

# Elastické lipozomy pro enkapsulaci kanabinoidů

Bc. Kateřina Mochťáková

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Mochtáková**  
Osobní číslo: **T22305**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Elastické lipozomy pro enkapsulaci kanabinoidů**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část

Zpracujte literární rešerši na zadané téma.

Charakterizujte elastické lipozomy, jejich složení, vlastnosti a metody přípravy.

Věnujte se rovněž skupině kanabinoidů a jejich farmaceutickému a kosmetickému využití.

Podrobněji pojednejte o kanabidiolu a diskutujte možnosti jeho účinné enkapsulace.

### II. Praktická část

V praktické části práce připravte elastické lipozomy s obsahem deoxycholátu jako aktivátoru hran.

Sledujte vliv složení membrány na vlastnosti elastických lipozomů a ve formulační studii vyberte optimální složení membrány pro účinnou enkapsulaci kanbidiolu.

Vhodnými technikami stanovte fyzikálně-chemické charakteristiky připravených lipozomů.

Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Legare, C. A. et al.: Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals. PHARMACOLOGY (2022), 107(3-4), 131-149.
- [2] Atalay, S; Jaročka-Karpowicz, I and Skrzydlewska, E.: Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol, ANTIOXIDANTS (2020), 9 (1), 1-20.
- [3] Hussain, A. et al; Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, (2017), 12, 5087-5108.
- [4] Franze, S, ET ALL.:Design of Liposomal Lidocaine/Cannabidiol Fixed Combinations for Local Neuropathic Pain Treatment. PHARMACEUTICS (2022), 14 (9), Article Number1915.
- [5] Demisli, S, et al.: Encapsulation of cannabidiol in oil-in-water nanoemulsions and nanoemulsion-filled hydrogels: A structure and biological assessment study, JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE (2023) 634, 300-313.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Kateřina Mocht'áková

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Elastické lipozomy jsou díky své deformovatelné struktuře schopny enkapsulovat velké množství aktivních látek a usnadňovat jejich transport kůží až na cílová místa. Kanabionoidy jsou významnými látkami při léčbě řady onemocnění. Jejich omezením je však špatná biologická dostupnost a náchylnost k degradaci. Pro překonání těchto nedostatků je vhodnou strategií jejich enkapsulace do systému elastických lipozomů. V rámci této diplomové práce byly připraveny formulace elastických lipozomů ze sójového fosfatidylcholinu metodou hydratace tenkého filmu. Jako aktivátory hran byly použity Tween80 a D- $\alpha$ -Tocopherol polyethylene glycol 1000 sukcinát. Enkapsulovanou terapeuticky aktivní látku představoval kanabidiol. U připravených formulací byly charakterizovány fyzikálně chemické vlastnosti včetně velikosti vezikul, distribuce a zeta potenciálu. Rovněž byly zhodnoceny z hlediska stability, enkapsulační účinnosti, antioxidační aktivity, cytotoxicity a na závěr schopnosti transdermální penetrace *ex vivo*.

Klíčová slova: elastické lipozomy, kanabidiol, transferozomy, transdermální penetrace, doručování léčiv

## **ABSTRACT**

Due to their deformable structure, elastic liposomes can encapsulate large amounts of active substances and facilitate their transport through the skin to the target sites. Cannabinoids play important role in the treatment of variety diseases. However, their limitation is their poor bioavailability and susceptibility to degradation. To overcome these shortcomings, their encapsulation in the elastic liposomes is an effective strategy. In the thesis, the thin film hydration method was used to prepare elastic liposome formulations containing soy phosphatidylcholine. Tween80 and D- $\alpha$ -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate were used as edge activators. The encapsulated therapeutically active substance was cannabidiol. The physicochemical properties of the prepared formulations were examined, including vesicle size, distribution and zeta potential. The samples were also evaluated for stability, encapsulation efficiency, antioxidant activity, cytotoxicity and finally *ex vivo* transdermal penetration ability.

Keywords: elastic liposomes, cannabinoids, cannabidiol, transferosomes, transdermal penetration, drug delivery

Na prvním místě patří mé velké poděkování vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. A to za vstřícnost, odborné vedení, rady, ochotu a trpělivost po celou dobu práce.

Dále bych velmi ráda poděkovala za odborné rady a pomoc při provedení experimentální části práce paní Ing. Lucii Urbánkové, Ph.D., Ing. Adamu Srncovi, doc. Tomáši Sedláčkovi, Ph.D. a Ing. Markétě Kadlečkové, Ph.D. Rovněž bych ráda poděkovala paní laborantce Ing. Markétě Kudláčkové, PhD.

V neposlední řadě zde chci poděkovat své rodině, která při mně po celou dobu studia stála, myslela na mne a podporovala mě.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 LIPOZOMY</b> .....	<b>12</b>
1.1 PŘÍPRAVA LIPOZOMŮ.....	13
1.2 KLASIFIKACE LIPOZOMŮ .....	13
<b>2 ELASTICKÉ LIPOZOMY</b> .....	<b>15</b>
2.1 MECHANISMUS PROSTUPU VEZIKUL DO KŮŽE.....	16
2.2 SLOŽENÍ LIPOZOMÁLNÍCH FORMULACÍ .....	17
2.2.1 Fosfolipidová složka .....	18
2.2.2 Aktivátory hran .....	21
2.2.3 Rozpouštědla .....	23
2.2.4 Hydratační média .....	23
2.3 METODY PŘÍPRAVY .....	23
2.3.1 Hydratace tenkého filmu .....	24
2.3.2 Metoda odpařování na reverzní fázi.....	24
2.3.3 Metoda vysokotlaké homogenizace .....	25
2.3.4 Metoda vortexování a sonikace.....	25
2.3.5 Metoda zmrazení a rozmražení .....	25
2.3.6 Metoda vstříkování do ethanolu.....	25
2.3.7 Modifikovaný postup ručního protřepávání.....	26
2.3.8 Metoda odstředování .....	26
2.4 VLASTNOSTI.....	26
2.5 VYUŽITÍ ELASTICKÝCH LIPOZOMŮ .....	27
<b>3 KANABINOIDY</b> .....	<b>32</b>
3.1 MECHANISMUS ÚČINKU KANABIONOIDŮ .....	33
3.2 FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ VYUŽITÍ.....	35
<b>4 KANABIDIOL</b> .....	<b>37</b>
4.1 ENKAPSULAČNÍ STRATEGIE – VLIV NA CÍLENÉ DORUČOVÁNÍ, BIOLOGICKOU DOSTUPNOST A STABILITU CBD .....	38
<b>5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>44</b>
<b>7 POUŽITÉ MATERIÁLY</b> .....	<b>45</b>
7.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	45
7.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	46
7.3 MATERIÁL BIOLOGICKÉHO PŮVODU .....	47
<b>8 METODIKA</b> .....	<b>48</b>

8.1	PŘÍPRAVA ELASTICKÝCH LIPOZOMŮ .....	48
8.1.1	Preformulační studie .....	50
8.1.2	Formulační studie .....	51
8.2	CHARAKTERIZACE AKTIVNÍ LÁTKY CBD .....	51
8.3	CHARAKTERIZACE ELASTICKÝCH LIPOZOMŮ .....	52
8.3.1	Velikost částic a index polydisperzity .....	52
8.3.2	Zeta potenciál .....	52
8.3.3	Vizuální zhodnocení .....	53
8.3.4	Mikroskopické zobrazení pomocí AFM .....	53
8.3.5	Enkapsulační účinnost EL .....	53
8.3.6	Stabilitní studie .....	54
	<i>Velikost a zeta potenciál</i> .....	55
	<i>Enkapsulační účinnost</i> .....	55
8.3.7	Stanovení antioxidační aktivity – ABTS test .....	55
8.3.8	Stanovení cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	56
8.4	PŘÍPRAVA GELŮ S OBSAHEM EL .....	56
8.5	CHARAKTERIZACE GELŮ S OBSAHEM EL .....	57
8.5.1	Reologické vlastnosti .....	57
8.5.2	Stanovení transdermální penetrace EL .....	57
	<i>Příprava biologického materiálu</i> .....	57
	58	
	<i>Ověření integrity kožního vzorku</i> .....	58
	<i>Analýza vzorků po testu transdermální absorpce</i> .....	59
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>61</b>
9.1	PŘÍPRAVA ELASTICKÝCH LIPOZOMŮ .....	61
9.1.1	Preformulační studie .....	61
9.1.2	Formulační studie .....	64
9.2	CHARAKTERIZACE AKTIVNÍ LÁTKY .....	65
9.3	CHARAKTERIZACE ELASTICKÝCH LIPOZOMŮ .....	66
9.3.1	Velikost částic a index polydisperzity .....	66
9.3.2	Zeta potenciál .....	67
9.3.3	Vizuální zhodnocení .....	67
9.3.4	Morfologie mikroskopické zobrazení pomocí AFM .....	68
9.3.5	Enkapsulační účinnost EL .....	69
9.3.6	Stabilitní studie .....	71
	<i>Velikost, zeta potenciál a vzhled</i> .....	71
	<i>Enkapsulační účinnost</i> .....	74
9.3.7	Stanovení antioxidační aktivity – ABTS test .....	75
9.3.8	Stanovení cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	77
9.4	PŘÍPRAVA GELŮ S OBSAHEM EL .....	79
9.5	CHARAKTERIZACE GELŮ S OBSAHEM EL .....	79
9.5.1	Reologické vlastnosti .....	79
9.5.2	Stanovení transdermální penetrace EL .....	81



<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>85</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>87</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>99</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>101</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>103</b>

## ÚVOD

Transdermální způsob podávání léčiv se potýká s překážkou funkce kůže, jako bariérového orgánu, jenž brání prostupu xenobiotik do vnitřního prostředí těla. Je proto nutné neustále inovovat strategie s jakými přistupujeme k topickému dodávání léčiv a aktivních látek.

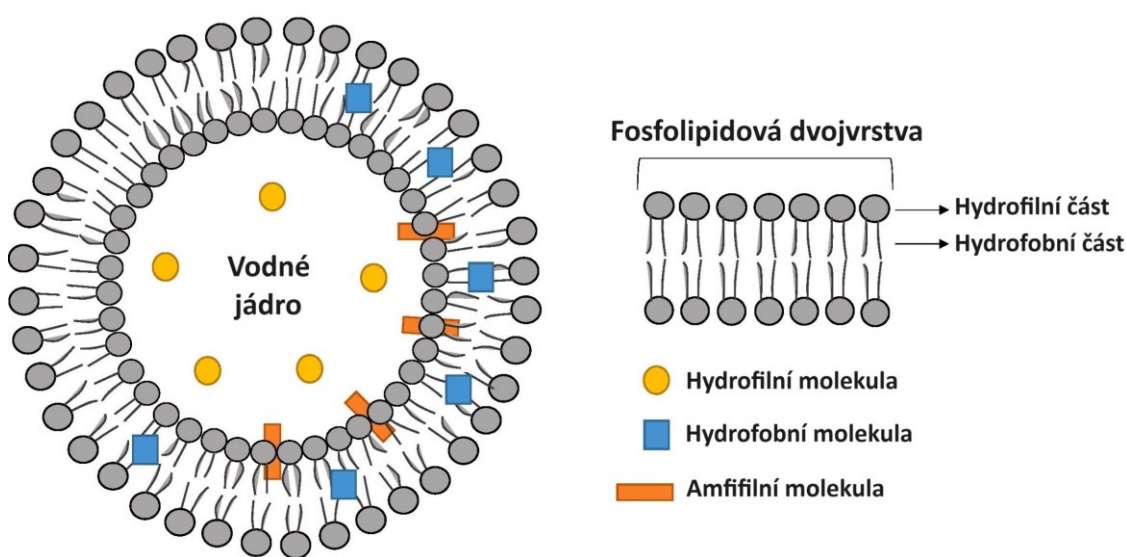
Zavádění nano nosičových systémů do farmaceutického vývoje představuje nové možnosti k rozšíření terapeutického potenciálu různých bioaktivních látek pro léčbu, prevenci i oblast diagnostiky řady onemocnění. Takovými nosičovými systémy nanometrových rozměrů jsou i elastické lipozomy. Jedná se o lipozomy obsahující v membráně aktivátory hran, které propůjčují vezikulám vysokou deformovatelnost. Vysoká flexibilita lipidové dvojvrstvy zajišťuje snazší vstup vezikul se zapouzdřenými látkami do hlubších, viabilních částí kůže odkud mohou být distribuovány do krevního řečiště. Technika enkapsulace aktivních látek do struktury elastických lipozomů zlepšuje nejen biologickou dostupnost, ale rovněž přispívá i k ochraně aktivních látek před jejich degradací.

V posledních několika letech se v kosmetických i farmaceutických aplikacích stále více využívají aktivní látky přírodního původu. Mezi přírodní látky se slibným terapeutickým potenciálem patří i sekundární metabolity rostlin rodu *Cannabis* známé jako kanabinoidy. Z této skupiny látek je hojně diskutovaným zástupcem kanabidiol, především pro jeho schopnost příznivě interagovat s lidským endokanabinoidním systémem a vyvolávat řadu účinků jako antiemetický, antioxidační, anxiolytický nebo analgetický. Využití kanabidiolu pro klinickou praxi však omezuje jeho náchylnost k degradaci a snížená biologická dostupnost. Tato omezení mohou být překonávána jeho enkapsulací do vezikul elastických lipozomů vedoucí ke zlepšení terapeutického potenciálu tohoto kanabinoidu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 LIPOZOMY

Lipozomy představují sférické vezikulární systémy koloidních rozměrů. Jsou zpravidla tvořeny z jedné nebo více koncentricky uspořádaných dvojvrstev fosfolipidů obepínající střed z vodné fáze (viz Obr. 1). Díky amfifilnímu charakteru molekul lipidů dochází k jejich samouspořádání v roztoku do lamel vlivem hydrofobních interakcí. Tato unikátní struktura dvojvrstev představuje možnost jak enkapsulovat a dodávat aktivní molekuly s různou polaritou. Do vnitřního vodného jádra jsou zapouzdřeny hydrofilní molekuly, hydrofobní do lipidové dvojvrstvy a amfifilní na rozhraní voda/lipidová dvojvrsteva [1], [2], [3].



Obrázek 1 Obecná struktura lipozomu, upraveno podle [1]

Lipozomy patří k nejvíce zkoumaným nanonosičům pro cílené podávání léčiv a aktivních látek, jelikož pozitivně ovlivňují rozpustnost a zprostředkovávají jejich řízenou distribuci. Pro praktické aplikace jsou výhodné především díky svým typickým vlastnostem, jako jsou absence toxicity, rychlá biologická odbouratelnost skrze metabolické dráhy, univerzálnost struktury, biokompatibilita a neschopnost vyvolávat imunitní reakci. Navíc nabízí i možnosti povrchové modifikace pro cílené, prodloužené a trvalé uvolňování aktivní látky. Jejich účinnému buněčnému vstřebávání napomáhá charakter složení lipozomálních částic. Ty jsou často na bázi fosfolipidů amfifilního charakteru, mimikující přirozené buněčné membrány. Nosiče pak snadno vstupují do interakce se savčími buněčnými membránami, překonávají překážky buněčného a tkáňového příjmu a zvyšují tak biodistribuci léčiv do cílových míst *in vivo* [1], [2], [4].

## 1.1 Příprava lipozomů

Příprava lipozomálních částic patří mezi relativně snadné a technicky méně náročné procesy. Obecně zahrnuje dvě hlavní fáze. První zahrnuje vysušení lipidů z organického rozpouštědla a druhá rozptýlení lipidů ve vodném roztoku. K získání lipozomálních nosičů lze využít různé techniky dispergace, např. mechanické metody, dispergaci v rozpouštědle, nebo techniky odstraňování detergentů. Jako mechanické dispergační metody lze uvést sonikaci, přetlačování přes membránu, extruzi přes francouzskou tlakovou komoru (frenchpress), hydrataci tenké lipidové vrstvy a mikrofluidu, nebo zmrazovací a rozmrazovací techniky. Mezi nejpoužívanější metody dispergace rozpouštědla patří technika odpařování na reverzní fázi a etherová nebo ethanolová injekční metoda [2], [5], [6].

## 1.2 Klasifikace lipozomů

Lipozomy lze rozdělit do příslušných kategorií na základě několika kritérií, jako je velikost, počet dvojvrstev, složení a použití. Na základě počtu dvojvrstev a jejich tloušťky rozlišujeme dvě skupiny lipozomů, a to unilamelární vezikuly (ULV) a multilamelární vezikuly (MLV). ULV jsou charakteristické jednou uzavřenou lipidovou dvojvrstvou. Lze je dále na základě velikosti rozdělit do 3 kategorií:

- malé unilamelární vezikuly (SUV), jímž přísluší velikost od 30–100 nm,
- velké unilamelární vezikuly (LUV) s velikostí 100–1000 nm,
- obrovské unilamelární vezikuly (GUV) s rozměry 1–100  $\mu\text{m}$ .

Jako multilamelární lipozomy (MLV) označujeme struktury skládající se z více než jedné lipidové dvojvrstvy. Tvoří je částice o poměrně velkých průměrech v řádech stovek nanometrů.

V závislosti na velikosti mohou lipozomy o jinak stejném chemickém složení vykazovat různé chování a aktivitu ve fyziologickém prostředí. Velikost vezikul je například důležitým faktorem ovlivňujícím poločas cirkulace v organismu. Zatímco lipozomy malých velikostí mohou cirkulovat v organismu po dlouhou dobu, u velkých vezikul dochází k jejich rychlejšímu odbourávání. Pro farmakologické aplikace se uvádí jako ideální rozměr lipozomů pro podávání léčiv v rozsahu od 50 nm do 200 nm. Velikost a počet dvojvrstev také ovlivňují schopnost zapouzdření většího množství aktivní látky [5], [2], [6].

Další klasifikace zohledňuje náboj přítomný na povrchu lipozomu. Systémy lze rozčlenit na kationické, anionické nebo neutrální typy. Formulace lipozomů s povrchovým nábojem vykazují lepší agregační stabilitu během skladování díky vzájemnému elektrostatickému odpuzování nabitých částic.

Kationické lipozomy nacházejí využití zejména v genové terapii, kde pomocí elektrostatického přitahování úspěšně enkapsulují negativně nabitě makromolekuly jako oligonukleotidy, nebo nukleové kyseliny ať už DNA nebo RNA typu. Překonávají tak jejich jinak omezenou pasivní difuzi do buněk vlivem jejich poměrně velké velikosti a záporného náboje. Kladně nabitě lipozomy jsou schopné také selektivního cílení na angiogenní endotelové buňky nádorů, což z nich činí ideální systémy pro doručování terapeutik. Anionické lipozomy vykazují v prostředí krevního řečiště menší stabilitu, než formulace obsahující neutrální nebo kationické lipozomy. Naopak vhodné jsou pro transdermální aplikaci léčiv, kde zlepšují penetraci formulace přes rohovou vrstvu kůže.

Podle složení nosičů lze rozdělit lipozomy na konvenční tzv. první generace, ty jsou tvořeny pouze lipidy. A lipozomy druhé generace, které kromě fosfolipidů obsahují ještě i další složky, jako jsou alkoholy nebo povrchově aktivní látky, které dodávají nosičům unikátní vlastnost jako je pružnost/deformovatelnost.

Jak již bylo uvedeno výše, na účinnost průchodu fosfolipidových nosičů při topické aplikaci má vliv několik parametrů. Mezi tyto parametry patří velikost částic, počet lamel, povrchový náboj a v neposlední řadě také pružnost dvojvrstvy. Lipozomy s vyšší flexibilitou lipidové dvojvrstvy, tedy schopností snadné deformace, účinněji pronikají do hlubších vrstev kůže ve srovnání s konvenčními systémy. Lze předpokládat, že pro klinické aplikace budou v budoucnu rozvíjeny převážně systémy druhé generace zahrnující modifikované lipozomální částice, jež příznivě ovlivňují farmakokinetiku a biodistribuční profil. Proto bude v této práci dále věnována větší pozornost elastickým lipozomům [2], [7], [5].

## 2 ELASTICKÉ LIPOZOMY

V posledních letech byla věnována velká pozornost studiu a vývoji pokročilých terapeutických systémů pro podávání aktivních farmaceutických látek přes kůži. Strategie transdermálního podávání, jako alternativa k parenterální nebo perorální formě, přináší pro pacienty mnohé výhody. Uspadňuje podávání, je neinvazivní a umožňuje kontrolu nad uvolňováním léčiva [8].

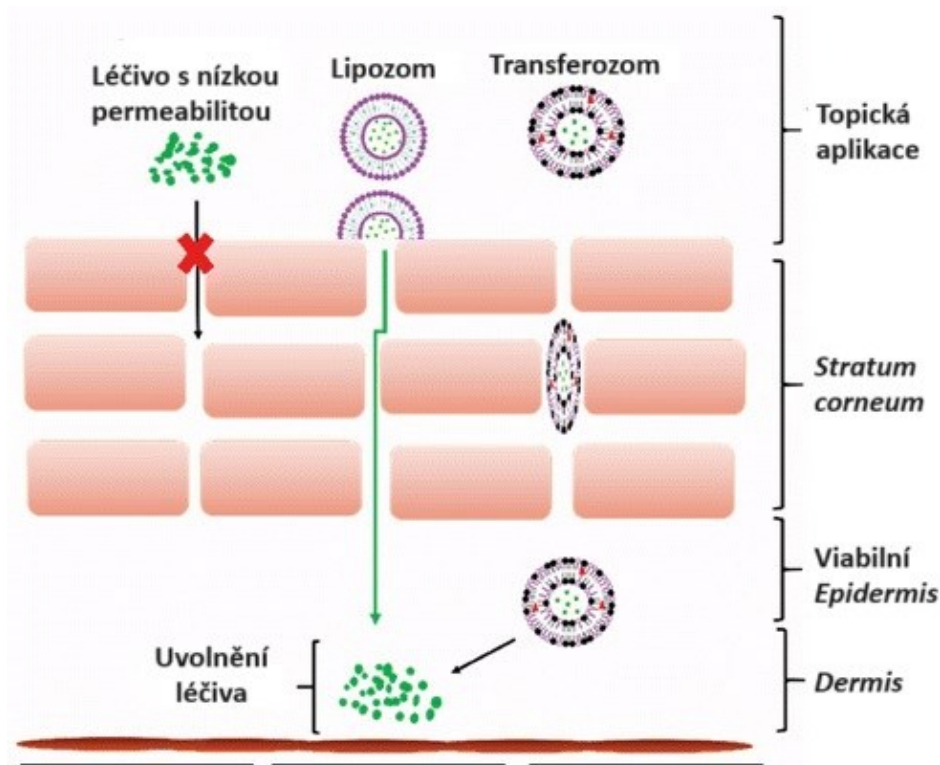
Odezvou na bariérovou funkci kůže, která brání transdermálnímu průchodu xenobiotik, je zařazování vezikulárních formulací na bázi lipidů, které usnadňují transport enkapsulovaných látek. Mezi tyto doručovací systémy patří i elastické lipozomy. Ultradeformovatelné lipozomy nazývané též elastické lipozomy (EL) lze v literatuře nalézt i pod několika dalšími označeními jako jsou deformovatelné lipozomy, flexibilní lipozomy, ultraflexibilní lipozomy, včetně komerční registrované ochranné známky Transfersomes® společnosti IDEA AG (Německo).

EL představují jedny z nejuniverzálnějších deformovatelných dvouvrstvých vezikulárních systémů, které mohou dodávat aktivní látky hydrofobního i hydrofilního charakteru pro biochemické, kosmetické a farmaceutické technologie. Byly zkoumány pro topické, transdermální, nazální a orální cesty podání. EL díky svým vylepšeným farmakokinetickým a fyzikálně-chemickým vlastnostem řeší problémy jímž čelí tradiční lipozomální nosiče léčiv. Hlavní nevýhodou konvenčních lipozomů je totiž neschopnost pronikat hluboko do kožních vrstev, respektive až do krevního oběhu.

EL kromě zvýšené enkapsulační kapacity umožňují upravovat uvolňování zapouzdřené aktivní látky nebo farmaceutika a zvyšovat její permeaci a penetraci do kůže. Biologická dostupnost *in vivo* léčivé látky podávané ve formě ultradeformovatelných lipozomů je srovnatelná s biologickou dostupností dosaženou při podávání téže léčivé látky ve formě roztoku subkutánní nebo epi-kutánní injekcí. To ukazuje na možnosti jejich slibného využití při transdermálním podávání léčiv [6], [9], [10], [11], [12].

## 2.1 Mechanismus prostupu vezikul do kůže

Farmaceuticky aktivní látky mohou do jisté míry prostupovat do kůže, aniž by byly připojeny na povrch, nebo inkorporovány do nosičových systémů. Avšak pokud je aktivní látka enkapsulována do lipozomálních vezikul, dochází k jejímu zvýšenému průniku interakcí nosiče s mezibuněčnými lipidy nebo rohovou vrstvou. Interakčním mechanismem původních konvenčních lipozomů je jejich splynutí s rohovou vrstvou, které vede k uvolnění aktivní látky, nebo dochází k jejich fúzi s lipidovou matricí ve *stratum corneum*, čímž je zvýšena difúze látky kůží. Ačkoliv lipozomy první generace působí samy jako enhancery penetrace, nemohou procházet neporušenou rohovou vrstvou kůže. V tomto ohledu jsou velkým přínosem EL, které mohou díky své unikátní struktuře dopravovat látky i přes *stratum corneum* (viz Obr. 2) [10].



Obrázek 2 Průchod léčiva do kůže po topické aplikaci z různých systémů, upraveno podle [13]

Přesný mechanismus průniku EL skrze kůži stále není zcela jednoznačně objasněn. Obecně jsou navrhovány dva přístupy, přičemž je velmi pravděpodobné, že oba mechanismy mohou probíhat současně. Prvním navrženým mechanismem je působení EL jako vektorů léčiv, kdy při prostupu kůží nedochází k jejich porušení. Druhý mechanismus předpokládá, že se EL



chovají jako enhancery penetrace a usnadňují průnik molekul léčiva desintegrací mezibuněčných lipidů rohové vrstvy. V závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech transportované aktivní látky a složení samotných částic nosičů je vždy jeden ze způsobů převažující.

Pokud je suspenze EL aplikovaná lokálně na nekrytý povrch kůže bez okluze, dochází k následujícím dějům. Nejprve dochází k odpaření vody přítomné v suspenzi EL z povrchu kůže. To vede k částečné dehydrataci horní vrstvy kůže (obsah vody 10-30 %) v kontrastu s viabilní *epidermis* (obsah vody až 75 %). Tento rozdíl vnímají lipidové vezikuly jako transepidermální osmotický gradient. Molekuly nosičů tak mají tendenci migrovat do hlubších, na vodu bohatých, vrstev, aby si zajistily dostatečnou hydrataci.

Díky schopnosti velké, reverzibilní deformace dvojvrstvy překonává (jinak příliš velký) EL problém s prostupem kůží tím, že se v deformovaném stavu (bez narušení integrity) protlačí skrz intracelulární lipidy rohové vrstvy nebo hydrofilní póry. EL mohou pronikat i zúženými 5–10 × menšími, než je samotný průměr vezikul. Elasticita také snižuje riziko roztržení částice a uvolnění léčiva na místa, které nejsou cílem jejich doručení.

Gradient a afinita EL k vodě pohání vezikuly směrem k vnitřní vrstvě *epidermis*. Po překonání bariéry *stratum corneum* dojde ke změně z mechanismu tahu vyvíjeného na vezikuly na mechanismus tlaku, který je způsoben difuzí. Roli v usnadnění postupu EL může hrát i příspěvek pohybu mezibuněčné tekutiny ve viabilní části kůže.

Poté, co EL dosáhnou *dermis*, která je bohatá na kapilární systém, dochází k postupnému řízenému uvolňování molekul léčiva z nosiče. Dále pak následuje jejich difuze přes stěnu kapilár, uvolňování do mikrocirkulace a odtud do systémové cirkulace. Konečně pak dojde i vazbě farmaceuticky aktivní látky na cílové místo [6], [8], [10], [14], [15], [16].

## 2.2 Složení lipozomálních formulací

Elastické liposomy se skládají z vnitřního vodního prostoru obepínaného lipidovými dvojvrstvami, které jsou tvořeny z amfipatických fosfolipidů různé chemické struktury a inkorporovaných dynamicky distribuovaných povrchově aktivních látek, zde označovaných jako aktivátory hran (edge activators EA). Aktivátory hran mohou být jednotězcové povrchově aktivní látky s vysokým poloměrem zakřivení, které způsobují zvýšenou tekutost a pružnost lipidových dvojvrstev. Vykazují současně stabilizační i destabilizační efekt a iniciují redistribuci fosfolipidů v rámci dvojvrstvy, což vede k nárůstu

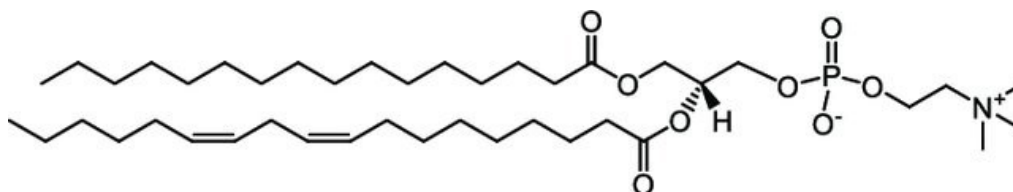
její flexibility. Míra deformovatelnosti dvojvrstvy určuje chování EL při prostupu kůží. Při tvorbě nosičových částic vykonává každá ze složek specifickou funkci, jejich základní přehled je uveden v Tabulce 1. Tento typ lipozomálních částic poskytuje velmi vysokou enkapsulační účinnost pro lipofilní léčiva a pozitivně ovlivňuje jejich stabilitu. Změnou typu nebo koncentrace obsažených složek lze upravovat podávání léčiva [8], [9], [11], [14].

Tabulka 1 Přehled základních složek elastických lipozomů

Složka	Funkce
Fosfolipidy	Složka tvořící vezikuly
Povrchově aktivní látky (aktivátory hran)	Zajištění flexibility
Alkoholy	Rozpouštědlo
Pufrační roztoky/Voda	Hydratační médium

### 2.2.1 Fosfolipidová složka

Základní složkou pružné lipidové dvojvrstvy jsou fosfolipidy amfipatického charakteru. V prostředí vodných roztoků dochází k samovolné asociaci fosfolipidových molekul obsahujících hydrofilní a hydrofobní část do vezikul. Tyto amfipatické molekuly vytvářejí glycerolové můstky jako spojnicí polárních skupin s dvojicí hydrofobních acylových řetězců. Toto propojení vede ke zvýšení elasticity lipidové membrány. Fosfolipidy mohou být přítomny v hydrogenované i nehydrogenované formě sestávající se z jednoho druhu fosfolipidů nebo jejich směsných formulací. Nejhojněji zastoupeným fosfolipidem buněčných membrán je fosfatidylcholin (znázorněn na Obrázku 3).



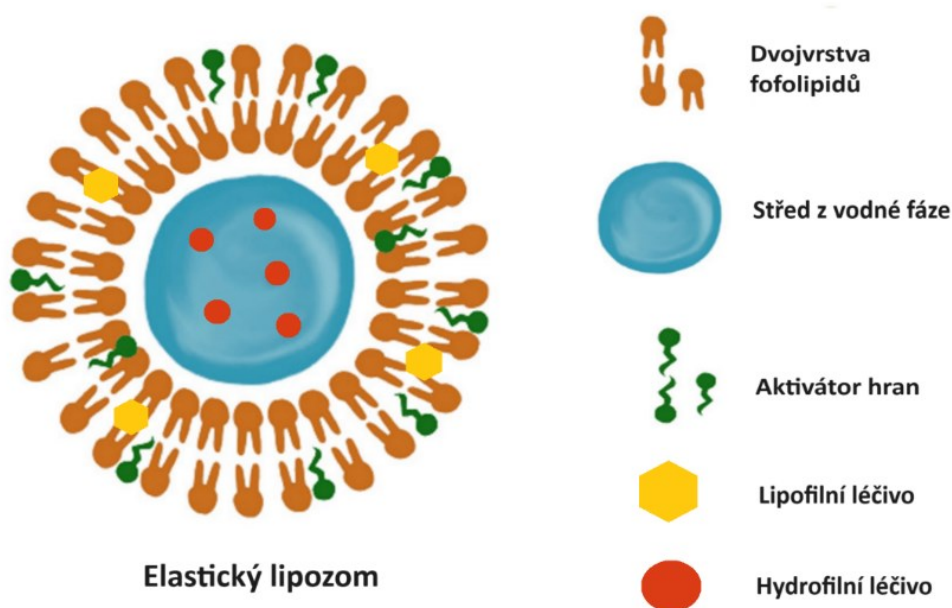
Obrázek 3: Struktura L- $\alpha$  fosfatidylcholin, převzato z [17]

Na základě této skutečnosti je jako primární stavební složka formulací využíván nenasycený sójový fosfatidylcholin. Jeho použitím je zajištěna vysoká kompatibilita s kůží, snížené podráždění nebo přecitlivělost a minimalizace vedlejších účinků.

V praxi se používá několik druhů fosfolipidů ať už přírodního, nebo syntetického původu:

- Neutrální, nasycené, s teplotou fázového přechodu  $T_m$  nižší, než  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , jako jsou např.  $L-\alpha$  fosfatidylcholin nebo hydrogenovaný sójový fosfatidylcholin
- Neutrální, nasycené, s  $T_m$   $41\text{ }^\circ\text{C}$  jako je 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-fosfatidylcholin
- Kationické, nenasyčené, s  $T_m$  nižší než  $5\text{ }^\circ\text{C}$ , jako je 1,2-dioleoyl-3-trimethylamonium propan
- Anionické, nenasyčené, s  $T_m$  pod  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , jako je fosfatidylinositol nebo fosfatidylserin

Unikátní struktura fosfolipidové dvojvrstvy umožňuje zapouzdření léčiv hydrofilního i hydrofobního charakteru. V acylové části struktury jsou zachyceny hydrofobní léčiva, ve vodném jádře vezikul směřující k polární části fosfolipidů jsou vázány léčiva hydrofilní povahy (znázorněno na Obrázku 4) [8], [9], [11], [14].



Obrázek 4 Struktura elastických lipozomů se zapouzdřenými léčivy. Na rozdíl od běžných lipozomů obsahují EL aktivátory hran, které jim propůjčují větší elasticitu, upraveno podle

[8]

Charakteristický profil používaných stavebních lipidů zásadně ovlivňuje výsledné vlastnosti a možnosti použití vezikul. Lipidy ovlivňují např. jejich zeta potenciál, enkapsulační účinnost, velikost vezikul a propustnost.

Mezi zásadní faktory s modulačním efektem patří:

- Složení lipidů
- Délka řetězce a míra nasycení lipidu
- Čistota lipidů
- Teplota fázového přechodu

#### *Složení lipidů*

Vlastnosti dvojvrstvy ovlivňuje poměrné zastoupení směsných fosfolipidů nebo charakter lipidu jedno druhového. A to zejména typ mastných kyselin hydrofobních řetězců a polární fosfátové skupiny, která může být ještě modifikována.

#### *Délka řetězce mastné kyseliny a stupeň nasycení*

Při zachování stejných podmínek přípravy a při stejném energetickém vstupu jsou vlastnosti výsledných vezikul (např. velikosti) ovlivněny charakterem řetězce mastných kyselin ve fosfolipidech, které řídí jejich organizaci do dvojvrstvy. Pro přípravu EL se využívají převážně nenasycené fosfolipidy s nízkou teplotou fázového přechodu. Vliv na elasticitu a schopnost transdermálního průchodu elastického lipozomu do kůže má i délka řetězce. Kratší řetězce vykazují lepší vlastnosti oproti řetězcům s vyšším počtem uhlíků.

#### *Čistota lipidů*

Čistota výchozí suroviny např. fosfatidylcholinu má vliv na výslednou permeační schopnost vezikul. Nejpriznivějších výsledků lze dosáhnout s alespoň 95% čistotou použitého fosfatidylcholinu [8], [9], [11], [14], [15], [18].

#### *Teplota fázového přechodu ( $T_m$ )*

Teplota fázového přechodu ovlivňuje stabilitu vezikul a schopnost udržení inkorporovaných aktivních látek. Obecně mají používané fosfolipidy nízké teploty fázového přechodu. Při vysokých teplotách (např. teplota povrchu kůže 32 °C) přechází lipidy do fáze tekutých krystalů, což má za následek zvýšenou propustnost enapsulovaného léčiva a jeho uvolnění z formulace.

Pro zlepšení stability vezikul při dlouhodobém skladování je vhodné upravit složení lipidů tak, aby se teplota fázového přechodu  $T_m$  pohybovala mezi 25 a 32 °C, tedy mezi teplotou skladování a teplotou odpovídající kožnímu povrchu. Změnou poměru fosfolipidů v lipozomální dvojvrstvě lze upravit teplotu fázového přechodu vezikul např. na optimálních

30 °C. Po aplikaci formulace na kůži, se dostávají nosiče nad svou  $T_m$  a tak přechodem do tekutého stavu dochází ke zvýšení jejich elasticity [8], [9], [11], [14], [15], [18].

### 2.2.2 Aktivátory hran

Aktivátory hran, známé také jako změkčovadla membrán, jsou druhou hlavní složkou EL. Jejich obsah ve formulaci se pohybuje v rozmezí 10-25 %. Jedná se o biokompatibilní sloučeniny, které se začleňují do struktury vezikul a působí zde změkčujícím efektem na jejich membrány. Při průchodu pokožkou destabilizují lipidovou matrix, čímž zvyšují její permeaci, tekutost a flexibilitu.

Povaha aktivátoru použitého při formulaci vezikul EL ovlivňuje jejich deformovatelnost, účinnost zachycení aktivní látky a zeta potenciál. Celkové množství povrchově aktivních látek a jejich správný poměr vzhledem k fosfolipidům je zodpovědný za kontrolu pružnosti membrány vezikul a minimalizaci rizika jejich prasknutí při průchodu kůží, které by vedlo k nechtěnému předčasnému uvolnění aktivní látky. Volbou vhodných biokompatibilních a biologicky odbouratelných aktivátorů hran lze dosáhnout formulací s příznivou lokální tolerancí při aplikaci na pokožku bez známek jejího podráždění nebo jiných nežádoucích reakcí.

Jako příklady používaných povrchově aktivních látek pro přípravu EL lze uvést deoxycholát sodný, cholát sodný, stearylamin, dodecyltrimethylamonium bromid, cetylpyridin chlorid, laurylsulfát sodný, Spany, Tweeny nebo Brij. Přičemž je nutné vždy zvolit povrchově aktivní látku s vhodnou hodnotou HLB.

Místo klasických povrchově aktivních látek lze využít i aktivátory hran na bázi olejů, jako je kyselina olejová, nebo ricinový olej. Vliv na elasticitu membrány má rovněž přídavek esenciálních olejů a jejich složek např. limonenu nebo eukalyptového oleje [8], [9], [11], [14], [15], [18], [19].

Tabulka 2 Příklady používaných aktivátorů hran nesoucích náboj a jejich HLB hodnoty, upraveno podle [9]

Povrchově aktivní látka/aktivátor hran	Náboj	Hodnota HLB
Sodium cholát	Kladný	16,7
Sodium deoxycholát	Kladný	16,0
Olejová kyselina	Záporný	1,0

Tabulka 3 Aktivátory hran z kategorie neionických povrchově aktivních látek a jejich HLB hodnoty , upraveno podle [9]

<b>Povrchově aktivní látka</b>	<b>Hodnota HLB</b>
Tween 85	1,8
Tween 80	14–15
Tween 60	14,9
Tween 40	15,6
Tween 20	16,7
Span 85	1,8
Span 80	4,3
Span 60	4,7
Span 40	6,7
Span 20	8,6

Vlastnosti EL jsou ovlivněny následujícími fyzikálně-chemickými charakteristikami EA.

- Teplota fázového přechodu  $T_m$ : přidavek EA snižuje hodnotu  $T_m$  a vede k fluidizaci lipidové dvojvrstvy.
- Náboj: částice nesoucí kladný náboj vykazují lepší permeaci ve srovnání s neutrálními nebo záporně nabitými částicemi. To je způsobeno vzájemným přitahováním kladného náboje částic se záporně nabitým povrchem pokožky.
- Afinita k lipidům: aktivátory hran lipofilního charakteru mají větší afinitu k lipidovým dvojvrstvám, což vede ke zvýšené enkapsulační účinnosti lipofilního léčiva.
- Elasticita: retence léčiva se snižuje se zvyšující se elasticitou aktivátoru.
- Hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy: EA s nízkými hodnotami HLB vedou k produkci částic o menších velikostech v důsledku snížení povrchové energie.
- Koncentrace: obecně platí, že se zvyšujícím se obsahem aktivátoru hran dochází k poklesu mezifázového napětí a zmenšení velikosti vezikul. Čím vyšší je

koncentrace EA, tím nižší je také index polydisperzity (PDI) částic. Příliš nízká koncentrace EA vede k tvorbě rigidnějších vezikul. Naopak pokud je zvolen vysoký obsah EA, dochází k tvorbě micel, které mají sníženou enkapsulační účinnost, nízkou flexibilitu a nízkou citlivost na osmotické gradienty v kůži.

Aktivátory hran hrají taktéž důležitou roli z hlediska účinnosti enkapsulace. Použitím zvýšeného množství EA dochází ke změně jejich uspořádání v rámci lipidové dvojvrstvy. V membráně vezikul dochází k tvorbě pórů, což vytváří místo pro únik léčiva z nosiče.

### 2.2.3 Rozpouštědla

Jako rozpouštědla pro směsi fosfolipidů a EA se nejčastěji používají těkavá organická rozpouštědla, především ethanol, methanol nebo di-ethylether, popřípadě jejich vhodné kombinace. Obsah rozpuštěných lipidů a EA obvykle činí 3–10 %. Účinným rozpouštědlem pro fosfolipidy je také chloroform, obecně je ale snahou vyhnout se ve farmaceutické výrobě chlorovaným rozpouštědlům. Nejčastěji je proto využíván ethanol, protože má menší zbytkovou toxicitu v lipidovém filmu ve srovnání s jinými organickými rozpouštědly.

### 2.2.4 Hydratační média

K hydrataci tenkého lipidového filmu se obvykle používají vodná hydratační média, jako je čištěná voda nebo fyziologický fosfátový pufr (pH 6,5-7,4), která umožňují přechod suchého lipidového filmu do dvouvrstvé vezikulární struktury. [8], [9], [14], [15], [16], [18], [20].

## 2.3 Metody přípravy

Ačkoliv je patentována řada postupů, jak EL připravovat, neexistuje žádný univerzální předpis nebo obecný protokol jejich přípravy. Při návrhu experimentálních postupů pro přípravu vezikul se specifickou terapeutickou látkou je proto potřeba vždy postupovat individuálně. Optimalizace podmínek přípravy vede k tvorbě nejlepších možných nosičů s vyhovující stabilitou, enkapsulační kapacitou a optimální elasticitou membrány [14].

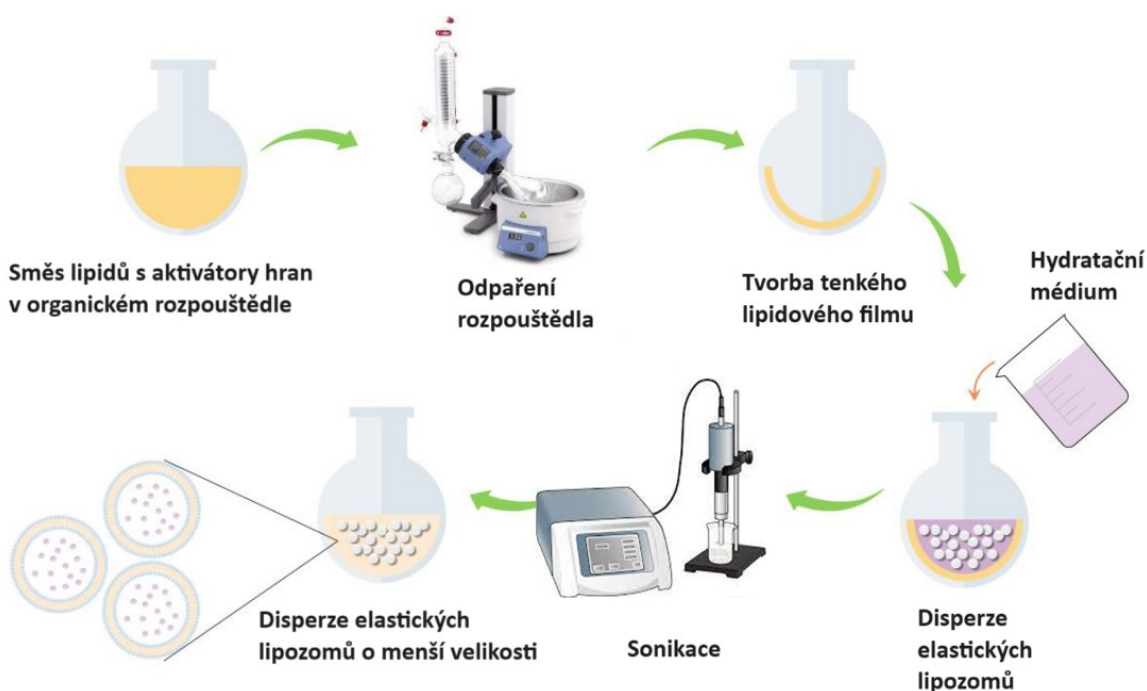
Elastické lipozomy lze připravit pomocí několika metod. Konvenční a zároveň nejpoužívanější metodou přípravy je technika hydratace tenkého filmu (tzv. rotační odpařovací metoda). Lze využít ale i metody modifikované, jako je centrifugace, vysokotlaká homogenizace suspenze, odpařování na reverzní fázi, vstříkávání do ethanolu, vortexování spojené se sonikací, nebo i ruční protřepávání [15].

### 2.3.1 Hydratace tenkého filmu

Elastické lipozomy jsou běžně připravovány pomocí techniky rotačního odpařování. Požadované množství fosfolipidů, aktivátorů hran a lipofilního léčiva nebo aktivní látky (v případě použití hydrofilního léčiva se nachází až v hydratačním médiu) je nejprve rozpuštěno při pokojové teplotě v baňce s kulatým dnem v organickém rozpouštědle (chloroform, methanol, ethanol) tak, aby bylo získán jednofázový roztok.

Ze získaného roztoku se poté odpaří na rotační vakuové odparce rozpouštědlo. V průběhu odpařování rozpouštědla dochází na vnitřní stěně baňky k tvorbě tenkého lipidového filmu.

Tento film je následně hydratován vodou nebo pufrům (ten může obsahovat hydrofilní léčivo), aby došlo k úplnému nabobtnání lipidových vezikul. Získaná mléčná koloidní suspenze vezikul, o velké velikosti, se pomocí sonikátoru, nebo procesem extruze přemění na unilamelární vezikuly menších rozměrů. Tento proces je znázorněn na Obrázku 5 [8], [10], [20].



Obrázek 5 Proces přípravy elastických lipozomů pomocí metody hydratace tenkého lipidového filmu, upraveno podle [21]

### 2.3.2 Metoda odpařování na reverzní fázi

Při odpařování na reverzní fázi je dávkován aktivátor hran spolu s fosfolipidy do baňky s kulatým dnem, kde jsou obě složky rozpuštěny ve směsi organických rozpouštědel. V této



fázi lze do směsi přidat také lipofilní léčivo. Poté je rozpouštědlo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky, čímž se získají lipidové filmy. Lipidové filmy jsou opět rozpuštěny v organické fázi složené z isopropyletheru a/nebo diethyletheru. Následně je k této organické fázi přidána vodná fáze, čímž dojde ke vzniku dvoufázového systému. Vodná fáze může obsahovat léčivo hydrofilního charakteru. Tento systém je poté podroben sonikaci dokud nedojde k vytvoření homogenní emulze V/O (voda v oleji). Organické rozpouštědlo je pak pomalu odpařováno pomocí rotační odparky za vzniku viskózního gelu, z něhož se poté stane vezikulární suspenze [14].

### **2.3.3 Metoda vysokotlaké homogenizace**

Složky EL, fosfolipidy, aktivátor a léčivo, jsou rovnoměrně rozptýleny ve fosfátovém pufru nebo vodě obsahující alkohol. Směs je nejprve sonikována v lázni za současného míchání. Výsledná směs je poté ještě podrobena vysokotlaké homogenizaci [14].

### **2.3.4 Metoda vortexování a sonikace**

Fosfolipid, EA a léčivo jsou rozpuštěny v ethanolu. K roztoku je kontinuálně za vortexování přidáván fosfátový pufr (pH 7), dokud se nevytvoří mléčně zakalená suspenze vezikul. Vzniklé EL jsou podrobeny sonikaci v sonikační lázni vedoucí k získání menších vezikul. Popřípadě je pro úpravu rozměrů vezikul možno využít techniku protlačení suspenze přes polykarbonátové membrány s póry o příslušné velikosti [22].

### **2.3.5 Metoda zmrazení a rozmražení**

Při této metodě jsou multilamelární vezikuly vystaveny střídavě velmi nízké teplotě (zmražení) a následně zahřátí na velmi vysokou teplotu. Suspenze je přenesena do zkumavky a ponořena na několik sekund do lázně tekutého dusíku ( $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Po zmražení se umístí na vodní lázni o vysoké teplotě. Pro získání malých EL se stejný proces opakuje osmkrát až devětkrát [18].

### **2.3.6 Metoda vstřikování do ethanolu**

Při tomto postupu se ethanolový roztok obsahující fosfolipid, EA a léčivo vstřikuje po kapkách do vodného roztoku fosfátového pufru za kontinuálního míchání homogenizátorem. Oba roztoky přitom musí být zahřátý na teplotu  $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jakmile se ethanolový roztok dostane do přímého kontaktu s vodným roztokem, dojde k tvorbě lipidové dvojvrstvy s inkorporovaným aktivátorem hran a zapouzdřeným léčivem. Ethanol je odstraněn vakuově

na odparce. Za účelem zmenšení velikosti částic lze provést ještě jejich doplňkovou sonikaci [8], [10], [14], [18], [20].

### 2.3.7 Modifikovaný postup ručního protřepávání

Modifikovaná metoda ručního protřepávání má stejný základní princip jako metoda rotačního odpařování a sonikace. Nejprve se fosfolipid a aktivátor hran rozpustí v organickém rozpouštědle v baňce s kulatým dnem. V této fázi lze přidat také léčivo lipofilního charakteru.

Poté je organické rozpouštědlo odstraněno odpařením při ručním protřepávání (namísto použití rotační vakuové odparky), přičemž je baňka s kulatým dnem částečně ponořena do vodní lázně udržované při teplotě 40-60 °C. Na vnitřní stěně baňky dochází k tvorbě tenkého lipidového filmu. Baňka je následně ponechána otevřená přes noc pro úplné odpaření rozpouštědla.

Vytvořený film je hydratován vhodným pufracím roztokem (např. fosfátový pufr o pH 7,4) za mírného protřepávání při teplotě vyšší, než je teplota fázového přechodu použitých lipidů. V této fázi lze provést inkorporaci hydrofilního léčiva.

### 2.3.8 Metoda odstředování

Při tomto procesu jsou fosfolipidy, aktivátory hran a lipofilní léčivo rozpuštěny v ethanolu (nebo jiném vhodném rozpouštědle). Následně je rozpouštědlo odstraněno na rotační odparce za sníženého tlaku při 40 °C, za současného vzniku lipidového filmu.

Nanesený lipidový film je hydratován odstředováním při 60 rpm příslušným pufrům po dobu 1 hodiny za pokojové teploty. V této fázi je opět možné přidat léčivo hydrofilní povahy. Výsledné vezikuly jsou ponechány bobtnat za pokojové teploty po dobu dalších 2 hodin. Tento proces vede ke vzniku multilamelárních lipidových vezikul, které je možno dále sonikovat pro získání unilamelárních částic s užší distribucí velikostí [8], [10], [14], [18], [20], [22].

## 2.4 Vlastnosti

Formulace EL přináší díky svým unikátním vlastnostem řadu výhod ve srovnání s jinými systémy.

Jednou z jejich unikátních a nejzásadnějších vlastností je vysoká deformovatelnost membrány poskytující částicím vysokou elasticitu. Elasticita usnadňuje permeabilitu

formulace skrze kůži (zvyšuje účinnost transdermálního toku) a zlepšuje tak biologickou dostupnost zapouzdřeného léčiva nebo jiné aktivní látky v cílovém místě. Enkapsulace do EL navíc minimalizuje potenciální riziko degradace terapeutické látky. Složení vezikul poskytuje systém pro prodloužené, předvídatelné a řízené uvolňování léčiv, zajišťující jejich optimální koncentraci v krevním oběhu. EL tak představují vhodné systémy pro lokální i systémové podávání léčiv.

Ve většině případů jsou membrány EL tvořeny fosfolipidy přírodního původu zajišťující jejich biokompatibilitu a biodegradabilitu. Mezi příznivé vlastnosti EL patří také jejich univerzálnost. Jsou schopny enkapsulovat a dodávat širokou škálu nízkomolekulárních i vysokomolekulárních terapeutických látek lipofilního i hydrofilního charakteru, přičemž pro lipofilní látky vykazují vysoké hodnoty enkapsulační kapacity. Díky jejich jednoduchému a krátkému výrobnímu procesu mají potenciál být snadno inovovány a rozvíjeny.

Problémy se stabilitou, které se běžně vyskytují u konvenčních lipozomů, překonávají EL díky zvýšené elasticitě a povrchové hydrofilitě. Tyto vlastnosti tak poskytují vezikulám dodatečnou stabilitu, bránící jejich aglomeraci a fúzi při osmotickém stresu.

EL jsou spojeny i s určitými nevýhodami a omezeními. Formulace na bázi fosfolipidů obecně vykazují chemickou nestabilitu při expozici slunečnímu záření, vystavení vysokým teplotám, nebo za přístupu vzduchu. Tato nestabilita vychází ze struktury fosfolipidů, kde představuje vazba hydroxylové skupiny glycerolu s řetězcí mastných kyselin místo náchylné k oxidační degradaci. Dalším omezením může být také nedostatečná čistota výchozí suroviny, přírodních fosfolipidů [15], [20], [22].

## 2.5 Využití Elastických lipozomů

Elastické lipozomy představují slibné nanotechnologické systémy usnadňující dodávání bioaktivních látek přes obtížně prostupné bariéry v lidských tkáních. Aplikace EL byly v posledních desetiletích intenzivně studovány zejména v oblasti transdermálního podávání léčiv.

Tyto lipozomy již byly použity jako vezikulární nosiče pro řadu terapeutických látek, jako jsou protizánětlivé a analgetické látky, anestetika, antipsychotika, antimikrobiální látky, hormony a steroidy, protinádorové látky, proteiny a peptidy, rostlinné bioaktivní látky a nutraceutika. V těchto aplikacích přináší podstatné zlepšení prostupu molekul léčiv kůží. V současné době se v různých fázích klinických studií hodnotí hned několik přípravků na bázi

EL. Některé formulace již byly úspěšně uvedeny na trh, např. v roce 2007 začala společnost Swiss Medic nabízet ketoprofen enkapsulovaný v EL pro léčbu bolesti kostí [12], [15], [16].

V následující části práce jsou uvedeny příklady využití EL pro podávání různých typů aktivních látek.

#### *Proteiny a peptidy*

Proteiny a peptidy jsou velké biogenní molekuly, k jejichž nedostatkům patří obtížná administrace do organismu; např. při perorálním podávání, kdy podléhají degradaci v gastrointestinálním traktu. To je také důvodem, proč se tyto peptidy a proteiny stále podávají injekčně. Úlevu pacientům mohou přinášet neinvazivní formulace EL, které jsou z hlediska biologické dostupnosti do jisté míry srovnatelné s účinky subkutánní injekce proteinové suspenze. Při opakované epikutánní aplikaci jsou EL s enkapsulovanými proteiny schopny rovněž vyvolávat silnou imunitní odpověď. Např. adjuvantní imunogenní sérový albumin v EL je po opakovaném topickém podání stejně imunologicky aktivní jako odpovídající injekčně aplikované přípravky [20].

#### *Inzulín*

Inzulín je obvykle podáván subkutánní cestou, která není pro pacienty příjemná. Proto představuje neinvazivní transdermální transfer inzulínu značné zlepšení při léčbě *diabetes mellitus*. Díky deformovatelnosti membrány jsou EL schopny enkapsulovat i toto vysokomolekulární léčivo [24]. Po aplikaci transferulinu (inzulín v systému EL) na neporušenou kůži je pozorován terapeutický účinek po 90-180 minutách v závislosti na složení nosiče [20]. Pro úspěšné podávání inzulínu, překonávající problémy konvenčního způsobu, lze připravit také transferomální suspenzi inzulínu inkorporovanou do methylcelulosového gelu, jehož prostup do kůže je usnadněn aplikací proudu na kůži (iontoforézou) [12].

Pomocí enkapsulace steroidních léčiv do EL lze potlačit bezpečnostní rizika spojená s jejich podáváním. Nejčastěji se formulace na bázi EL využívají k transdermálnímu podávání kortikosteroidů (hydrokortizonu a dexamethasonu). Takto zapouzdřené kortikosteroidy jsou biologicky aktivní v dávkách několikanásobně nižších, než jsou dávky v dermálních přípravcích používané v současné době k léčbě kožních onemocnění. Při aplikaci kortikosteroidů inkorporovaných do vezikul EL dochází rovněž k rychlejšímu nástupu antiedematózních účinků a bioaktivity aktivních látek [12].

### *Lokální anestetika*

Většina dostupných lokálních anestetik tlumí bolest krátkodobě a k dosažení dlouhodobého účinku je třeba častého a opakovaného podávání. Pro zajištění prodlouženého uvolňování těchto látek, bez ohledu na způsob jejich podání a dávku, jsou připravovány EL s obsahem lokálních anestetik [12]. Aplikace těchto formulací vyvolá nástup lokální anestezie do 10 minut (za vhodných podmínek). V případě bolesti a citlivosti, je míra účinku téměř stejná (80 %) jako u odpovídající podkožní injekce, ale EL s inkorporovanými anestetiky vykazují trvalejší účinek [20].

### *Lokální antimykotika a antibiotika*

Plísňové infekce kůže jsou velmi častým onemocněním, při kterém se výskyt přítomných patogenů omezuje na rohovou vrstvu kůže. K léčbě těchto plísňových infekcí se proto používají různé lokální přípravky, jejichž účinnost je však vzhledem k bariéře *stratum corneum* snížena. K překonání této bariéry jsou připravovány EL s obsahem antifungálních léčiv jako je Mikonazol nebo Nystantin. Vezikuly EL mohou díky své deformovatelnosti snadno projít přes *stratum corneum* a následně uvolňovat zapouzdřené léčivo, což vede k maximalizaci protiplísňového účinku [9].

### *Protinádorová léčiva*

Technologie využívající EL poskytují nový přístup k léčbě rakoviny. Zejména v oblasti kožních karcinomů, jichž je každoročně na celém světě hlášeno více než milion případů, je potřeba hledat nové účinnější léčebné přístupy. Účinnost konvenčních formulací s obsahem chemoterapeutik je limitována jejich špatným průnikem do hlubších částí nádoru. Proto byly vyvinuty nové nosičové systémy na bázi EL, které mohou být používány k transdermálnímu podávání protinádorových látek, jako je např. 5-fluorouracil nebo methotrexát. Ty překonávají nedostatky běžných přípravků. Aplikací EL dochází ke zlepšení *in-vitro* permeace chemoterapeutika kůží a k ukládání léčiva v hlubších částech kůže [12], [20]. Dobrou antiproliferační aktivitu vůči maligním buňkám karcinomu kůže vykazují rovněž formulace ultradeformovatelných vezikul s enkapsulovaným sulforafanem [9].

### *Fytochemické látky*

Fytochemické látky obsažené v léčivých bylinách se dnes často používají k léčbě různých onemocnění. Omezená biologická dostupnost těchto látek však může bránit jejich optimální terapeutické využitelnosti. Rovněž zde je řešením použití EL. Dosud byla do EL úspěšně enkapsulována řada fytochemických látek [15]. Byly připraveny např. formulace ultra

deformovatelných lipozomů s obsahem Silymarinu, zaměřené na léčbu hyperglykémie. Ty obstály při studiích *in vivo*, kde vyvinutý přípravek významně snižoval hladinu glukózy v krvi. Výsledky *ex vivo* zase ukázaly vysoký transdermální tok terapeutické látky [25].

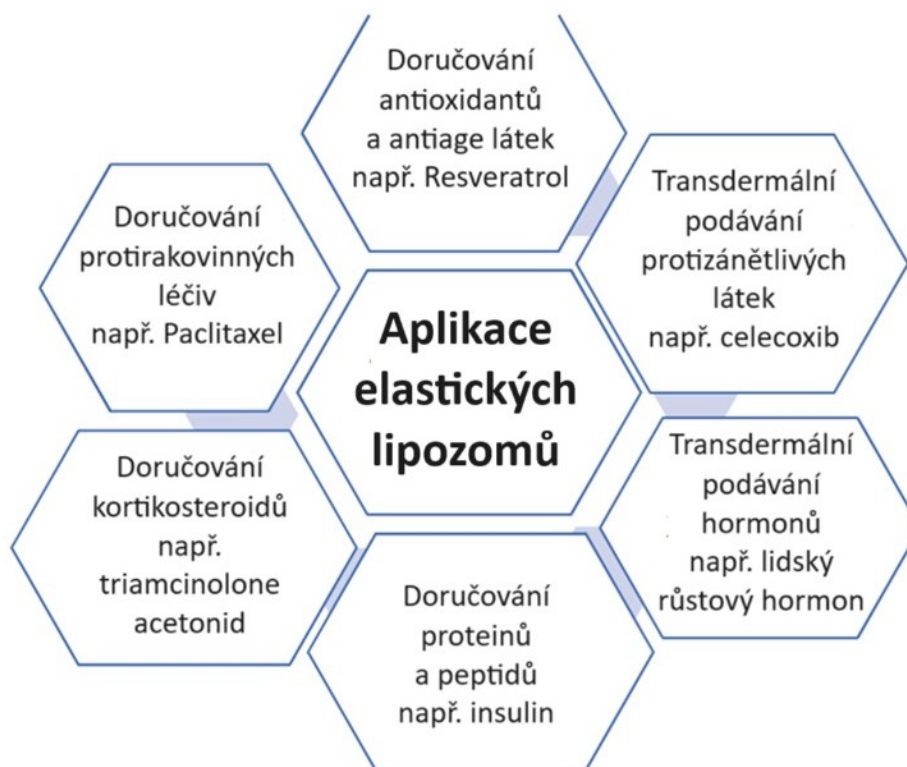
#### *Vitamíny a doplňky stravy*

Elastické lipozomy se používají také jako nosičové systémy pro vitamíny a antioxidanty. Retinoidy (deriváty vitamínu A) mají významné účinky na kožní buňky. Podílejí na správném buněčném zrání keratinocytů, které zajišťují náležité fungování kůže. Formulace EL s enkapsulovaným retinylpalmitátem vykazují lepší penetraci přes *stratum corneum* ve srovnání s kontrolní formulací s volným retinylpalmitátem. Dochází také k akumulaci účinné látky v *epidermální* a *dermální* vrstvě kůže [12].

Rovněž enkapsulace antioxidantů do EL zlepšuje jejich účinnost a využitelnost. Ve srovnání s konvenčními krémy vykazují formulace EL s antioxidantem resveratrolem vyšší permeační tok a ukládání aktivní látky do hlubších vrstev kůže [9].

#### *Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID)*

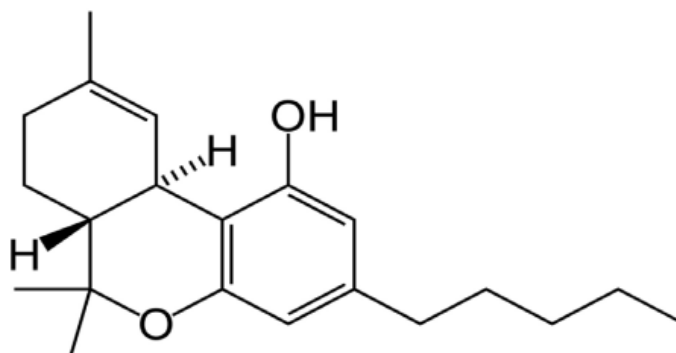
Problémy většiny NSAID jsou spojeny s jejich orálním podáváním vedoucím k řadě nežádoucích účinků, jako jsou např. zažívací potíže a bolesti žaludku. Tyto obtíže lze překonat změnou strategie administrace NSAID, a to transdermálním podáním pomocí EL. Lze tak enkapsulovat léčiva jako jsou diklofenak, ketoprofen nebo meloxikam. V porovnání s konvenčními lipozomy a suspenzemi vede aplikace NSAID ve formulacích EL k jejich zvýšené permeaci kůži, která je způsobená adsorpcí vezikul a fúzí se *stratum corneum* [12], [20].



Obrázek 6: Aplikace elastických lipozomů, upraveno podle [23]

### 3 KANABINOIDY

Fytokanabinoidy představují skupinu biologických sloučenin, které se vyskytují jako přirozená součást rostlin rodu *Cannabis*, včetně *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* a *Cannabis ruderalis*, nebo jsou takto označovány látky z nich získávané. Patří mezi sekundární metabolity rostlin společně se složkami nekanabinoidního typu jako jsou terpeny, flavonoidy nebo alkaloidy. Během let bylo izolováno a identifikováno více než 100 různých kanabinoidů. Z nichž nejznámějšími představiteli je kanabidiol (CBD), kannabinol (CBN), kannabigerol (CBG), a tetrahydrokannabinol (THC), jež je zodpovědný za psychoaktivní účinky konopí. Chemické složení kanabinoidů je ovlivněno genetikou, pěstováním, sklizní, sušením a rostlin, jakož i dalšími výrobními faktory. Všechny fytokanabinoidy vznikají z centrálního prekurzoru kyseliny kannabigerolové (CBGA) a nejvyšší koncentrace těchto látek se nachází především v květní části samičí rostliny [26]. Pro kategorii fytokanabinoidních sloučenin je charakteristická C21 terpenofenolická struktura, která je patrná i např. u nejznámějšího zástupce THC (Obrázek 7) [27], [28], [29], [30], [31], [32], [33], [34], [35], [36].



**9-Δ-tetrahydrocannabinol (THC)**

Obrázek 7: Chemická struktura THC, převzato z [37]

V kontextu původu lze kanabinoidy dělit na:

- Fytokanabinoidy – získávané přirozeně z flóry.
- Endokanabinoidy – vznikají endogenně.
- Syntetické kanabinoidy – uměle připravené.



*Syntetické kanabinoidy* jsou vyvíjeny v laboratořích a mají chemickou a strukturní podobnost s endokanabinoidy a fytoKANABINOIDY. Tato skupina molekul se diverzifikuje a zdokonaluje za účelem zkoumání terapeutického potenciálu kanabinoidů. Příkladem syntetických kanabinoidů jsou dronabinol a nabilon [38].

*Endogenní kanabinoidy* (endokanabinoidy) jsou přirozenými produkty lidí a živočichů. Tyto sloučeniny jsou považovány za neuromodulátory. Mají charakteristické vlastnosti, které je odlišují od typických neurotransmiterů. Jsou syntetizovány v místě svého působení prostřednictvím receptorem stimulovaného štěpení prekurzorů lipidové membrány a nejsou uloženy v synaptických vezikulách. Jsou to deriváty kyseliny arachidonové syntetizované z fosfolipidů na vnitřním listu membrány a mezi nejznámější zástupce této třídy patří 2-arachidonoylglycerol a anandamid [38], [35].

Biologická aktivita těchto sloučenin z nich činí atraktivní látky pro farmacii, ale představují i látky se slibným potenciálem pro aplikace v kosmetickém průmyslu [27], [28], [29], [30], [31], [32].

### 3.1 Mechanismus účinku kanabionoidů

Terapeutické účinky kanabinoidů a jejich následné klinické využití je z velké části založeno na existenci endokanabinoidního systému (ECS) a také na schopnosti kanabinoidů interagovat a vysílat signály prostřednictvím velkého počtu různých receptorových molekul [30], [39]. Proteiny ECS, včetně kanabinoidních receptorů a enzymů syntetizujících a degradujících jejich endogenní ligandy, představují vhodné terapeutické cíle pro léčbu mnohých onemocnění [40], [41].

Endokanabinoidní systém je komplexní mezibuněčná signální síť zodpovědná za udržování homeostázy v lidském těle [41]. Vykazuje v organismu víceúčelový regulační charakter. Podílí se na rozsáhlé škále fyziologických procesů, včetně nocicepce, neurogeneze a neuroprotektce, modulace imunitního systému, reprodukce, metabolismu lipidů, ovlivnění růstu a proliferace buněk a také na regulaci kognitivních funkcí, chuti k jídlu, nálady a spánku [40], [41], [42], [43], [44], [45].

Řada biologických účinků kanabinoidů je zprostředkována jejich interakcí se dvěma úzce příbuznými receptory, známými jako kanabinoidní receptor typu 1 (CB1) a 2 (CB2). Jedná se o metabotropní receptory spřažené s G-proteinem široce rozšířené v centrálním nervovém

systemu (CNS) s výraznou expresí v bazálních gangliích, mozečku a hipokampu. Receptory CB1 jsou lokalizovány převážně v dřeni a periferních nervových zakončení ale funkčně relevantní exprese byla identifikována také v játrech, endokrinních tkáních, kardiovaskulárním systému a gastrointestinálním traktu. Výskyt CB2 receptorů pak převažuje v imunitním systému, zejména v buňkách makrofágového původu, jako jsou makrofágy. V nižších expresích působí také v reprodukčním systému a kostních tkáních.

Kromě vazby na CB1 a CB2 se endokanabinoidy a fytoKANabinoidy vážou spolu s dalšími receptory spřaženými s G proteiny, s receptory kyseliny gama-aminomáselné (GABA) a serotoninovými receptory. Přítomny jsou i ve vazbě s řadou receptorů s intracelulárními vazebnými místy, z nichž nejdůležitější jsou přechodné ionotropní vaniloidní receptory (Transient receptor potential vanilloid, TRPV) a transkripční faktory, jako jsou jaderné receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (Peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR). Kanabinoidy zde mohou působit jako částeční, úplní, neutrální a inverzní agonisté a antagonisté [35], [40], [42], [43], [45], [46], [47], [48], [49].

V praktické části práce je využíván CBD jako aktivní látka, proto bude dále podrobněji popsán jeho mechanismus účinku. Kanabidiol působí jako antagonist receptorů CB1 a CB2. Působí ale také na několik dalších receptorů. Jeho antiemetické, anxiolytické a analgetické účinky mohou být částečně zprostředkovány vazbou na serotonergní receptory, zejména 5HT1A. Stejná dráha by se také uplatňovala při snížení excytotoxicity, oxidačního stresu a prozánětlivé aktivace. Takový účinek by byl v souladu s možným protektivním působením CBD u několika onemocnění, jako jsou neurodegenerativní onemocnění (včetně Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby), chronická bolest, zánětlivé, srdeční, jaterní, renální a gastrointestinální onemocnění, sepse a u podpůrné léčby diabetu.

Jedním z prvních objevených způsobů využití CBD byla jeho schopnost významně přispět ke zmírnění obtíží u pacientů s epilepsií. Možným přínosem by mohla být také aplikace CBD v oblasti protinádorové léčby. Bylo zjištěno, že ve vyšších koncentracích inhibuje proliferaci lidských nádorových buněk různých linií, např. prostaty, prsu a tlustého střeva. Tato inhibice je vysvětlována předpokládanou interakcí s vaniloidními receptory (TRPV1) a receptory CB2 a PPAR. Existují i důkazy o interakci CBD s mu-delta opioidními receptory, což ve spojení s jeho afinitou k vaniloidním receptorům podporuje jeho uplatnění při léčbě bolesti [36], [42], [43], [45], [46], [49].

### 3.2 Farmaceutické a kosmetické využití

Endokanabinoidní systém představuje komplexní molekulárně-biologický systém rozmístěný po celém těle. Hraje klíčovou roli v řadě fyziologických procesů pro udržení vnitřní rovnováhy v mozku, kůži, trávicím traktu a játrech a v dýchacím, kardiovaskulárním a reprodukčním systému. Regulace probíhá skrze ovlivnění vývoje mozku, neurotransmitery a uvolňování cytokinů z mikroglíí. Bylo zjištěno, že se změny ve složkách ECS podílejí na rozvoji několika patologických onemocnění, jako je rakovina a neurodegenerativní a kardiovaskulární choroby. Z těchto důvodů se stala farmakologická modulace ECS předmětem medicinského výzkumu s cílem nalézt a vyvinout léčiva schopná ovlivňovat signální dráhy navazující na ECS. Externě dodávané fyto-kanabinoidy, které mají účinky na kanabinoidní receptory, představují u těchto zdravotních poruch značný terapeutický potenciál [36], [45], [48].

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) již schválil několik léčiv odvozených z konopí. Jsou to Epidiolex (na bázi kanabidiolu) a tři léčiva Cesamet (nabilon), Marinol (dronabinol) a Syndros (dronabinol) obsahující syntetické analogy  $\Delta^9$ -THC. Klinické studie prokázaly účinnost nabilonu, jako doplňkové terapie onkologické léčby, při snižování nevolnosti a zvracení u pacientů [50]. V poslední době je zkoumána účinnost nabilonu v léčbě neuropatické a chronické bolesti a spasticity související s roztroušenou sklerózou [51]. Dronabinol je používán pro své analgetické vlastnosti pacientkami s kostními metastázami při diagnóze karcinomu prsu a jako doplňková léčba opiáty u pacientů s chronickou bolestí. Dronabinol se podává jako stimulant chuti k jídlu při syndromu chřadnutí AIDS a při nevolnosti a zvracení vyvolané chemoterapií, [35], [40]. Epidiolex obsahuje více než 98 % CBD a méně než 0,15 % THC, jedná se o perorálně podávaný roztok k léčbě dvou forem těžké dětské epilepsie (syndrom Dravetové a Lennoxův-Gastautův syndrom). Klinické studie prokázaly, že Epidiolex významně snižuje frekvenci záchvatů u léčených pacientů [35], [52].

Další z komerčních produktů, Sativex®, je farmaceutický produkt na bázi konopí obsahující THC a CBD v poměru přibližně 1:1, dodávaný v orálním spreji. Je schválen ve Velké Británii, Německu a Švýcarsku pro mírnění spasticity související s roztroušenou sklerózou. V Kanadě je schválen pro terapii bolesti spojené s roztroušenou sklerózou a jako analgetická léčba u dospělých pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním a přetrvávající bolesti, kteří již nereagují na nejvyšší tolerovanou dávku silných opioidů [35], [45].

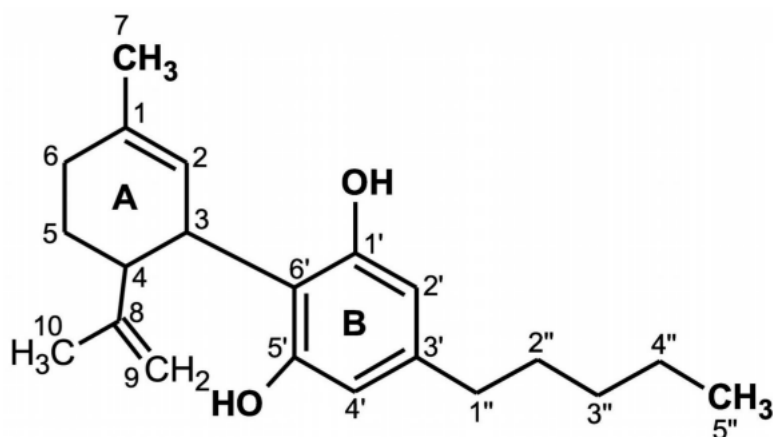
Endokanabinoidní systém figuruje také v kůži. Bylo objeveno, že receptory CBR1 a CBR2 jsou přítomny v epidermálních keratinocytech, melanocytech, dermálních buňkách, žírných buňkách, potních žlázách, vlasových folikulech a kožních nervových vláknech. Tento systém hraje zásadní roli při udržování homeostázy regulací buněčné proliferace a diferenciaci. Podílí se také na udržování bariérové funkce kůže a ovlivnění aspektů zánětlivé signalizace. Jeho narušení může vést k rozvoji poruch, jako je dermatitida, akné a pruritus [41]. Modulace ECS tak představuje slibný terapeutický cíl u různých patologických stavů kůže.

Postupem času roste zájem o použití přírodních lokálních terapií, přičemž kanabinoidy se jeví jako vhodná skupina sloučenin s rozličným spektrem účinků. Např. nepsychoaktivní kanabinoid CBD může být účinný u některých kožních onemocnění, jako jsou ekzémy, psoriáza, pruritus a zánětlivé stavy [39].

Při *acne vulgaris*, rozšířené dermatologické poruše s multifaktoriální povahou, je nutné zaujmout inovativní léčebné strategie. V souvislosti s léčbou akné jsou kanabinoidy obzvláště zajímavé díky svým lipostatickým, protizánětlivým, antiproliferativním a antimikrobiálním účinkům. Mezi těmito bioaktivními sloučeninami vyniká CBD, který v pre-klinických a klinických studiích prokázal schopnost modulovat produkci kožního mazu, snižovat zánět a inhibovat množení bakterií, což jsou kritické složky v patogenezi této dermatózy. Do budoucna by tak mohl představovat aktivní složku kosmetických i farmaceutických formulací [38], [41].

## 4 KANABIDIOL

Kanabidiol (CBD) je jedním z hlavních aktivních fytokanabinoidů *Cannabis sativa L* s komplexním farmakologickým profilem. Nevykazuje psychoaktivní aktivitu, ale má řadu příznivých farmakologických účinků, včetně protizánětlivých a antioxidačních vlastností [36]. Jedná se o terpenofenolovou sloučeninu obsahující 21 atomů uhlíku s molekulovou hmotností 314,464 g/mol. Chemická struktura obsahuje terpenový kruh (A), fenolový kruh (B) a pentylový postranní řetězec (Obrázek 8). Chemická aktivita CBD je dána především umístěním a okolím hydroxylových skupin ve fenolickém kruhu (B) v polohách C-1' a C-5', jakož i methylové skupiny v poloze C-1 terpenového kruhu (A) a řetězce pentylu na pozici C-3' fenolového kruhu (B) [36].



Obrázek 8: struktura CBD, převzato z [36]

Stabilita CBD ve formě roztoků, je ovlivněna více faktory. Jeden z nejkritičtějších parametrů představuje teplota. Při pokojové teplotě je CBD vysoce nestabilní. Při teplotě snížené na 5 °C však vykazuje dobrou stabilitu až po dobu 12 měsíců. Je také náchylný k degradaci za přístupu kyslíku a působení světla. Stabilita CBD v roztoku je ovlivněna i rozpouštědlem a je lepší v ethanolu než v prostředí vodném, což je nutné brát v úvahu při vývoji zamýšlených lékových forem [53].

Kanabidiol je vysoce lipofilní, dochází k jeho rychlé distribuci z krve do mozku, tukových tkání a dalších orgánů. Jeho administrace může probíhat prostřednictvím inhalační, perorální, intravenózní nebo transdermální cesty, a může být podáván ve formě purifikovaného izolátu extrahovaného z konopí, nebo jako součást extraktu z konopí s dalšími fytokanabinoidy a chemickými látkami [54]. Navzdory velkým potenciálním

farmakologickým přínosům omezuje využití CBD jeho nízká rozpustnost ve vodě, nízká systémová biologická dostupnost, špatná stabilita a výrazný pre-systémový metabolismus [55], [56]. Proto jsou v práci dále uváděny možné strategie pro překonání těchto omezení.

#### **4.1 Enkapsulační strategie – vliv na cílené doručování, biologickou dostupnost a stabilitu CBD**

Jak bylo uvedeno výše, širší využití CBD pro klinickou praxi čelí jistým omezením. Řešením by zde mohl být vývoj nových systémů pro cílené dodávání této aktivní látky, které budou schopny zlepšit farmakokinetický profil, biologickou dostupnost a zároveň ji ochrání před degradací [56].

V posledních letech byla navržena řada strategií pro enkapsulaci bioaktivních lipofilních molekul. Řadu výhod představují v této oblasti (nano)koloidní nosiče, zejména díky vysokému poměru povrchu k objemu a jejich jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem [56], [57]. Tyto systémy pomáhají zlepšit stabilitu enkapsulované látky, zvyšují její absorpci a chrání ji před časnou enzymatickou degradací v gastrointestinálním traktu či metabolismem v těle. Enkapsulace do struktur nanonosičů vede také k prodloužení doby cirkulace aktivní látky v těle, čímž dochází k omezení jejich nežádoucích účinků. Při enkapsulaci CBD, zlepšují modifikované nanonosiče jeho rozpustnost a prostupnost. Rozměry v řádech nanometrů umožňují prostup přes biologické bariéry a napomáhají doručení do cílových míst, čímž zlepšují biologickou dostupnost [34], [55].

Mezi používané systémy patří nanonosiče na bázi polymerů nebo lipidů jako jsou nanoemulze (NE), nanostrukturované lipidové nosiče (NLC), lipidové nanokapsle (LNC), pevné lipidové nanočástice (SNC), Pickeringovy emulze (PE), nanogely, nanolipozomy, etozomy a transferozomy (TF) [34]), [56], [57]. Hlavní charakteristikou těchto systémů je vysoká univerzálnost jejich způsobů podávání, včetně parenterálních, orálních, nasálních, pulmonálních, okulárních a transdermálních cest [55].

Ve studii Shilo-Benjamino et al. (2022) bylo lipozomální CBD formulováno s použitím hydrogenovaného sójového fosfatidylcholinu. Bylo zjištěno, že enkapsulací CBD dochází ke zlepšení jeho biologické dostupnosti při léčbě bolesti ve veterinární medicíně [58].

Metodou odpařování na tenké vrstvě připravili Moqejwa et al. (2022) transferozomy obsahující cholesterol, sójový lecitin, polysorbát 80 a CBD. Bylo pozorováno, že po enkapsulaci do TF se stabilita CBD zlepšila po dobu šesti měsíců při pokojové teplotě.

Formulace transferozomů taktéž usnadňovala permeaci tohoto fytkanabinoidu rektální tkání a umožňovala měnit kinetiku jeho uvolňování [59].

Výzkumnou skupinou Francke et al. (2021) bylo zjištěno, že dochází k výraznému zlepšení absorpce CBD z nanoemulzí ve srovnání s nosičem v podobě oleje na bázi triacylglycerolů se středně dlouhými řetězci (MCT) [60].

Uvedené studie tedy jasně naznačují, že lze zlepšit vlastnosti, stabilitu, rozpustnost a biologickou dostupnost CBD jeho inkorporací do struktury nanonosičů a překonat tak omezení spojená s jeho využitím ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu.

## 5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V posledních desetiletích se stále více pozornosti věnuje vývoji inovativních přístupů k podávání léčiv a jiných aktivních látek. Zejména aplikace principů nanotechnologie v kombinaci s pokrokem v chemických vědách významně rozšiřuje možnosti, s jakými můžeme přistupovat k léčbě řady onemocnění. V současné době je zkoumáno několik lékových forem založených na nanotechnologiích vedoucí ke zlepšení fyzikálně-chemických a farmakologických vlastností léčiv. Jedním z takových nano nosičů jsou i elastické liposomy (EL), na vědeckém poli známější pod názvem Transferezomy (TF). Tyto vezikuly mohou díky své unikátní deformovatelné struktuře pronikat přes úzké póry. Jsou schopny enkapsulovat látky o různých molekulových hmotnostech a přenášet je dovnitř buněk. Amfipatická povaha TF nosičů má potenciál dopravovat léčiva přes obtížně přístupné biologické membrány, jako je hematoencefalická bariéra, vrstvy kůže nebo nosní epitel. S vědomím ohromného potenciálu pro klinické využití se staly TF předmětem několika studií [15], [18].

Systémy na bázi TF byly vyvinuty a studovány zejména v oblasti dermální farmakologie za využití transdermální cesty podání. Cílem studie Prashanthini et al. (2023) bylo vyvinout transdermální formulaci inzulínu. Transferezomy byly připraveny metodou protřepávání za použití sójového lecitinu a deoxycholátu sodného jako povrchově aktivní látky. Výsledky studie ukázaly, že tvar TF byl dobře definovaný a sférický. Průměrná velikost TF byla stanovena na 130 nm. Bylo zjištěno, že TF vykazují stabilitu po dobu čtyř týdnů. Enkapsulační účinnost pro inzulín činila 87,3 %. Studie průniku hydrogelu s obsahem TF *ex vivo* na modelu kůže ucha ukázala, že dochází k pomalému a trvalému uvolňování inzulínu až do 180 minut. Z výše uvedené studie lze vyvodit závěr, že by TF mohly představovat vhodné nosiče inzulínu [24].

Ve studii výzkumné skupiny Mazhar et al. (2023) byly studovány TF jako nový systém pro transdermální podávání Metformin hydrochloridu (MF) pro léčbu diabetu. Cílem bylo zlepšení biologické dostupnosti léčiva v důsledku zvýšení jeho jinak omezené permeability. Transferezomy s obsahem MF (MF-TF) byly připraveny pomocí modifikované techniky hydratace tenkého filmu. Připravené MF-TF byly následně převedeny do karbopolového gelu s obsahem enhancerů permeace. Výsledné MF-TF byly hladké a sférické o velikosti  $185,3 \pm 3,2$  nm a jejich enkapsulační účinnost činila  $88 \pm 1,4$  %.



Profil uvolňování léčiva z MF-TF vykazoval dlouhodobý charakter. Studie permeace kůží ukázaly na účinnější prostup MF-TF gelu ve srovnání s gelem obsahujícím pouze samotné léčivo. V případě glukózového tolerančního testu vykazoval MF-TF systém potenciál významně snižovat hladinu glukózy v krvi u testovaných zvířat. Farmakokinetické hodnocení *in vivo* prokázalo zvýšenou biologickou dostupnost MF-TF v gelu ve srovnání s perorálním roztokem léčiva. Na základě výsledků studie lze gel MF-TF považovat za možnou alternativu k perorálnímu podávání MF s potenciálem zvyšovat biologickou dostupnost a pomáhat tak pacientům zvládat léčbu *diabetes mellitus* typu II prostřednictvím transdermální aplikace [61].

Podávání kombinací léčiv pomocí nano-nosičů je novým atraktivním přístupem, zejména díky potenciální synergii účinků enkapsulovaných látek a usnadnění jejich penetrace kůží. Transdermální podání kombinace lidokainu (LD) a kanabidiolu (CBD) může být užitečné pro lokální léčbu neuropatické bolesti. Předpokládá se, že by tyto látky mohly mít komplementární účinek na tlumení bolesti pomocí působení na sodno – vápenaté kanály. Ve studii Franzé et al. (2022) byla sledována možnost podávat tuto kombinaci terapeuticky aktivních látek do hlubších vrstev kůže pomocí elastických lipozomů. Kanabidiol byl inkorporován do lipidové dvojvrstvy, zatímco lidokain byl enkapsulován do vnitřního vodného jádra metodou pH gradientu za tvorby G-lipozomů nebo pomocí předchozí enkapsulace do micel (DiMiL). Systém s LD zapouzdřeným do micel (DiMiL) zvyšoval jak průnik kůží, tak i retenci CBD a LD v *dermis* ve srovnání se systémem samotných G-lipozomů. DiMiL i G-lipozomy vykazovaly vyšší účinnost a usnadňovaly permeaci léčiva kůží ve srovnání s kontrolním přípravkem nesoucím neenkapsulované léčivé látky. Kombinace léčiv by tak mohly být doručovány současně pomocí elastických lipozomů čímž by se posílily jejich terapeutické vlastnosti [62].

Pro transdermální doručování CBD mohou být použity i další systémy. Demisli et al. (2023) připravili nanoemulze (NE) typu olej ve vodě a odpovídající chitosanové hydrogely naplněné touto nanoemulzí (NE/HG) pro účinné transdermální podávání CBD. Vyhodnocení schopnosti permeace proběhlo *ex vivo* s využitím modelu prasečí kůže. Díky velké mezifázové ploše vezikul a přítomnosti povrchově aktivních látek v ME, které solubilizují lipidy a proteiny SC, byla penetrace CBD kůží usnadněna jak u NE, tak u NE/HG. Tato práce naznačila, že navržené koloidní doručovací systémy mohou být ideálními kandidáty pro účinné transdermální podávání vysoce lipofilních bioaktivních sloučenin [57].

V řadě vědeckých prací bylo prokázáno, že CBD inhibuje růst mnoha nádorových buněčných linií, včetně nádorů prsu. Dokáže také tlumit bolest a úzkost spojenou s nádorovým onemocněním a účinně zmírňuje zejména dopady nádorové kachexie. Představuje tak slibné terapeutikum pro léčbu onkologických pacientů. Fu et al. (2022) ve svých experimentech enkapsulovali 20(S)-Protopanaxadiol (PPD), získaný z ženšenu, společně s CBD do lipozomů a zkoumali jejich synergii při inhibici nádorového bujení. Studie *in vivo* na myších BALB/c s nádorem prsu (4T1 buňky) prokázaly dobrou protinádorovou účinnost CBD-PPD lipozomů v závislosti na dávce. Bylo dosaženo vysoké míry inhibice růstu nádoru (TIR) 82,2 % při současné dobré toleranci tohoto léčiva. Souhrnně lze říci, že kombinovaná léčba s PPD se ukázala být slibnou strategií pro vývoj CBD jako nového protinádorového léčiva, které se vyznačuje účinností, dobrou snášenlivostí a potenciálem překonat nádorovou kachexii [63].

S ohledem na rostoucí potřebou vývoje nových nosičových systémů pro podávání léčiv je strategie využívající TF v odborné literatuře hojně diskutována a vyhodnocována jako perspektivní cesta pro možné dodávání různých kategorií terapeutických látek. V návaznosti na zájem trhu o využívání přírodních alternativ, vystupuje CBD jako atraktivní terapeutická látka. Její biologická aktivita by ve spojení s cílením pomocí transferozomálního způsobu doručování mohla do budoucna představovat pozitivní přínos při léčbě řady onemocnění.

## 6 CÍL PRÁCE

Cílem první části práce bylo vypracování literární studie zaměřené na tematiku elastických lipozomů a kanabinoidů. Práce se konkrétně zaměřila na kanabidiol a možnosti jeho enkapsulace pro cílené doručování.

Cílem praktické části práce bylo připravit elastické lipozomy o různém složení membrány. Za tímto účelem byl sledován vliv membránových fosfolipidů a aktivátorů hran na vlastnosti lipozomů a byla zvolena optimální formulace pro účinnou enkapsulaci kanabidiolu. U zvolených lipozomálních formulací byly pomocí fyzikálně-chemických metod stanoveny jejich vlastnosti, včetně enkapsulační účinnosti, antioxidační aktivity a stability v čase. Testovány byly rovněž biologické vlastnosti, konkrétně cytotoxicita a transdermální penetrace *ex vivo*.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 POUŽITÉ MATERIÁLY

Následující část obsahuje výčet použitých přístrojů, pomůcek, chemikálií a roztoků, včetně použitého biologického materiálu.

### 7.1 Přístroje a pomůcky

- Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern)
- Ultrazvukový homogenizér UP400St (Hielscher)
- Vakuová rotační odparka Hei-VAP (Heidolph)
- UV/VIS Spektrofotometr V-750 (Jasco)
- Sestava vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Shimadzu)
- Chromatografická kolona Kintex 5u C18 100 A, 250 x 4,6 mm (Phenomenex)
- FTIR Spektrometr Nicolet Summit (ThermoScientific) s Everest ATR adaptérem
- Mikroskop atomárních sil- AFM, easyScan2 (NanoSurf)
- Magnetická míchačka se záhřevem (Heidolph)
- Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan)
- Inverzní mikroskop Olympus s fázovým kontrastem (IX 81)
- Reometr PHYSICA MCR-502 (Anton Paar)
- Analytické váhy (Kern)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Dialyzační svorky (Spectralabs)
- Dialyzační membrány MWCO: 12-14 kDa Spectra/Por (Spectralabs)
- Stříkačkové membránové filtry 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE (VWR)
- Přenosný pH metr CPH 51 (Elteca)
- Stanice MPA5 + Tewameter TM 300 (Courage + Khazaka)
- Mikrometr
- Ponorný ohřívací cirkulátor s lázní (Huber)

- Franzovy difuzní komůrky
- Běžné laboratorní sklo a plasty

## 7.2 Chemikálie a roztoky

- D- $\alpha$ -Tocopherol polyethylene glycol 1000 sukcinát (Sigma Aldrich)
- Diethylene glycol monoethyl ether – Transcutol® P (Sigma Aldrich)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok PBS (Bio Sera)
- Sójový L- $\alpha$ -fosfatidylcholin 95 % (Avanti polar lipids)
- Sodium deoxycholát (Sigma Aldrich)
- Polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát – Tween® 80 (TW) (Carl Roth)
- Přírodní CBD, čistá aktivní farmaceutická ingredience (Lipomed AG)
- Demineralizovaná voda
- Ethanol 96% (Penta)
- Methanol >99,9%, HPLC kvalita (Riedel-de Haën, Honeywell)
- Polygel CA Carbomer (M+H, Míča a Harašta)
- Askorbyl palmitát (ZVC Dr. Hoffmann)
- Tokoferyl acetát (Atok)
- Glycerol (Fichema)
- Hydroxid sodný (Sigma Aldrich)
- 2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonová kyselina (Sigma Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich)
- Receptorová kapalina:
  - Brij® 98- Polyoxyethylen (20) oleyl ether (Sigma Aldrich)
  - Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Biosera)
  - Gentamicin sulfát (Sigma Aldrich)
- Trypsin EDTA roztok (Sigma Aldrich)

- Tetrazoliová sůl MTT ( Duchefa Biochemie B. V.)
- Médium pro test cytotoxicity :
  - Dulbecco's modifikované Eagle's médium (Biosera)
  - Hydrogenuhličitan sodný (Penta)
  - Hovězí sérum 10 % (CS; Biosera)
  - Penicilin/streptomycin 1 % (Biosera)

### **7.3 Materiál biologického původu**

- Kůže prasečího ucha
- Buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ECACC 93061524)

## 8 METODIKA

Následující část práce obsahuje popis metodik prováděných experimentů.

### 8.1 Příprava elastických lipozomů

Koloidní disperze elastických lipozomů byly připraveny pomocí metody hydratace tenkého lipidového filmu. V preformulační fázi experimentů byly připraveny elastické lipozomy bez obsahu aktivní látky a antioxidantů. Po výběru formulací s optimálními vlastnostmi byly pro samotnou formulační studii připraveny elastické lipozomy s obsahem aktivní látky – kanabidiolu a s obsahem antioxidantů.

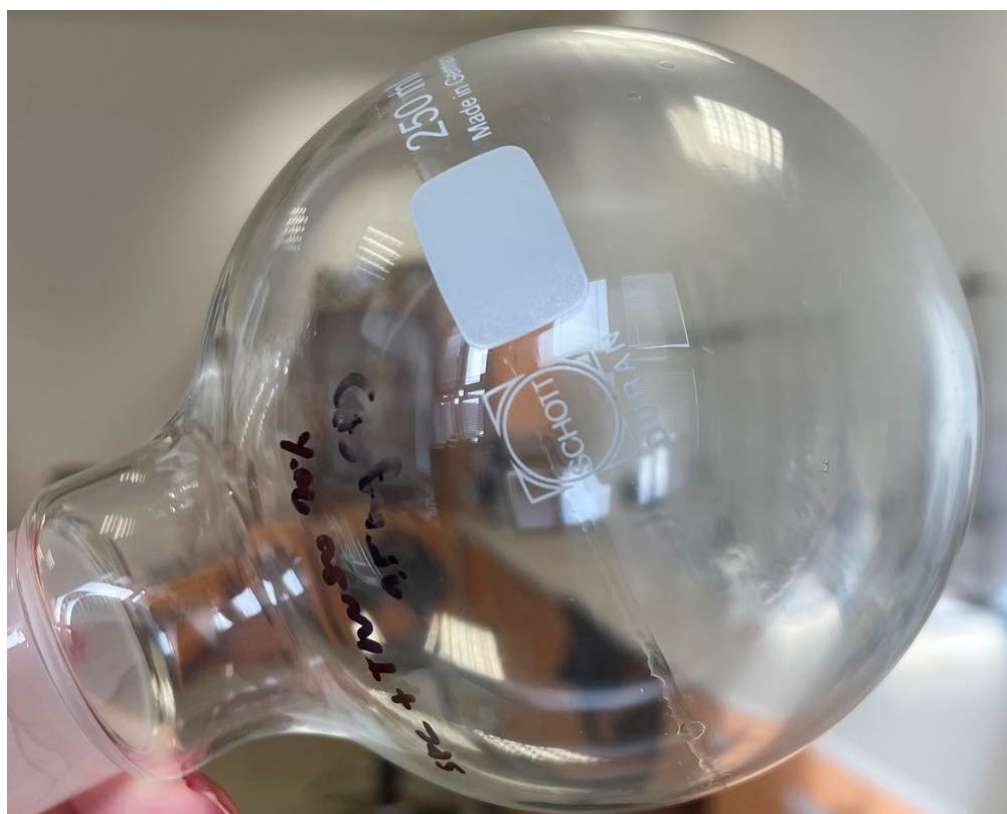
Pro výchozí složení membrán byl zvolen fosfolipid–směsný sojový fosfatidylcholin (SPC) v kombinaci vždy s jedním z aktivátorů hran Tweenem 80 (TW80), Tocopherol polyethylene glycol 1000 sukcinátem (SUK) a v preformulační fázi i se Sodium deoxycholátem (CHOL). V prvním kroku bylo vždy odváženo příslušné množství SPC a konkrétního aktivátoru hran a rozpuštěno v 10 ml ethanolu. Směs byla převedena do baňky s kulatým dnem a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce za podmínek 50 °C, 100 rpm po dobu 15 minut. Tenký film vytvořený na stěnách baňky byl zpětně hydratován 10 ml roztoku pufru PBS s obsahem Transcutolu (TC) za stejných podmínek. Připravená disperze byla za účelem zmenšení velikosti liposomů sonikována pomocí ultrazvukového sonikátoru UP400St po dobu 2 minut (amplituda 80 %, cyklování 50:50) za chlazení v ledové lázni. Postup přípravy je znázorněn na Obrázcích 9 a 10.

V případě formulační studie již bylo přistoupeno k samotné enkapsulaci aktivní látky. Příslušné množství CBD a antioxidantu (askorbyl palmitátu – AP, nebo tokoferyl acetátu – TA) bylo vždy naváženo a přidáváno v prvním kroku přípravy do 10 ml ethanolu. Další postup byl stejný jako v případě preformulační studie. Konkrétní množství jednotlivých složek je předmětem preformulační a formulační studie a je uvedeno v další části diplomové práce.





Obrázek 9 Příprava formulace elastických lipozomů metodou hydratace tenkého lipidového filmu na vakuové odparce



Obrázek 10 Tenký lipidový film utvořený na stěnách baňky po odpaření organické fáze

### 8.1.1 Preformulační studie

Cílem preformulační studie (příprava lipozomů bez aktivní látky) bylo vybrat vhodné složení membrán, zejména s ohledem na volbu optimálního typu aktivátoru hran a jeho poměru k obsahu lipidu. Taktéž byl hodnocen vliv rozdílného obsahu TC (zesilovač penetrace) v hydratačním roztoku na vlastnosti disperzí. Konkrétní složení připravovaných formulací elastických lipozomů je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4 Složení elastických lipozomů z preformulační části studie (SPC – sójový fosfatidylcholin,

Formulace	Lipid – SPC (%)	Aktivátor hran Typ	Aktivátor hran (%)	Transcutol (%)
SPC_95_SUK_5	95	SUK	5	1
				10
SPC_95_TW80_5	95	TW80	5	1
				10
SPC_95_CHOL_5	95	CHOL	5	1
				10
SPC_90_SUK_10	90	SUK	10	1
				10
SPC_90_TW80_10	90	TW80	10	1
				10
SPC_90_CHOL_10	90	CHOL	10	1
				10
SPC_80_SUK_20	80	SUK	20	1
				10
SPC_80_TW80_20	80	TW80	20	1
				10
SPC_80_CHOL_20	80	CHOL	20	1
				10

### 8.1.2 Formulační studie

Pro formulační studii byl zvolen jako ideální poměr lipid: aktivátor hran 90 : 10 (w/w). Jako lipid byl použit opět SPC a jako aktivátory hran byly zvoleny povrchově aktivní látky TW80 a SUK. Deoxycholát sodný byl z experimentu vyřazen kvůli špatné stabilitě připravených vezikul při delším skladování. Formulace byly připravovány vždy v celkovém objemu 10 ml. V této fázi již bylo přistoupeno k enkapsulaci aktivní látky CBD, a to v množství 10 mg na formulaci. Aby byla aktivní látka chráněna před degradací při delším skladování, byl do formulací přidáván antioxidant, AP nebo TA, vždy v množství 5 mg na formulaci. Obsah TC v hydratačním roztoku činil vždy 10 %. Konkrétní složení je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5 Složení elastických lipozomů z formulační části studie.

Formulace	Lipid SPC (%)	Aktivátor hran		Aktivní látka CBD (mg)	Antioxidant	
		Typ	(%)		Typ	(mg)
SPC_SUK_TA	90	SUK	10	10	TA	5
SPC_TW80_TA		TW80	10		TA	5
SPC_SUK_AP		SUK	10		AP	5
SPC_TW80_AP		TW80	10		AP	5

## 8.2 Charakterizace aktivní látky CBD

Aktivní látka CBD, dodaná firmou Lipomed AG, byla před jejím využitím charakterizována pomocí ATR analýzy FTIR spektrometrií. Základním principem této techniky je ozáření vzorku infračerveným zářením, u něhož dochází k násobnému úplnému odrazu na fázovém rozhraní mezi měřeným materiálem a krystalem. V případě absorpce určité frekvence záření vzorkem, dochází k zeslabení dané složky v totálně odraženém světle [64].

Samotné měření bylo provedeno dávkováním prosté suroviny CBD v práškové formě na ZnSe krystal ATR aparatury FTIR. Měření probíhalo za laboratorních podmínek na pozadí vzduchu v oblasti od 600 do 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 8.3 Charakterizace elastických lipozomů

V následující fázi studie byly připravené formulace elastických lipozomů charakterizovány pomocí níže uvedených metod.

#### 8.3.1 Velikost částic a index polydisperzity

Pro zhodnocení velikosti připravených lipozomů a k určení distribuce velikostí (polydispersity index, PDI) bylo využito metody dynamického rozptylu světla (DLS). Tato metoda byla zvolena s ohledem na velikost připravovaných částic, které spadají do nanometrové oblasti.

Technika DLS je založena na analýze rozptýleného světla, které se řídí mikroskopickými fluktuacemi, jež vznikají v důsledku Brownova tepelného pohybu částic v kapalině obsahující disperzní částice. Frekvence světla rozptýleného částicí je posunuta v závislosti na rychlosti částice. Malé částice se v médiu pohybují rychleji než částice velké, což vede k rychlejší změně intenzity signálu. Pomocí DLS jsou tyto charakteristické změny intenzity rozptýleného světla zaznamenávány. Z intenzity rozptýleného záření naměřené detektorem jsou pak vyhodnoceny velikosti částic a jsou vyjádřeny jako z-průměr velikosti (z-average), což je intenzitně vážený střední hydrodynamický průměr velikosti částic. Další parametr, který lze měřením DLS získat je index polydisperzity (PDI). Hodnota PDI nabývají hodnot od 0 do 1, přičemž hodnoty blíží se 0 ukazují na monodisperzitu systému, zatímco hodnoty směřující k 1 odkazují na přítomnost několika velikostních frakcí či velmi širokou distribuci [65], [66].

Stanovení velikosti částic elastických lipozomů probíhalo ihned po přípravě formulací. Z disperze byl vždy pipetován objem 20  $\mu\text{l}$  do kyvety a doplněn 980  $\mu\text{l}$  DEMI vody. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), při zadaných parametrech indexu lomu fosfolipidů v prostředí disperzního média (DEMI voda o pH 6) za teploty 25  $^{\circ}\text{C}$  a úhlu 90 $^{\circ}$ . Měření bylo prováděno v 6 opakováních. Data získaná měřením byla následně vyhodnocena jako průměrná velikost částic (z-average a PDI) spolu s jejich směrodatnými odchylkami.

#### 8.3.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál (ZP), označovaný také jako elektrokinetický potenciál, je ukazatelem povrchového náboje a koloidní stability. Zeta potenciál odráží rozdíl potenciálů v rovině skluzu mezi elektrickou dvojrůstvou elektroforeticky se pohyblivých částic a vrstvou

disperzantu kolem nich. Zeta potenciál je měřen s využitím elektroforetického rozptylu světla (ELS). Vyhodnocením měření elektroforetické pohyblivosti pomocí ELS a převedením této hodnoty pomocí Smoluchowského rovnice je získán zeta potenciál [67].

Měření ZP formulací EL probíhalo s využitím přístroje Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern) při 25 °C. Vzorky pro stanovení byly připraveny převedením 20 µl disperze do 4 ml DEMI vody. Získaná disperze byla za pomoci stříkačky převedena do měřících kyvet. Měření bylo provedeno v 6 opakováních. Z naměřených dat byly vypočítány průměrné hodnoty ZP včetně směrodatné odchylky.

### 8.3.3 Vizuální zhodnocení

Disperze elastických lipozomů byly ihned po přípravě vizuálně zhodnoceny. Byla sledována barva, homogenita nebo případná přítomnost sedimentů.

### 8.3.4 Mikroskopické zobrazení pomocí AFM

Pro mikroskopické zobrazení pomocí atomárních sil byl vybrán reprezentativní vzorek formulace EL s obsahem EA TW80 a antioxidantu AP s enkapsulovaným CBD. Vzorek byl pro samotné měření naředěn 100 × ultračistou vodou a deponován na povrch slídy. Poté byl vzorek vysušen při laboratorní teplotě a analyzován mikroskopem skenující sondou Dimension ICON (Bruker).

Metoda AFM je založena na detekci vzájemných přitažlivých/ odpuzivých meziatomových sil mezi skenujícím hrotem a povrchem zkoumaného vzorku. Detekována je změna polohy skenujícího hrotu při průchodu nad vzorkem (vlivem mezi atomárních sil) laserovým paprskem odrazem na detektor [68].

### 8.3.5 Enkapsulační účinnost EL

Pro stanovení koncentrace CBD enkapsulovaného do struktury EL byla použita metoda HPLC. Množství CBD bylo stanoveno pomocí kalibrační přímky, pro jejíž sestavení byly připraveny kalibrační roztoky CBD navážením příslušného množství a jeho rozpuštěním v EtOH. Koncentrace kalibračních roztoků jsou uvedeny v Tabulce 6. Tyto roztoky byly následně analyzovány pomocí HPLC (Shimadzu).

Tabulka 6 Koncentrační řada kalibračních roztoků

Látka	Koncentrace (µg/ml)					
Kanabidiol	5	10	25	50	75	100

Před stanovením enkapsulační účinnosti byly formulace EL dialyzovány, aby došlo k odstranění případného nezaenkapsulovaného CBD. Příslušná formulace byla nadávkována do dialyzační membrány s velikostí pórů 12-14 kDa, membrána byla z obou stran uzavřena svorkami a ponechána v destilované vodě za stálého míchání k dialýze po dobu 8 hodin. Po dialýze bylo z disperze odebráno 500  $\mu\text{l}$ , které byly převedeny do 5 ml EtOH a sonikovány na ultrazvukovém homogenizéru UP400St (Hielscher) po dobu 2 minut (Amplituda 80, cyklování 50) pod chlazením, aby došlo k rozrušení EL a uvolnění enkapsulovaného CBD. Tento vzorek byl přefiltrován přes PTFE membránu s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a doplněn na 10 ml EtOH. V takto získaném extraktu by teoretické množství CBD mělo činit 50  $\mu\text{g/ml}$ . Obdobným způsobem byly připraveny všechny extrakty pro stanovení koncentrace CBD ve formulacích EL.

Kvantifikace obsahu CBD v EL byla prováděna pomocí systému HPLC (Shimadzu). Jako mobilní fáze byla použita směs methanol : voda (85/15, v/v). Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla stanovena na 0,8 ml/min. Objem vzorku při dávkování autosamplerem byl nastaven na 5  $\mu\text{l}$ . Pro chromatografickou separaci byla použita kolona Kintex C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex) při teplotě 35  $^{\circ}\text{C}$ . Detekce probíhala pomocí detektoru diodového pole (DAD) SPD-M20A (Shimadzu) při vlnové délce 207 nm.

Enkapsulační účinnosti (Encapsulation efficiency, EE) připravených EL byla stanovena podle Rovnice (1), kde  $c_{Teor}$  je teoretická maximální koncentrace CBD v EL a  $c_{Real}$  je koncentrace CBD stanovená měřením reálných vzorků disperzí.

$$EE (\%) = \frac{c_{Real}}{c_{Teor}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Pro ověření opakovatelnosti extrakčního postupu byl proveden test, v němž byly připraveny paralelně 3 extrakty (dle metodiky popsané výše) z jednoho vybraného vzorku. Ty byly následně pomocí HPLC zhodnoceny z hlediska koncentrace CBD. Naměřené výsledky byly porovnány mezi sebou za účelem posouzení opakovatelnosti.

### 8.3.6 Stabilitní studie

U připravených vzorků EL z formulační fáze studie byly sledovány a hodnoceny změny vybraných charakteristik v čase.

### *Velikost a zeta potenciál*

Stabilita formulací elastických lipozomů byla sledována po dobu 4 týdnů pomocí hodnocení změn ve velikostech částic, PDI a zeta potenciálu stanovených měřeními na Zetasizeru (Malvern). Vzorky byly měřeny v týdenních intervalech dle metodiky uvedené v kapitolách 8.3.1 a 8.3.2. Disperze lipozomů byly po celou dobu uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C. Připravené formulace byly hodnoceny rovněž vizuálním pozorováním.

### *Enkapsulační účinnost*

Ze skladovaných disperzí byly každý týden připraveny ethanolové extrakty podle metodiky uvedené v kapitole 8.3.5. Kvantifikace obsahu CBD probíhala analýzou na systému HPLC popsanou ve stejné kapitole.

### **8.3.7 Stanovení antioxidační aktivity – ABTS test**

Stanovení antioxidačního potenciálu formulací bylo provedeno pomocí testu ABTS. Ten určuje relativní schopnost látek s antioxidační aktivitou vychytávat radikály ABTS•+ vznikající ve vodné fázi po reakci soli ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenziazolin-6-Sulfonová kyselina) se silným oxidačním činidlem. Antioxidační aktivita je pak vyhodnocována jako relativní pokles absorbance při požadované vlnové délce ve srovnání se slepým vzorkem [69], [70].

Při samotném provedení testu byl nejprve připraven vodný roztok ABTS (7 mM) a vodný roztok persíranu amonného (2,45 mM). Roztoky byly následně smíchány ve stejném poměru a ponechány k reakci ve tmě a při pokojové teplotě po dobu 12 h za vzniku ABTS•+. Před vlastním provedením testu byl připravený roztok ABTS•+ (3,5 mM) zředěn demineralizovanou vodou tak, aby bylo dosaženo absorbance  $0,70 \pm 0,02$  při 736 nm.

Poté bylo smícháno vždy 50 µl příslušné formulace EL s 1 ml ABTS•+, výsledná směs byla jemně protřepána a ponechána ve tmě po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby byla u všech vzorků změřena absorbance ( $Abs_{Fin}$ ) při 736 nm na UV-VIS spektrofotometru V-750 (Jasco). Jako reference byla místo vzorku formulace EL dávkováno 50 µl demineralizované vody ( $Abs_{Ref}$ ). Relativní inhibice radikálů (%RI) byla vypočtena podle rovnice (2). Experimenty byly provedeny paralelně ve třech opakováních.

$$\%RI = \frac{(Abs_{Ref} - Abs_{Fin})}{Abs_{Ref}} \cdot 100\% \quad (2)$$

### 8.3.8 Stanovení cytotoxicity *in vitro*

Vybrané formulace EL byly testovány na cytotoxicitu s využitím MTT testu. Redukce činidla MTT monotetrazolové soli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) vede k rozrušení jádra tetrazolového kruhu a vzniku fialovomodrého formazanu. Činidlo MTT může procházet buněčnou membránou i vnitřní mitochondriální membránou životaschopných buněk díky svému kladnému náboji a lipofilní struktuře a je metabolicky aktivními buňkami redukován na formazan. Chromogenní povaha této redoxní chemické reakce umožňuje kolorimetrické měření intracelulární produkce formazanu [71].

Test byl proveden dle normy ISO 10993-5. První den byla buněčná suspenze myších embryonálních fibroblastů o koncentraci  $10^5$  buněk na ml vyseta na destičky a ponechána ke kultivaci za podmínek 37 °C s 5% obsahem CO<sub>2</sub> ve zvlhčeném vzduchu. Druhý den byly vzorky formulací EL (složení identické s uvedeným v kapitole 8.1.2 Tabulka 5) přidány k buňkám v ředění 1, 5, 10, 15, 20 a 25 objemových % výchozí disperze, což odpovídá koncentraci CBD 10, 50, 100, 150, 200 a 250 µg/ml. Třetí den byla morfologie buněk pozorována pomocí inverzního mikroskopu Olympus s fázovým kontrastem (IX 81) a následně byl proveden test proliferace MTT. Absorbance byla měřena pomocí přístroje Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan) při 570 nm a referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm. Výsledky jsou uvedeny jako snížení životaschopnosti buněk v procentech ve srovnání s buňkami kultivovanými v médiu bez obsahu testovaných formulací EL. Všechny testy byly provedeny v pěti opakováních.

## 8.4 Příprava gelů s obsahem EL

Z důvodu optimalizace nanášení EL při reálných aplikacích byly vzorky vybraných formulací převedeny do formy gelu. Jako gelační činidlo byl použit polygel CA (Carbomer), který byl vždy v příslušném množství navážen a hydratován v dané formulaci/disperzi elastických lipozomů. Jako reference byl připravován gel tvořený pouze karbomerem a demineralizovanou vodou. Dva z gelů obsahovaly rovněž glycerol.

Suroviny byly navažovány na celkové množství 3 g formulace. Složení vzorků je uvedeno v Tabulce 7. U připravených gelů bylo pH adjustováno na hodnotu 7 pomocí 1M roztoku NaOH. Hodnota pH byla ověřena na přenosném pH metru CPH 51 (Elteca).



Tabulka 7 Složení gelových formulací (3 g) s obsahem elastických lipozomů

Vzorek	Formulace EL – její množství (mg)	Carbomer (mg)	Glycerol (mg)
Reference_C_0,5 %	DEMI H <sub>2</sub> O 2985	15	–
Reference_C_1 %	DEMI H <sub>2</sub> O 2970	30	–
SUK_AP_C_0,5 %_G×	EL_SUK_AP 2985	15	–
SUK_AP_C_1 %_G×	EL_SUK_AP 2970	30	–
SUK_AP_C_0,5 %_G_10 %	EL_SUK_AP 2685	15	300
SUK_AP_C_1 %_G_10 %	EL_SUK_AP 2670	30	300

## 8.5 Charakterizace gelů s obsahem EL

Připravené gely s obsahem EL byly hodnoceny z hlediska reologických vlastností a schopnosti transdermální penetrace.

### 8.5.1 Reologické vlastnosti

U vybraných formulací ve formě carbomerového gelu bylo sledováno reologické chování. Zkoumaný materiál je podrobován smykové deformaci mezi plochou, jež je v klidu (deska) a plochou vykonávající pohyb otáčivý (kužel). Viskozita je vyhodnocena z potřebné síly pro otáčení kužele ve zkoumaném materiálu [72]. Charakterizace gelů byla provedena pomocí reometru PHYSICA MCR-502 (Anton Paar, Rakousko) v uspořádání kužel deska (D-CP 40, s průměrem desky 40 mm a úhlem 2°). Elastický  $G'$  a viskózní  $G''$  modul byly měřeny jako funkce úhlové frekvence v rozmezí od 100 do 1 rad/s při teplotách 25 a 37 °C.

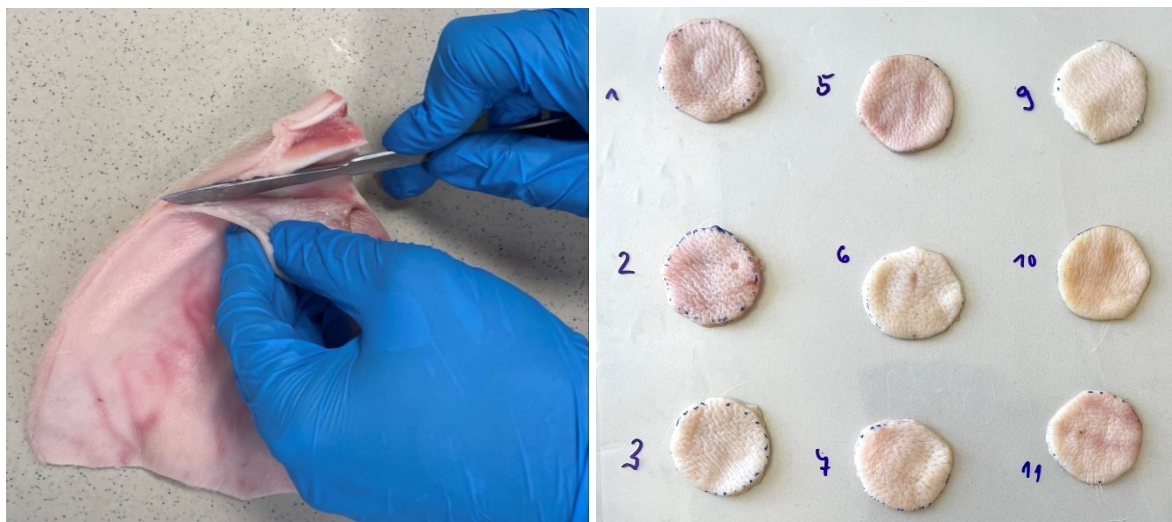
### 8.5.2 Stanovení transdermální penetrace EL

Schopnosti transdermální penetrace byla ověřena na vybrané formulaci dle modifikovaného postupu pokynu OECD 428: Absorpce pokožkou: metoda *in vitro* [73].

#### *Příprava biologického materiálu*

Z důvodu podobnosti lidské kůže s kůží vnitřní strany ucha prasete byl tento model zvolen jako biologický materiál pro test transdermální penetrace. Biologický materiál byl uchováván v mrazícím boxu při teplotě – 20 °C. Před zahájením experimentu bylo ucho povolna rozmrazeno v chladničce (4 °C). Ucho bylo po rozmražení zbaveno chlupů a poté byla kůže na vnitřní straně ucha šetrně skalpelem oddělena od chrupavky. Z neporušené

odseparované kůže byly vystříženy vzorky o ploše 2 cm<sup>2</sup> (Obrázek 11). Pomocí mikrometru byla změřena tloušťka kožních vzorků a pro následné testy byly vybrány vzorky s podobnou tloušťkou.



Obrázek 11 Příprava kožních vzorků

#### *Ověření integrity kožního vzorku*

Pro zjištění integrity kožní bariéry byla u připravených vzorků kůže měřena *trans-epidermální ztráta vody* (TEWL) pomocí sondy Tewameter™ 300. Sonda byla vždy přiložena k povrchu vzorku kůže a byl proveden odečet ztráty vody v g/h·m<sup>2</sup>. K samotnému testu transdermální absorpce byly vybrány vzorky, u nichž hodnota TEWL nepřekračovala 15 g/h·m<sup>2</sup>. Tímto byla zajištěna integrita vzorků kůže zaručující reprodukovatelnost výsledků transdermální propustnosti.

#### *Provedení testu transdermální absorpce na Franzových difuzních komůrkách*

Pro finální testování transdermální absorpce byly vybrány dva 0,5% carbomerové gely připravené z formulace EL s obsahem aktivátoru hran SUK, stabilizátoru AP s enkapsulovaným CBD. Jeden z gelů obsahoval glycerol (G+) a ve druhém gelu glycerol přítomen nebyl (G×). Jako reference (Ref) byl použit ethanolový roztok CBD. Složení testovaných vzorků je uvedeno v Tabulce 8.

Tabulka 8 Složení formulací pro testování transdermální absorpce

Formulace	Aktivátor hran	Antioxidant	Aktivní látka CBD (mg/ml)	Glycerol (%)
Ref	–	–	1	–
SUK_AP_CBD_G×	SUK	AP	1	–
SUK_AP_CBD_G+	SUK	AP	1	10

Samotný test transdermální penetrace byl proveden s využitím aparatury Franzových difuzních komůrek. Teplota termoregulační lázně byla nastavená na 32 °C po celou dobu experimentu. Tato teplota byla zvolena vzhledem k podobnosti s teplotou povrchu lidské kůže proto, aby byly co nejlépe simulovány podmínky reálného použití gelů. Receptorová kapalina simulující krevní řečiště byla složena z roztoku PBS s obsahem 1,5 % neionického tenzidu Brij® 98 a 0,05 % gentamycin sulfátu. Připravené kožní vzorky byly umístěny do aparatury Franzových komůrek pokožkou směrem nahoru tak, aby byly spodní části v dokonalém kontaktu s receptorovou kapalinou. Vzorky byly následně ponechány ke kondicionaci po dobu 30 minut. Po uplynutí kondicionační doby bylo na kůži rovnoměrně nanášeno 100 µl připraveného carbomerového gelu s obsahem EL s enkapsulovaným CBD. Jako reference bylo nanášeno 100 µl ethanolového roztoku CBD. Komůrka byla následně překryta pryžovou zátkou. Pro všechny vzorky byla provedena trojice paralelních stanovení. Doba experimentu činila 24 hodin.

#### *Analýza vzorků po testu transdermální absorpce*

Po 24 hodinách byly jednotlivé díly Franzových komůrek odděleny, kožní vzorky byly vyjmuty a zpracovány za účelem sledování průchodu CBD kůží. Přítomnost CBD byla ověřována v následujících částech: 1) oplach donorové části Franzových komůrek, 2) zbytek formulace na povrchu kožního vzorku, 3) v okrajích kožního vzorku mimo aparaturu komůrek, 4) ve *Stratum Corneum* (SC, stripování páskou), 5) *Epidermis*, 6) *Dermis* a 7) receptorové kapalině.

První získaný vzorek představoval oplach donorové části Franzovy komůrky a pryžové zátky methanolem (1 ml). Okraje kožního vzorku mimo aparaturu byly nastříhány na malé kousky za účelem zvětšení extrakční plochy a převedeny do mikrozkušavky s 1 ml methanolu. Vzorky ze SC byly získány technikou stripování pomocí lepicí pásky. Lepicí páska byla vždy přitisknuta k povrchu kožního vzorku, prudce odtržena a vložena do 1 ml methanolu

v mikrozkuhavce. Celkem bylo takto získáno 8 stripů pro každý kožní vzorek umístěných po 2 do 3 mikrozkuhovek s methanolem. Oddělení *Epidermis* od *Dermis* proběhlo pomocí trypsinové metody. Kožní vzorek byl ponechán 24 h při 4 °C v 5 ml roztoku Trypsinu o koncentraci 0,25 %. Po uplynutí této doby byly *Epidermis* a *Dermis* opatrně odděleny pomocí pinzety. Každá z vrstev byla nastříhána na menší kousky a vložena do separátní mikrozkuhavky s 1 ml methanolu. Takto připravené extrakty byly před samotnou analýzou ještě vortexovány po dobu 1 minuty, za účelem uvolnění obsažených látek (CBD) do methanolu, a přefiltrovány přes PTFE membránové filtry o velikosti pórů 0,22 μm. Z receptorové kapaliny byl rovněž odebrán vzorek k analýze.

Analýza získaných extraktů byla prováděna s využitím vysokoúčinného kapalinového chromatografu s chromatografickou kolonou Kinetex C18 (5 μm) a detekce byla prováděna pomocí DAD SPD-M20A detektoru (Shimadzu) při vlnové délce 207 nm. Signály byly vyhodnoceny softwarem LC Real Time Analysis. Analýza byla prováděna při teplotě 35 °C a průtoku mobilní fáze (methanol : voda, 85 : 15, v/v) kolonou nastaveném na 0,8 ml/min. Vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru v objemu 5 μl. Každý vzorek byl analyzován jako triplikát. Vyhodnocení bylo provedeno odečtením plochy píků v odpovídající hodnotě retenčního času. Pro stanovení koncentrace CBD v methanolvých extraktech byla použita metoda kalibrační přímky dle metodiky uvedené v kapitole 8.3.5.

Návratnost z aplikované dávky byla vyhodnocena podle rovnice (3) jako teoretická maximální koncentrace CBD  $c_{max}$  v dávkovaném množství gelu (100 μg/ml) v porovnání s celkovou koncentrací CBD stanovenou  $c_{cel,stan}$  v extraktech.

$$Návratnost (\%) = \frac{c_{max}}{c_{cel,stan}} \cdot 100 \quad (3)$$

## 9 VÝSLEDKY A DISKUSE

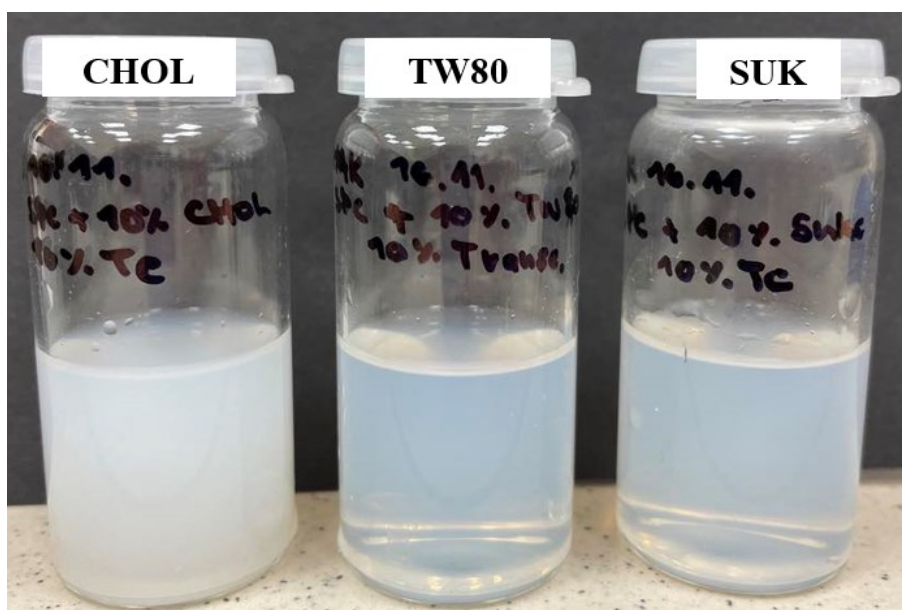
V následující části práce jsou představeny vybrané výsledky měření a jejich diskuse.

### 9.1 Příprava elastických lipozomů

Metodou hydratace tenkého lipidového filmu byla připravena řada disperzí EL, u nichž byly sledovány a hodnoceny klíčové vlastnosti, které ovlivňují další aplikační možnosti těchto systémů.

#### 9.1.1 Preformulační studie

Pro volbu optimálního složení membrán byly připraveny zkušební disperze EL bez obsahu aktivní látky. Testované formulace obsahovaly odlišné typy EA (CHOL, SUK, TW80) a různým zastoupením (5, 10 a 20 %) vzhledem k použitému typu lipidu (SPC). To umožnilo sledování jejich vlivu na vlastnosti EL, konkrétně na velikost vezikul a index polydispersity (PDI). Hodnocen byl rovněž vliv různého obsahu zesilovače transdermální penetrace TC (1 a 10 %) v hydratačním roztoku na velikost vezikul.

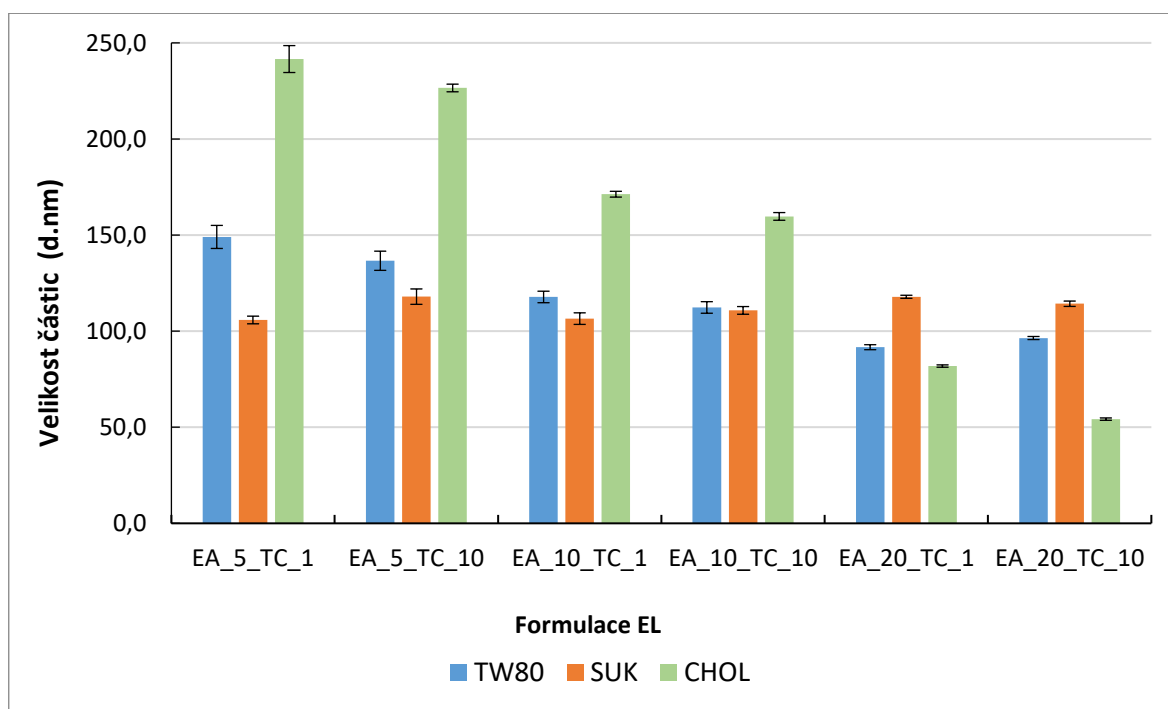


Obrázek 12 Vzhled disperzí EL, s obsahem aktivátorů CHOL, TW80, SUK a 10% obsahem TC, bez aktivní látky

Vliv zvoleného typu EA na velikosti vezikul EL byl pozorován již při vizuálním zhodnocení připravených formulací, kde CHOL v 10% obsahu poskytoval částice větší oproti formulacím EL s využitím SUK nebo TW80 (Obrázek 12). To se projevilo mléčným zabarvením disperze oproti opalescentnímu vzhledu zbylých dvou disperzí. Tato skutečnost

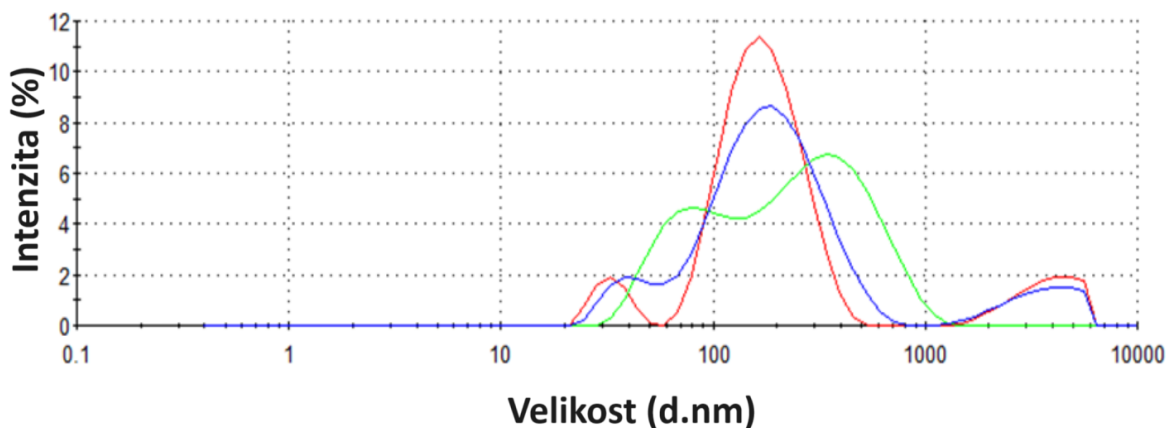
byla potvrzena při měření velikosti vezikul s využitím techniky DLS na Zetasizeru Nano-ZS90 (Malvern).

Z výsledků měření (Obrázek 13) je patrné, že největší vliv na velikost vezikul měl typ EA a jeho obsah. Zejména u formulací EL s CHOL bylo pozorováno významné zmenšení velikosti vezikul v závislosti na jeho narůstajícím obsahu. Zvyšující se množství této povrchově aktivní látky zřejmě umožňovalo větší zakřivení vezikul a tím i jejich kompaktnější sbalení. Mírný pokles ve velikosti vezikul v závislosti na zvyšujícím se obsahu EA byl pozorován také u disperzí s TW80. Naopak u EL s SUK měl různý obsah EA na velikost vezikul jen nepatrný vliv. Rovněž obsah TC v hydratačním roztoku velikost vezikul významně neovlivnil.

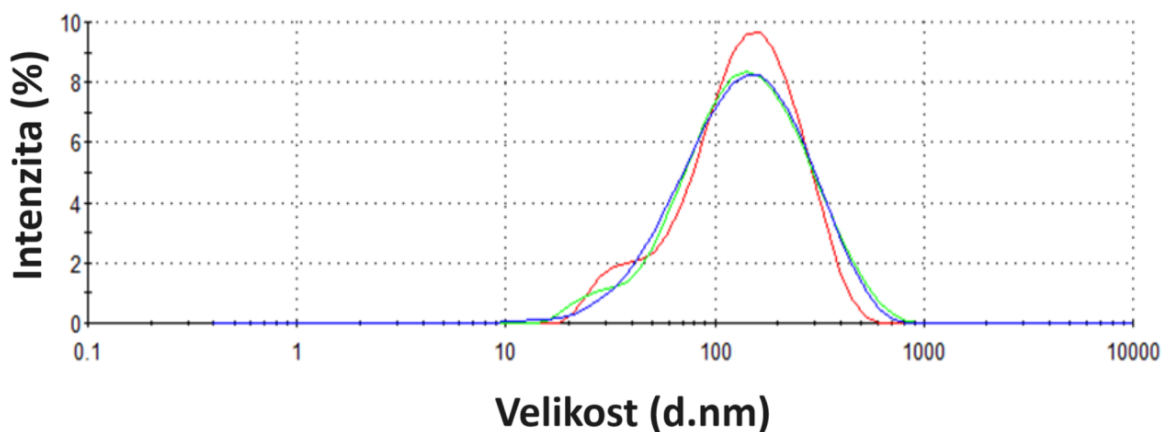


Obrázek 13 Vliv typu (TW80, SUK, CHOL), množství (5, 10, 20 %) EA a množství transkutolu TC (1, 10 %) na velikost částic EL

Nízký obsah EA vedl u všech formulací k širším distribucím, kde koncentrace 5 % vedly k polydisperzním systémům se zastoupením více velikostních frakcí (Obrázek 14). Při navýšení obsahu EA na 10 % docházelo k zúžení distribuce, což je dokumentováno na Obrázku 15). Ke zúžení distribuce přispíval také vyšší obsah TC (data nejsou prezentována).



Obrázek 14 Intenzitní distribuce velikosti vezikul EL s 5% obsahem EA TW80 a 1 % TC, ihned po přípravě, výsledek 3 měření



Obrázek 15 Intenzitní distribuce velikosti vezikul EL s 10% obsahem EA TW80 a 1 % TC, ihned po přípravě, výsledek 3 měření

Vizuální hodnocení připravených disperzí ukázalo, že u formulací s 10 a 20% obsahem EA CHOL byla pozorována během skladování nestabilita projevující se shromažďováním vezikul na povrchu disperze (Obrázek 16). Z tohoto důvodu byl CHOL jako EA pro další experimenty vyloučen. Na základě uvedených výsledků bylo rozhodnuto využít pro formulační studii (EL s aktivní látkou) EA SUK a TW80 v obsahu 10 % s 10% obsahem TC v hydratačním roztoku, při kterých vykazovaly vezikuly v disperzi vhodnou velikost i PDI a byly z fyzikálního hlediska stabilní.



Obrázek 16 Projev nestability u formulace EL s obsahem EA CHOL

Řada studií též upozorňuje na vliv poměru lipid:EA na enkapsulační účinnost EL, velikost jejich vezikul a schopnost permeace. Obecně je uváděno, že by mohla být EE snížena v důsledku přítomnosti vyšší koncentrace EA. To může být zapříčiněno změnou uspořádání molekul povrchově aktivní látky ve struktuře lipidové dvojvrstvy vezikul, což by mohlo vést ke vzniku pórů a ke zvýšené tekutosti membrány a tím pádem i k úniku enkapsulované aktivní látky. Tvorba pórů v membráně dvojvrstvy v důsledku zvýšeného obsahu EA může zároveň vést i ke snížení permeační schopnosti vezikul [14].

Z výše uvedených důvodů bylo přistoupeno k volbě poměru lipid: EA 90:10.

### 9.1.2 Formulační studie

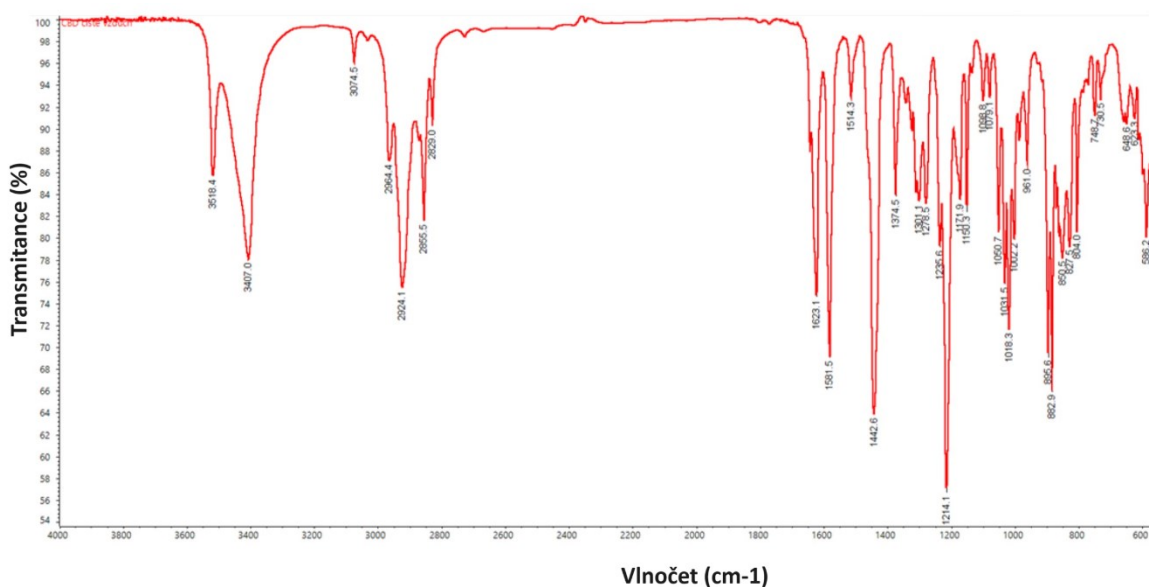
V této části již bylo přistoupeno k enkapsulaci aktivní látky CBD do struktury EL se zvoleným poměrem lipidu SPC:EA 90:10 dle metodiky uvedené v podkapitole 8.1.2. Součástí připravených formulací byly rovněž askorbyl palmitát (AP) nebo tokoferyl acetát (TA), které byly použity jako antioxidanty pro stabilizaci CBD. Všechny dále připravené a testované formulace EL obsahují rovněž 10 % Transkutolu (TC) jako zesilovače transdermální permeace. Následně byly hodnoceny vlastnosti připravených vzorků.



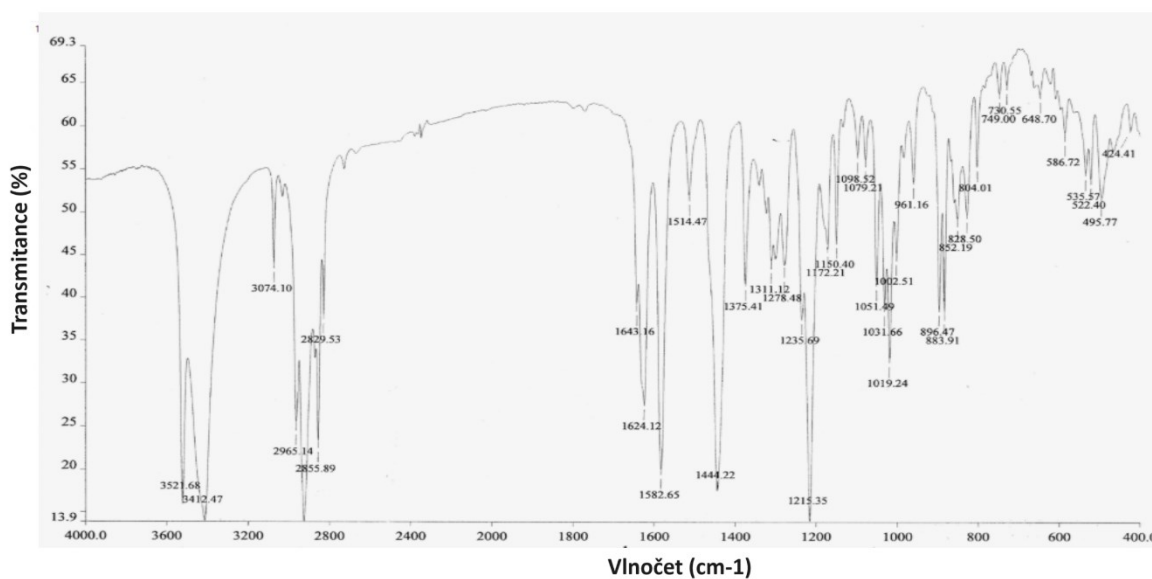
## 9.2 Charakterizace aktivní látky

Ještě před samotnou enkapsulací aktivní látky CBD do struktury EL byla pomocí FTIR-ATR ověřena jeho kvalita. Naměřené spektrum CBD je ve srovnání se spektrem CBD dodaného výrobcem Lipomed AG shodné (Obrázek 17 a 18), což ukazuje na jeho dobrou kvalitu a absenci degradačních projevů nebo znečištění.

O dobré stabilitě CBD v práškové formě informovali i Kosovic et al. (2021), kde testovaná surovina prášku CBD vystavená teplotě  $25 \pm 2$  °C a  $60 \pm 5$  % relativní vlhkosti zůstala statisticky nezměněna po dobu 270 dnů [44]. To hovoří o jeho dobré stabilitě v čase.



Obrázek 17 FTIR-ATR spektrum prosté aktivní látky CBD



Obrázek 18 FTIR-ATR spektrum CBD dodávané výrobcem Lipomed k látce CBD

### 9.3 Charakterizace Elastických lipozomů

Charakterizace vybraných formulací EL je představena v následující části práce, která se soustředila na popsání vlivu konkrétního složení membrán na vlastnosti disperzí EL.

#### 9.3.1 Velikost částic a index polydisperzity

V případě vlivu složení membrány na velikosti disperzních vezikul a PDI bylo pozorováno zejména působení zvoleného typu EA (SUK nebo TW80) a vybraného antioxidantu (TA nebo AP). Získané výsledky z měření pomocí techniky DLS jsou prezentovány v Tabulce 9, jako průměrná hodnota 6 měření se směrodatnou odchylkou.

Tabulka 9 Velikost vezikul a PDI u testovaných formulací EL SPC: EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5 mg

Formulace	Z-Ave ± SD (d.nm)	PDI ± SD
SPC_SUK_CBD_TA	103 ± 2	0,29 ± 0,03
SPC_TW80_CBD_TA	125 ± 2	0,28 ± 0,03
SPC_SUK_CBD_AP	123 ± 1	0,26 ± 0,01
SPC_TW80_CBD_AP	152 ± 4	0,26 ± 0,02

Použitý typ EA (SUK/ TW80) ani druh pomocného antioxidantu (AP/TA) neměl na velikost vezikul jednoznačný vliv. Nejmenší vezikuly EL poskytovala kombinace SUK\_TA (103 ± 2 nm) k naopak největším vezikulám vedlo složení TW80\_AP (152 ± 4 nm). Dopad na PDI systému vykazoval převážně obsažený antioxidant, kde mírně užší distribuci poskytoval AP oproti TA. Enkapsulace aktivní látky CBD měla mírný vliv na zvětšení velikosti vezikul oproti formulacím prázdných EL. Velikost EL SPC:EA 90:10 bez aktivní látky ležela v intervalu od 110 do 112 nm.

Moqejwa et al. (2022) připravovali transferozomy složené z lipidů sójového lecitinu a cholesterolu a EA TW80 metodou tenkého filmu. Připravené vezikuly vykazovaly hydrodynamické velikosti ~ 130 nm a hodnoty PDI ~0,285 [59]. Podobné hodnoty uvedených parametrů byly pozorovány i u námi připravených EL.

### 9.3.2 Zeta potenciál

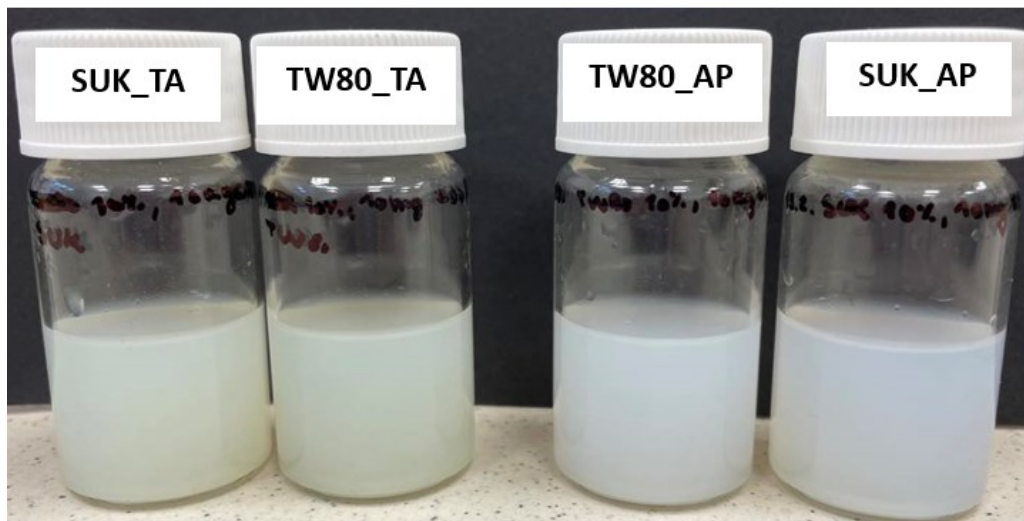
U vybraných formulací byl měřen zeta potenciál s využitím ELS techniky. Výsledné hodnoty jsou prezentovány v Tabulce 10 jako průměry 6 měření. Formulace s obsahem EA SUK a TW80 a antioxidantu AP vykazovaly hodnoty zeta potenciálu  $-25$  a  $-27$  mV, ukazující na lepší stabilitu tohoto disperzního systému. U formulací s obsahem antioxidantu TA byly pozorovány hodnoty nižší blíží se nule, což by mohlo představovat systém náchylnější k nestabilitám. Je zde velmi patrný vliv přídavku podpůrných antioxidantů AP/TA na výsledný zeta potenciál disperzí. Vliv použitého EA se do hodnot zeta potenciálu výrazně nepromítnul.

Tabulka 10 Naměřené hodnoty zeta potenciálu s přesností  $\pm 2$  mV, u vybraných formulací EL SPC: EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5 mg

Formulace	ZP (mV)
SPC_SUK_CBD_TA	-2
SPC_TW80_CBD_TA	-5
SPC_SUK_CBD_AP	-25
SPC_TW80_CBD_AP	-27

### 9.3.3 Vizuální zhodnocení

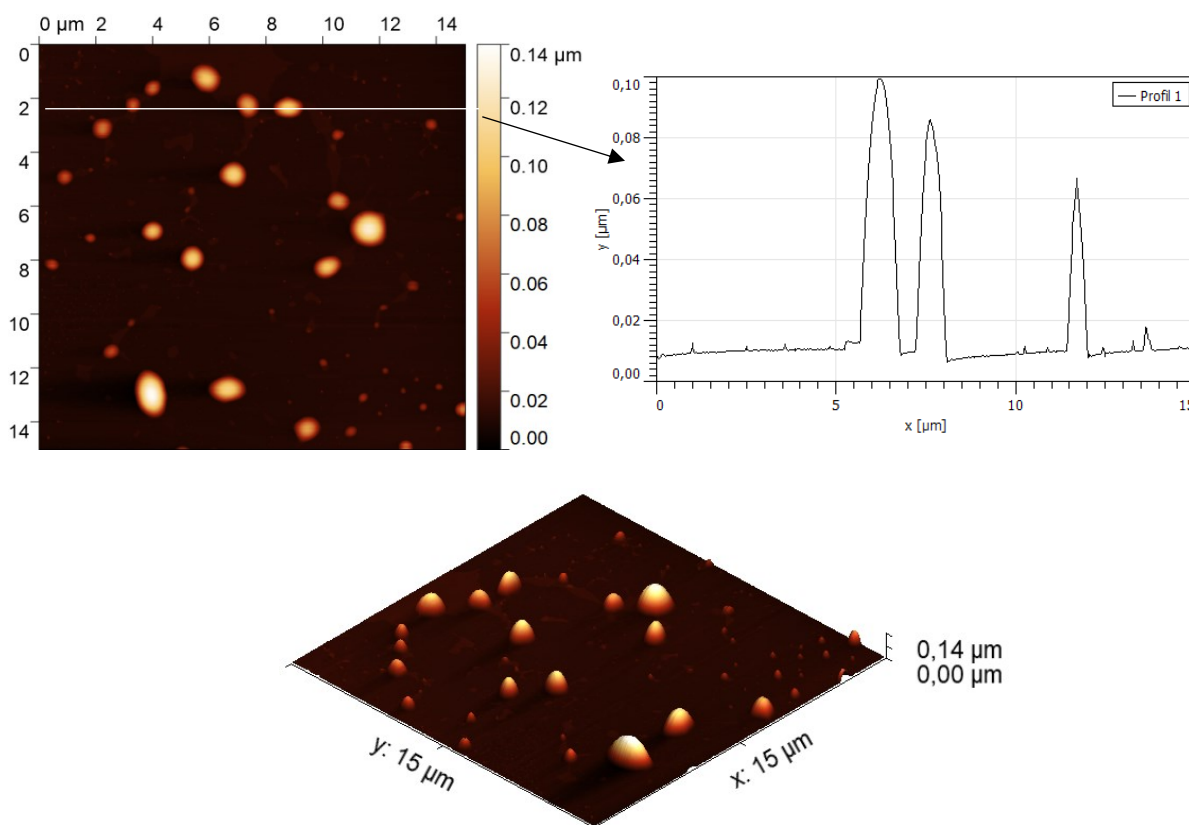
Ihned po přípravě byly vybrané disperze EL zhodnoceny rovněž vizuálně (Obrázek 19). Všechny formulace vykazovaly mléčné zbarvení a nebyly v nich pozorovány žádné nehomogenity. Patrná mírná barevná odlišnost u disperzí s obsahem antioxidantu TA mohla být způsobena nažloutlým zbarvením vstupní suroviny tohoto antioxidantu.



Obrázek 19 Vzhled formulací EL s enkapsulovanou aktivní látkou CBD a EA (TW80 nebo SUK) a antioxidanty (TA nebo AP), ihned po přípravě

#### 9.3.4 Morfologie mikroskopické zobrazení pomocí AFM

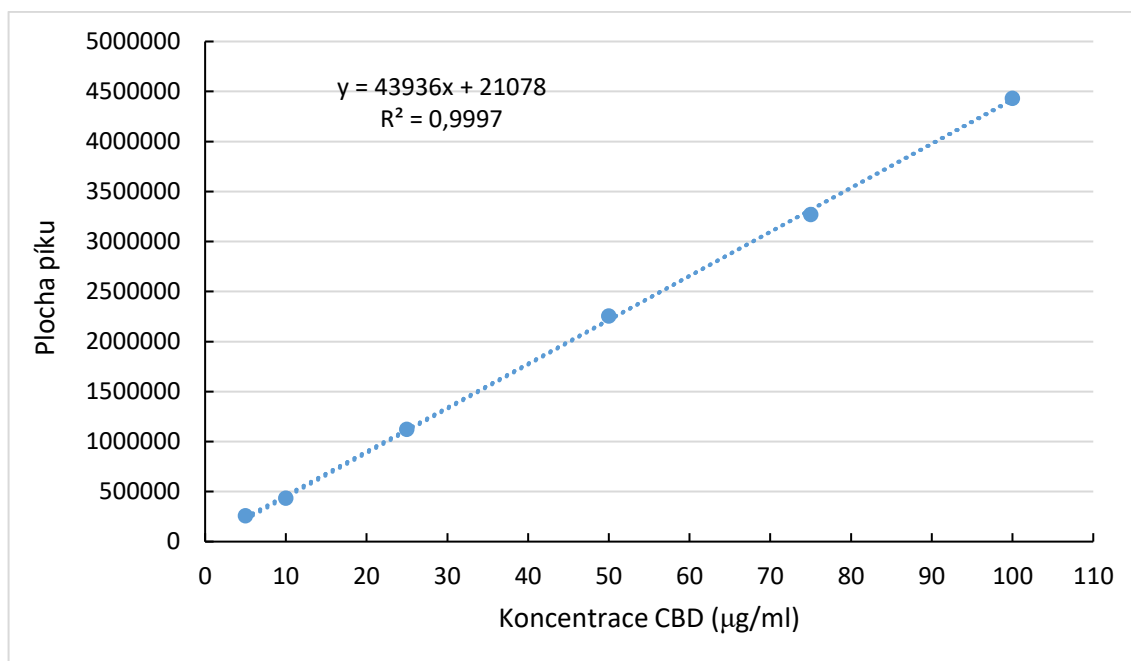
Na Obrázku 20 je zobrazena morfolgie a profilový řez vezikul u vybrané formulace EL s obsahem EA TW80 a pomocného antioxidantu AP metodou mikroskopie atomárních sil (AFM). Mikroskopický snímek potvrdil přítomnost vezikul o velikostech cca 0,1-5  $\mu\text{m}$ . I když hlavní populace částic EL vykazuje nanometrovou velikost, vezikuly s mikrometrovou velikostí byly u některých vzorků pozorovány i na distribucích zaznamenaných DLS, což dokumentuje např. Obrázek 14. Přítomnost větších vezikul detekovaná pomocí AFM může být způsobena použitou technikou přípravy vzorku pro mikroskopické zobrazování, kdy byly disperse po zředění demineralizovanou vodou aplikovány na slídu a vysušeny.



Obrázek 20 Nahoře – 2D rekonstrukce a profilový řez 3D snímkem EL SPC\_TW80\_AP pomocí softwaru Gwyddion. Dole – 3D rekonstrukce morfologie vezikul EL SPC\_TW80\_AP

### 9.3.5 Enkapsulační účinnost EL

Vyhodnocení enkapsulační účinnosti připravených systémů EL pro aktivní látku CBD probíhalo stanovením jeho množství zapouzdřeného do struktury vezikul po odplavení nezaenkapsulovaného podílu dialýzou. Příprava extraktů pro HPLC analýzu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 8.3.5. V první řadě byla na základě teoretické maximální koncentrace CBD v EL sestavena vhodná řada kalibračních roztoků CBD v rozmezí koncentrací 5–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Tyto roztoky byly charakterizovány pomocí HPLC. Retenční čas CBD byl stanoven na 6 min. Z naměřených hodnot ploch píků v závislosti na koncentraci kalibračních roztoků byla sestrojena kalibrační přímka (Obrázek 21). Z její rovnice ( $y = 43936x + 21078$ ) pak byly vyhodnoceny koncentrace CBD u testovaných formulací. Tyto hodnoty následně sloužily pro výpočet EE % formulací (Tab. 12)



Obrázek 21 Kalibrační přímka pro CBD

Pro zajištění reprodukovatelnosti výsledků byl rovněž proveden test opakovatelnosti extrakčního postupu. Bylo zjištěno, že 3 připravené extrakty z jednoho vzorku se koncentrací výrazně neliší (Tabulka 11), lze tak tento způsob přípravy považovat za reprodukovatelný

Tabulka 11 Naměřené hodnoty koncentrací CBD u formulace EL SPC: SUK 90:10, CBD 10 mg, antioxidant AP 5mg během testu opakovatelnosti extrakčního postupu

	Koncentrace extraktu (µg/ml)		
	1	2	3
<b>EL_SPC_SUK_CBD_AP</b>	34,233	38,263	34,952
<b>Průměr</b>	36		
<b>SD</b>	2		

Výsledky testu enkapsulační účinnosti jsou uvedeny v Tabulce 12, z uvedených dat je zřejmé, že ani typ EA, ani typ antioxidantů nevedl k signifikantním odlišnostem mezi jednotlivými formulacemi z hlediska účinnosti EL na enkapsulaci CBD. Ve všech případech docházelo k velmi účinné enkapsulaci aktivní látky blížící se 100 %. Mírně sníženou EE  $98 \pm 0,5$  % vykazoval systém s EA TW80 a antioxidantem TA.

Tabulka 12 Enkapsulační účinnost vybraných systémů EL, SPC:EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5mg

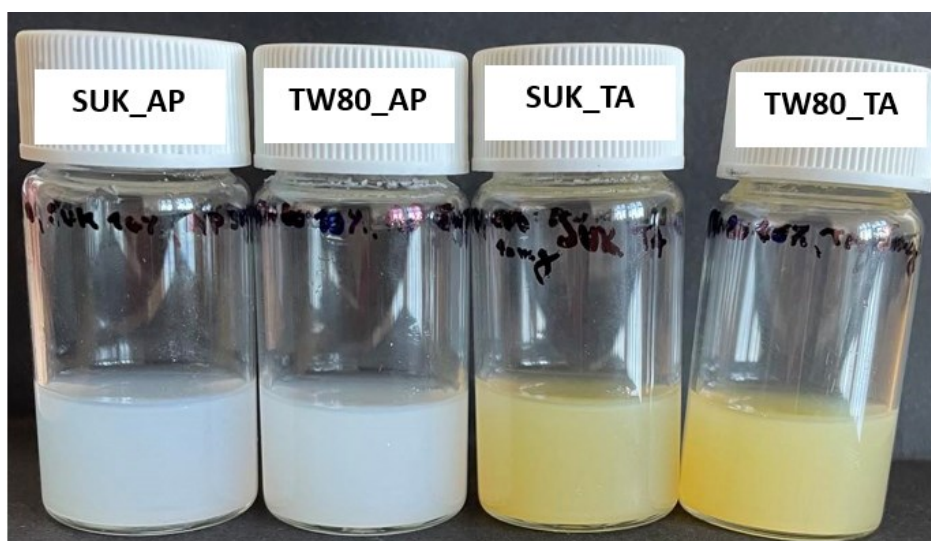
Vzorek	EE ± SD (%)
SPC_SUK_CBD_TA	102 ± 0,2
SPC_TW80_CBD_TA	98 ± 0,5
SPC_SUK_CBD_AP	102 ± 1,1
SPC_TW80_CBD_AP	105 ± 0,1

O dobré enkapsulační účinnosti transferozomálních vezikul složených ze sójového lecitinu, cholesterolu a TW80 připravených metodou tenkého filmu informoval také výzkumný tým Moqejwa et al. (2022). Připravené vezikuly vykazovaly  $80,0 \pm 0,077$  % účinnost enkapsulace pro CBD [59].

### 9.3.6 Stabilitní studie

Vzorky připravené ve formulační části studie byly sledovány a hodnoceny z hlediska stability. Hodnocení probíhalo po dobu 4 týdnů, vzorky byly skladovány při 4 °C. U jednotlivých formulací bylo prováděno v týdenních intervalech měření velikosti vezikul, PDI, zeta potenciálu a EE. Prováděno bylo rovněž i vizuální zhodnocení. Naměřená data jsou prezentována na Obrázcích 22 až 27.

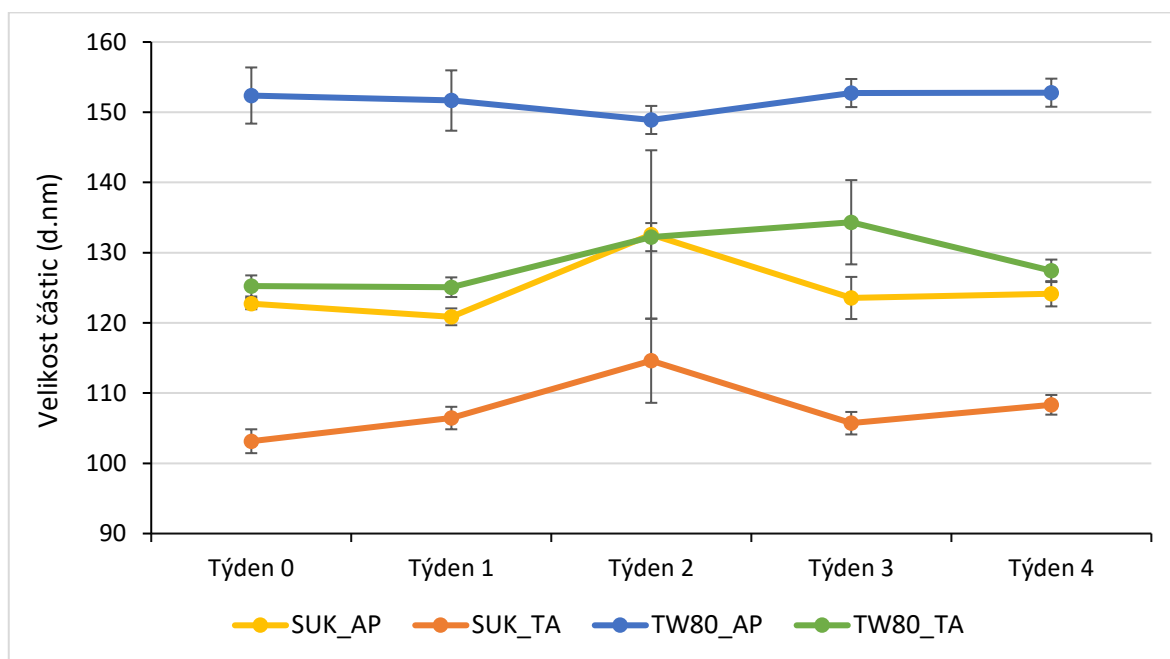
*Velikost, zeta potenciál a vzhled*



Obrázek 22 Vzhled vybraných formulací EL po 4 týdnech skladování při 4°C.

Během skladování byly u formulací s obsahem pomocného antioxidantu TA pozorovány výrazné barevné změny (Obrázek 22) zřejmě jako důsledek možných degradačních procesů.

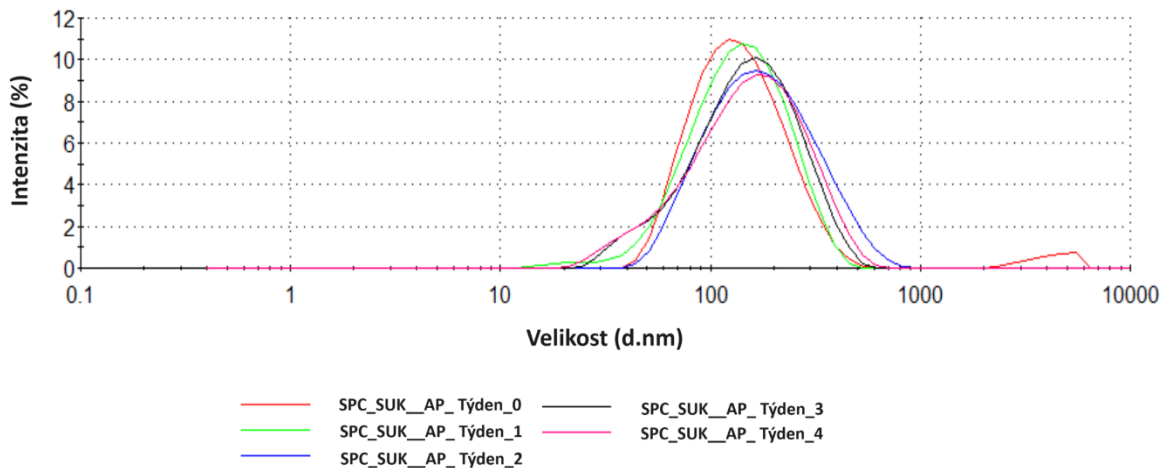
Na grafickém záznamu změny velikostí vezikul EL v čase (Obrázek 23) je patrné, že v čase nedochází k výrazným změnám ve velikostech vezikul ani u jedné z formulací, což značí schopnost systémů zachovávat si dobrou stabilitu. Mírné změny ve velikosti v 2. týdnu skladování byly nejspíš zapříčiněny vzorkováním, kdy jistá nehomogenita vzorku použitého pro stanovení může vést v odebíraném množství ke zkreslení celkového výsledku velikosti vezikul. Tento trend byl pozorován i u distribuce částic (Obrázek 24) a PDI (Obrázek 25).



Obrázek 23 Změny v hodnotách velikosti vezikul vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů

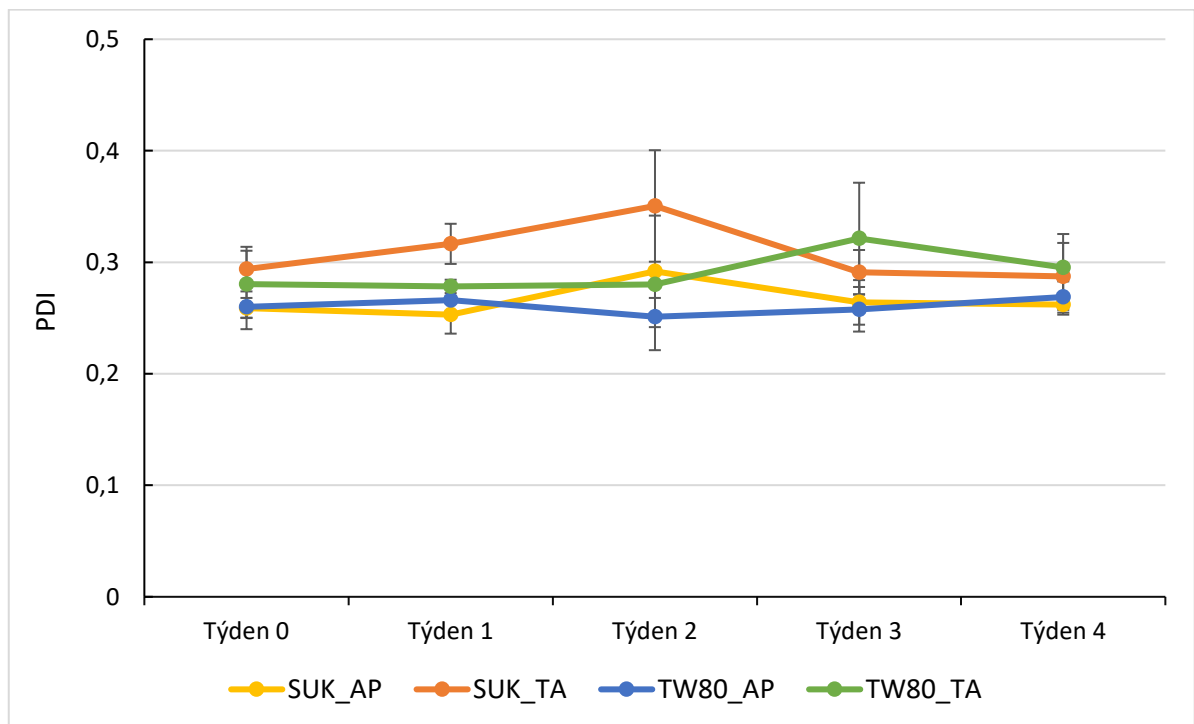
Pro znázornění intenzitní distribuce velikosti vezikul jsou níže prezentována vybraná data pro formulaci EL SUK\_AP (Obrázek 24) V průběhu skladování docházelo jen k mírným změnám v distribuci velikosti vezikul, což opět ukazuje na dobrou stabilitu systému.





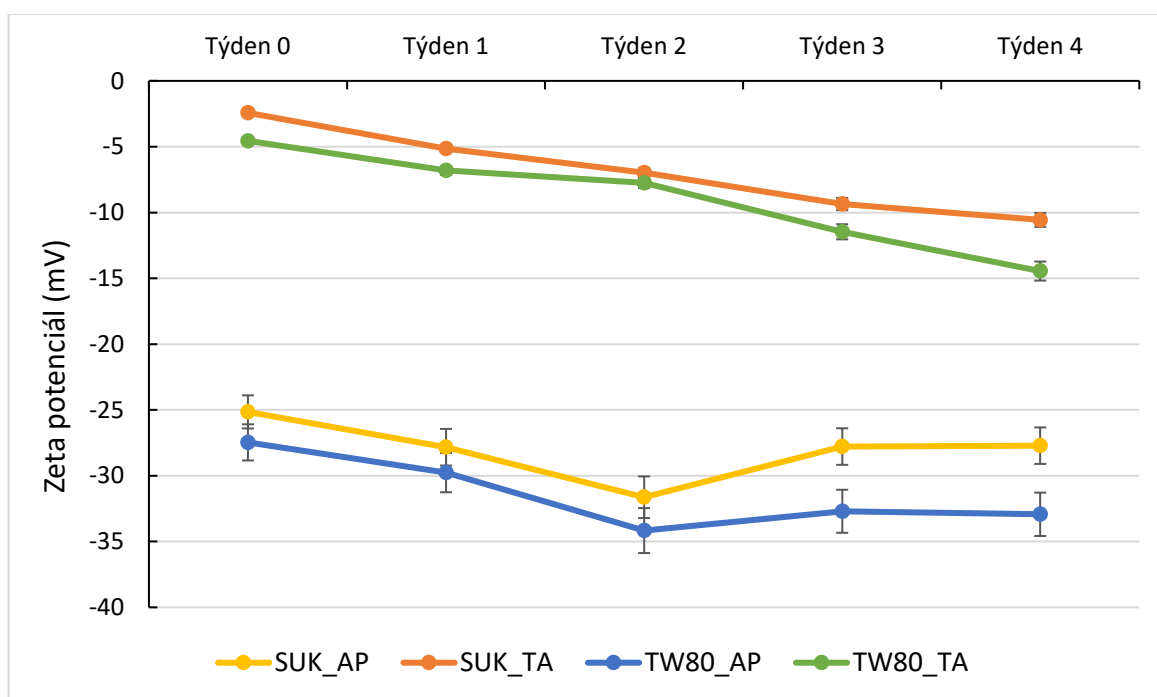
Obrázek 24: Změny v intenzitní distribuci velikosti částic v průběhu 4 týdnů u vybrané formulace EL SUK\_AP

Hodnoty PDI ukazují na zastoupení frakcí velikostí v připraveném systému EL. Pokud by docházelo k nárůstu této hodnoty směrem k hodnotě  $PDI = 1$  značilo by to nestabilitu systému vykazující značnou polydisperzitu. Ani u jedné z formulací však k statisticky významným změnám v nárůstu nedocházelo (Obrázek 25), lze tak všechny formulace považovat za stabilní minimálně po dobu 4 týdnů. Nebyl pozorován ani vliv konkrétního složení formulace EL na tento parametr.



Obrázek 25 Změny v hodnotách PDI u vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů

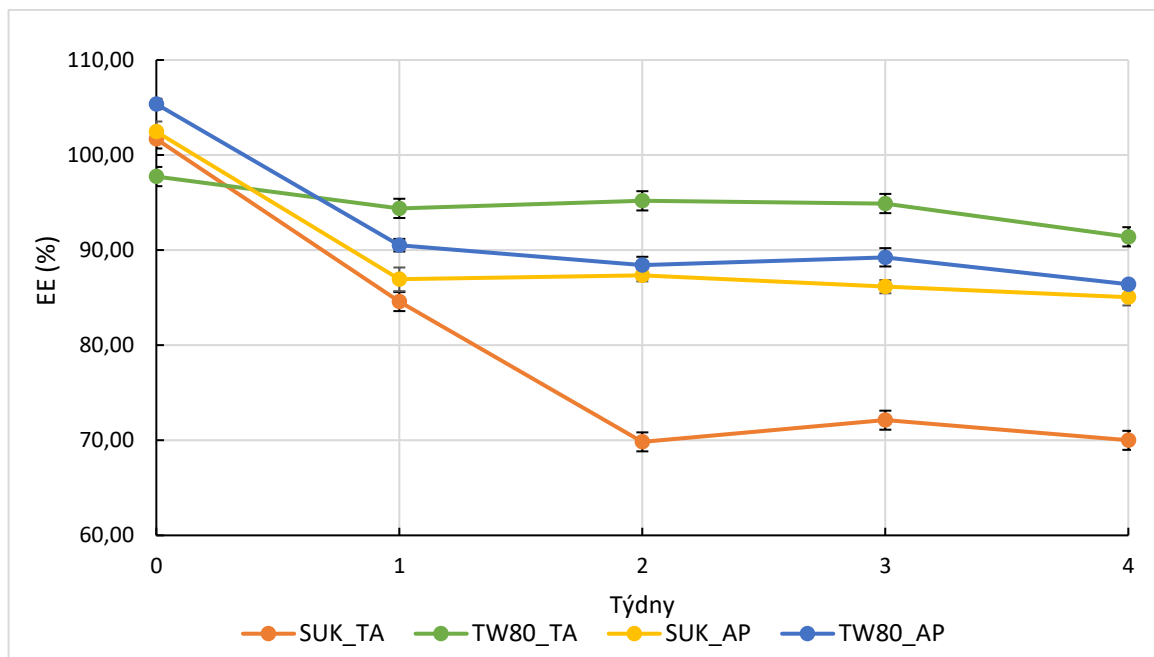
U hodnot zeta potenciálu v čase byl pozorován největší vliv přídatku pomocného antioxidantu AP/TA (Obrázek 26). U formulací s obsahem TA docházelo v průběhu 4 týdnů ke konstantnímu pozvolnému nárůstu zeta potenciálu. U formulací s obsahem AP došlo během prvních dvou týdnů k růstu o zeta potenciálu a ve zbývajících dvou týdnech k jeho mírnému snížení. Pokud však uvažujeme přesnost měření hodnot zeta potenciálu, která je uváděna v literatuře  $\pm 2$  mV [74] lze konstatovat, že v rámci sledovaného časového intervalu se zeta potenciál žádného ze sledovaných vzorků signifikantně nemění. Případná nestabilita systému by se projevovala poklesem záporného zeta potenciálu směrem k nulovým hodnotám. Zde však lze hovořit, z hlediska zeta potenciálu, o poměrně stabilních systémech.



Obrázek 26 Změny zeta potenciálu u vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů

### *Enkapsulační účinnost*

V průběhu 4 týdnů po které probíhala stabilitní studie nedocházelo u připravených formulací k významnému zhoršení enkapsulační účinnosti (méně než 15 %). Výjimkou byl vzorek EL obsahující SUK jako aktivátor hran a antioxidant TA, kde docházelo k poklesu EE až o 30 %, jak je prezentováno na Obrázku 27.

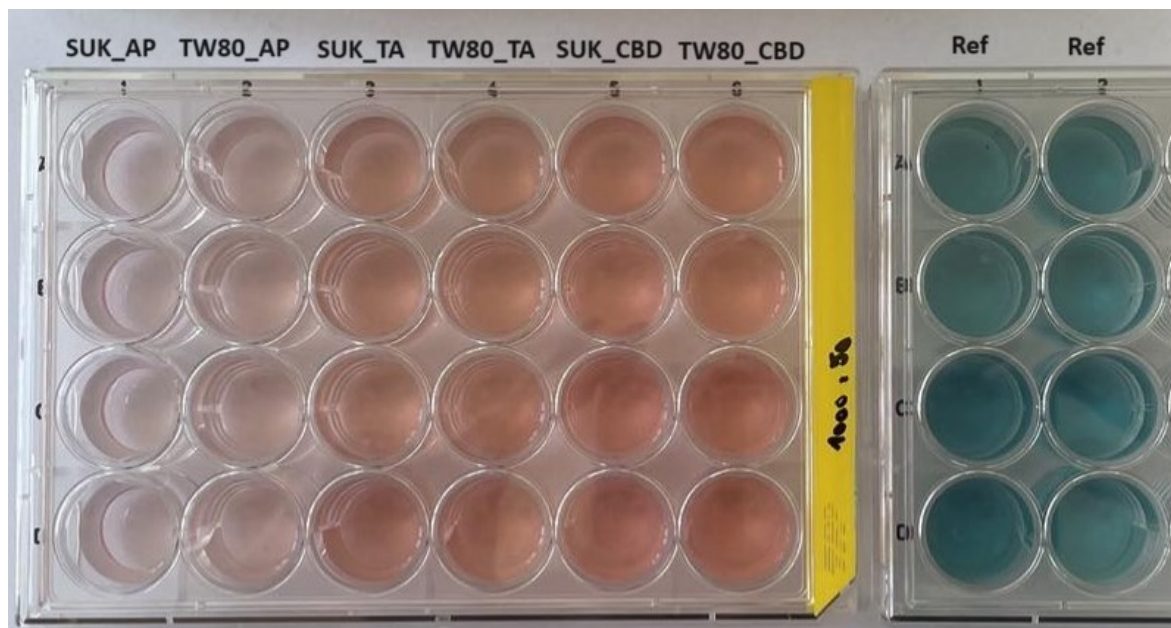


Obrázek 27 Enkapsulační účinnost vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů

Na základě shrnutí výsledků stabilitních studií byla pro následné testy transdermální penetrace vybrána formulace EL s enkapsulovaným CBD s obsahem EA SUK a s pomocným antioxidantem AP.

### 9.3.7 Stanovení antioxidační aktivity – ABTS test

Vyhodnocení antioxidačního potenciálu vybraných formulací probíhalo pomocí ABTS testu (viz kapitola 8.3.7). Jako reference byla přidávána, místo vzorku, DEMI voda v odpovídající množství (50  $\mu$ l na 1000  $\mu$ l roztoku radikálů ABTS•). Antioxidační aktivita byla sledována u formulací EL jak s obsahem CBD i antioxidantu (TA nebo AP), tak i u formulací EL pouze s obsahem CBD. Tímto způsobem mohlo být popsáno antioxidační působení samotného CBD, bez příspěvku přidaného antioxidantu AT nebo TA.



Obrázek 28 Test antioxidační aktivity ABTS u vybraných formulací ve srovnání s referencí

Antioxidační působení studovaných formulací se projevilo již několika sekundách po přidání formulací EL k roztoku ABTS•, kdy došlo k barevným změnám (Obrázek 28). Odbarvení roztoku ABTS• značí schopnost testovaných látek zhášet volné radikály. Antioxidační potenciál vykazovaly, dle očekávání, nejen formulace EL s obsahem CBD v kombinaci s oběma antioxidanty (AP nebo TA), ale i formulace EL s CBD bez obsahu antioxidantů. Po přidavku EL zde rovněž docházelo k výraznému odbarvení roztoku vzhledem k referenci. K nevýraznější barevné změně docházelo u EL s obsahem CBD a antioxidantu AP, lze tak předpokládat, že synergie těchto látek vede k dobrému antioxidačnímu potenciálu připravených vzorků. Navíc i obsah EA SUK, který má základ ve vitaminu E, může mírně přispívat k celkové antioxidační aktivitě u těchto konkrétních formulací EL [75].

Vizuálně pozorované změny byly následně potvrzeny měřením absorbance roztoků EL s ABTS při vlnové délce 736 nm ve srovnání s referencí a následným výpočtem relativní inhibice radikálů (RI). Výsledky vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13 Schopnost formulací EL s enkapsulovaným CBD inhibovat volné radikály vyjádřena jako relativní inhibice (RI %)

EA	SUK			TW80		
antioxidant	AP	TA	není	AP	TA	není
RI (%)	95	94	92	93	94	85

U téměř všech formulací docházelo k více než 90% relativní inhibici radikálů projevující se jako úbytek absorbance. Výjimkou byla formulace EA s TW80 a obsahem CBD bez antioxidantu, kde byl úbytek relativní absorbance o něco nižší a činil 85 %. Celkově lze ale považovat všechny připravené formulace jako schopné inhibice volných radikálů.

Antioxidační aktivita neutrálních kanabinoidů byla studována a hodnocena skupinou Dawidowicz et al. (2021) pomocí testu zhášení ABTS radikálů. Výsledky pak autoři porovnali s analogem vitamínu E Troloxem. Výsledky studie dokazují, že CBD vykazuje dobrou antioxidační aktivitu, která se projevuje jeho schopností vychytávat volné radikály, a to ve větší míře než Trolox [76]. To je v dobré shodě s námi prezentovanými výsledky, kde byla prokázána antioxidační aktivita i samotného CBD bez přítomnosti pomocných antioxidantů.

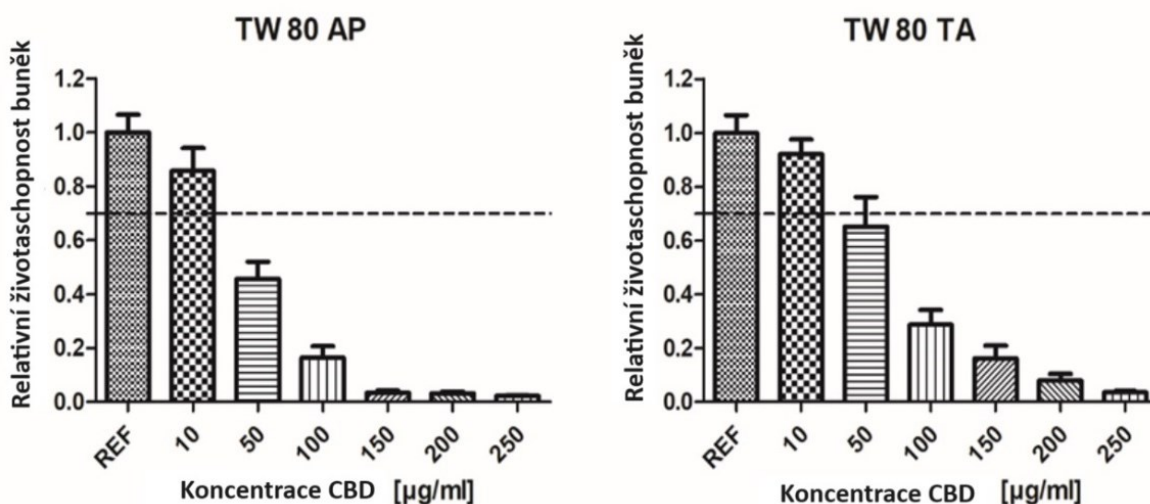
### 9.3.8 Stanovení cytotoxicity *in vitro*

Vyhodnocení cytotoxicity vybraných formulací EL proběhlo s využitím MTT testu dle metodiky popsané v kapitole 8.3.8.

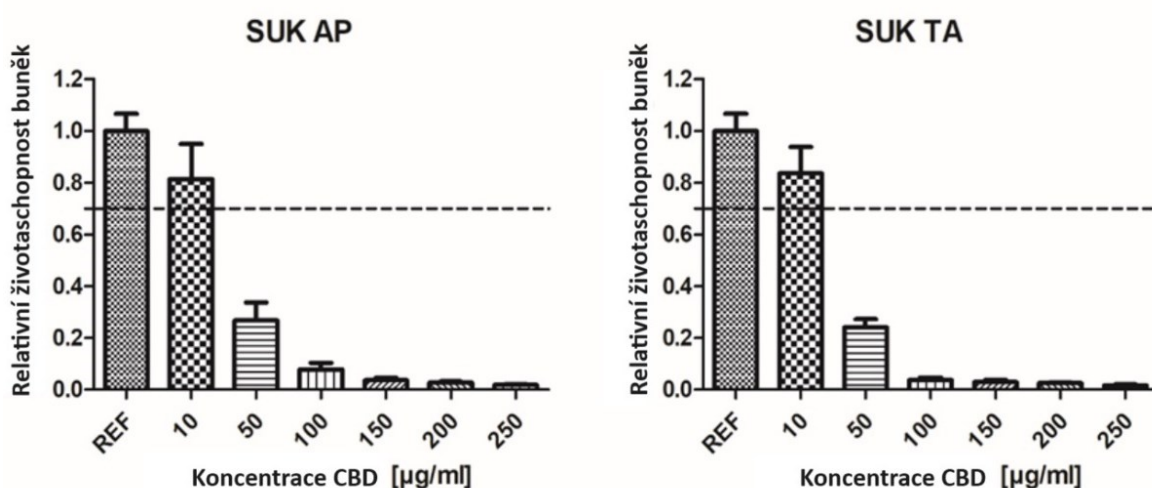
Na Obrázcích 29 a 30 jsou uvedeny výsledné závislosti relativní životaschopnosti buněk na koncentraci testované látky CBD obsažené v přidávaném množství formulace EL s antioxidanty (AP, TA) a EA (SUK, TW80). Jako reference vystupovalo čisté médium. V grafu jsou výsledky vyjádřeny jako průměrné hodnoty z 5 opakování se směrodatnou odchylkou. Cytotoxický účinek byl hodnocen podle normy ISO 10993-5, dle které se hodnoty životaschopnost nižší než 0,7 považují za známku cytotoxicity. Koncentrace CBD vyšší než 10 µg/ml vykazovaly u všech formulací EL silnou cytotoxicitu vůči buňkám myších embryonálních fibroblastů. Na cytotoxicitu měl vliv i formulace EL, v jaké byl CBD zapouzdřeno, kde přítomnost EA TW80 vyvolávala mírnější cytotoxicitu ve srovnání s formulacemi s obsahem SUK. S přihlédnutím ke směrodatné odchylce stanovení, lze hranici pro absenci cytotoxicity pro tento vzorek EL (TW80\_TA) stanovit na 50 µg/ml CBD.

V dostupných publikacích byla cytotoxicita hodnocena při nižších koncentracích CBD, než byly koncentrace námi testované. Např. v publikaci Li et al. (2022) byly testovány koncentrace CBD v rozmezí od 3 do 6  $\mu\text{g/ml}$ . Bylo zjištěno, že koncentrace CBD od 4 do 6  $\mu\text{g/ml}$  vedly ve srovnání s kontrolní skupinou po 48 h k významnému snížení životaschopnosti myších Sertoliho buněk TM4 [77]. Toto množství je dvakrát menší než množství námi testované, při němž již byly zaznamenány cytotoxické účinky.

Z časových důvodů však neproběhlo srovnání s prázdnými EL a s EL s CBD bez obsahu antioxidantů, ale jako reference vystupovalo pouze čisté médium. Nelze tak vyloučit případný vliv ostatních složek na zvýšení cytotoxicity. Použitá buněčná linie byla rovněž v nedávné době ošetřena antibiotiky, což mohlo vést ke zvýšené citlivosti na testované látky.



Obrázek 29 Relativní životaschopnost buněk myších embryonálních fibroblastů v závislosti na koncentraci CBD ve formulaci EL s obsahem EA TW80 a antioxidanty (AP nebo TA). Údaje jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD



Obrázek 30 : Relativní životaschopnost buněk myších embryonálních fibroblastů v závislosti na koncentraci CBD ve formulaci EL s obsahem EA SUK a antioxidanty (AP nebo TA). Údaje jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD

#### 9.4 Příprava gelů s obsahem EL

Vybrané disperze EL byly převedeny na formu carbomerového gelu dle metodiky uvedené v kapitole 8.4.

#### 9.5 Charakterizace gelů s obsahem EL

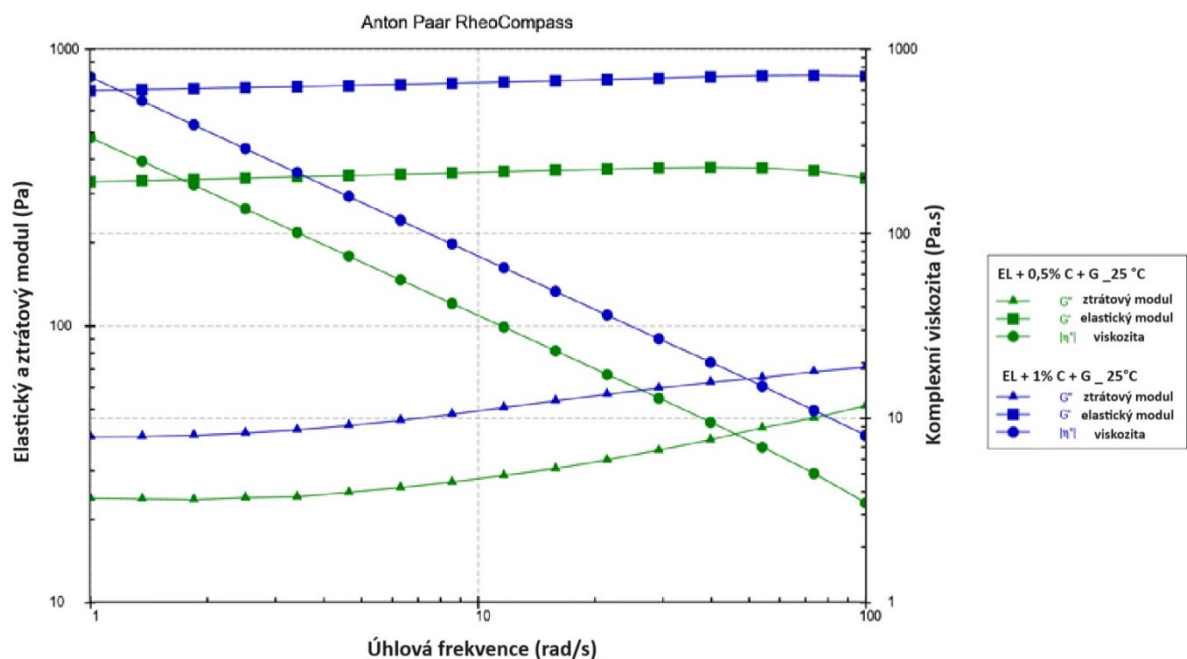
Charakterizace připravených gelových formulací se soustředila zejména na sledování vlivu konkrétního složení gelu, především obsahu carbomeru a přítomnost či nepřítomnost glycerolu, na reologické vlastnosti a u vybraných formulací i na schopnost transdermální penetrace.

##### 9.5.1 Reologické vlastnosti

Reologické charakteristiky byly stanoveny u vzorků gelů připravených s 0,5 nebo 1 % carbomeru a EL (složení uvedené v kapitole 8.4. Tabulce 7). Vzhledem ke skutečnosti, že gelové formulace mohou snižovat hydrataci pokožky, byl do gelů přidán i humektant glycerol (10 hm.%). V testech bylo porovnáno chování gelu o různé koncentraci carbomeru, bez a v přítomnosti glycerolu a bylo rovněž srovnáno chování gelů při teplotách 25 a 37 °C. Viskoelastické vlastnosti gelů byly hodnoceny pomocí elastického modulu  $G'$  (elastická složka), ztrátového modulu  $G''$  (viskózní složka) a komplexní viskozity, které byly stanoveny jako funkce frekvence. V případě vyšších hodnot  $G'$ , je chování gelu spíše

podobné chování tuhého tělesa, pokud ovšem převažuje  $G''$ , látka se chová spíše jako kapalina.

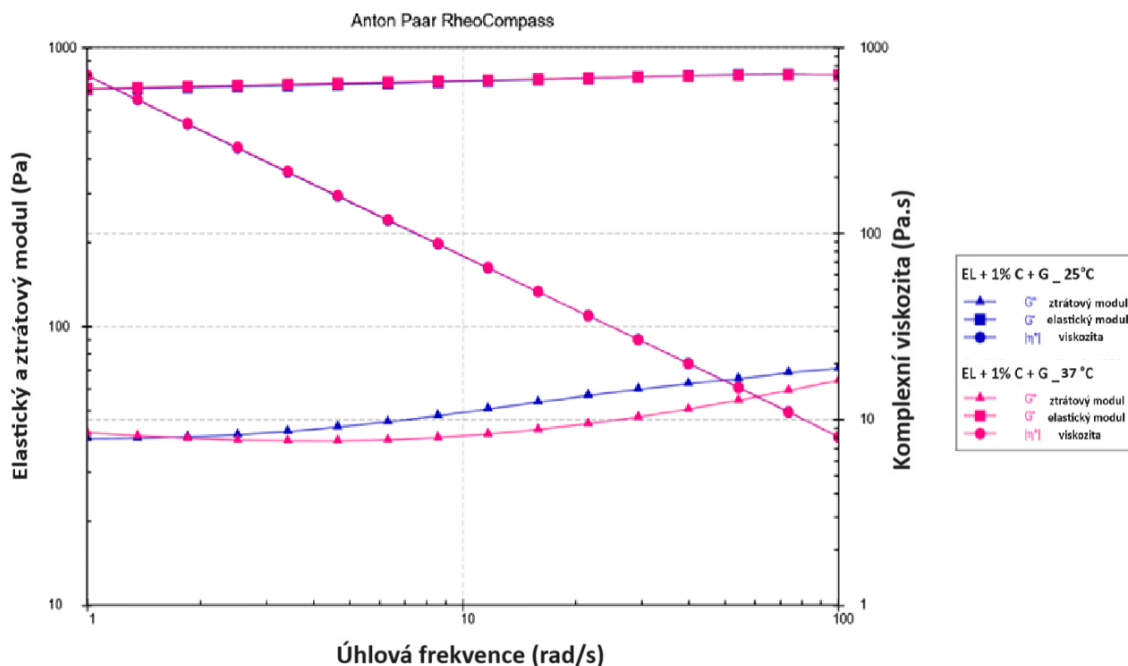
Typický průběh závislosti modulů  $G'$  a  $G''$  na deformaci je uveden na Obr. 31, kde je srovnáno chování gelů s obsahem EL připravených s 1 a 0.5 % carbomeru, ve kterých byl přítomen glycerol. Z obrázku je zřejmé, že při obou koncentracích carbomeru převažuje elastický modul nad viskozitním a gely tedy vykazují převahu elastického chování, které se v použitém frekvenčním rozsahu výrazně nemění. Zároveň je ze závislosti viskozity na frekvenci zřejmé, že oba gely vykazují očekávané pseudoplastické chování. Srovnání reologického chování gelů pak prokázalo, že přídavek glycerolu do gelu neměl na jejich charakteristiky žádný vliv (graf není uveden).



Obrázek 31 Srovnání reologického chování gelů s obsahem EL a 10 % glycerolu připravených s 0.5 a 1 % carbomeru. Stanoveno při teplotě 25 °C

Drobné rozdíly byly pozorovány v reologickém chování gelu připraveného s 1 % carbomeru při teplotách 25 a 37 °C (Obrázek 32). Tyto rozdíly jsou zaznamenány pouze u viskozitního modulu, kdy při vyšších frekvencích dosahuje  $G''$  nižších hodnot svědčících o lepší tekutosti tohoto gelu při zvýšené teplotě. Z analýzy je však zřejmé, že námi připravené gely vykazují dobrou teplotní stabilitu, což je v souladu se závěry publikovanými Islam et al. (2004), kde autoři studovali chování carbomerových gelů [78].





Obrázek 32 Vliv teploty (25 a 37 °C) na reologické chování gelů s obsahem EL a glycerolu

### 9.5.2 Stanovení transdermální penetrace EL

Vybrané formulace EL ve formě carbomerových gelů byly podrobeny testu na schopnost transdermální penetrace s využitím aparatury Franzových difuzních komůrek a vzorku prasečí kůže ušního boltce. Pro samotné stanovení transdermální penetrace byly použity vozky kůže s hodnotami TEWL pod  $9 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$ , což odpovídá velmi dobrému stavu kůže. Výsledky měření tak nejsou zkresleny případnou porušenou bariérou kůže, která by mohla vést k vyšší propustnosti testovaných látek

Při testu transdermální penetrace byl sledován zejména vliv složení daného nosiče na schopnost prostupu CBD do kůže ve srovnání s referencí představenou prostým ethanolickým roztokem CBD. Koncentrace aktivní látky v jednotlivých extraktech byla stanovována pomocí HPLC s následným výpočtem s využitím rovnice kalibrační přímky z kapitoly 9.3.5. Výsledky stanovených koncentrací a návratnost jsou uvedeny jako průměr ze dvou paralelních stanovení v Tabulce 14.

Tabulka 14 Naměřené koncentrace CBD a jeho návratnost v jednotlivých vrstvách kůže po testu transdermální penetrace u formulace EL, která se liší obsahem glycerolu

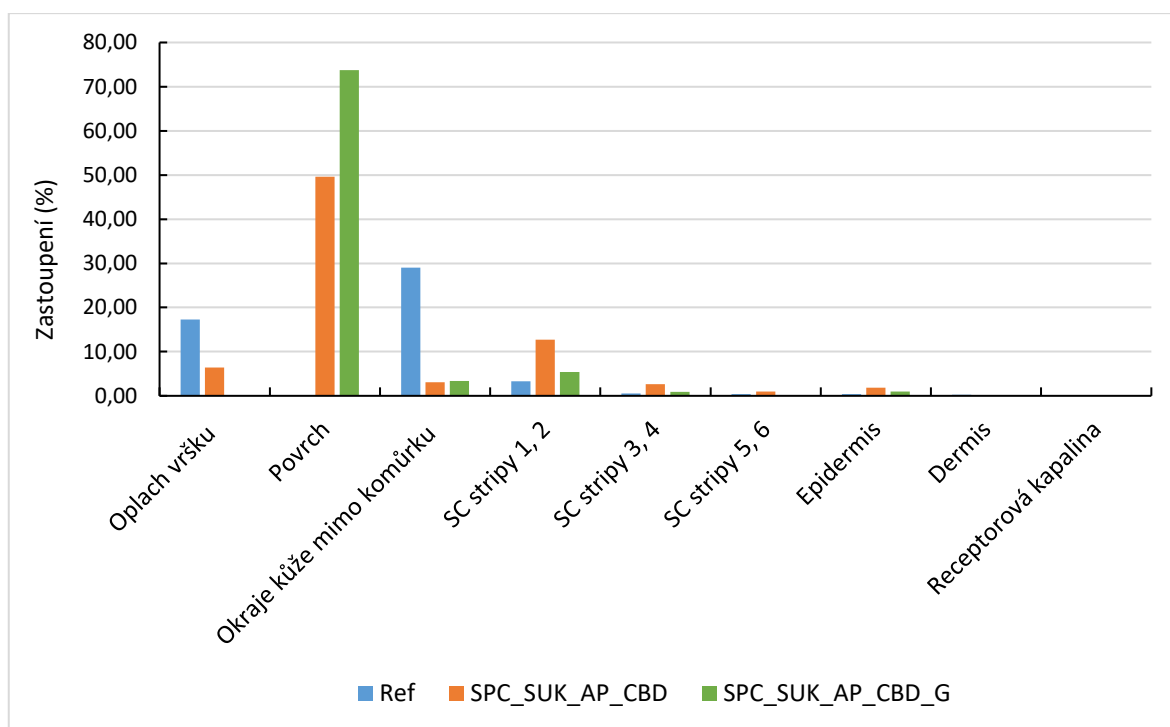
Část pro přípravu extraktu	CBD c (µg/ml)		
	Ref	SPC_SUK_AP_CBD	SPC_SUK_AP_CBD_G
<b>Oplach donorové části</b>	17,30	6,41	0,08
<b>Povrch</b>	0,10	49,61	73,75
<b>Okraje kůže mimo komůrku</b>	29,06	3,06	3,38
<b>SC stripy 1, 2</b>	3,28	12,73	5,38
<b>SC stripy 3, 4</b>	0,50	2,61	0,92
<b>SC stripy 5, 6</b>	0,43	0,98	0,19
<i>Epidermis</i>	0,41	1,85	0,96
<i>Dermis</i>	0,27	0,08	0,08
<b>Receptorová kapalina</b>	0,00	0,00	0,00
<b>Návratnost (%)</b>	51	77	85

Z naměřených výsledků je patrné, že konkrétní složení formulace má vliv na prostup CBD kožním vzorkem. Nejvyšší procentuální zastoupení CBD u obou gelových formulací EL, ať už s obsahem glycerolu nebo bez, bylo přítomno v nevstřebaném zbytku gelu na povrchu jako je patrné na Obrázku 33. K setrvávání většího množství nevstřebaného gelu na povrchu kožního vzorku by pravděpodobně nedocházelo při zamýšleném reálném uživatelském použití, kde by docházelo k aplikaci formulace vtíráním, což by vedlo k lepšímu vstřebávání většího množství CBD. V tomto případě byla však gelová formulace pouze lehce rozetřena kličkou po povrchu kožního vzorku a měla tak tendenci na povrchu setrávat.

Dále bylo významné množství CBD z obou typů formulací EL stanoveno v prvních dvou stripech ze *Stratum corneum*. U formulací bez obsahu glycerolu docházelo k mírnému zlepšení prostupu CBD oproti formulacím s obsahem glycerolu. To je patrné např. i u pronikání do *Epidermis*, kde byla zaznamenáno téměř dvakrát větší zastoupení CBD u formulací bez glycerolu (2 %) ve srovnání s glycerolem obsaženým gelem (1 %).

Nízké koncentrace byly u obou formulací naměřené také v *Dermis*. Do receptorové kapaliny již neprocházelo žádné CBD ani u jedné z formulací. Návratnost CBD byla u vzorků gelů EL 77 % a 85 %, což je nižší hodnota ve srovnání s požadovanou návratností  $100 \pm 10$  % uváděnou v pokynech OECD 428.

V případě reference bylo zaznamenáno největší množství CBD 29 % v okrajích kůže mimo komůrku (viz. Obrázek 33). Referencí byl ethanolický roztok CBD, který zřejmě umožňoval difundování aktivní látky do okrajů kožního vzorku, které nebyly omývány receptorovou kapalinou. Významné množství CBD bylo stanoveno také v oplachu donorové části komůrek, kde pravděpodobně docházelo k zachycení části odpařovaného referenčního vzorku. Ačkoliv v tomto případě nebyla aktivní látka zapouzdřena do vezikul s obsahem TC, které by měly usnadňovat proces prostupu kůží, pronikalo odtud CBD až do vrstvy *Dermis*. To je pravděpodobně vyvoláno schopností přítomného ethanolu působit jako zesilovač penetrace. Návratnost CBD z aplikované dávky činila pouhých 51 %, což neodpovídá požadované návratnosti uvedené v pokynech OECD 428



Obrázek 33 Procentuální zastoupení CBD v jednotlivých frakcích kožního vzorku po testu transdermální penetrace u vybraných formulací ve srovnání s referencí

Farmaceuticky aktivní látky s vysokým lipofilním charakterem, jakou je i CBD, mají tendenci se přednostně rozdělovat do rohové vrstvy než do hlubších vrstev kůže a systémového oběhu, což omezuje jejich pasivní difuzi. Za účelem řešení tohoto problému je při formulaci transdermálních formulací využíváno aplikace chemických zesilovačů penetrace, kterými lze usnadnit prostup CBD transdermální cestou. Jako vhodná strategie je taktéž navrhována jejich enkapsulace do nanonosičových systémů [79].

Khabir et al. (2023) ve své studii dospěli k podobným výsledkům při testu transdermální penetrace volného a enkapsulovaného CBD do PVA filmů. Vyšší koncentrace CBD byly naměřeny ve vrstvě *Stratum corneum*. Přičemž systém s CBD zapouzdřeným v PVA filmu vykazoval lepší prostupnost než čisté CBD. Dále byla prokázána přítomnost CBD ve vrstvě *dermis*, ale v koncentracích nižších než terapeuticky relevantních. Do receptorové kapaliny pak nepronikalo již žádné CBD [80].

Ačkoliv byla v námi připravených formulacích aplikována jak strategie doručování CBD pomocí nanonosičů EL s využitím EA SUK, který je samotný taktéž hodnocen jako enhancer penetrace [75] a do formulace byl zařazen i akcelerátor penetrace TC, nedocházelo k příliš efektivnímu prostupu CBD kožním vzorkem. Pro zlepšení prostupu CBD enkapsulovaného do EL by bylo zřejmě potřeba upravit složení gelové matrice, ve které byla aktivní látka aplikována. Výsledky testů totiž ukazují, že použitá matrice carbomerového gelu znesnadňovala prostup formulace z povrchu do kožního vzorku do hlubších vrstev kůže.

## ZÁVĚR

Diplomová práce je soustředěna na problematiku elastických lipozomů se zaměřením na stanovení vlivu jejich složení na vlastnosti, mechanismus prostupu vezikul kůží a jejich využití v oblasti farmaceutické i kosmetické. Pozornost je rovněž věnována kanabidiolu (CBD) a vlivu enkapsulační strategie na jeho stabilitu a biologickou dostupnost.

Praktická část se soustředila na přípravu elastických lipozomů s enkapsulovaným CBD a charakterizaci jejich fyzikálně chemických vlastností, jako je morfologie, velikost vezikul, index polydisperzity a zeta potenciál. Sledována byla rovněž schopnost připravených formulací zachovávat stabilitu v čase. U vybraných formulací byla taktéž posouzena enkapsulační účinnost EL pro CBD. Pomocí testu zhášení ABTS radikálů byla ověřena antioxidační aktivita EL a formulace byly podrobeny testu *in vitro* cytotoxicity na buněčné linii myších embryonálních fibroblastů s využitím MTT testu. Za účelem optimalizace topické aplikace byly vybrané formulace převedeny na formu carbomerového gelu. Ty byly charakterizovány z reologického hlediska a podrobeny *ex vivo* testu transdermální penetrace na prasečí kůži.

V rámci práce byly připraveny formulace EL z lipidu SPC a EA v poměru 90:10 (w/w) metodou hydratace tenkého filmu. Jako EA byly použity TW80 a SUK. Enkapsulovanou terapeuticky aktivní látku představoval CBD v koncentraci 1 mg/ml. Stabilita aktivní látky byla dále podpořena přidavkem sekundárního antioxidantu AP nebo TA. Součástí hydratačního roztoku byl rovněž zesilovač penetrace TC použitý za účelem usnadnění prostupu vezikul kůží pro zamýšlené transdermální doručování CBD.

Výsledky analýzy formulací EL provedených ihned po přípravě prokázaly zejména vliv konkrétního složení vezikul na jejich vlastnosti. Byl pozorován jen mírný vliv použitého typu EA (SUK nebo TW80) a pomocného antioxidantu (AP nebo TA) na velikost vezikul, kde systém s SUK\_TA poskytoval nejmenší vezikuly ( $\sim 103 \pm 2$  nm), a naopak k největším vezikulám ( $152 \pm 4$  nm) vedla kombinace TW80\_AP. Co se týká polydisperzity (hodnota PDI), byl zaznamenán mírný vliv přidaného antioxidantu, kde byly patrné užší distribuce u EL s obsahem AP ( $PDI < 0,26$ ) ve srovnání s EL s obsahem TA ( $PDI < 0,29$ ). Signifikantní vliv složení byl pozorovaný u zeta potenciálu, kde jeho hodnotu nejvíce ovlivňovala přítomnost podpůrného antioxidantu. Formulace EL s obsahem TA dosahovaly nižších hodnot ZP a to  $-5$  a  $-2 \pm 2$  mV a formulace s obsahem AP výrazně vyšších hodnot  $-25$  a  $-27 \pm 2$  mV.

Výsledky testu enkapsulační účinnosti prokázaly velmi dobrou schopnost všech připravených systémů EL efektivně enkapsulovat aktivní látku CBD, kde se míra EE blížila 100 %. Schopnosti zapouzdření velkého množství aktivní látky zřejmě přispívá elastický charakter membrány vezikul jako důsledek přítomnosti inkorporovaného aktivátoru hran (SUK/, TW80).

Z hlediska stability bylo na základě sledování charakteristik velikosti vezikul, PDI a zeta potenciálu po dobu skladování 4 týdnů (při 4 °C) možné označit všechny připravené formulace za stabilní. Mírně zhoršenou stabilitu s ohledem na EE pro CBD v čase vykazovaly formulace o složení SUK\_TA, kde docházelo po 2 týdnech k 30 % ztrátě EE.

Vysoký antioxidační potenciál připravených formulací byl ověřen pomocí ABTS testu. Bylo potvrzeno, že již formulace EL pouze s obsahem CBD vykazují dobrou schopnost zhášet volné radikály (> 85 %). Přítomnost pomocných antioxidantů (AP, TA) pak jen vedla k synergickému účinku schopnosti inhibice radikálů a tyto formulace vykazovaly více než 90% schopnost zhášení ABTS•.

Cytotoxický účinek vůči buňkám myších embryonálních fibroblastů vykazovaly všechny studované formulace EL s koncentrací CBD vyšší než 10 µg/ml. Na cytotoxicitu mělo rovněž vliv složení membrány EL, kde obsah EA TW80 vykazoval mírnější cytotoxicitu ve srovnání s formulacemi s obsahem SUK.

Vybrané formulace EL, začleněné do carbomerového gelu byly podrobeny testu transdermální penetrace. Bylo zjištěno, že u všech formulací setrvalo většího množství gelu na povrchu kožního vzorku a gelová matrice tak zřejmě znesnadňovala prostup EL kůží. U všech testovaných formulací pronikal CBD nejdále do vrstvy *dermis*, ale to v koncentracích tak nízkých (< 0,3 %), že je nelze považovat za farmaceuticky relevantní. Rovněž návratnost CBD z aplikované dávky (< 90 %) nebyla ani u jedné z testovaných formulací, dle OECD standardů, uspokojivá.

Výsledky diplomové práce ukazují, že EL mohou sloužit jako vhodné nosiče aktivních látek s dobrou enkapsulační účinností a schopností prodlužovat stabilitu systému ochranou zapouzdřené aktivní látky vůči degradaci. Z hlediska vhodnosti systému pro transdermální doručování CBD bude do budoucna potřebná optimalizace složení formulací, a především gelové matrice.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] GUIMARÃES, Diana; CAVACO-PAULO, Artur a NOGUEIRA, Eugénia. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, roč. 601. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>. [cit. 2024-05-03].
- [2] NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Heliyon*. 2022, roč. 8, č. 5. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>. [cit. 2024-05-03].
- [3] JARA-QUIJADA, Erick; PÉREZ-WON, Mario; TABILO-MUNIZAGA, Gipsy; LEMUS-MONDACA, Roberto; GONZÁLEZ-CAVIERES, Luis et al. Liposomes Loaded with Green Tea Polyphenols—Optimization, Characterization, and Release Kinetics Under Conventional Heating and Pulsed Electric Fields. Online. *Food and Bioprocess Technology*. 2024, roč. 17, č. 2, s. 396-408. ISSN 1935-5130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03136-8>. [cit. 2024-05-03].
- [4] BHUIMALI, Mitali; MUNSHI, Sunya; HAPA, Kunali; KADU, Pramod K. a KALE, Pravin P. Evaluation of liposomes for targeted drug delivery in lung cancer treatment. Online. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2024, roč. 73, č. 5, s. 395-404. ISSN 0091-4037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2163639>. [cit. 2024-05-03].
- [5] DYMEK, Michał a SIKORA, Elżbieta. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – the current state. Online. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022, roč. 309. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757>. [cit. 2024-05-03].
- [6] LIU, Lijun; ZHAO, Wenbin; MA, Qingming; GAO, Yang; WANG, Weijiang et al. Functional nano-systems for transdermal drug delivery and skin therapy. Online. *Nanoscale Advances*. 2023, roč. 5, č. 6, s. 1527-1558. ISSN 2516-0230. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D2NA00530A>. [cit. 2024-05-03].
- [7] TOUTI, Rita; NOUN, Manale; GUIMBERTEAU, Florence; LECOMTE, Sophie a FAURE, Chrystel. What is the fate of multi-lamellar liposomes of controlled size, charge and elasticity in artificial and animal skin? Online. *European Journal of Pharmaceutics*

- and Biopharmaceutics*. 2020, roč. 151, s. 18-31. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.03.017>. [cit. 2024-05-03].
- [8] AKRAM, Muhammad Waseem; JAMSHAIID, Humzah; REHMAN, Fiza Ur; ZAEEM, Muhammad; KHAN, Jehan zeb et al. Transfersomes: a Revolutionary Nanosystem for Efficient Transdermal Drug Delivery. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2022, roč. 23, č. 1. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02166-9>. [cit. 2024-05-03].
- [9] HUSSAIN, Afzal; SINGH, Sima; SHARMA, Dinesh; WEBSTER, Thomas; SHAFAT, Kausar et al. Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, roč. 12, s. 5087-5108. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S138267>. [cit. 2024-05-03].
- [10] SOUTO, Eliana B.; MACEDO, Ana S.; DIAS-FERREIRA, João; CANO, Amanda; ZIELIŃSKA, Aleksandra et al. Elastic and Ultradeformable Liposomes for Transdermal Delivery of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 18. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22189743>. [cit. 2024-05-03].
- [11] CARITÁ, Amanda C.; RESENDE DE AZEVEDO, Jacqueline; CHEVALIER, Yves; ARQUIER, Delphine; BURI, Marcus V. et al. Elastic cationic liposomes for vitamin C delivery: Development, characterization and skin absorption study. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, roč. 638. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122897>. [cit. 2024-05-03].
- [12] NAYAK, D, TIPPAVAJHALA, VK. A Comprehensive Review on Preparation, Evaluation and Applications of Deformable Liposomes. Online, *Iran J Pharm Res*. 2021 roč. Winter;20(1):186-205. PMID: 34400952; PMCID: PMC8170744. Dostupné z: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112878.13997>. [cit. 2024-05-03].
- [13] SAPKOTA, Rachana a DASH, Alekha K. Liposomes and transfersomes: a breakthrough in topical and transdermal delivery. Online. *Therapeutic Delivery*. 2021, roč. 12, č. 2, s. 145-158. ISSN 2041-5990. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0122>. [cit. 2024-05-04].
- [14] OPATHA, Shakthi Apsara Thejani; TITAPIWATANAKUN, Varin a CHUTOPRAPAT, Romchat. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2020, roč. 12, č. 9.



- ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855>. [cit. 2024-05-04].
- [15] MATHAROO, Namrata; MOHD, Hana a MICHNIAK-KOHN, Bozena. Transferosomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. Online. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024, roč. 16, č. 1. ISSN 1939-5116. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/wnan.1918>. [cit. 2024-05-04].
- [16] DAS, Biswarup; NAYAK, Amit Kumar a MALLICK, Subrata. Transferosomes: a novel nanovesicular approach for drug delivery. Online. In: *Systems of Nanovesicular Drug Delivery*. Elsevier, 2022, s. 103-114. ISBN 9780323918640. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91864-0.00022-X>. [cit. 2024-05-04].
- [17] MKAM TSENGAM, Igor Kevin; OMAROVA, Marzhana; KELLEY, Elizabeth G.; MCCORMICK, Alon; BOTHUN, Geoffrey D. et al. Transformation of Lipid Vesicles into Micelles by Adding Nonionic Surfactants: Elucidating the Structural Pathway and the Intermediate Structures. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2022, roč. 126, č. 11, s. 2208-2216. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c09685>. [cit. 2024-05-04].
- [18] SIMRAH; HAFEEZ, Abdul; USMANI, Shazia Afzal a IZHAR, Mishkaat Parveen. Transfersome, an ultra-deformable lipid-based drug nanocarrier: an updated review with therapeutic applications. Online. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2024, roč. 397, č. 2, s. 639-673. ISSN 0028-1298. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02670-8>. [cit. 2024-05-04].
- [19] MARZOLA CORONEL, M.B.; FRAENZA, C.C. a ANOARDO, E. On the deformability of additivated phosphatidylcholine liposomes: Molecular dynamic regimes and membrane elasticity. Online. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2023, roč. 252. ISSN 00093084. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2023.105290>. [cit. 2024-05-04].
- [20] CHAURASIYA, Priyanka; GANJU, Eisha; UPMANYU, Neeraj; RAY, Sudhir Kumar a JAIN, Prabhat. Transfersomes: a novel technique for transdermal drug delivery. Online. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019, roč. 9, č. 1, s. 279-285. ISSN 2250-1177. Dostupné z: <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i1.2198>. [cit. 2024-05-04].
- [21] KUCUK, N, PRIMOZIC, M, KNEZ, Z, LEITGEB, M. Incorporation of Biologically Active Ingredient Gallic Acid Into Nano-scale Lipid Vesicles. *Chemical Engineering*

- Transactions. Online. 2023 roč. 100 s.517-522. Dostupné z: <https://www.cetjournal.it/index.php/cet/article/view/CET23100087>. [cit. 2024-05-04].
- [22] WAHI, Nikhil; KAUR, Gursimran a NARANG, Jasjeet Kaur. Transferosomes - A Lipid Based Vesicular Carrier with Versatile Applications. Online. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2023, roč. 81, č. 1. ISSN 0976044X. Dostupné z: <https://doi.org/10.47583/ijpsr.2023.v81i01.030>. [cit. 2024-05-04].
- [23] KIRANJEET, Kaur, GURPREET, Kaur, HANUM, Sharma, RAVIKA, Nanda and KAURA, Narang Jasjeet. "Current Status and Future Perspective of Transferosomes-an Effective Vesicular Carrier for Delivery of Drugs". Online. *Journal of Coastal Life Medicine* 2022, roč. 10, č.3, s. 325-38. Dostupné z: <https://www.jclmm.com/index.php/journal/article/view/199>. [cit. 2024-05-04].
- [24] PADMA PRASHANTHINI, V.; SIVARAMAN, Shanmugapriyan; KATHIRVELU, Parimala; SHANMUGASUNDARAM, Jaikumar; SUBRAMANIAN, Viswanathan et al. Transferosomal gel for transdermal delivery of insulin: Formulation development and ex vivo permeation study. Online. *Intelligent Pharmacy*. 2023, roč. 1, č. 4, s. 212-216. ISSN 2949866X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.07.001>. [cit. 2024-05-04].
- [25] ABDALLAH, Marwa H.; ABU LILA, Amr S.; SHAWKY, Seham Mohammed; ALMANSOUR, Khaled; ALSHAMMARI, Farhan et al. Experimental Design and Optimization of Nano-Transfersomal Gel to Enhance the Hypoglycemic Activity of Silymarin. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 3. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14030508>. [cit. 2024-05-04].
- [26] NACHNANI, Rahul; RAUP-KONSAVAGE, Wesley M. a VRANA, Kent E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. Online. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2021, roč. 376, č. 2, s. 204-212. ISSN 0022-3565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000340>. [cit. 2024-05-04].
- [27] SHEIKH, Nafiz K, DUA, Anterpreet. "Cannabinoids." Online. *StatPearls Publishing*, 2023. PMID: 32310522. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556062/>. [cit. 2024-05-04].

- [28] KABA, Arijeta a RAY, Sidhartha D. Cannabinoids. Online. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, 2023. ISBN 9780128012383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00380-8>. [cit. 2023-10-22].
- [29] RADWAN, Mohamed M.; CHANDRA, Suman; GUL, Shahbaz a ELSOHLY, Mahmoud A. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 9. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>. [cit. 2023-10-22].
- [30] RAUP-KONSAVAGE, Wesley M. Special Issue: Therapeutic Potential for Cannabis and Cannabinoids. Online. *Biomedicines*. 2023, roč. 11, č. 3. ISSN 2227-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030902>. [cit. 2024-05-04].
- [31] ANTUNES, Mónica; BARROSO, Mário a GALLARDO, Eugenia. Analysis of Cannabinoids in Biological Specimens: An Update. Online. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023, roč. 20, č. 3. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph20032312>. [cit. 2024-05-04].
- [32] MEAH, Farah; LUNDHOLM, Michelle; EMANUELE, Nicholas; AMJED, Hafsa; POKU, Caroline et al. The effects of cannabis and cannabinoids on the endocrine system. Online. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2022, roč. 23, č. 3, s. 401-420. ISSN 1389-9155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09682-w>. [cit. 2024-05-04].
- [33] ROCK, Erin M. a PARKER, Linda A. Constituents of Cannabis Sativa. Online. In: MURILLO-RODRIGUEZ, Eric; PANDI-PERUMAL, S. R. a MONTI, Jaime M. (ed.). *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2021, s. 1-13. ISBN 978-3-030-57368-3. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_1). [cit. 2024-05-04].
- [34] ASSADPOUR, Elham; REZAEI, Atefe; DAS, Sabya Sachi; KRISHNA RAO, Balaga Venkata; SINGH, Sandeep Kumar et al. Cannabidiol-Loaded Nanocarriers and Their Therapeutic Applications. Online. *Pharmaceuticals*. 2023, roč. 16, č. 4. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph16040487>. [cit. 2024-05-04].
- [35] LEGARE, Christopher A.; RAUP-KONSAVAGE, Wesley M. a VRANA, Kent E. Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based

- Pharmaceuticals. Online. *Pharmacology*. 2022, roč. 107, č. 3-4, s. 131-149. ISSN 0031-7012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000521683>. [cit. 2024-05-04].
- [36] ATALAY, Sinemyiz; JAROCKA-KARPOWICZ, Iwona a SKRZYDLEWSKA, Elzbieta. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. Online. *Antioxidants*. 2020, roč. 9, č. 1. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>. [cit. 2024-05-04].
- [37] FALCÃO, Maria Alice Pimentel; DE SOUZA, Lucas Santos; DOLABELLA, Silvio Santana; GUIMARÃES, Adriana Gibara a WALKER, Cristiani Isabel Banderó. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, roč. 25, č. 35, s. 35015-35026. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3399-7>. [cit. 2024-05-04].
- [38] FERREIRA, Inês; LOPES, Carla M. a AMARAL, Maria Helena. Treatment Advances for Acne Vulgaris: The Scientific Role of Cannabinoids. Online. *Cosmetics*. 2024, roč. 11, č. 1. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics11010022>. [cit. 2024-05-04].
- [39] BASWAN, Sudhir M; KLOSNER, Allison E; GLYNN, Kelly; RAJGOPAL, Arun; MALIK, Kausar et al. Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. Online. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2020, roč. 13, s. 927-942. ISSN 1178-7015. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>. [cit. 2024-05-04].
- [40] STASIULEWICZ, Adam; ZNAJDEK, Katarzyna; GRUDZIENÍ, Monika; PAWIŃSKI, Tomasz a SULKOWSKA, Joanna I. A Guide to Targeting the Endocannabinoid System in Drug Design. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 8. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21082778>. [cit. 2024-05-04].
- [41] MARTINS, Ana M.; GOMES, Ana L.; VILAS BOAS, Inês; MARTO, Joana a RIBEIRO, Helena M. Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: A Timely Review. Online. *Pharmaceuticals*. 2022, roč. 15, č. 2. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15020210>. [cit. 2024-05-04].
- [42] PANDEY, Khushboo a HODA, Wasimul. Cannabinoids in anesthesia and chronic pain: Where do we stand? Online. *Saudi Journal of Anaesthesia*. 2024, roč. 18, č. 1, s.

- 100-104. ISSN 1658-354X. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/sja.sja\\_710\\_23](https://doi.org/10.4103/sja.sja_710_23). [cit. 2024-05-04].
- [43] FONSECA, Bruno M. a REBELO, Irene. Cannabis and Cannabinoids in Reproduction and Fertility: Where We Stand. Online. *Reproductive Sciences*. 2022, roč. 29, č. 9, s. 2429-2439. ISSN 1933-7191. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00588-1>. [cit. 2024-05-05].
- [44] KOSOVIĆ, Ema; SÝKORA, David a KUCHAR, Martin. Stability Study of Cannabidiol in the Form of Solid Powder and Sunflower Oil Solution. Online. *Pharmaceutics*. 2021, roč. 13, č. 3. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030412>. [cit. 2024-05-05].
- [45] PAGANO, Cristina; NAVARRA, Giovanna; COPPOLA, Laura; AVILIA, Giorgio; BIFULCO, Maurizio et al. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23063344>. [cit. 2024-05-05].
- [46] ARAÚJO, Mauro; ALMEIDA, Mauro Brito a ARAÚJO, Luiza Lamartine Nogueira. The cannabinoids mechanism of action: an overview. Online. *Brazilian Journal Of Pain*. 2023, roč. 6. ISSN 25950118. Dostupné z: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20230028-en>. [cit. 2024-05-05].
- [47] PERUCCA, Emilio. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Hard Evidence at Last? Online. *Journal of Epilepsy Research*. 2017, roč. 7, č. 2, s. 61-76. ISSN 2233-6249. Dostupné z: <https://doi.org/10.14581/jer.17012>. [cit. 2024-05-05].
- [48] CHAYASIRISOBHON, Sirichai. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. Online. *The Permanente Journal*. 2021, roč. 25, č. 1, s. 1-3. ISSN 1552-5775. Dostupné z: <https://doi.org/10.7812/TPP/19.200>. [cit. 2024-05-05].
- [49] SIDERIS, Alexandra; LAUZADIS, Justas a KACZOCHA, Martin. The Basic Science of Cannabinoids. Online. *Anesthesia & Analgesia*. 2024, roč. 138, č. 1, s. 42-53. ISSN 0003-2999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000006472>. [cit. 2024-05-05].
- [50] FERNÁNDEZ-RUIZ, Javier; GALVE-ROPERH, Ismael; SAGREDO, Onintza a GUZMÁN, Manuel. Possible therapeutic applications of cannabis in the neuropsychopharmacology field. Online. *European Neuropsychopharmacology*. 2020,

- roč. 36, s. 217-234. ISSN 0924977X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.01.013>. [cit. 2024-05-05].
- [51] MANERA, Clementina a BERTINI, Simone. Cannabinoid-Based Medicines and Multiple Sclerosis. Online. In: MURILLO-RODRIGUEZ, Eric; PANDI-PERUMAL, S. R. a MONTI, Jaime M. (ed.). *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2021, s. 111-129. ISBN 978-3-030-57368-3. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_8). [cit. 2024-05-05].
- [52] GOLUB, Victoria a REDDY, D. Samba. Cannabidiol Therapy for Refractory Epilepsy and Seizure Disorders. Online. In: MURILLO-RODRIGUEZ, Eric; PANDI-PERUMAL, S. R. a MONTI, Jaime M. (ed.). *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2021, s. 93-110. ISBN 978-3-030-57368-3. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_7). [cit. 2024-05-05].
- [53] FRAGUAS-SÁNCHEZ, A.I.; FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A.; MARTIN-SABROSO, C. a TORRES-SUÁREZ, A.I. Stability characteristics of cannabidiol for the design of pharmacological, biochemical and pharmaceutical studies. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1150. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122188>. [cit. 2024-05-05].
- [54] SIDERIS, Alexandra a DOAN, Lisa V. An Overview of Cannabidiol. Online. *Anesthesia & Analgesia*. 2024, roč. 138, č. 1, s. 54-68. ISSN 0003-2999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000006584>. [cit. 2024-05-05].
- [55] GRIFONI, Lucia; VANTI, Giulia; DONATO, Rosa; SACCO, Cristiana a BILIA, Anna Rita. Promising Nanocarriers to Enhance Solubility and Bioavailability of Cannabidiol for a Plethora of Therapeutic Opportunities. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 18. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27186070>. [cit. 2024-05-05].
- [56] REDDY, T. Srinivasa; ZOMER, Roby a MANTRI, Nitin. Nanoformulations as a strategy to overcome the delivery limitations of cannabinoids. Online. *Phytotherapy Research*. 2023, roč. 37, č. 4, s. 1526-1538. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.7742>. [cit. 2024-05-05].

- [57] DEMISLI, Sotiria; GALANI, Eleni; GOULIELMAKI, Maria; KYRILIS, Fotios L.; ILIĆ, Tanja et al. Encapsulation of cannabidiol in oil-in-water nanoemulsions and nanoemulsion-filled hydrogels: A structure and biological assessment study. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2023, roč. 634, s. 300-313. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.12.036>. [cit. 2024-05-05].
- [58] SHILO-BENJAMINI, Yael; CERN, Ahuva; ZILBERSHEID, Daniel; HOD, Atara; LAVY, Eran et al. A Case Report of Subcutaneously Injected Liposomal Cannabidiol Formulation Used as a Compassion Therapy for Pain Management in a Dog. Online. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022, roč. 9. ISSN 2297-1769. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.892306>. [cit. 2024-05-05].
- [59] MOQEJWA, Thope; MARIMUTHU, Thashree; KONDIAH, Pierre P. D. a CHOONARA, Yahya E. Development of Stable Nano-Sized Transfersomes as a Rectal Colloid for Enhanced Delivery of Cannabidiol. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 4. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040703>. [cit. 2024-05-05].
- [60] FRANCKE, Nadine Monika; SCHNEIDER, Frederic; BAUMANN, Knut a BUNJES, Heike. Formulation of Cannabidiol in Colloidal Lipid Carriers. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 5. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26051469>. [cit. 2024-05-05].
- [61] MAZHAR, Danish; HAQ, Naveed Ul; ZEESHAN, Mahira; AIN, Qurat Ul; ALI, Hussain et al. Preparation, characterization, and pharmacokinetic assessment of metformin HCl loaded transfersomes co-equipped with permeation enhancer to improve drug bioavailability via transdermal route. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023, roč. 84. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104448>. [cit. 2024-05-05].
- [62] FRANZÈ, Silvia; ANGELO, Liliana; CASIRAGHI, Antonella; MINGHETTI, Paola a CILURZO, Francesco. Design of Liposomal Lidocaine/Cannabidiol Fixed Combinations for Local Neuropathic Pain Treatment. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 9. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091915>. [cit. 2024-05-05].
- [63] FU, Jingxin; ZHANG, Kunfeng; LU, Likang; LI, Manzhen; HAN, Meihua et al. Improved Therapeutic Efficacy of CBD with Good Tolerance in the Treatment of Breast

- Cancer through Nanoencapsulation and in Combination with 20(S)-Protopanaxadiol (PPD). Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 8. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081533>. [cit. 2024-05-05].
- [64] NASEER, Khulla; ALI, Salmann a QAZI, Javaria. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. Online. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2021, roč. 56, č. 2, s. 85-97. ISSN 0570-4928. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1738453>. [cit. 2024-05-05].
- [65] KOLLER, Thomas M.; RAUSCH, Michael H. a FRÖBA, Andreas P. Dynamic Light Scattering for the Measurement of Transport Properties of Fluids. Online. *International Journal of Thermophysics*. 2024, roč. 45, č. 4. ISSN 0195-928X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10765-024-03344-0>. [cit. 2024-05-05].
- [66] JIA, Zixian; LI, Jiantao; GAO, Lin; YANG, Dezheng a KANAIEV, Andrei. Dynamic Light Scattering: A Powerful Tool for In Situ Nanoparticle Sizing. Online. *Colloids and Interfaces*. 2023, roč. 7, č. 1. ISSN 2504-5377. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/colloids7010015>. [cit. 2024-05-05].
- [67] GEURINK, Lars; VAN TRICHT, Ewoud; VAN DER BURG, Debbie; SCHEPPINK, Gerard; PAJIC, Bojana et al. Sixteen capillary electrophoresis applications for viral vaccine analysis. Online. *ELECTROPHORESIS*. 2022, roč. 43, č. 9-10, s. 1068-1090. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elps.202100269>. [cit. 2024-05-05].
- [68] HEATH, George R.; KOTS, Ekaterina; ROBERTSON, Janice L.; LANSKY, Shifra; KHELASHVILI, George et al. Localization atomic force microscopy. Online. *Nature*. 2021, roč. 594, č. 7863, s. 385-390. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03551-x>. [cit. 2024-05-06].
- [69] CANO, Antonio; MAESTRE, Ana B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, Josefa a ARNAO, Marino B. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. Online. *Processes*. 2023, roč. 11, č. 1. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr11010185>. [cit. 2024-05-05].
- [70] WOŁOSIAK, Rafał; DRUŻYŃSKA, Beata; DEREWIKA, Dorota; PIECYK, Małgorzata; MAJEWSKA, Ewa et al. Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach.



- Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 1. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27010050>. [cit. 2024-05-05].
- [71] GHASEMI, Mahshid; TURNBULL, Tyron; SEBASTIAN, Sonia a KEMPSON, Ivan. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>. [cit. 2024-05-05].
- [72] LEWIS, Michael. Viscosity measurement. Online. In: *Food Process Engineering Principles and Data*. Elsevier, 2023, s. 81-93. ISBN 9780128211823. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821182-3.00025-X>. [cit. 2024-05-05].
- [73] *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*. Online. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD, 2004. ISBN 9789264071087. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>. [cit. 2024-05-05].
- [74] LOWRY, Gregory V.; HILL, Reghan J.; HARPER, Stacey; RAWLE, Alan F.; HENDREN, Christine Ogilvie et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. Online. *Environmental Science: Nano*. 2016, roč. 3, č. 5, s. 953-965. ISSN 2051-8153. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6EN00136J>. [cit. 2024-05-08].
- [75] TAVARES LUIZ, Marcela; DELELLO DI FILIPPO, Leonardo; CAROLINA ALVES, Renata; SOUSA ARAÚJO, Victor Hugo; LOBATO DUARTE, Jonatas et al. The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological barriers. Online. *European Polymer Journal*. 2021, roč. 142. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110129>. [cit. 2024-05-08].
- [76] DAWIDOWICZ, Andrzej L.; OLSZOWY-TOMCZYK, Małgorzata a TYPEK, Rafał. CBG, CBD,  $\Delta^9$ -THC, CBN, CBGA, CBDA and  $\Delta^9$ -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. Online. *Fitoterapia*. 2021, roč. 152. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104915>. [cit. 2024-05-08].
- [77] LI, Yuxi; WU, Qiangen; LI, Xilin; VON TUNGELN, Linda S.; BELAND, Frederick A. et al. In vitro effects of cannabidiol and its main metabolites in mouse and human Sertoli cells. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2022, roč. 159. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112722>. [cit. 2024-05-08].

- [78] ISLAM, Mohammad T.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, Naír; CIOTTI, Susan a ACKERMANN, Chrisita. Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. Online. *Pharmaceutical Research*. 2004, roč. 21, č. 7, s. 1192-1199. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000033006.11619.07>. [cit. 2024-05-08].
- [79] TIJANI, Akeemat O.; THAKUR, Divya; MISHRA, Dhruv; FREMPONG, Dorcas; CHUKWUNYERE, Umeh I. et al. Delivering therapeutic cannabinoids via skin: Current state and future perspectives. Online. *Journal of Controlled Release*. 2021, roč. 334, s. 427-451. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.005>. [cit. 2024-05-08].
- [80] KHABIR, Zahra; PARTALIS, Connie; PANCHAL, Jimit Vijay; DEVA, Anand; KHATRI, Aparajita et al. Enhanced Skin Penetration of Cannabidiol Using Organosilane Particles as Transdermal Delivery Vehicles. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 15, č. 3. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030798>. [cit. 2024-05-08].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ULV	Unilamelární vezikuly
MLV	Multilamelární vezikuly
SUV	Malé unilamelární vezikuly
LUV	Velké unilamelární vezikuly
GUV	Obrovské unilamelární vezikuly
EL	Elastické lipozomy
EA	Aktivátory hran
HLB	Hodnota hydrofilně lipofilní rovnováhy
NSAID	Nesteriodní protizánětlivá léčiva
THC	Tetrahydrokanabinol
CBD	Kanabidiol
CBN	Kannabinol
CBG	Kannabigerol
ECS	Endokanabinoidní systém
TF	Trasferozom
SPC	Směsný sojový fosfatidylcholin
AP	Ascorbyl palmitát
TA	Tocopheryl acetát
TW80	Tween 80
CHOL	Deoxycholát sodný
SUK	Sukcinát
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
TC	Transcutol
DEMI	Demineralizovaná voda
EE	Enkapsulační účinnost

ZP Zeta potenciál

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Obecná struktura lipozomu, upraveno podle [1].....	12
Obrázek 2 Průchod léčiva do kůže po topické aplikaci z různých systémů, upraveno podle [13].....	16
Obrázek 3: Struktura L- $\alpha$ fosfatidylcholin, upraveno podle [17].....	18
Obrázek 4 Struktura elastických lipozomů se zapouzdřenými léčivy. Na rozdíl od běžných lipozomů obsahují EL aktivátory hran, které jim propůjčují větší elasticitu, upraven podle [8].....	19
Obrázek 5 Proces přípravy elastických lipozomů pomocí metody hydratace tenkého lipidového filmu, upraveno podle [21] .....	24
Obrázek 6: Aplikace elastických lipozomů, Upraveno podle [23].....	31
Obrázek 7: Chemická struktura THC upraveno podle [37].....	32
Obrázek 8: struktura CBD převzato z [36] .....	37
Obrázek 9 Příprava formulace elastických lipozomů metodou hydratace tenkého lipidového filmu na vakuové odparce.....	49
Obrázek 10 Tenký lipidový film utvořený na stěnách baňky po odpaření organické fáze .	49
Obrázek 11 Příprava kožních vzorků.....	58
Obrázek 12 Vzhled disperzí EL, s obsahem aktivátorů CHOL, TW80, SUK a 10% obsahem TC, bez aktivní látky .....	61
Obrázek 13 Vliv typu (TW80, SUK, CHOL), množství (5, 10, 20 %) EA a množství transkutolu TC (1, 10 %) na velikost částic EL .....	62
Obrázek 14 Intenzitní distribuce velikosti vezikul EL s 5% obsahem EA TW80 a 1 % TC, ihned po přípravě, výsledek 3 měření .....	63
Obrázek 15 Intenzitní distribuce velikosti vezikul EL s 10% obsahem EA TW80 a 1 % TC, ihned po přípravě, výsledek 3 měření .....	63
Obrázek 16 Projev nestability u formulace EL s obsahem EA CHOL.....	64
Obrázek 17 FTIR-ATR spektrum prosté aktivní látky CBD.....	65
Obrázek 18 FTIR-ATR spektrum CBD dodávané výrobcem Lipomed k látce CBD .....	65

Obrázek 19 Vzhled formulací EL s enkapsulovanou aktivní látkou CBD a EA (TW80 nebo SUK) a antioxidanty (TA nebo AP), ihned po přípravě .....	68
Obrázek 20 Nahoře – 2D rekonstrukce a profilový řez 3D snímkem EL SPC_TW80_AP pomocí softwaru Gwyddion. Dole –3D rekonstrukce morfologie vezikul EL SPC_TW80_AP .....	69
Obrázek 21 Kalibrační přímka pro CBD .....	70
Obrázek 22 Vzhled vybraných formulací EL po 4 týdnech skladování při 4°C. ....	71
Obrázek 23 Změny v hodnotách velikosti vezikul vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů .....	72
Obrázek 24: Změny v intenzitní distribuci velikosti částic v průběhu 4 týdnů u vybrané formulace EL SUK_AP .....	73
Obrázek 25 Změny v hodnotách PDI u vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů .....	73
Obrázek 26 Změny zeta potenciálu u vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů .....	74
Obrázek 27 Enkapsulační účinnost vybraných formulací EL v průběhu 4 týdnů .....	75
Obrázek 28 Test antioxidantní aktivity ABTS u vybraných formulací ve srovnání s referencí .....	76
Obrázek 29 Relativní životaschopnost buněk myších embryonálních fibroblastů v závislosti na koncentraci CBD ve formulaci EL s obsahem EA TW80 a antioxidanty (AP nebo TA). Údaje jsou vyjádřeny jako průměr ± SD .....	78
Obrázek 30 : Relativní životaschopnost buněk myších embryonálních fibroblastů v závislosti na koncentraci CBD ve formulaci EL s obsahem EA SUK a antioxidanty (AP nebo TA). Údaje jsou vyjádřeny jako průměr ± SD .....	79
Obrázek 31 Srovnání reologického chování gelů s obsahem EL a 10 % glycerolu připravených s 0.5 a 1 % karbomeru. Stanoveno při teplotě 25 °C .....	80
Obrázek 32 Vliv teploty (25 a 37 °C) na reologické chování gelů s obsahem EL a glycerolu .....	81
Obrázek 33 Procentuální zastoupení CBD v jednotlivých frakcích kožního vzorku po testu transdermální penetrace u vybraných formulací ve srovnání s referencí .....	83

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Přehled základních složek elastických lipozomů .....	18
Tabulka 2 Příklady používaných aktivátorů hran nesoucích náboj a jejich HLB hodnoty, upraveno podle [9] .....	21
Tabulka 3 Aktivátory hran z kategorie neionických povrchově aktivních látek a jejich HLB hodnoty , upraveno podle [9] .....	22
Tabulka 4 Složení elastických lipozomů z preformulační části studie (SPC – sójový fosfatidylcholin, .....	50
Tabulka 5 Složení elastických lipozomů z formulační části studie. ....	51
Tabulka 6 Koncentrační řada kalibračních roztoků .....	53
Tabulka 7 Složení gelových formulací (3 g) s obsahem elastických lipozomů.....	57
Tabulka 8 Složení formulací pro testování transdermální absorpce .....	59
Tabulka 9 Velikost vezikul a PDI u testovaných formulací EL SPC: EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5 mg .....	66
Tabulka 10 Naměřené hodnoty zeta potenciálu s přesností $\pm 2$ mV, u vybraných formulací EL SPC: EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5 mg.....	67
Tabulka 11 Naměřené hodnoty koncentrací CBD u formulace EL SPC: SUK 90:10, CBD 10 mg, antioxidant AP 5mg během testu opakovatelnosti extrakčního postupu .....	70
Tabulka 12 Enkapsulační účinnost vybraných systémů EL, SPC:EA 90:10, CBD 10 mg, antioxidant (TA nebo AP) 5mg .....	71
Tabulka 13 Schopnost formulací EL s enkapsulovaným CBD inhibovat volné radikály vyjádřena jako relativní inhibice (RI %).....	77
Tabulka 14 Naměřené koncentrace CBD a jeho návratnost v jednotlivých vrstvách kůže po testu transdermální penetrace u formulace EL, která se liší obsahem glycerolu .....	82

