidské kůže v závislosti na čase. Přesné koncentrace TH v akceptorové části cel byly po 24 hodinách následující – TH/H_2O 4,92 ± 1,52 µg/cm^2, TH/20 mM C_8MIM 17,81 ± 4,84 µg/cm^2 a TH/20 mM C_{12}MIM 51,44 ± 9,92 µg/cm^2. Z grafu pro TH lze odvodit, že po 24 hodinách je silnějším zesilovačem prostupu přes lidskou kůži C_{12}MIM než C_8MIM. V porovnání

s kontrolním vzorkem bylo množství prošlého TH do akceptorové fáze s C_{12}MIM po 24 hodinách 10,5násobně vyšší a s C_8MIM 3,6násobně vyšší.

V případě DIC nevedlo přidání ani jedné z IL v koncentraci 20 mM k významnému ovlivnění prostupu přes kůži do akceptorové fáze. Přesné koncentrace DIC v akceptorové části cel byly po 24 hodinách následující – DIC/H_2O 60,08 ± 11,26 μg/cm^2, DIC/20 mM C_8MIM 72,96 ± 11,58 μg/cm^2, DIC/20 mM C_{12}MIM 93,65 ± 39,27 μg/cm^2.

5.2.3. Shrnutí permeačního experimentu v závislosti na testech rozpustnosti

Vezmeme-li v úvahu výsledky rozpustnosti, dalo by se očekávat, že C_{12}MIM bude účinnějším zesilovačem permeace. Tato hypotéza se však nepotvrdila, což ukazuje, že vyšší rozpustnost ne vždy vede k lepší propustnosti.

Obecně lze uzavřít, že rozpustnost modelových permeantů může být středně (tj. pro TH) nebo silně (tj. pro DIC) ovlivněna přítomností použité IL. Nicméně retence v kůži nebo propustnost kůže pro modelové permeanty nemůže být vždy spojena se zvýšenou rozpustností a je třeba vzít v úvahu více faktorů.

Všechny výsledky prezentované v této diplomové práci byly publikovány ve vědeckém článku dohromady s doplňujícími permeačními pokusy na lidské kůži a modelových membránách. [109]

6. Závěr

Experimentální část diplomové práce navázala na předchozí výsledky se zjednodušeným modelem lipidových membrán sestávajících ze směsi lipidů – Cer, Chol, mastných kyselin, CholS s nebo bez IL. [115] Cílem této práce bylo prozkoumat schopnost dvou IL na bázi imidazolu, zvýšit rozpustnost dvou modelových molekul ve vodném prostředí a jejich potenciál jako látek zvyšujících permeaci lidskou kůží *in vitro*.

Experimentální výsledky prokázaly, že vybrané IL mohou mírně zlepšit rozpustnost TH ve vodě (zvýšení o 6 % při 20 mM C_{12}MIM), zatímco jejich vliv na rozpustnost DIC ve vodě byl silnější (o 20 % pro C_8MIM a 49 % pro C_{12}MIM při 20 mM). Kromě toho permeační experimenty na lidské kůži *in vitro* ukázaly, že IL významně zvýšily retenci DIC v kůži (přičemž C_8MIM byl učenějším zesilovačem než C_{12}MIM) nikoli však retenci TH. Na druhé straně, transdermální doručení TH byla významně zvýšena IL (s C_{12}MIM, které vykazovalo vyšší kumulativní množství než C_8MIM), zatímco transdermální doručení DIC nebyla přítomností IL ovlivněna.

Tyto výsledky dokazují, že IL mohou být použity jako látky zvyšující depozici a permeaci látek kůží, ale jich účinek je specifický pro dané léčivo a nelze z něj vyvodit přímý závěr o jejich účinku. K určení plného potenciálu IL jako látek zvyšujících permeaci kůží je zapotřebí dalšího výzkumu.

7. Seznam obrázků

Obrázek 1. Zjednodušené schéma tří vrstev, které se v kůži vyskytují. [2] 10
Obrázek 2. Schematické znázornění vrstvy epidermis. [8] 12
Obrázek 3. Model cihly a malty. Obrázek ilustruje korneocyty v podobně „cihel“, mezibuněčné lipidy tvořící „maltu“ a desmosomy spojující korneocyty. [13] 14
Obrázek 4. Chemická struktura hlavních složek ceramidů SC a jejich zkrácené názvosloví. [33] 17
Obrázek 5. Schéma znázorňující trojrozměrnou strukturu lipidových lamel.[42] 19
Obrázek 6. Lamelární a laterální uspořádání lipidových membrán SC. [33] 20
Obrázek 7. Cesty průniku léčiv kůží. [43] 20
Obrázek 8. Příklady kationtů a aniontů běžně používaných v iontových kapalinách.[56] 21
Obrázek 9. Struktura C_8MIM (A) a C_{12}MIM (B) 31
Obrázek 10. Zobrazení permeačního pokusu s již aplikovaným donorovým vzorkem. 32
Obrázek 11: Struktury TH (A) a DIC (B) 34
Obrázek 12: Rozpustnost TH a DIC v testovaných formulacích. 35
Obrázek 13: Vliv C_8MIM a C_{12}MIM na retenci TH a DIC v lidské kůži. 36
Obrázek 14: Vliv C_8MIM a C_{12}MIM na průnik TH a DIC lidskou kůží. 37

8. Reference

1. Mohamed, S.A. and R. Hargest, *Surgical anatomy of the skin.* Surgery (Oxford), 2022. **40**(1): p. 1-7.
2. Eucerin. *Jak kůže funguje- Struktura a funkce kůže, Eucerin.cz [online] [cit. 2023 -12-19]*. Available from: https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze.
3. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.* European journal of dermatology : EJD, 2001. **12**: p. 390-9; quiz 400.
4. Agache, P.G. and P. Humbert, *Measuring the skin*. 2004, Berlin: Springer Berlin.
5. AlBastaki, U.M. and C. Pierre-Jerome, *Chapter 10 - The skin: anatomy and pathologies in diabetes*, in *The Essentials of Charcot Neuroarthropathy*, C. Pierre-Jerome, Editor. 2022, Elsevier. p. 287-298.
6. Arda, O., N. Göksügür, and Y. Tüzün, *Basic histological structure and functions of facial skin.* Clinics in Dermatology, 2014. **32**(1): p. 3-13.
7. Wong, R., et al., *The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin.* Experimental Dermatology, 2015. **25**.
8. himthansanga, V., et al., *Improved Topical Drug Delivery: Role of Permeation Enhancers and Advanced Approaches.* 2022.
9. *Biology for Majors II*, in *Structure and Function of Skin*. 26.4.2020.
10. *StatPearls*. 2023.
11. Baroni, A., et al., *Structure and function of the epidermis related to barrier properties.* Clin Dermatol, 2012. **30**(3): p. 257-62.
12. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier.* Exp Dermatol, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
13. Wickett, R.R. and M.O. Visscher, *Structure and function of the epidermal barrier.* American Journal of Infection Control, 2006. **34**(10, Supplement): p. S98-S110.
14. Abdo, J.M., N.A. Sopko, and S.M. Milner, *The applied anatomy of human skin: A model for regeneration.* Wound Medicine, 2020. **28**: p. 100179.
15. Lee, S.H., et al., *Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis.* J Clin Invest, 1992. **89**(2): p. 530-8.
16. Rawlings, A.V. and P.J. Matts, *Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An Update in Relation to the Dry Skin Cycle.* Journal of Investigative Dermatology, 2005. **124**(6): p. 1099-1110.
17. Rahma, A. and M.E. Lane, *Skin Barrier Function in Infants: Update and Outlook.* Pharmaceutics, 2022. **14**(2).
18. Wickett, R.R., C. Trobaugh, and S.C.J. Wax, *Personal care products : effects on skin surface pH.* Cosmetics and toiletries, 1990. **105**: p. 41-46.
19. Fluhr, J.W., et al., *Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity.* J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 44-51.
20. Krien, P.M. and M. Kermici, *Evidence for the Existence of a Self-Regulated Enzymatic Process Within the Human Stratum Corneum –An Unexpected Role for Urocanic Acid.* Journal of Investigative Dermatology, 2000. **115**(3): p. 414-420.
21. Denda, M., et al., *Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system.* Exp Dermatol, 2007. **16**(3): p. 157-61.
22. Tsutsumi, M., et al., *Morphological and functional differences in coculture system of keratinocytes and dorsal-root-ganglion-derived cells depending on time of seeding.* Exp Dermatol, 2011. **20**(6): p. 464-7.
23. Denda, M., *Epidermis as the "Third Brain"?* Dermatologica Sinica, 2015. **33**(2): p. 70-73.
24. Knox, S. and N.M. O'Boyle, *Skin lipids in health and disease: A review.* Chem Phys Lipids, 2021. **236**: p. 105055.
25. Wertz, P.W. and B. van den Bergh, *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers.* Chem Phys Lipids, 1998. **91**(2): p. 85-96.

26. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
27. Alexandr, V.K.a.H., *Role ceramidů v kůži.* Farmacie pro praxi- Praktické lékárenství, 2006. **2006; 2(2) : 55-58**.
28. Wertz, P.W., et al., *The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum.* J Invest Dermatol, 1989. **93**(1): p. 169-72.
29. Landmann, L., *Lamellar granules in mammalian, avian, and reptilian epidermis.* Journal of Ultrastructure Research, 1980. **72**(3): p. 245-263.
30. Elias, P.M. and G.K. Menon, *Structural and Lipid Biochemical Correlates of the Epidermal Permeability Barrier*, in *Advances in Lipid Research*, P.M. Elias, Editor. 1991, Elsevier. p. 1-26.
31. Choi, M.J. and H.I. Maibach, *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin.* Am J Clin Dermatol, 2005. **6**(4): p. 215-23.
32. Motta, S., et al., *Ceramide composition of the psoriatic scale.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1182**(2): p. 147-51.
33. Vávrová, K., A. Kováčik, and L. Opálka, *Ceramides in the skin barrier.* Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 2017. **64**.
34. Bouwstra, J.A., et al., *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations.* Progress in Lipid Research, 2003. **42**(1): p. 1-36.
35. Skolová, B., et al., *Ceramides in the skin lipid membranes: length matters.* Langmuir, 2013. **29**(50): p. 15624-33.
36. Coderch, L., et al., *Ceramides and skin function.* Am J Clin Dermatol, 2003. **4**(2): p. 107-29.
37. Uchida, Y., *Ceramide signaling in mammalian epidermis.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 453-62.
38. Schaefer, H. and T.E. Redelmeier, *Skin barrier : principles of percutaneous absorption*. 1996, Basel: Karger Basel.
39. Fandrei, F., et al., *Cholesterol sulfate fluidizes the sterol fraction of the stratum corneum lipid phase and increases its permeability.* J Lipid Res, 2022. **63**(3): p. 100177.
40. Boncheva, M., F. Damien, and V. Normand, *Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(5): p. 1344-55.
41. Boncheva, M., *The physical chemistry of the stratum corneum lipids.* Int J Cosmet Sci, 2014. **36**(6): p. 505-15.
42. Pereira, R., et al., *Current Status of Amino Acid-Based Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery.* Membranes (Basel), 2021. **11**(5).
43. Yewale, C., et al., *Chapter 5 - Polymers in Transdermal Drug Delivery*, in *Applications of Polymers in Drug Delivery (Second Edition)*, A. Misra and A. Shahiwala, Editors. 2021, Elsevier. p. 131-158.
44. Hmingthansanga, V., et al., *Improved Topical Drug Delivery: Role of Permeation Enhancers and Advanced Approaches.* Pharmaceutics, 2022. **14**(12).
45. Parhi, R. and A. Mandru, *Enhancement of skin permeability with thermal ablation techniques: concept to commercial products.* Drug Deliv Transl Res, 2021. **11**(3): p. 817-841.
46. Dobler, D., et al., *Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems.* (1873-3476 (Electronic)).
47. Prausnitz, M.R. and R. Langer, *Transdermal drug delivery.* Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1261-8.
48. Forslind, B., *A domain mosaic model of the skin barrier.* Acta Derm Venereol, 1994. **74**(1): p. 1-6.
49. Barry, B.W., *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery.* (0928-0987 (Print)).
50. Alkilani, A.Z., M.T. McCrudden, and R.F. Donnelly, *Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum.* Pharmaceutics, 2015. **7**(4): p. 438-70.

51. Welton, T., *Ionic liquids: a brief history.* Biophys Rev, 2018. **10**(3): p. 691-706.
52. Dobler, D., et al., *Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems.* Int J Pharm, 2013. **441**(1-2): p. 620-7.
53. Shishu, et al., *Ionic Liquids as Promising Carriers in Drug Delivery*. 2014. p. 209-242.
54. Plechkova, N.V. and K.R. Seddon, *Applications of ionic liquids in the chemical industry.* Chemical Society Reviews, 2008. **37**(1): p. 123-150.
55. Egorova, K.S., E.G. Gordeev, and V.P. Ananikov, *Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine.* Chem Rev, 2017. **117**(10): p. 7132-7189.
56. Huddleston, J.G., et al., *Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation.* Green Chemistry, 2001. **3**(4): p. 156-164.
57. Gonçalves, A.R.P., et al., *Ionic Liquids-A Review of Their Toxicity to Living Organisms.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
58. Freemantle, M., *An Introduction to Ionic Liquids*. 2010: Royal Society of Chemistry.
59. Ferraz, R., et al., *Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients.* ChemMedChem, 2011. **6**(6): p. 975-985.
60. Hayes, R., G.G. Warr, and R. Atkin, *Structure and nanostructure in ionic liquids.* Chem Rev, 2015. **115**(13): p. 6357-426.
61. Sidat, Z., et al., *Ionic Liquids as Potential and Synergistic Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery.* Pharmaceutics, 2019. **11**(2).
62. Zahn, S., et al., *Intermolecular forces in an ionic liquid ([Mmim][Cl]) versus those in a typical salt (NaCl).* Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(19): p. 3639-41.
63. Curreri, A.M., S. Mitragotri, and E.E.L. Tanner, *Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine.* Adv Sci (Weinh), 2021. **8**(17): p. e2004819.
64. Fumino, K., A. Wulf, and R. Ludwig, *The cation-anion interaction in ionic liquids probed by far-infrared spectroscopy.* Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(20): p. 3830-4.
65. José, O.V. and A.C. Richard, *Melting properties of molten salts and ionic liquids. Chemical homology, correlation, and prediction.* Comptes Rendus. Chimie, 2016. **19**(5): p. 654-664.
66. Armand, M., et al., *Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future.* Nature materials, 2009. **8**: p. 621-9.
67. Dong, K., et al., *Multiscale Studies on Ionic Liquids.* Chem Rev, 2017. **117**(10): p. 6636-6695.
68. Das, R.N. and K. Roy, *Advances in QSPR/QSTR models of ionic liquids for the design of greener solvents of the future.* Mol Divers, 2013. **17**(1): p. 151-96.
69. Tokuda, H., et al., *Physicochemical Properties and Structures of Room Temperature Ionic Liquids. 2. Variation of Alkyl Chain Length in Imidazolium Cation.* The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(13): p. 6103-6110.
70. Miskiewicz, A., et al., *The Use of Liquids Ionic Fluids as Pharmaceutically Active Substances Helpful in Combating Nosocomial Infections Induced by.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
71. Bonhôte, P., et al., *Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts.* Inorg Chem, 1996. **35**(5): p. 1168-1178.
72. Sangoro, J.R., et al., *Charge transport and mass transport in imidazolium-based ionic liquids.* Physical Review E, 2008. **77**(5): p. 051202.
73. Shirota, H. and E.W. Castner, Jr., *Physical properties and intermolecular dynamics of an ionic liquid compared with its isoelectronic neutral binary solution.* J Phys Chem A, 2005. **109**(42): p. 9388-92.
74. Marsh, K.N., J.A. Boxall, and R. Lichtenthaler, *Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review.* Fluid Phase Equilibria, 2004. **219**(1): p. 93-98.
75. Zhang, S., et al., *Physical Properties of Ionic Liquids: Database and Evaluation.* Journal of Physical and Chemical Reference Data, 2006. **35**: p. 1475.
76. Mantz, R.A. and P. Trulove, *Viscosity and density of ionic liquids.* Ionic Liquids in Synthesis, 2003. **2**: p. 56-68.

77. Cao, Y., et al., *The physical and chemical properties of ionic liquids and its application in extraction.* Handbook of Ionic Liquids: Properties, Applications and Hazards, 2012: p. 145-172.
78. Shukla, M.K., et al., *Role and Recent Advancements of Ionic Liquids in Drug Delivery Systems.* Pharmaceutics, 2023. **15**(2).
79. Shamshina, J.L., et al., *Chemistry: Develop ionic liquid drugs.* Nature, 2015. **528**(7581): p. 188-9.
80. Singhal, D. and W. Curatolo, *Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective.* Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(3): p. 335-47.
81. Moniruzzaman, M. and M. Goto, *Ionic liquids: Future solvents and reagents for pharmaceuticals.* Journal of Chemical Engineering of Japan, 2011. **44**(6): p. 370-381.
82. Mizuuchi, H., et al., *Room temperature ionic liquids and their mixtures: potential pharmaceutical solvents.* Eur J Pharm Sci, 2008. **33**(4-5): p. 326-31.
83. Kumar, V., V.S. Parmar, and S.V. Malhotra, *Enhanced solubility and selective benzoylation of nucleosides in novel ionic liquid.* Tetrahedron Letters, 2007. **48**(5): p. 809-812.
84. Hough, W.L., et al., *The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients.* New Journal of Chemistry, 2007. **31**(8): p. 1429-1436.
85. Stoimenovski, J., et al., *Crystalline vs. ionic liquid salt forms of active pharmaceutical ingredients: a position paper.* Pharm Res, 2010. **27**(4): p. 521-6.
86. Bica, K., et al., *In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(8): p. 2011-2017.
87. Frizzo, C., et al., *Pharmaceutical Salts: Solids to Liquids by Using Ionic Liquid Design*. 2013. p. 557-579.
88. Pedro, S.N., et al., *The Role of Ionic Liquids in the Pharmaceutical Field: An Overview of Relevant Applications.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
89. Pernak, J. and P. Chwała, *Synthesis and anti-microbial activities of choline-like quaternary ammonium chlorides.* Eur J Med Chem, 2003. **38**(11-12): p. 1035-42.
90. Stock, F., et al., *Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase – a structure–activity relationship consideration.* Green Chemistry, 2004. **6**(6): p. 286-290.
91. Wang, Z., et al., *Preparation and antimicrobial activity of sulfopropyl chitosan in an ionic liquid aqueous solution.* Journal of Applied Polymer Science, 2017. **134**(26).
92. Bains, D., et al., *Development of Biological Self-Cleaning Wound-Dressing Gauze for the Treatment of Bacterial Infection.* ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(1): p. 969-978.
93. Weyhing-Zerrer, N., et al., *Predictability of ionic liquid toxicity from a SAR study on different systematic levels of pathogenic bacteria.* Ecotoxicol Environ Saf, 2017. **139**: p. 394-403.
94. Monti, D., et al., *Ionic liquids as potential enhancers for transdermal drug delivery.* Int J Pharm, 2017. **516**(1-2): p. 45-51.
95. Zhang, D., et al., *Evaluations of imidazolium ionic liquids as novel skin permeation enhancers for drug transdermal delivery.* Pharm Dev Technol, 2017. **22**(4): p. 511-520.
96. Lu, B., et al., *Ionic Liquid Transdermal Delivery System: Progress, Prospects, and Challenges.* Journal of Molecular Liquids, 2022. **351**: p. 118643.
97. Kumar, S., et al., *Amphiphilic Ionic Liquid-Induced Membrane Permeabilization: Binding Is Not Enough.* J Phys Chem B, 2018. **122**(26): p. 6763-6770.
98. Sindhu, A., et al., *Implications of Imidazolium-Based Ionic Liquids as Refolding Additives for Urea-Induced Denatured Serum Albumins.* ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020. **8**(1): p. 604-612.
99. Flieger, J. and M. Flieger, *Ionic Liquids Toxicity-Benefits and Threats.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
100. Egorova, K.S. and V.P. Ananikov, *Toxicity of ionic liquids: eco(cyto)activity as complicated, but unavoidable parameter for task-specific optimization.* ChemSusChem, 2014. **7**(2): p. 336-60.

101. Coleman, D. and N. Gathergood, *Biodegradation studies of ionic liquids.* Chemical Society reviews, 2010. **39**: p. 600-37.
102. Jordan, A. and N. Gathergood, *Biodegradation of ionic liquids – a critical review.* Chemical Society reviews, 2015.
103. Stolte, S., et al., *The Biodegradation of Ionic Liquids - the View from a Chemical Structure Perspective.* Current Organic Chemistry, 2011. **15**: p. 1946-1973.
104. Hallett, J.P. and T. Welton, *Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. 2.* Chem Rev, 2011. **111**(5): p. 3508-76.
105. Kumar, S., et al., *Effect of the Alkyl Chain Length of Amphiphilic Ionic Liquids on the Structure and Dynamics of Model Lipid Membranes.* Langmuir, 2019. **35**(37): p. 12215-12223.
106. Školová, B., et al., *Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics.* Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. **1859**(5): p. 824-834.
107. Kopečná, M., et al., *Transdermal Permeation and Skin Retention of Diclofenac and Etofenamate/Flufenamic Acid From Over-the-Counter Pain Relief Products.* J Pharm Sci, 2021. **110**(6): p. 2517-2523.
108. ČR, M.z., *Český lékopis 2017- Doplněk 2020*. Speciální část-Monografie. 2020, Praha: Grada Publishing, a. s.
109. Paraskevopoulos, G., et al., *Effects of imidazolium ionic liquids on skin barrier lipids - Perspectives for drug delivery.* J Colloid Interface Sci, 2024. **659**: p. 449-462.
110. Goodchild, I., et al., *Structural studies of the phase, aggregation and surface behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium halide + water mixtures.* J Colloid Interface Sci, 2007. **307**(2): p. 455-68.
111. Baltazar, Q., et al., *Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **302**: p. 150-156.
112. Kaur, R., H. Kumar, and M. Singla, *Micellization studies of selected imidazolium based ionic liquid in aqueous solution and in presence of different additives: A review.* Journal of Ionic Liquids, 2022. **2**: p. 100036.
113. Tan, D., M. Maniruzzaman, and A. Nokhodchi, *Development and Optimisation of Novel Polymeric Compositions for Sustained Release Theophylline Caplets (PrintCap) via FDM 3D Printing.* Polymers, 2019. **12**: p. 27.
114. Saei, A.A., et al., *Solubility of sodium diclofenac in binary water + alcohol solvent mixtures at 25°C.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2008. **18**(2): p. 149-151.
115. Seidlová, T., *Inkorporace vybraných imidazoliových iontových kapalin do modelových lipidových membrán a vliv na jejich permeabilitu*, in *Diplomová práce, Katedra farmaceutické technologie*. 2024, Farmaceutická fakulta UK: Hradec Králové.