

Transdermální penetrace aktivních látek z nosičů na bázi lipidů

Vendula Vágnerová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Vendula Vágnerová
Osobní číslo: T22117
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace: Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Transdermální penetrace aktivních látek z nosičů na bázi lipidů

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

V teoretické části zpracujete literární rešerši na zadané téma. Představte jednotlivé typy nosičů na bázi lipidů a blíže charakterizujte jejich vlastnosti. Představte rovněž metody vhodné pro stanovení transdermální penetrace aktivních látek kůží.

II. Praktická část

V praktické části připravte lipidové nosiče, např. liposomy, transferosomy a/nebo nanostrukturované lipidové nosiče s obsahem kanabidiolu. Přípravené vzorky charakterizujte vhodnými fyzikálně-chemickými metodami. Proveďte test transdermální absorpce připravených vzorků s využitím Franzových difuzních komůrek a srovnajte jejich transdermální penetraci. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Bartosova, L and Bajgar, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. Current medicinal chemistry (2012), 19 (27) , pp.4671-4677
2. Junaid, MSA; Tijani, AO; Puri, A; Banga, AK. In vitro percutaneous absorption studies of cannabidiol using human skin: Exploring the effect of drug concentration, chemical enhancers, and essential oils (2022), INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, Vol. 616, article number 121540
3. Lapteva, M; Barros, JF and Kalia, YN. Cutaneous Delivery and Biodistribution of Cannabidiol in Human Skin after Topical Application of Colloidal Formulations. PHARMACEUTICS (2024), 16 (2)
4. Salau, O; Bagde, A; Singh, M. Enhancement of transdermal permeation of cannabinoids and their pharmacodynamic evaluation in rats. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (2022), Vol. 624, article number 122016

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

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou 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 mohu užít své dílo – bakalářskou 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 bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské 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 bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá dermální aplikací kanabidiolu (CBD) pomocí lipidových nosičů, konkrétně transferosomů, liposomů a nanostrukturovaných lipidových nosičů. V teoretické části jsou porovnány studované typy lipidových nosičů, jejich výhody, nevýhody a způsob přípravy. Dále je představena aktivní složka CBD a její funkce v organismu. Závěrečná část literárního přehledu se zabývá studiemi, které zkoumaly řešenou problematiku. Praktická část se věnuje přípravě lipidových nosičů a testování jejich velikosti, zeta potenciálu a stability. V konečné části práce je na modelu prasečí kůže srovnána transdermální penetrace CBD enkapsulovaného do nosičů.

Klíčová slova: lipidové nosiče, transdermální penetrace, CBD

ABSTRACT

The bachelor's thesis focuses on dermal application of cannabidiol (CBD) using lipid-based carriers, specifically transferosomes, liposomes, and nanostructured lipid carriers. The theoretical part compares studied types of lipid carriers, their advantages, disadvantages, and methods of preparation. The active substance CBD and its function in the body is also discussed. The final part of the literature review deals with studies that have summarised the studied topic. The practical part deals with the preparation of lipid carriers and testing their size, zeta potential and stability. In the final section of the thesis, the transdermal penetration of CBD encapsulated in carriers is compared on a pig skin model.

Keywords: lipid carriers, transdermal penetration, CBD

Ráda bych v první řadě poděkovala vedoucí mé bakalářské práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za veškerou podporu, odborné vedení, cenné rady, strávený čas a trpělivost během zpracování práce.

Dále patří mé poděkování panu Ing. Adamu Srncovi za pomoc při zpracování experimentální části a cenné rady.

V neposlední řadě jsem vděčná rodině za podporu, motivaci a klidné zázemí po celou dobu studia.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK NA BÁZI LIPIDŮ	13
1.1 LIPOSOMY	13
1.2 TRANSFEROSOMY	15
1.3 TUHÉ LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE	16
1.4 NANOSTRUKTUROVANÉ LIPIDOVÉ ČÁSTICE	17
1.5 KUBOSOMY	18
2 KANABIDIOL JAKO AKTIVNÍ LÁTKA.....	19
3 DERMÁLNÍ PODÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK	21
3.1 PENETRACE LÁTEK KŮŽÍ.....	21
3.2 MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ DERMÁLNÍ PENETRACE	22
3.2.1 Fyzikální postupy	23
3.2.2 Chemické postupy	23
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
5 CÍL PRÁCE	28
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	29
6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	30
6.1 MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE POUŽITÉ V PRÁCI	30
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	30
7 METODIKA	32
7.1 PŘÍPRAVA TRANSFEROSOMŮ	32
7.2 PŘÍPRAVA LIPOSOMŮ.....	33
7.3 PŘÍPRAVA NLC	33
7.4 CHARAKTERIZACE NOSIČŮ	34
7.4.1 Velikost a distribuce částic.....	34
7.4.2 Zeta potenciál	34
7.4.3 Stanovení stability	35
7.4.4 Antioxidační stabilita zhášením ABTS radikálů.....	35
7.5 TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE	36
7.5.1 Analýza kožních vzorků pomocí HPLC	38
8 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
8.1 VELIKOST A DISTRIBUCE NOSIČŮ.....	39
8.2 ZETA POTENCIÁL.....	42
8.3 STANOVENÍ STABILITY VZORKŮ	43

8.4	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	48
8.5	TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE	49
ZÁVĚR.....		53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		54
SEZNAM OBRÁZKŮ		59
SEZNAM TABULEK.....		60
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		61

ÚVOD

Transdermální a dermální podání léčiv i dalších aktivních látek pomocí nosičů na bázi lipidů představuje alternativu k jejich tradičnímu způsobu podání a přináší řadu výhod. Nevýhodou této metody je však přirozená bariérová funkce kůže, zejména *Stratum corneum*, která penetraci některých aktivních molekul omezuje.

V poslední době se rozvíjí výzkumy v oblasti lipidových nosičů, které mohou tuto komplikaci vyřešit. Nosiče na bázi lipidů mohou totiž zvýšit penetraci účinných látek do kůže, jelikož díky své lipidové povaze napodobují strukturu kožní bariéry, což umožňuje jejich efektivnější průnik přes *Stratum corneum*. Lipidové nosiče rovněž zlepšují biodostupnost látek, tedy jejich množství, které se dostane do cílového místa a zároveň poskytují aktivním látkám ochranu před vnějšími vlivy, jako je UV záření nebo oxidace. V neposlední řadě je jejich velkou výhodou biokompatibilita a biodegradabilita, protože jsou tvořeny lipidy, které jsou tělu vlastní a snadno odbouratelné.

Tato práce se zabývá studiem transferosomů, liposomů a nanostrukturovaných lipidových nosičů, které pro transdermální podání aktivních látek využívají své fyzikálně-chemické vlastnosti jako např. flexibilitu, schopnost enkapsulovat hydrofilní i lipofilní látky nebo cílený transport k buňkám.

Pro enkapsulaci byl využit kanabidiol (CBD), což je jedna z nepsychoaktivních složek rostliny *Cannabis sativa*. Díky svým protizánětlivým, analgetickým a antioxidačním vlastnostem je CBD považován za významnou látku pro využití v dermatologii i farmacii. Jeho hlavní nevýhodou však je skutečnost, že je to lipofilní molekula, což komplikuje její penetraci a absorpci kůží. Tento nedostatek lze odstranit právě enkapsulací CBD do vhodného lipidového nosiče.

Cílem práce bylo uvedené nosiče připravit a zhodnotit jejich klíčové vlastnosti (velikost, zeta potenciál vezikul a jejich stabilitu) a analyzovat jejich efektivitu, co se týče transdermální absorpce.

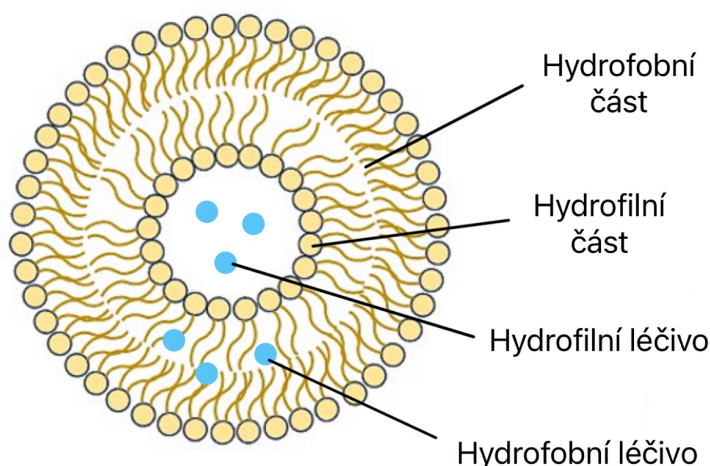
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK NA BÁZI LIPIDŮ

Hlavním cílem účinného systému pro podávání léků (i dalších aktivních látek) je doručit molekuly přímo k specifickému místu v těle, přičemž je důležité minimalizovat předčasnou degradaci léku a zajistit, aby se v místě účinku udržovala jeho optimální koncentrace. Metody pro tradiční podávání léků mají několik nevýhod, jako jsou riziko vynechání dávky, kolísání hladiny léku v těle, vedlejší účinky, rychlý metabolismus nebo toxicita. Řešením může být využití moderních nosičových systémů, které jsou cílené na specifická místa v těle. Mezi tyto systémy patří nosiče na bázi lipidů, kterými jsou např. tuhé lipidové nanočástice, liposomy, transferosomy, nanostrukturované lipidové nosiče a mnoho dalších. V následující části bakalářské práce budou některé z těchto nosičů krátce představeny [1].

1.1 Liposomy

Liposomy jsou kulovité, jedno- i vícevrstvé vezikuly, které vznikají díky schopnosti fosfolipidů s diacylovými řetězci spontánně tvořit organizované struktury ve vodných roztocích. V současné době jsou považovány za jedny z nejběžněji používaných nano-nosičů hydrofobních i hydrofilních aktivních molekul. Díky své dobré biokompatibilitě, nízké imunitní odpovědi a biodegradabilitě jsou ideálním prostředkem pro dodání léčiv i dalších aktivních látek např. pro kosmetiku. Tyto vezikuly umožňují řízenou distribuci léčiv a zvyšují jejich rozpustnost v těle. Další výhodou liposomů je možnost modifikovat jejich povrch, což umožňuje cílené, dlouhodobé a stabilní uvolňování léčiv. Mnoho liposomálních systémů je již schváleno pro použití v klinické praxi, zejména při léčbě rakoviny a infekcí způsobených plísněmi a viry [2].



Obrázek 1: Struktura liposomu [3] – *upraveno*

Liposomy lze podle jejich struktury rozdělit do čtyř kategorií, které se liší velikostí a počtem lipidových dvojvrstev [2]:

- Malé unilamelární vezikuly (SUV)
- Velké unilamelární vezikuly (LUV)
- Multilamelární vezikuly (MLV)
- Multivezikulární vezikuly (MVV)

Mezi nejběžnější typ liposomů patří malé a velké unilamelární vezikuly. Jejich struktura umožňuje (dle lipofility/hydrofility) buď rovnoměrné rozdělení látek ve vnitřním prostoru liposomu, který je naplněn vodným prostředím, nebo zachycení látek do lipidové dvojvrstvy [4].

Při enkapsulaci hydrofilních léčiv/aktivních látek se směs lipidů hydratuje vodným roztokem léčiva. Léčivo se následně uzavírá do vnitřní části liposomu. Zbylý neenkapsulovaný materiál se odstraňuje nejčastěji dialýzou. Kromě toho může být pro dosažení vysoké koncentrace léčiva v liposomech využita metoda dehydratace a rehydratace již připravených liposomů, což je velmi efektivní pro zapouzdření molekul, jako je DNA nebo proteiny.

Při enkapsulaci hydrofobních léčiv/aktivních látek jsou léčiva zachycena v hydrofobní části fosfolipidové dvojvrstvy liposomů. Při tomto procesu se léčivo rozpustí v organickém

rozpouštědla a následně se smíchá s fosfolipidy. Odpařením tohoto roztoku se připraví suchý lipidový film s obsahem léčiva a následnou hydratací se z něj vytvoří liposomy [4].

Pro výrobu liposomů existují čtyři základní metody, které se liší způsobem, jakým jsou lipidy extrahovány z organických rozpouštědel a následně rozptýleny ve vodném prostředí. V této části bakalářské práce jsou představeny dvě z těchto metod [5].

Metoda hydratace tenkého lipidového filmu (Banghamova metoda) je jednou z nejstarších a stále široce využívanou technikou pro výrobu liposomů. Při jejím použití se směs fosfolipidů a cholesterolu (případně lipofilních aktivních látek) rozpustí v organickém rozpouštědla a následně se organické rozpouštědlo odstraní pomocí odpaření. Po odpaření vznikne na stěně nádoby tenký lipidový film. Tento film se poté hydratuje přidáním vodného roztoku pufru. Tato metoda se používá díky své jednoduchosti. Hydratované fosfolipidy ve vodném roztoku vytvářejí multilamelární vezikuly (MLV), které jsou velikostně i tvarově heterogenní. Pro získání menších a stejných vezikul se MLV následně podrobí např. sonikaci (pro tvorbu SUV) nebo extruzi přes polykarbonátové filtry (pro tvorbu LUV).

Reverzní odpařovací technika je metoda, při které se nejdříve lipidy rozpustí v organickém rozpouštědla. Když je tento roztok přidán do vodného pufru, dochází (např. sonikací) k tvorbě emulze voda v oleji s obsahem velkých unilamelárních reverzních vezikul (LUV). Poté se rozpouštědlo odstraní na rotační odparce, což vede k tvorbě viskózního gelu, nebo dokonce suchého lipidového filmu. Ke gelu/filmu je následně přidán pufr, kterým jsou vezikuly rehydratovány. Hlavní výhodou této metody je, že značná část vodné fáze (až 62 %) je zachycena uvnitř vezikul. Tento proces umožňuje efektivní zapouzdření velkých makromolekul.

Mezi další metody patří například metoda odstranění **detergentu** nebo **technika vstřikování z rozpouštědla** (ether nebo ethanol) [5].

1.2 Transferosomy

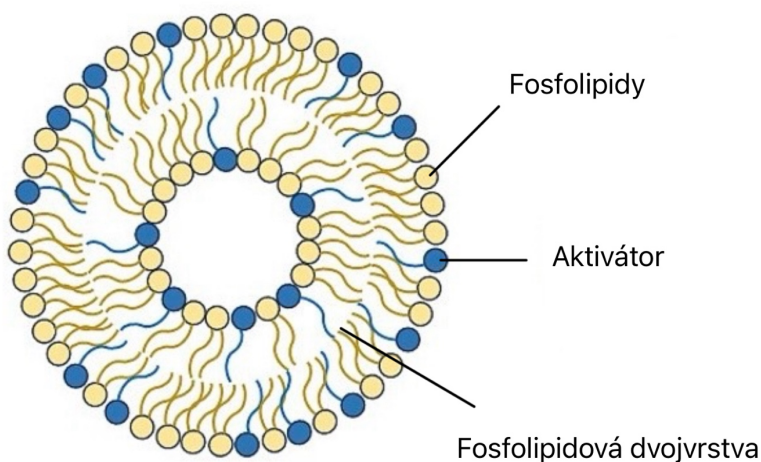
Tyto lipidové nosiče jsou speciálním typem liposomů a skládají se z fosfolipidů (obvykle fosfatidylcholinu) a aktivátoru hran, kterým je surfaktant. Mají ultradeformovatelnou strukturu s hydrofilním jádrem, které je obklopeno lipido-surfaktantovou dvojvrstvou. Transferosomy jsou flexibilní vezikuly, což je činí ideálními nosiči pro účinné doručování aktivních látek. Jsou navrženy tak, aby připomínaly buněčný vezikul nebo buňku. Vlastnosti

lipidové dvojvrstvy transferosomů je možné ovlivnit jejím složením, což umožňuje samoregulaci a optimalizaci vlastností transferosomu [6; 7].

Díky své schopnosti přizpůsobovat se vnějším podmínkám dokážou tyto nosiče procházet póry, které jsou mnohem menší než jejich vlastní velikost. Tohoto efektu dosahují tím, že mohou měnit svůj tvar a velikost a snadno se přizpůsobí prostředí lipidové dvojvrstvy. To jim umožňuje efektivně transportovat i větší molekuly přes neporušenou kůži. Molekuly s vysokou molekulovou hmotností totiž běžně nemohou pronikat do hlubších vrstev kůže a do krevního oběhu, proto transferosomy představují alternativu k tradičnímu subkutánnímu podávání látek, jako je například inzulin [8].

Většina transferosomů obsahuje fosfatidylcholin jako hlavní lipidovou složku, jelikož je to nejběžnější lipid v buněčných membránách. Mezi nejčastěji používané aktivátory hran patří deoxycholát sodný, Tween 80 a Span 80, které se díky délce svých řetězců snadněji začleňují do fosfolipidové dvojvrstvy [8].

Metody přípravy těchto nosičů jsou totožné s metodami pro přípravu liposomů.



Obrázek 2: Struktura transferosomu [3] - *upraveno*

1.3 Tuhé lipidové nanočástice

Dalším typem nosičů na bázi lipidů jsou tuhé lipidové nanočástice (SLN), které představují zajímavou alternativu k tradičním koloidním nosičům léčiv. Tyto struktury kombinují výhody běžných koloidních nosičů a zároveň potlačují některé jejich hlavní nevýhody. Mají vysoký stupeň biologické dostupnosti a účinnosti, nízkou toxicitu, chrání citlivé látky před degradací a umožňují výrobu ve velkém měřítku [9]. Jsou to v principu nanoemulze oleje ve

vodě, ve kterých je kapalný olej nahrazen pevným lipidem nebo směsí několika triacylglycerolů a vosků, které jsou v tuhém stavu i při pokojové a tělesné teplotě. Tyto nosiče odstraňují nedostatky typické pro polymerní nanočástice, např. použití organických rozpouštědel, nedostatky spojené s emulzemi, jako je nekontrolovatelné rychlé uvolňování léčiva i nedostatky liposomů, které jsou náchylné k degradaci enkapsulovaného léčiva během skladování [10]. Při výrobě SLN se používají lipidy (mastné kyseliny, triacylglyceroly, steroidy), emulgátory a voda, přičemž jejich příprava může probíhat různými metodami [11]. Výběr určité techniky závisí na rozpustnosti a stabilitě léčiva/aktivní látky, typu použitého lipidu a způsobu aplikace. Mezi nejběžnější metody patří vysokotlaká homogenizace, odpařování rozpouštědla nebo ultrazvuková homogenizace při vysokých rychlostech [12]. Účinnost SLN jako nosičů závisí na několika faktorech:

- Rozpustnost účinné látky v lipidech
- Schopnost účinné látky a lipidů tvořit homogenní taveninu
- Fyzikálně-chemické vlastnosti této taveniny
- Struktura pevné lipidové matrice

Pro dosažení vyšší enkapsulace aktivní látky je třeba, aby byla tato látka v lipidové tavenině dobře rozpustná, přičemž rozpustnost aktivní látky klesá, jakmile tavenina chladne a krystalizuje. Aby byla rozpustnost vyšší, používají se pro přípravu SLN i solubilizátory. Použití mono- a diacylglycerolů může podpořit lepší solubilizaci aktivních látek v lipidech, ale důležité je také použít typ lipidu, který netvoří krystalické struktury [11].

1.4 Nanostrukturované lipidové částice

Nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) představují druhou generaci pokročilých nosičů na bázi lipidů, které mají pevnou strukturu při pokojové teplotě. Jsou, podobně jako SLN, vyráběny z lipidů, které jsou biokompatibilní. Díky širokému výběru lipidů, povrchově aktivních látek a kosurfaktantů, které jsou k dispozici pro jejich výrobu, jsou NLC ideální pro různé aplikace, včetně lokálního, perorálního, inhalačního, očního a parenterálního podání. Technologie NLC se v poslední době rychle rozvíjí a ukazuje velký potenciál pro lokální použití také v kosmetických přípravcích. Tyto částice mají díky přítomnosti lipidů řadu prospěšných účinků na pleť, a zároveň fungují jako koloidní nosiče aktivní látky [13].

Byly vyvinuty pro zlepšení SLN tak, aby překonaly některé jejich nevýhody. Na rozdíl od SLN, které mají více uspořádanou strukturu, NLC umožňují vyšší enkapsulační kapacitu pro

ukládání složitějších sloučenin, protože vytvářejí méně krystalickou pevnou lipidovou matici. To je umožněno díky tomu, že se při výrobě NLC používají tekuté i pevné lipidy. Proto mají NLC vyšší kapacitu pro uchování léčiv a nižší pravděpodobnost, že dojde k jejich vyloučení během skladování [14].

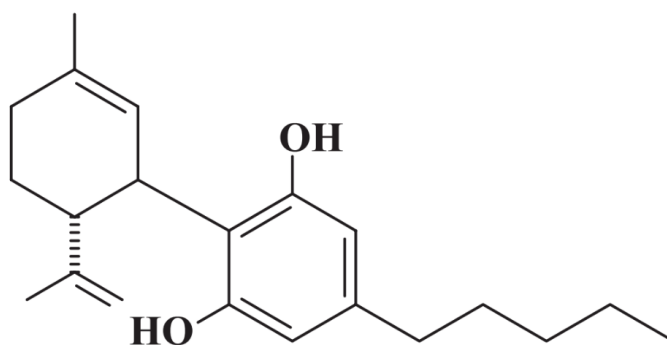
NLC je možné vyrábět několika metodami, přičemž velký důraz je kladen na udržitelné technologie, které nevyžadují použití toxických organických rozpouštědel. Mezi tyto metody patří vysokotlaká homogenizace za horka, která je díky své efektivitě výhodná pro průmyslové aplikace. Další využívanou metodou je technika ultrazvukové homogenizace a následná sonikace, která se snadno aplikuje i v laboratorních podmínkách [15].

1.5 Kubosomy

Tento typ nosičů je tvořený propojenými kapalnými krystaly v kubické fázi, které vykazují řadu zajímavých vlastností. Jednou z hlavních výhod kubosomů je jejich schopnost enkapsulovat a efektivně dodávat jak hydrofobní, tak hydrofilní léčiva. Tato všestrannost činí kubosomy vhodnými pro podávání širokého spektra terapeutických látek, včetně malých molekul, proteinů, nukleových kyselin a peptidů. Krystaly jsou tvořeny pomocí povrchově aktivní látky (nebo polárního lipidu) a vody v daném poměru. Povrchově aktivní látky se organizují do dvojvrstev, které se skládají do prostorově uspořádané struktury s minimálním povrchem. Při hydrataci povrchově aktivní látky nebo polárního lipidu, který tvoří kubickou fázi, dochází k rozptýlení pevné fáze na částice o menší velikosti, což vede k tvorbě kubosomů. Díky své struktuře dokážou zachovávat účinnost a stabilitu aktivních látek (vitamíny, proteiny). Nanostruktury jsou termodynamicky stabilní a zůstávají po určitou dobu nezměněné. Kubosomy vykazují vysoký stupeň uspořádání a obvykle se vytvářejí ve vodném prostředí s vysokou koncentrací amfifilních látek [16; 17].

2 KANABIDIOL JAKO AKTIVNÍ LÁTKA

Kanabidiol (CBD) patří mezi jednu z bioaktivních složek rostliny Konopí seté (*Cannabis sativa*). Díky svým léčebným účinkům byla tato konopná rostlina pěstována a využívána již od starověku. Obsahuje více než 80 různých chemických látek, které se nazývají kanabinoidy [18].



Obrázek 3: Chemický vzorec kanabidiolu [19]

Kanabinoidy se mohou rozdělit do tří kategorií podle toho, kde jsou produkovány [18]:

- **Fytokanabinoidy** (PCB) jsou získávány z rostlin, vyskytují se ve velkém množství v pryskyřici produkované trichomy rostliny *Cannabis sativa*
- **Endokanabinoidy** (ECB) jsou přirozeně se vyskytující sloučeniny syntetizovány v lidském těle
- **Syntetické kanabinoidy** (SC) jsou tvořeny synteticky pomocí různých chemických procesů.

Nejznámější z kanabinoidů je tetrahydrokanabinol (THC), který je známý pro své psychoaktivní účinky, a proto komplikuje širší přijetí rostliny pro pacienty a zdravotnické pracovníky. Druhá nejrozšířenější složka konopí CBD však zásadně vědomí neovlivňuje, a proto má velký potenciál v medicíně a farmacii. Kromě seriózní vědecké literatury se na zdravotní přínosy CBD zaměřila také značná pozornost médií, přičemž produkty CBD jsou obvykle prezentovány jako revoluční léky nebo také zázraky řešící široké spektrum onemocnění [20; 21].

Přestože má CBD řadu farmakologických účinků, o jeho bezpečnosti a vedlejších účincích u lidí a zvířat se stále ví jen málo. Ačkoliv existuje mnoho veřejných diskuzí o terapeutických

přínosech kanabinoidů, terapeutických studií na toto téma je stále malé množství, což je způsobeno nelegálním postavením kanabinoidů v mnoha zemích [21].

Tato konopná složka působí jako analgetikum, antipsychotikum, je účinný proti epilepsii, je neuroprotektivní a uvolňuje svaly, stejně tak působí protizánětlivě, antioxidačně a využívá se pro léčbu spojenou s rakovinou. CBD také ovlivňuje určité receptorové systémy v mozku a působí spolu s receptory, které reagují na určité léky a neurotransmitery. Látka má schopnost předávat informace nervovým buňkám, včetně receptorů citlivých na opioidy, které hrají klíčovou roli ve vnímání jak mírné, tak intenzivní bolesti [21].

Zde hraje významnou úlohu i tzv. endokanabinoidní systém (ESC). Je to evolučně stabilní síť, která pomáhá udržovat homeostázu těla. Je prokázáno, že ovlivňuje i biologii kůže, ačkoliv výzkum o účincích kanabinoidů při aplikaci na kůži je stále velmi omezený [18]. Receptory tohoto systému byly objeveny v kůži a zneužívání syntetických kanabinoidů je spojeno s výskytem různých kožních problémů, což ukazuje, že ESC má vliv na funkci a zdraví pleti. Tento systém se skládá z několika klíčových složek:

- **Signální molekuly** – zvané jako endokanabinoidy, které se syntetizují podle potřeby
- **Specifické receptory** – CB1 receptory se nachází především v mozku a nervovém systému, CB2 receptory se vyskytují v imunitních buňkách a periferních tkáních
- **Enzymy** – syntetizují a rozkládají endokanabinoidy a nosiče, které je přenášejí, čímž ukončují jejich účinky

Mezi hlavní funkce ESC zahrnujeme vliv na centrální nervový systém a imunitní odpověď v těle. Jestliže se tento systém naruší, může dojít k různým kožním problémům, jako je atopický ekzém, akné, problémy s růstem nebo vypadáváním vlasů, svědění a poruchy pigmentace. ESC je stále rozvíjející oblastí výzkumu, přičemž jeho pochopení by mohlo mít významný vliv na medicínu, nejen ve vztahu ke kožním problémům, ale zejména v léčbě bolesti, duševních poruch a zánětlivých onemocnění [18].

3 DERMÁLNÍ PODÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK

Aplikace aktivních látek skrz kůži představuje alternativu k tradiční orální terapii, protože se vyhýbá problémům spojeným s vedlejšími účinky, metabolickými změnami při průchodu játry a malou spoluprací pacientů. Transdermální podání má oproti subkutánním injekcím i další výhody – není bolestivé, neprodukuje nebezpečný odpad a představuje menší riziko přenosu infekcí. Navíc je neinvazivní a může poskytovat postupné uvolňování látek v delším časovém rozmezí [22].

3.1 Penetrace látek kůží

Hlavním orgánem, který umožňuje průnik látek do těla je kůže, přičemž zároveň chrání organismus před ztrátou vody a brání vniknutí potenciálně toxických látek, mikroorganismů a alergenů.

Lidská kůže se skládá z *epidermis* (pokožka), *dermis* (škára) a *hypodermis* (podkožní vazivo) [22].

Epidermis se nachází mezi *Stratum corneum* a *dermis*. Je to vícevrstvá epitelová vrstva, která se skládá z bazálních, spinózních a granulárních buněčných vrstev a je zodpovědná za vznik *Stratum corneum* (rohová vrstva) [22]. Buňky *epidermis* jsou vázány pomocí tonofibril, což jsou bílkovinné vlákna z kolagenu a elastinu. Obsah vody v této vrstvě je přibližně 90 % [23].

Stratum corneum je nejsvrchnější vrstva kůže a představuje fyzickou bariéru při průchodu daných látek, které jsou v kontaktu s pokožkou. Její složení zahrnuje 5 až 15 % lipidů, přičemž převládají glykosfingolipidy, cholesterol sulfát, fosfolipidy a neutrální lipidy, a 75 až 85 % bílkovin, přičemž převážnou část tvoří keratin [23].

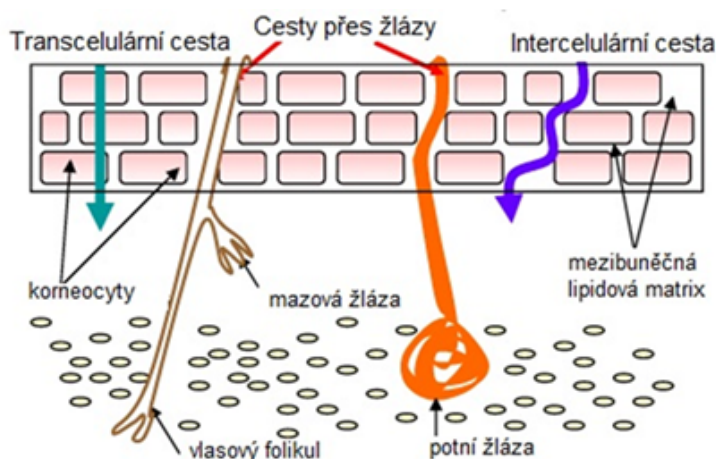
Přímo pod *epidermis* se nachází *dermis*, která tvoří pevnou strukturu a mechanickou podporu kůže. Tato vrstva je převážně tvořena strukturální fibrózní tkání, která obsahuje jen velmi málo buněk – podobné struktury se v normálních tkáních vyskytují vzácně. *Dermis* je silná vrstva a skládá z volné pojivové tkáně, která se skládá z vláknitých proteinů [23].

Podkožní tkáň, známá také jako *hypodermis*, leží pod *dermis* a obsahuje tukové buňky, které slouží jako energetická rezerva, nacházejí se zde i vitamíny A, D, E a K. Její hlavní funkcí je izolace těla a ochrana svalů a nervů. Tato vrstva také rozhoduje o celkovém tvaru a hmotnosti lidského těla [24].

Aktivní látky penetrují a absorbují se do systémového oběhu skrze vrchní vrstvu *Stratum corneum*, *epidermis* a hlubší vrstvy pokožky. *Stratum corneum* je nejméně propustná vrstva pro vybrané látky, zatímco *epidermis* slouží jako bariéra především pro lipofilní sloučeniny.

Existují tři hlavní možnosti cesty penetrace látek skrze pokožku:

- **Appendageální cesta** transportuje látky skrze mazové a potní žlázy
- **Transfolikulární cesta** vede látky skrze vlasové folikuly
- **Transcelulární cesta** se využívá pro dopravu aktivní látky přes korneocyty
- **Intercelulární cesta** vede skrze intercelulární prostor.



Obrázek 4: Cesty průniku kůží [25] - upraveno

První zmíněná cesta se nepovažuje za příliš významnou z důvodu poměrně malé plochy mazových žláz a je relevantní pouze pro ionty, látky s vysokou molekulovou hmotností a vysoce polární molekuly (v případě potních žláz), které mají potíže pronikat neporušenou vrstvou *Stratum corneum*. Tato cesta je problematická, protože léčivo se může ve žláze akumulovat a jeho přechod z lipofilního prostředí do organismu může být složitý. Stejný problém se vyskytuje i u transfolikulární cesty. Zbývající dvě cesty se považují za nejpravděpodobnější a společně se někdy označují jako transepidermální [24].

3.2 Možnosti ovlivnění dermální penetrace

Zvýšení absorpce aktivních látek přes pokožku může být dosaženo buď fyzikálními metodami, nebo chemickými zásahy do struktury kožní bariéry. Mezi fyzikální techniky se řadí např. iontoforéza, elektroporace a sonoforéza. Na druhé straně chemické modifikace kožní bariéry zahrnují použití různých látek, obvykle označovaných jako akcelery

(enhancery) penetrace, kterými mohou být např. organická rozpouštědla, mastné kyseliny, surfaktanty a alkoholy [26].

3.2.1 Fyzikální postupy

Pro všechny výše uvedené metody je pro dosažení požadovaných účinků nutné dodání energie. Pro transdermální podání se v současnosti tyto techniky jeví jako nejslibnější.

Iontoforéza je metoda, která pro přenos nabitých látek skrze buněčnou membránu využívá elektrické pole a usnadňuje a reguluje pohyb ionických aktivních látek přes pokožku. Tato technika je považována za efektivní a bezbolestnou, a umožňuje cílené dodání látek do určité oblasti tkáně. Princip metody spočívá v tom, že se použije aktivní elektroda, která má stejný náboj jako transportovaná látka, což tuto látku odpuzuje a nutí ji pronikat do kůže. Tento proces se řídí pomocí intenzity elektrického proudu a vlastnostmi aktivní látky a jejího nosiče.

Elektroporace (elektropermeabilizace) je proces, při kterém se pomocí krátkých a intenzivních elektrických pulzů vytvářejí v buněčné membráně dočasné póry o velikosti nanometrů. Díky tomu mohou různé látky těmito póry procházet. Příkladem jsou proteiny, DNA, RNA, sacharidy a další malé molekuly [27].

Sonoforéza využívá ultrazvukové vlny různých frekvencí. Obecně se dá říct, že nízkofrekvenční ultrazvuk (kolem 1 kHz) zlepšuje prostup pokožkou více než vysokofrekvenční ultrazvuk (3–16 kHz). Hlavními mechanismy fungování sonoforézy jsou **tepelné účinky**, kdy se ultrazvuková energie absorbuje v pokožce, což vede k mírnému ohřevu, který pomáhá změkčit pokožku a zvyšuje její propustnost. Prostup látek kůží napomáhají rovněž **kavitační efekty**, kdy ultrazvuk vytváří bubliny, které oscilují a kolabují v ultrazvukovém poli, vytváří malé trhliny nebo póry v kůži a tím umožňují snadnější prostup aktivních látek [28].

3.2.2 Chemické postupy

U těchto metod se používají různé chemické látky, které jsou farmakologicky inertní, což znamená, že nemají samy o sobě žádný terapeutický účinek. Pokud jsou však součástí transdermálního přípravku, mohou proniknout do *Stratum corneum* a interagovat s jejími složkami. Touto funkcí pomáhají snížit odpor pokožky vůči pronikání léků a usnadňují tím jejich absorpci [29]. V následující části práce jsou uvedeny vybrané typy těchto akcelérátorů.

Sulfoxidy – dimethylsulfoxid (DMSO) je jednou z nejvíce zkoumaných látek, které zlepšují penetraci pokožkou. Je to rozpouštědlo, které je bez zápachu a dobře pohlcuje vlhkost. Nicméně může mít i vedlejší účinky, které závisí na koncentraci. Pro zlepšení penetrace je často potřeba roztok, který obsahuje více než 60 % DMSO, avšak při těchto koncentracích může DMSO vyvolat podráždění kůže, jako je zarudnutí, svědění nebo tvorba puchýřů [29].

Esenciální oleje zlepšují pronikání malých aktivních látek do pokožky tím, že interagují s mezibuněčnými lipidy. Tento proces zahrnuje fyzikální mechanismy, jako je extrakce, fluidizace a separace fází. I když esenciální oleje a jejich složky snadno pronikají kůží do krevního oběhu, mají tendenci se rychle vylučovat z těla pomocí moči nebo stolice. Esenciální oleje z rostlin, jako je eukalyptus nebo ylang-ylang, byly shledány jako účinné pro zlepšení průniku aktivních látek, například látky 5-fluorouracilu [29; 30].

Mastné kyseliny se běžně využívají jako zlepšovače penetrace v mnoha komerčně dostupných produktech. Jejich účinnost je úzce spojena s mírou nenasycenosti – čím vyšší je stupeň nenasycenosti, tím silnější je efekt zvýšení průchodnosti membrán. Také delší vzdálenost mezi karboxylovou skupinou a dvojnou vazbou podporuje lepší tok léčiv skrze pokožku. Kromě toho i *cis* konformace u nenasycených mastných kyselin způsobuje větší narušení lipidové struktury ve *Stratum corneum* než konformace *trans* mastných kyselin [31].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Kanabidiol patří mezi jednu z nejslibnějších složek, která vykazuje širokou škálu farmakologických účinků. Jeho využití je však omezené z důvodu nízké biologické dostupnosti. Aby se tento problém vyřešil, vědci se soustředili na vývoj nových postupů, které by umožnily efektivnější vstřebávání CBD v těle. Jedním z těchto postupů je enkapsulace CBD do nano-nosičů, které překonávají nedostatky spojené se špatnou biodostupností CBD. Tyto nanonosiče zlepšují terapeutický účinek a vykazují lepší distribuci/cílení CBD v organismu. V následujícím oddílu se práce zaměří na využití CBD při léčbě různých onemocnění [32].

První studie zaměřená na výzkum antiepileptických účinků CBD byla publikována již v roce 1980. Hodnotila účinnost CBD u lidí trpících nekontrolovatelnou epilepsií. Výsledky studie prokázaly, že po podání CBD v dávkách 200-300 mg denně došlo u 88 % pacientů ke snížení četnosti křečí, přičemž u 38 % pacientů bylo zaznamenáno částečné vyléčení. Další výzkumy ukázaly, že kombinace CBD s jinými antiepileptiky mohou účinně snižovat počet záchvatů u pacientů, kteří trpí nekontrolovatelnými záchvaty. Ačkoli existuje několik navržených mechanismů účinku CBD, způsob, jakým tato látka na epilepsii působí, zůstává stále nejasný [32].

Dalším příkladem terapeutických účinků CBD je jeho využití proti rakovině. V experimentu, kde byly použity myši s kolorektálním karcinomem, bylo zjištěno, že CBD působí prostřednictvím několika chemo-preventivních mechanismů, jako je zvýšení koncentrace endokanabinoidů, ochrana DNA před oxidativním poškozením a snížení buněčné proliferace v přítomnosti antagonistů. Další studie popsaly roli CBD při vyvolání buněčné smrti a zvýšení citlivosti glioblastomu na radioterapii. CBD v tomto případě vyvolalo apoptózu buněk glioblastomu, blokovalo buněčnou proliferaci a také tvorbu prozánětlivých cytokinů. Tímto způsobem zlepšovalo CBD účinnost léčby [33].

U pacientů, kteří trpí chronickou bolestí, byly zaznamenány pozitivní účinky kanabinoidů nebo konopí na její zmírnění. Předpokládá se, že CBD funguje jako analgetikum tím, že se váže na CB1 a CB2 receptory, ale stále chybí jasné důkazy, které by tento mechanismus potvrdily [32; 34].

Další možná terapie pomocí CBD je léčba úzkostí. Mnohé studie potvrdily terapeutické účinky CBD na úzkost, depresi a další psychotické příznaky. Nicméně, některé výzkumy naznačují, že účinnost CBD je závislá na dávkování, kdy nižší dávky vykazují pozitivní

anxiolytický účinek, naopak u vyšších dávek ztrácí CBD svou anxiolytickou aktivitu [33]. Jako příklad lze uvést studii na myších která ukázala, že dávka 3 mg/kg má mírný pozitivní účinek, dávka 3-10 mg/kg vede k buněčné proliferaci a neurogenezi, což má antidepresivní efekt, avšak u dávky 10-30 mg/kg nebyl pozorován žádný pozitivní farmakologický účinek [32].

CBD se využívá pro léčbu Alzheimerovy choroby. Jeho terapeutický potenciál zatím není podrobně prozkoumán, ale několik studií naznačuje, že CBD má ochranné a protizánětlivé účinky na nervovou soustavu. V dané studii bylo CBD injekčně aplikováno myším po dobu 7 dnů a výsledky naznačily, že CBD dokáže snížit aktivitu buněk v mozku, které se podílejí na zánětlivých procesech. Mezi další funkce CBD se ukázalo, že snížilo produkci zánětlivých molekul, které mohou poškodit nervové buňky. Molekuly, jako je oxid dusnatý a interleukin 1 β , jsou spojeny s neurozánětlivými reakcemi a mohou podporovat rozvoj neurodegenerativních onemocnění mezi které patří Alzheimerova choroba [35].

Výše uvedený stručný přehled ukazuje široké možnosti použití CBD. V následující části práce jsou uvedeny příklady enkapsulace CBD do nosičů, které jsou studovány v této bakalářské práci.

V roce 2024 provedli Jurgelane s kolegy studii, ve které připravili liposomy s obsahem CBD. K tomuto účelu použili distearoylfosfatidylcholin (DSPC), dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) a 1,2 distearoyl-sn-glycero-3 fosfoethanolamine-N-[karbonyl-amino (polyethylene glycol)-4300] (DSPE-PEG). Liposomy byly připraveny metodou hydratace tenkého lipidového filmu a byly charakterizovány infračervenou spektroskopií, skenovací transmisí elektronovou mikroskopií a dynamickým rozptylem světla. Analýza ukázala, že velikost liposomů se v důsledku přítomnosti CBD snížila o 23-53 %. Nejvyšší účinnost enkapsulace CBD vykazovaly liposomy s DSPC a DSPE-PEG (87 %). Uvolňování CBD bylo nejrychlejší u liposomů DPPC, zatímco DSPC a DSPE-PEG uvolňovaly CBD dlouhodobě (79 % uvolňování po dobu 504 hodin). Začlenění DSPE-PEG zlepšilo účinnost enkapsulace a stabilitu liposomů. Studie ukázala, že liposomy DSPC a DSPE-PEG jsou pro dlouhodobé uvolňování CBD výhodnější [36].

Studie, která byla publikována v roce 2022 Moqejwou a kolegy se zaměřila na formulaci koloidního systému, který by mohl nabídnout stabilnější způsob podávání CBD. Byly použity transferosomy s nano velikostí, které díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem umožňují lepší absorpci, biologickou dostupnost a uvolňování CBD. Transferosomy byly

složeny z kombinace sójového lecitinu, cholesterolu a polysorbátu 80 a připraveny pomocí metody odpaření tenkého lipidového filmu. Byly analyzovány z hlediska velikosti, účinnosti enkapsulace, permeace a morfologie. Optimální přípravek měl následující vlastnosti: až 80 % enkapsulace CBD, velikost částic 130 nm a stabilita 6 měsíců. Skenovací a transmisní elektronový mikroskop ukázaly, že transferosomy mají kulovitou a unilamelární strukturu, což vedlo k lepší permeaci [37].

V další studii z roku 2024 se Yang Xie a kolegové zaměřili na potenciál CBD v léčbě deprese. Pro zlepšení chemické stability a biodostupnosti CBD proto použili nanostrukturované lipidové nosiče (NLC). Nosiče byly připraveny metodou emulgace za horka. Připravené nano-nosiče vykazovaly průměrnou velikost částic ~54 nm, zeta potenciál -29,7 mV a vysokou účinnost enkapsulace (87,6 %). Testy stability ukázaly, že NLC účinně chrání CBD před fotodegradací a jsou stabilní až 42 dní. Uvolňování CBD z NLC bylo nejdříve rychlé (více než 50 % během 20 minut), a následně se CBD uvolňovalo postupně. Výsledky studie ukazují, že NLC by mohly být slibným nosičem CBD ve farmaceutických aplikacích [38].

5 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo zpracovat literární přehled, který poskytne informace o jednotlivých typech lipidových nosičů a jejich vlastnostech. Pozornost byla věnována i kanabidiolu (CBD), který je v práci použit jako aktivní látka. Práce se zaměřila i na metody pro stanovení transdermální penetrace.

V praktické části práce bylo cílem připravit různé formulace lipidových nosičů (transferosomy, liposomy, nanostrukturované lipidové nosiče) obsahující CBD, a následně je charakterizovat pomocí fyzikálně-chemických metod. Součástí práce bylo i zhodnocení antioxidačních vlastností nosičů pomocí ABTS testu a stanovení transdermální absorpce CBD za použití modelu prasečí kůže.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

6.1 Materiály a chemikálie použité v práci

- 95% Sójový fosfatidyl cholin (Avanti® Polar Lipids, INC., USA)
- Surfactant Tween 80 – polyoxyethylen-80-sorbitan monooleát
- Askorbyl palmitát (ZVC Dr. Hoffmann)
- Cholesterol (Avanti® Polar Lipids, INC., USA)
- Přírodní CBD prášek (lipomed AG, Švýcarsko)
- Glyceryl behenát Compritol® 888 CG ATO (Nature-store, Česká republika)
- 90% kosmetická kyselina olejová (Sigma Aldrich, USA)
- 2,2'-azinobis (3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), Sigma Aldrich (Merck Life Science)
- Peroxodisíran amonný, Sigma Aldrich (Merck Life Science)
- Ultračistá voda (UPW)
- Kůže z prasečího ucha
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) – fosfátem pufovaný roztok (Biosera)
- Gentamycin sulfát (Himedia)
- Trypsin – EDTA roztok (Sigma Aldrich)
- Demineralizovaná voda
- Ethanol

6.2 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (Kern)
- Rotační vakuová odparka Hei-VAP (Heidolph)
- Laboratorní sonikační zařízení Hielscher UP400St, Německo)
- Vysokorychlostní homogenizér T 25 digital ULTRA TURRAX (IKA, Německo)

- Zetasizer (Malvern Nano ZS 90, Spojené království)
- Kyveta SARSTEDT, DTS0012, kyveta DTS1070
- Jamkové destičky (Greiner 24-well flat bottom transparent, polystyrene)
- Multifunkční modulární reader INFINITE 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- Sonda pro měření transepidermální ztráty vody (TEWL)
- Franzovy difúzní komůrky
- Míchací ploténka Multistirrer DIG 15 (VELP Scientifica)
- Membránové filtry 0,45 µm PTFE (VWR)
- Aparatura vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Schimadzu)
- Kolona chromatografie Kintex 5u C18 100 A (Phenomenex)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Běžné laboratorní pomůcky (laboratorní pipety, kádinky, odměrné válce, nálevky, tyčinky, odpařovací baňky, laboratorní destička, lednice na skladování)

7 METODIKA

V tomto oddílu praktické části jsou popsány postupy přípravy lipidových nosičů s aktivní látkou CBD. Pro bakalářskou práci byly vyrobeny 3 typy nosičů – transferosomy, liposomy a nanostrukturované lipidové částice. Pro výrobu transferosomů a liposomů byla použita metoda hydratace tenkého lipidového filmu vytvořeného na stěně baňky a sonikace vytvořených vezikul. Příprava NLC byla provedena metodou emulgace za horka pomocí přístroje Turrax (homogenizace vzorku) s následnou sonikací pro vytvoření stejně velkých lipidových částic. U všech typů částic byla provedena jejich charakterizace, tedy stanovení jejich velikosti, stability, antioxidační aktivity a transdermální absorpce.

7.1 Příprava transferosomů

V experimentální části byly připraveny dva vzorky transferosomů s různým množstvím aktivátoru hran - Tween 80. První vzorek obsahoval 5 mg a druhý 10 mg Tweenu 80, který byl dávkován jako roztok v ethanolu o koncentraci 5 mg/ml. Pomocí pipet byly do baňky s kulatým dnem napipetovány roztoky, které jsou potřeba k tvorbě transferosomů (roztok SPC v koncentraci 10 mg/ml, roztok Tweenu, roztok AP v koncentraci 5 mg/ml a roztok CBD v chloroformu v koncentraci 5 mg/ml), a baňka byla vložena do rotační vakuové odparky. Rozpouštědlo bylo odpařeno při teplotě 55 °C. Po skončení odpařování (20 minut) se na stěně baňky vytvořil tenký film. Baňka byla ponechána v digestoři po dobu 30 minut pro dodatečné vyschnutí filmu. Poté se pipetou do baňky přidalo 10 ml demineralizované vody, baňka se opět vložila na odparku (bez spuštěného odpařování), byla zapnuta rotace a po dobu 20 minut byl lipidový film hydratován za vzniku transferosomů. Po tomto kroku se vytvořená disperze transferosomů sonikovala 2 minuty v ledové lázni (80 % amplituda, 50:50 cyklování). Formulace obou vzorků jsou uvedeny v Tabulce 1 a jsou označeny jako TR1 a TR2.

Tabulka 1: Množství základních komponent pro přípravu transferosomů (10 ml disperze)

	SPC [mg]	Tween 80 [mg]	AP [mg]	CBD [mg]
Funkce	Lipid	Aktivátor hran	Antioxidant	Aktivní látka
TR1	95	5	5	7,5
TR2	90	10	5	7,5



Obrázek 5: Vizualizace tenkého lipidového filmu pomocí barviva na stěnách baňky před samotným hydratováním disperze

7.2 Příprava liposomů

Liposomy byly připraveny stejnou metodou jako transferosomy. Do baňky však byly dávkovány roztoky lipidů (SPC, cholesterol), aktivní látky (CBD) a antioxidantu (AP). V liposomech nebyl přítomen Tween 80. Cholesterol byl přidáván ve formě roztoku v ethanolu o koncentraci 5 mg/ml. Složení liposomů (LIP) je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2: Množství základních komponent pro přípravu liposomů (10 ml disperze)

	SPC [mg]	CHOL [mg]	AP [mg]	CBD [mg]
Funkce	Lipid	Lipid	Antioxidant	Aktivní látka
LIP	70	30	5	5

7.3 Příprava NLC

Pro přípravu NLC byla použita olejová a vodná fáze (OF, VF). Nejdříve byla sestavena aparatura, kde byl použit homogenizátor Ultraturrax a na jeho stojan se umístilo magnetické míchadlo s ohřevem. Před vlastní přípravou NLC byla v chladničce vychlazena jedna část demineralizované vody (15 ml) na teplotu $\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechny složky olejové fáze byly smíchány v kádince a roztopeny na vodní lázni, která byla vytemperována na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byla

rovněž připravena další část vodné fáze (15 ml) vytemperována na stejnou teplotu 70 °C. K roztopené olejové fázi byla poté přidána zahřátá vodná fáze, celý obsah byl homogenizován po dobu 5 minut pomocí přístroje Utraturrax při otáčkách 13 500 rpm a sonikován 10 minut na vodní lázni bez ledu (90 % amplituda, 80 % cyklování). Poté se do vodní lázně přidal led a do emulze se přidala vychlazená demineralizovaná voda a opět došlo k sonikaci po dobu 60 sekund (90 % amplituda, 80 % cyklování). Formulace NLC je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3: Množství základních komponent pro výrobu NLC

Složky	Množství [mg]
Glyceryl behenát (OF)	141,3
Kyselina olejová (OF)	62,1
Askorbyl palmitát (OF)	25,7
CBD (OF)	5,7
Tween 80 (VF)	149,7
Demineralizovaná voda (VF)	15 g

7.4 Charakterizace nosičů

7.4.1 Velikost a distribuce částic

Pro měření velikosti a distribuce částic byl použit přístroj Zetasizer. Velikost byla vyjádřena jako intenzitně vážený z-průměr velikosti částic v nanometrech a distribuce jako index polydisperzity (PDI), který charakterizuje rozložení velikosti částic v koloidním systému. Pro měření velikosti částic byl do kyvety pipetován 1 ml demineralizované vody a 10 µl vzorku, kyveta byla poté vložena do přístroje a měření bylo provedeno při teplotě 25 °C. Hodnoty indexu lomu pro použité materiály byly následující: pro liposomy a transferosomy RI = 1,34, pro NLC RI = 1,47. Všechna měření byla provedena ve třech opakováních.

7.4.2 Zeta potenciál

Přístroj zeta sizer byl rovněž použit pro stanovení zeta potenciálu částic, který určuje jejich elektrický náboj na rozhraní mezi částicí a okolní kapalinou a je ukazatelem stability koloidního systému. Vzorek pro stanovení zeta potenciálu byl připraven pipetováním 4 ml

demineralizované vody a 20 µl vzorku do kádinky, ze které se pomocí injekční stříkačky nadávkoval do speciální kyvety určené pro měření zeta potenciálu. Vzorky byly opět měřeny ve třech opakování.

7.4.3 Stanovení stability

Stanovení stability všech vzorků lipidových částic v čase bylo provedeno sledováním změn jejich velikosti, PDI a zeta potenciálu. Měření probíhalo za použití metod popsanych v kapitolách 7.4.1 a 7.4.2 v pravidelných časových intervalech po dobu 5 týdnů. Vzorky byly skladovány v chladničce při teplotě 5 °C.

7.4.4 Antioxidační stabilita zhášením ABTS radikálů

Pro měření antioxidační aktivity bylo nejprve smícháno 25 ml 7mM roztoku ABTS a 25 ml 2,45mM roztoku (NH₄)₂S₂O₈ a směs byla ponechána reagovat ve tmě při laboratorní teplotě po dobu nejméně 12 hodin. Připravený roztok kation-radikálu ABTS^{•+} o koncentraci 3,5 mmol/l byl těsně před zahájením experimentu naředěn ultra čistou vodou (UPW) tak, aby výsledná absorbance při vlnové délce 736 nm činila 0,7 – 0,75.

Experiment byl proveden ve 24-jamkových destičkách (Greiner 24-well flat bottom transparent, polystyrene). Do jamky bylo aplikováno 2000 µl roztoku ABTS^{•+} a 20 µl vzorku disperze. Měření absorbance bylo provedeno v intervalech 1, 2, 4 a 6 hodin, vždy 5× pro každý vzorek. Pro určení absorbance samotnými disperzemi vzorků bez přídavku ABTS^{•+} byla absorbance proměřena také u směsi 2000 µl UPW a 20 µl daného vzorku. Výpočet korigované absorbance (Abs') byl proveden podle vztahu (1).

Antioxidační aktivita vzorku byla vypočtena na základě vztahu pro procentuální inhibici koncentrace radikálu dle vztahu (2).

$$Abs' = Abs_i - Abs_0 [-] \quad (1)$$

Kde:

Abs' – korigovaná absorbance [-]

Abs_i – hodnota pro směs ABTS^{•+} se vzorkem

Abs₀ – hodnota pro směs UPW se vzorkem

$$RI = \frac{(Abs'_{initial} - Abs'_{final})}{Abs'_{initial}} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

Kde:

RI – procentuální inhibice radikálů [%]

$Abs'_{initial}$ – korigovaná hodnota absorbance referenčního roztoku $ABTS^{•+}$ bez vzorku

Abs'_{final} – hodnota absorbance hodnoceného vzorku v daném čase

7.5 Transdermální absorpce

Pro stanovení transdermální absorpce nosičů s aktivní látkou CBD byla použita kůže prasečího ucha. Štětiny na uchu byly oholeny a ostrým skalpelem byla kůže ucha oddělena od chrupavky. Z odseparované kůže byly vystříženy kožní štěpy o ploše 2 cm^2 a byla změřena jejich tloušťka.



Obrázek 6: Příprava kožních štěpů

Pro stanovení integrity kožní bariéry byla změřena jejich hodnota transepidermální ztráty vody (TEWL) pomocí sondy Tewameter™ 300, kdy se sonda přiložila k povrchu vzorku kůže a bylo provedeno měření v $\text{g/h}\cdot\text{m}^2$. K experimentu byly použity vzorky, u nichž hodnota TEWL nepřekračovala hodnotu $10 \text{ g/h}\cdot\text{m}^2$.

V dalším kroku byla do Franzových komůrek nadávkována receptorová kapalina, která byla připravena smícháním 400 ml PBS, 100 ml absolutního ethanolu a 0,25 g antibiotika gentamycin sulfátu, který slouží pro potlačení mikrobiálního růstu. Připravené kožní štěpy byly vloženy na povrch receptorové kapaliny, upevněny donorovou částí komůrky a po 30 minutách bylo na štěpy nadávkováno 100 μl každého z připravených vzorků. Teplota

termoregulační lázně byla nastavena na 32 °C, která představuje teplotu povrchu kůže. Takto se aparatura ponechala bez přístupu světla po dobu 24 hodin.



Obrázek 7: Franzova difúzní komůrka s kožním vzorkem

Po 24 hodinách byly kožní vzorky vyjmuty a zpracovány pro sledování průchodu CBD kůží. Přítomnost CBD se analyzovala v následujících oddílech:

- 1) Oplach donorové části difúzních Franzových komůrek
- 2) Vzorek seškrábnutý z povrchu kožního štěpu
- 3) Okraje kožního vzorku mimo kontakt s receptorovou kapalinou v komůrce
- 4) Stripy jednotlivých vrstev ze *Stratum corneum*
- 5) Vzorek *Epidermis*
- 6) Vzorek *Dermis*
- 7) Vzorek receptorové kapaliny

Jako první byla opláchnuta donorová část Franzových komůrek pomocí 1 ml methanolu (vzorek označený Oplach). Seškrábnutí zbytku vzorků z povrchu kožního vzorku bylo provedeno pomocí špachtle, která byla opláchnuta 1 ml methanolu (vzorek označený Povrch). Okraje kožního vzorku, které nebyly v kontaktu s receptorovou kapalinou, byly

nastříhány na malé kousky a vloženy do mikrozkušavky s 1 ml methanolu (vzorek označený Okraj). Pro získání vzorků ze *Stratum corneum* byla využita technika stripování pomocí lepící pásky, která se přelepila přes vzorek a přejelo se špachtlí třemi tahy v jednom směru a třemi tahy v druhém směru. Lepící páska se poté odtrhla a vložila do 1 ml methanolu v mikrozkušavce. Pro každý vzorek bylo připraveno 6 stripů a do jedné mikrozkušavky se vložily vždy 2 kusy lepící pásky se vzorkem (vzorky označené Strip 1,2; Strip 3,4 a Strip 5,6). Pro analýzu byl také použit vzorek z receptorové kapaliny (vzorek označený Kapalina). Pro oddělení *Epidermis* a *Dermis* se kožní vzorek vložil do 4 ml Trypsinu a byl ponechán 24 hodin v chladničce (4 °C). Po této době se pomocí pinzety oddělila *Epidermis* od *Dermis*. *Dermis* se rozstříhala na menší kousky a každý ze vzorků se vložil do mikrozkušavky s 1 ml methanolu (vzorky označené Epidermis a Dermis). Pro uvolnění CBD do methanolu byly všechny vzorky před další analýzou 1 minutu vortexovány a přefiltrovány přes PTFE membránové filtry.

7.5.1 Analýza kožních vzorků pomocí HPLC

Obsah CBD v získaných extraktech byl analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s chromatografickou kolonou typu Kinetex C18 (5 µm). Detekce probíhala pomocí detektoru DAD SPD-M20A (Schimadzu) při vlnové délce 207 nm. Signály byly zpracovány softwarem LabSolution. Měření probíhalo při teplotě 35 °C a mobilní fáze složená z methanolu a vody v poměru 85:15 (v/v) měla průtok 0,8 ml/min. Dávkování vzorku bylo prováděno pomocí autosampleru s nástřikem o objemu 5 µl a vzorky byly analyzovány ve třech opakovaných měřeních. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno metodou kalibrační přímky. Kalibrační přímka ve tvaru $y = 43936x + 21078$ byla převzata z diplomové práce [39] a byla sestavena za použití standardů CBD v rozsahu koncentrací 5 až 100 µg/ml.

Návratnost podané látky byla vypočtena pomocí rovnice (3).

$$\text{Návratnost} = \frac{C_{\text{součet}}}{C_{\text{poč. obsah}}} \cdot 100 \quad (3)$$

Kde:

$C_{\text{součet}}$ – součet koncentrací CBD v jednotlivých vrstvách kůže

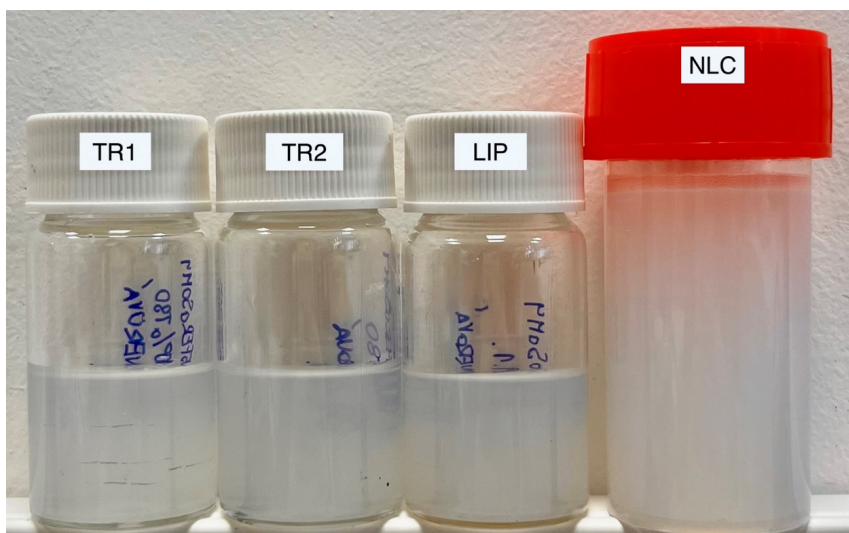
$C_{\text{poč. obsah}}$ – obsah CBD, který byl dávkován na vzorek prasečí kůže

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Velikost a distribuce nosičů

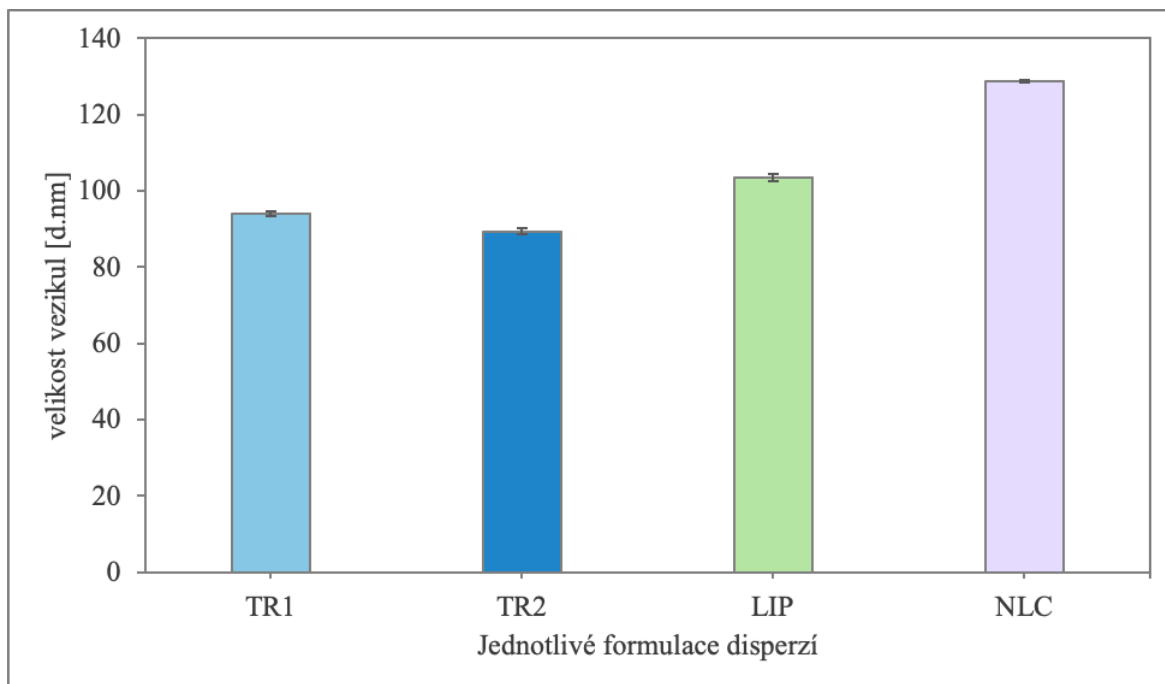
Pro studium lipidových nosičů byly použity čtyři formulace. Transfersomy se dvěma koncentracemi aktivátoru hran (TR1, TR2), lipozomy (LIP) a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC). Všechny tyto nosiče byly využity pro enkapsulaci aktivní látky CBD a následně byly sledovány jejich vlastnosti, konkrétně velikost vezikul a index polydisperzity (PDI).

Výsledky ukázaly, že typ zvoleného nosiče měl vliv na velikost vezikul ihned po jejich přípravě, kdy NLC poskytovaly větší velikost oproti ostatním nosičům. Rozdíl byl pozorován i vizuálně, kdy disperze NLC po přípravě vykazovala mléčně zakalený vzhled, zatímco zbývající tři disperze byly transparentnější (Obrázek 8).



Obrázek 8: Vzhled formulací (TR1, TR2, LIP a NLC) po přípravě

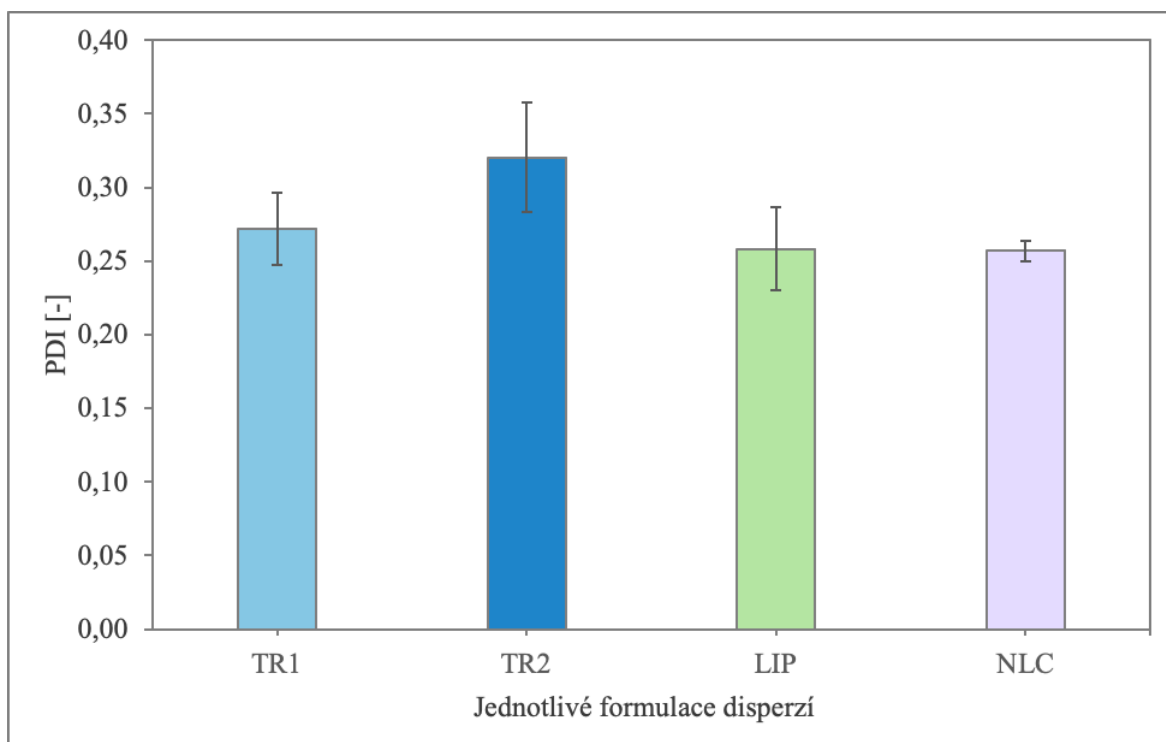
Pomocí měření velikosti částic na Zetasizeru Nano-ZS90 bylo toto zjištění potvrzeno (Obrázek 9).



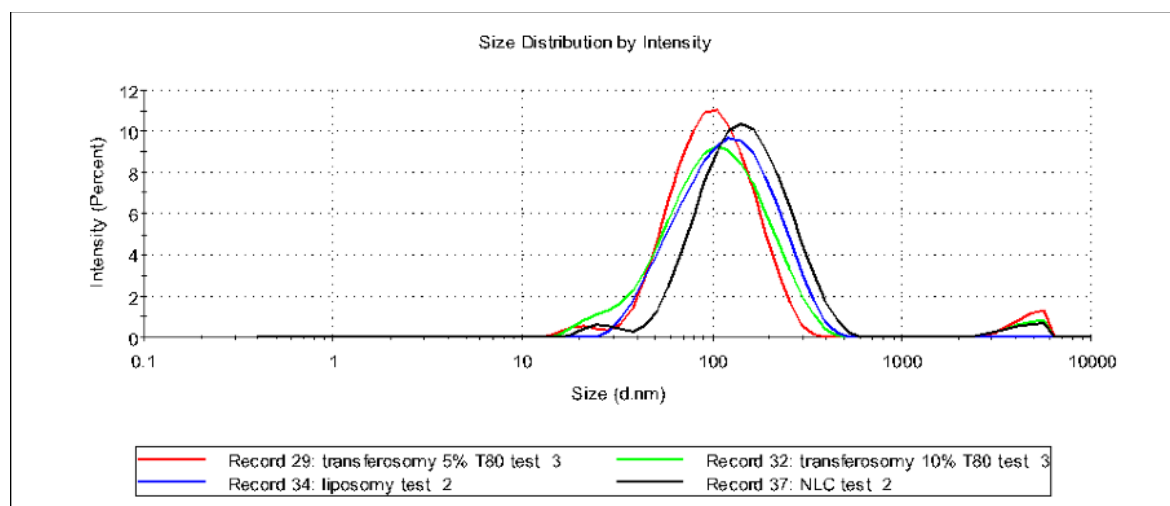
Obrázek 9: Vliv jednotlivých formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na velikosti vezikul při prvním měření

Z Obrázku 9 je patrné, že formulace TR2 obsahovala vezikuly s nejmenší velikostí, jejíž průměrná hodnota činila 89 ± 1 nm. Tato skutečnost může být vysvětlena vyšším obsahem surfaktantu Tween 80 (10 mg), který funguje jako aktivátor hran vezikul. Obecně platí, že vyšší koncentrace surfaktantu podporuje tvorbu menších a stabilnějších struktur. Důvod vzniku menších vezikul u TR2 mohl být dán také poměrem fosfatidylcholinu k surfaktantu. Při nižším poměru je stabilizující vrstva fosfatidylcholinu kompaktnější, než při vyšším poměru lipid:surfaktant [40]. Lipozomy, které aktivátor hran neobsahují, a jejich membrána je tvořena pouze fosfatidylcholinem měly velikost 103 ± 1 nm. Nejvyšší velikost vezikul pak byla pozorována u částic v disperzích NLC (129 ± 1 nm). Důvodem je jednak zcela odlišné složení tohoto nosiče, tedy přítomnost glyceryl behenátu, který významně ovlivňuje velikost částic, a také jiný způsob přípravy tohoto vzorku.

V další části práce byla analyzována distribuce velikostí částic nosičů, která popisuje rozložení velikosti částic ve zvolených vzorcích. Jejím ukazatelem je index polydisperzity (PDI). Ihned po přípravě bylo zjištěno, že všechny formulace (TR1, TR2, LIP, NLC) měly PDI v rozsahu 0.25 – 0.4, přičemž nejvyšší hodnota PDI byla zaznamenána u TR2. Tento výsledek poukazuje na to, že vzorky TR1, LIP a NLC měly PDI hodnotu odpovídající relativně úzké až střední distribuci velikostí částic, pouze distribuce vzorku TR2 byla širší (Obrázek 10).



Obrázek 10: Vliv formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na PDI ihned po jejich výrobě



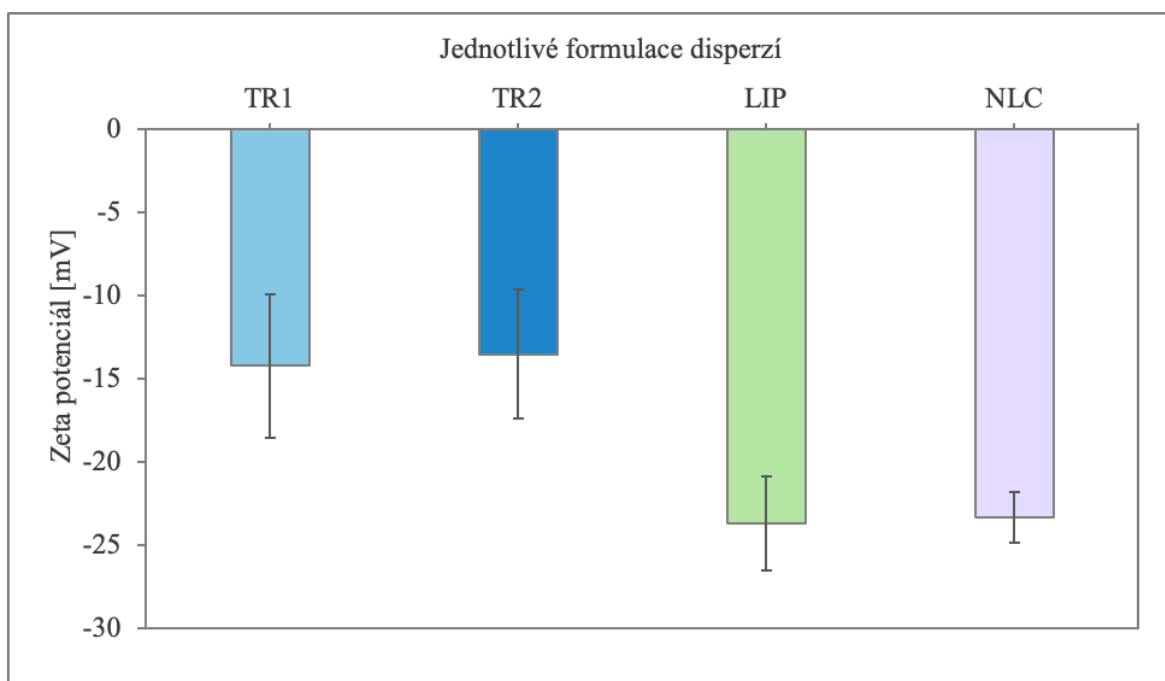
Obrázek 11: Distribuce velikostí lipidových formulací po jejich výrobě. TR1 – červená čára, TR2 – zelená čára, LIP – modrá čára, NLC – černá čára

Na Obrázku 11 jsou srovnány distribuční křivky všech lipidových formulací po prvním týdnu měření. Lze vidět, že distribuční křivky jsou obdobné a leží v rozsahu cca od 20 do 700 nm. Kromě hlavních píků lze na křivkách pozorovat i menší vedlejší píky, které indikují přítomnost frakcí s menší, či větší velikostí částic. Důvodem přítomnosti frakcí s velikostí

částic v řádu mikrometrů může být nedostatečná sonikace během přípravy formulací. Nejširší distribuci vykazuje vzorek TR2 (zelená čára), což potvrzuje i graf z Obrázku 10.

8.2 Zeta potenciál

Analýza zeta potenciálu u daných formulací je důležitým ukazatelem jejich stability. Tento parametr určuje míru elektrostatického náboje na povrchu částice, který ovlivňuje jejich agregaci. Na Obrázku 12 jsou znázorněny hodnoty zeta potenciálu v závislosti na typu studovaných lipidových disperzí.



Obrázek 12: Vliv jednotlivých formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na hodnotu jejich zeta potenciálu po přípravě

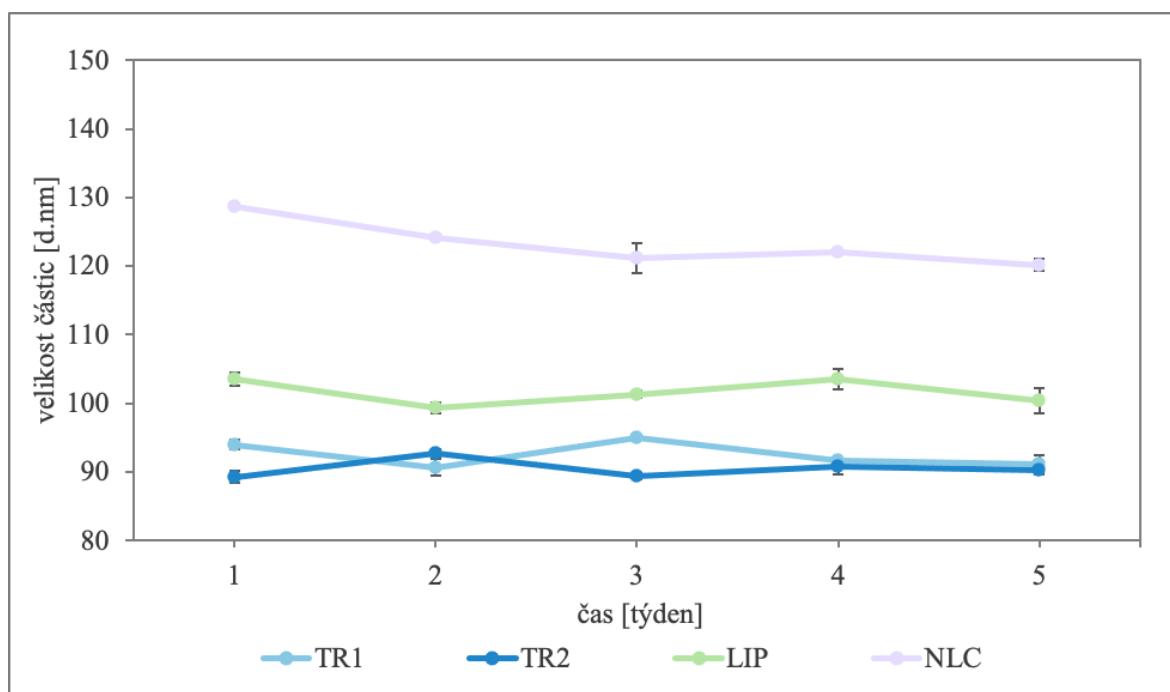
Obrázek 12 dokumentuje, že zeta potenciál transferosomů (TR1 a TR2) vykazoval hodnoty $TR1 = -14 \pm 5$ mV a $TR2 = -14 \pm 4$ mV. Tento údaj naznačuje, že vezikuly nemusí dosahovat dostatečného elektrostatického odpuzování a mohly by tedy mít vyšší tendenci k agregaci. Oproti tomu, zbývající dvě formulace (LIP a NLC) měly zeta potenciál vyšší ($LIP = -24 \pm 3$ mV, $NLC = -23 \pm 2$ mV). Tyto výsledky ukazují na vyšší negativní náboj, což je předpoklad pro lepší stabilitu disperze, jelikož se částice od sebe více odpuzují. Nicméně samotná hodnota zeta potenciálu není jediným ukazatelem stability disperzních systémů a při hodnocení stability v čase musí být v úvahu brána i velikost částic a jejich distribuce, či povaha disperzního prostředí.

8.3 Stanovení stability vzorků

Stabilita lipidových nosičů je důležitým parametrem pro určení, zda je aktivní látka schopná vykonávat svou roli v organismu. Určení koloidní stability studovaných formulací probíhalo po dobu 5 týdnů pomocí přístroje Zetasizer Nano-ZS90. Vzorky (TR1, TR2, LIP) byly uchovány při teplotě 5 °C a disperze NLC při laboratorní teplotě (~ 20 °C). Test stability byl hodnocen pomocí měření velikosti částic a zeta potenciálu. Výsledky shrnující velikosti vezikul jsou znázorněny na Obrázku 13 a výsledky popisující zeta potenciál na Obrázku 19.

Tabulka 4: Stabilita jednotlivých formulací v čase hodnocená ze změn velikostí vezikul

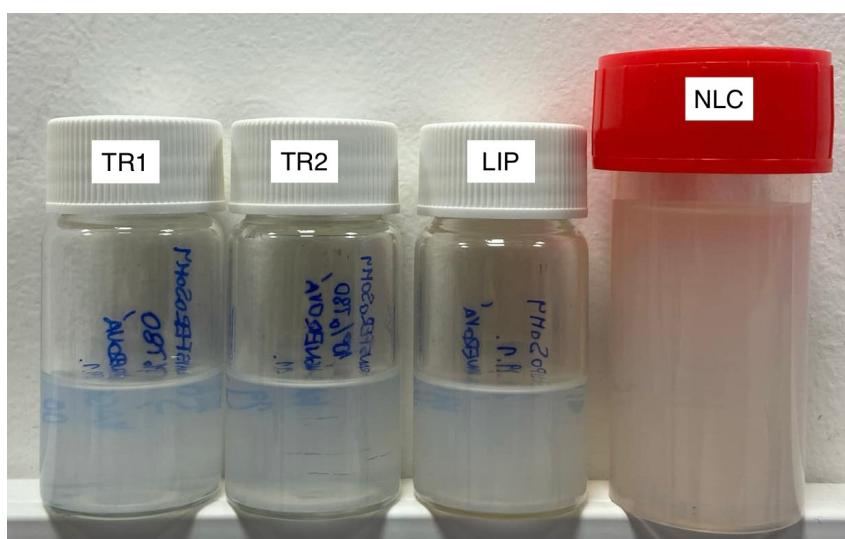
	Doba měření [týden]				
	1.	2.	3.	4.	5.
TR1	94 ± 1	91 ± 2	95 ± 1	92 ± 0	91 ± 2
TR2	89 ± 1	93 ± 1	89 ± 1	91 ± 1	90 ± 1
LIP	104 ± 1	99 ± 1	101 ± 1	104 ± 2	100 ± 2
NLC	129 ± 1	124 ± 1	121 ± 3	122 ± 1	120 ± 1



Obrázek 13: Grafické znázornění velikosti částic připravených formulací v čase (1., 2., 3., 4., 5. týden)

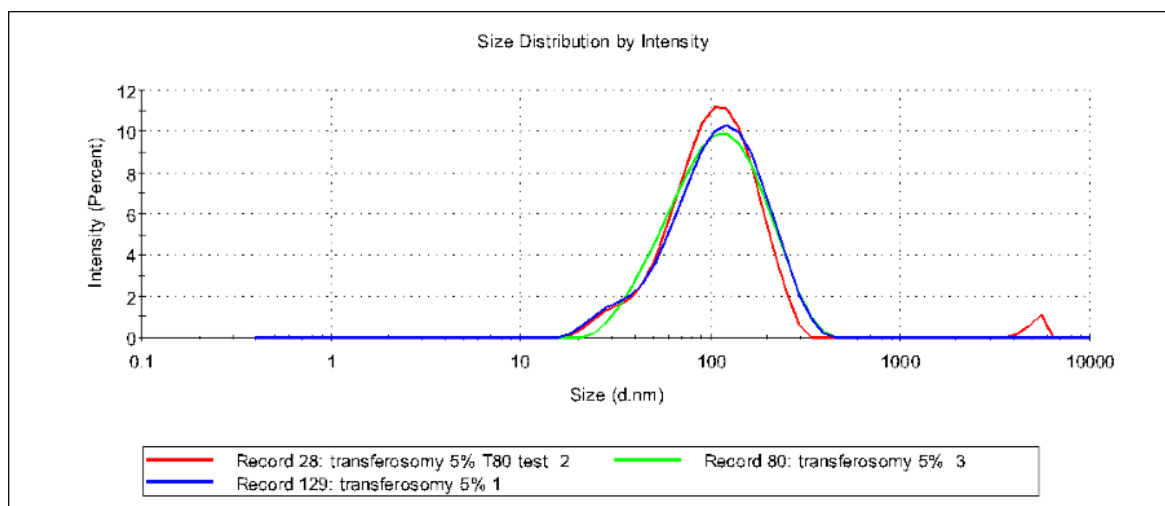
Z naměřených hodnot lze říct, že se velikost vezikul měnila jen málo. Výjimkou byly velikosti vezikul NLC, u kterých došlo během tří týdnů k poklesu (ze 129 ± 1 nm na 121 ± 3 nm), po této době byla už velikost téměř konstantní. Tento pokles udává, že NLC měly větší tendenci ke změnám velikosti. Malá změna velikosti částic byla také pozorována u formulace liposomů, uvedené hodnoty velikostí však indikují dobrou stabilitu i pro tento vzorek. Obě transferosomální disperze vykazovaly poměrně stabilní velikost. Velikosti vzorku TR1 se pohybovaly mezi 94 ± 1 nm (na začátku měření) a 91 ± 2 nm (na konci měření), což představuje jen malou změnu velikosti. U vzorku TR2 velikosti ležely v intervalu 89 ± 1 nm až 90 ± 1 nm, což rovněž ukazuje na velmi dobrou stabilitu tohoto vzorku.

Na Obrázku 14 jsou zobrazeny lipidové formulace po 5. týdnu skladování, které lze srovnat s Obrázkem 8, kde je představen vzhled vzorků po přípravě. U vzorků TR1, TR2 a LIP lze vidět, že disperze jsou transparentnější a došlo i k sedimentaci částic. Disperze NLC je zakalená a vykazuje mírnou změnu barvy ve srovnání se vzorkem v 1. týdnu skladování. Ta může být způsobena degradací enkapsulovaného CBD.

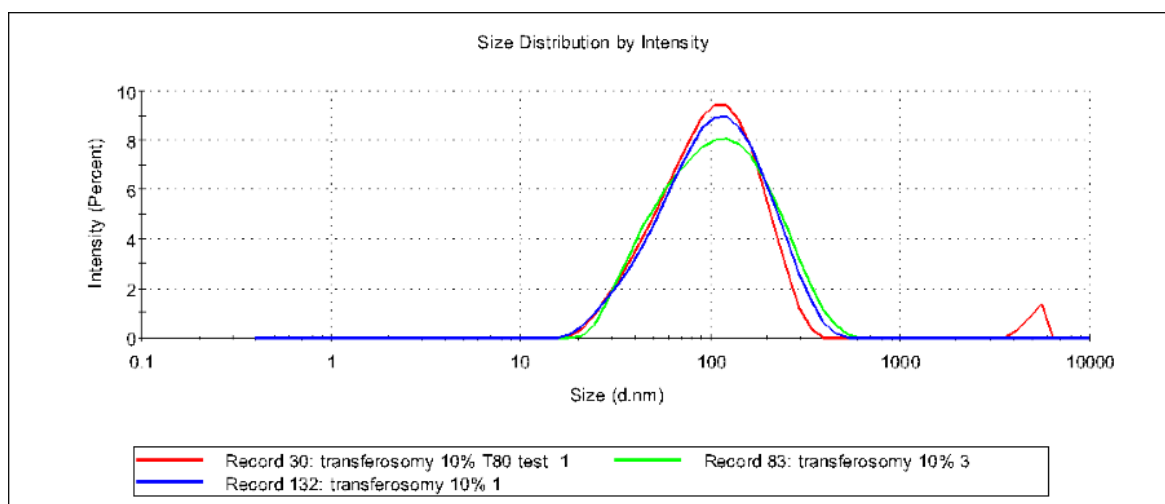


Obrázek 14: Vizualizace lipidových formulací po 5. týdnu skladování

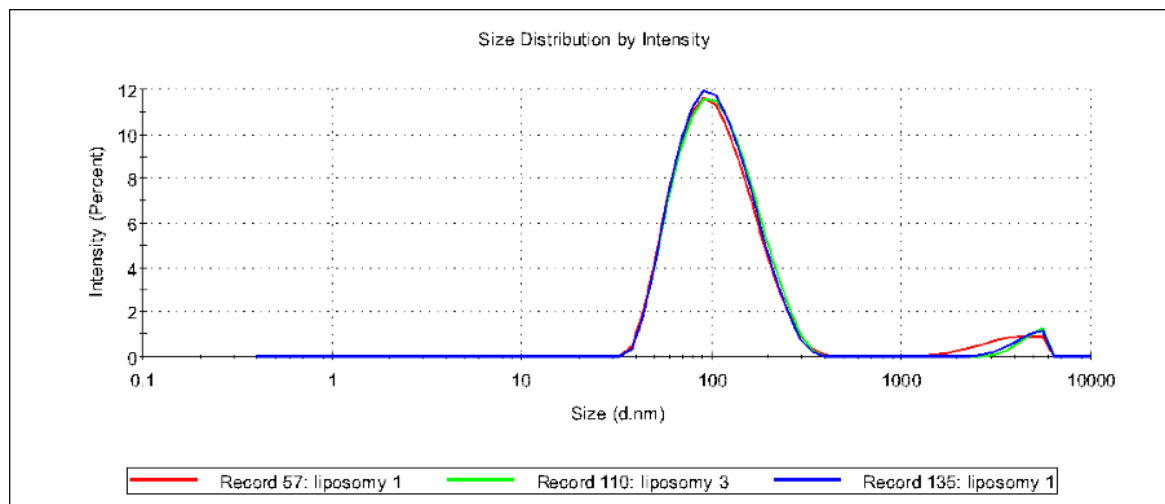
Na Obrázcích 15–18 jsou srovnány distribuční křivky vezikul studovaných lipidových formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) v průběhu doby skladování (na začátku, po 3. a 5. týdnu).



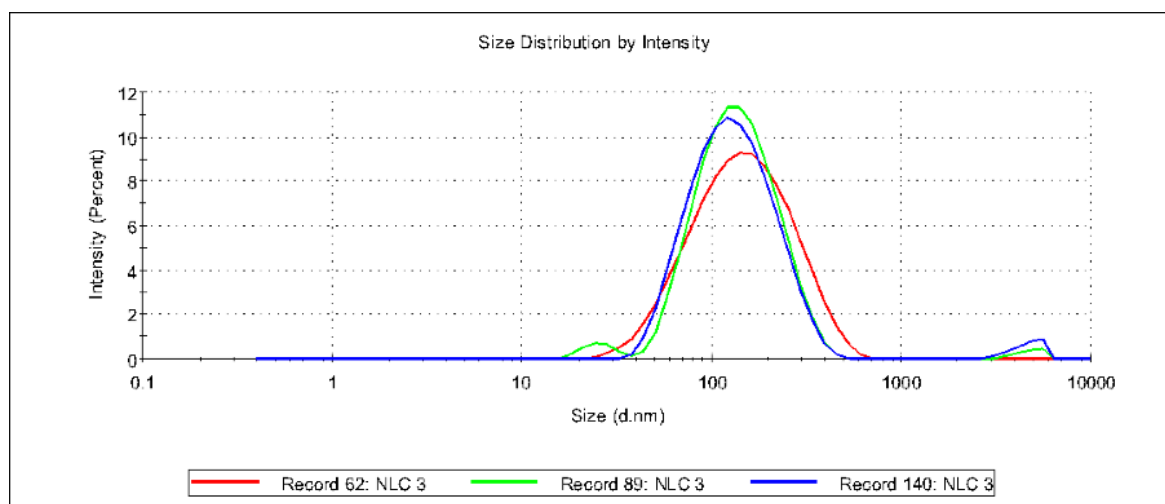
Obrázek 15: Změny distribuce velikosti částic u formulace TR1 po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára)



Obrázek 16: Změny distribuce velikosti částic u formulace TR2 po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára)



Obrázek 17: Změny distribuce velikosti částic u formulace LIP po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára)



Obrázek 18: Změny distribuce velikosti částic u formulace NLC po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára)

Obrázky znázorňují, že distribuce velikosti částic u vzorků TR1, TR2 a LIP zůstala po dobu měření relativně stabilní. Ve všech sledovaných časových intervalech byly zaznamenány obdobné distribuční křivky. Tento fakt svědčí o tom, že disperze mají dobrou stabilitu. Pouze na začátku měření byl u vzorků TR1 a TR2 pozorován menší vedlejší pík v oblasti vyšších velikostí částic (cca 5–10 μm). Lze tedy říct, že tyto vzorky se dají považovat za stabilní po dobu 5 týdnů.

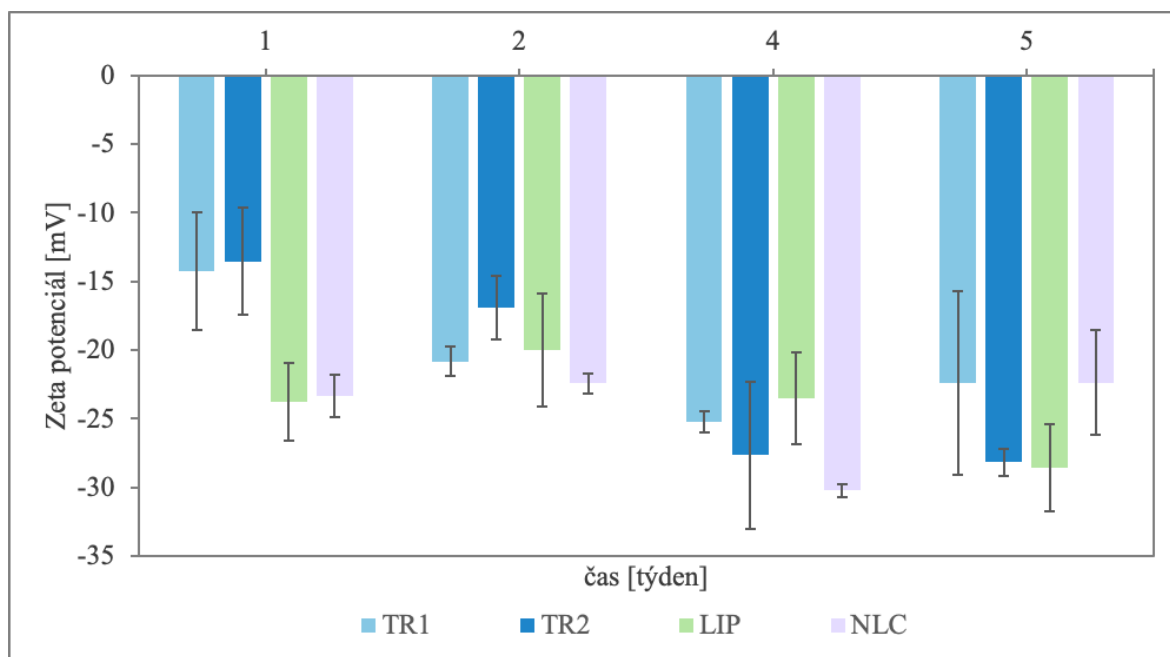
U formulace LIP byly vedlejší píky v oblasti vyšších velikostí přítomné v průběhu celého období sledování stability. Tyto píky indikují tendenci vzorku k agregaci nebo přítomnost populace částic, které mají větší velikost.

Distribuce velikosti částic u formulace NLC vykazovala po přípravě širší profil (červená čára), což ukazuje na přítomnost rozdílnějších velikostí částic ve vzorku ihned po jeho přípravě. V průběhu skladování docházelo k postupné stabilizaci NLC částic, což je dokumentováno i na distribučních křivkách, které se mírně zúžily a byly poté během sledovaného období velmi podobné. Tato skutečnost je v souladu s mírným poklesem velikostí částic uvedeným na Obrázku 13. Ve všech časových intervalech byly však na distribučních křivkách přítomny i vedlejší píky (cca 5–10 μm), které svědčí o přítomnosti částic s větší velikostí.

Další sledovanou hodnotou v průběhu skladování byl zeta potenciál (Obrázek 19, Tabulka 5).

Tabulka 5: Výsledné hodnoty zeta potenciálu u daných lipidových formulací

Formulace	Doba měření [týden]			
	1.	2.	4.	5.
TR1	-14 ± 5	-21 ± 1	-25 ± 1	-22 ± 7
TR2	-14 ± 4	-17 ± 3	-28 ± 6	-28 ± 1
LIP	-24 ± 3	-20 ± 4	-24 ± 4	-29 ± 3
NLC	-23 ± 2	-22 ± 1	-30 ± 1	-22 ± 4



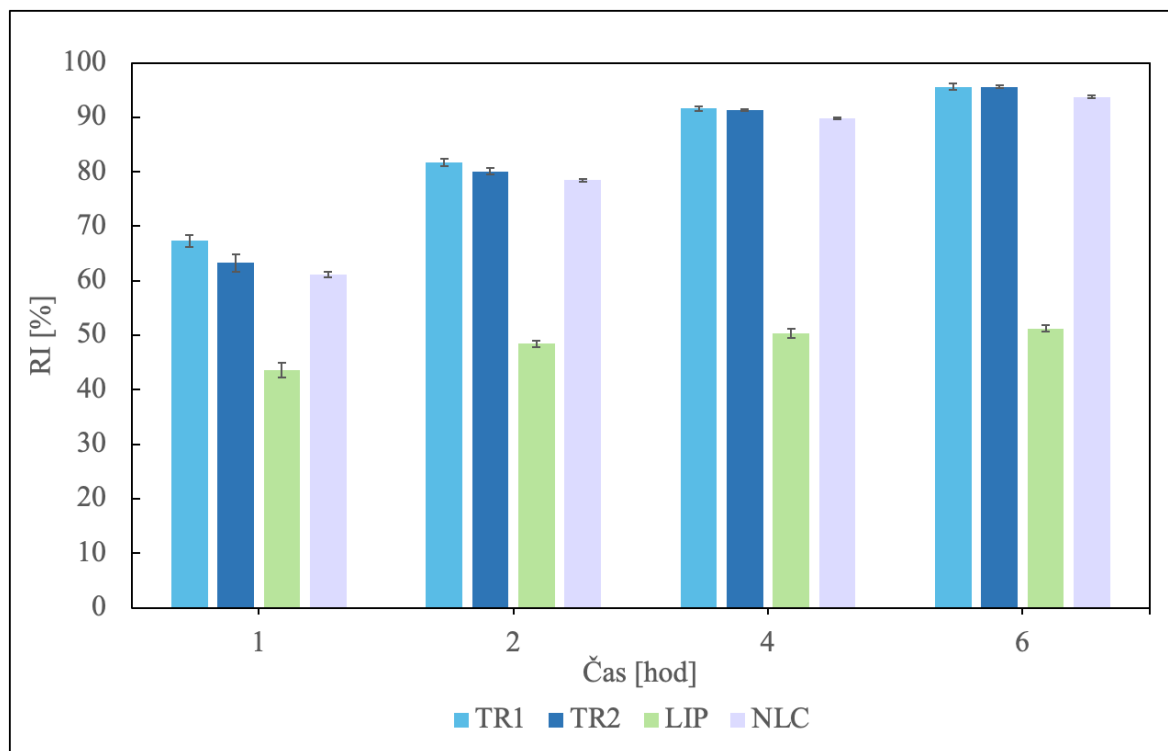
Obrázek 19: Grafické znázornění hodnot zeta potenciálu připravených formulací v daném časovém období [1., 2., 4., 5. týden]

Ke změnám docházelo také u zeta potenciálu. U vzorku TR1 se potenciál snižoval z počáteční hodnoty -14 ± 5 mV na hodnotu $-25 \pm 1,2$ mV (4. týden) a -22 ± 7 mV (5. týden). U vzorku TR2 byl rovněž pozorován snižující se potenciál v celém sledovaném časovém období. V prvním týdnu vykazoval vzorek zeta potenciál -14 ± 4 mV, avšak v posledním týdnu měření se jeho hodnota snížila na -28 ± 1 mV. Tato skutečnost naznačuje, že vzorky TR1 a TR2 vykazují v dlouhodobém měřítku dobrou stabilitu. Vzorek značený LIP projevil v prvním až čtvrtém týdnu kolísání hodnot zeta potenciálu (v rozmezí -20 až -24 mV) a jeho potenciál se pak v pátém týdnu snížil a vykazoval hodnotu -29 ± 3 mV. Nejnižší hodnota potenciálu ze všech formulací byla zaznamenána u disperze NLC ve čtvrtém týdnu měření (-30 ± 1 mV), avšak v pátém týdnu se její zeta potenciál zvýšil na -22 ± 4 mV. Celkově lze říct, že u většiny disperzí (TR1, TR2 a LIP) hodnoty zeta potenciálu během skladování mírně klesaly, změny zeta potenciálu tedy nepředstavují faktor, který by mohl vést k výrazné destabilizaci připravených vzorků.

8.4 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita jednotlivých lipidových disperzí byla stanovena pomocí metody ABTS, která je založena na principu zhášení kation-radikálu $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (2,2'-azino-bis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátu) studovanou látkou. Nejprve je jedoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS vhodným oxidačním činidlem (např. peroxodisíran amonný) vytvořen radikál $\text{ABTS}^{+\bullet}$, který je zhášen látkami s antioxidačními vlastnostmi (donory vodíku). Tato reakce je sledována spektrofotometricky pomocí změn absorpčního spektra $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (absorbance je měřena při 734–736 nm). Při stanovení je nutné, aby testované látky nevykazovaly výraznou absorpci záření v této oblasti [41].

Měření absorbance bylo provedeno v intervalech 1, 2, 4 a 6 hodin po smíchání radikálu se studovanými disperzemi. Pokles absorbance byl pak přímo úměrný antioxidační aktivitě vzorku. Účinnost antioxidačních vlastností může být pozorována také vizuálně ze změny barvy po smíchání roztoku radikálu a vzorku. Jestliže je celkový roztok sytě zelený, znamená to, že radikál je nedostatečně zhášen aktivní látkou (CBD), což indikuje nízkou antioxidační aktivitu testované látky. Na Obrázku 20 je znázorněna schopnost testovaných vzorků (TR1, TR2, LIP, NLC) zhášet v určitém časovém intervalu ABTS radikály stanovená pomocí spektrofotometrického měření.



Obrázek 20: Grafická závislost radikálové inhibice (RI) vzorků (antioxidační aktivity) v čase (1, 2, 4 a 6 hodin)

Na základě naměřených dat byla zjištěna rozdílná účinnost inhibice kation-radikálu $\text{ABTS}^{+\bullet}$ testovaných vzorků. U transferosomálních disperzí (TR1, TR2) a vzorku NLC byla prokázána silná antioxidační účinnost. Po 6 hodinách kontaktu byly tyto vzorky schopné zhášet více než 90 % radikálů. V případě liposomální disperze byla antioxidační schopnost po 6 hodinách oproti ostatním vzorkům podstatně nižší (~50 %). Tento rozdíl může být způsoben odlišnou koncentrací CBD v disperzích (v liposomech bylo obsaženo nejméně CBD), rozdílnou velikostí nosičů a také odlišnou schopností reagovat s kation-radikálem $\text{ABTS}^{+\bullet}$ v závislosti na typu lipidového nosiče. Antioxidační schopnosti NLC s enkapsulovaným CBD byly potvrzeny i literárními daty. Autoři publikace [42] zjistili, že čerstvě připravené NLC se 100 mg CBD byly schopné zhášet až 100 % DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikálů.

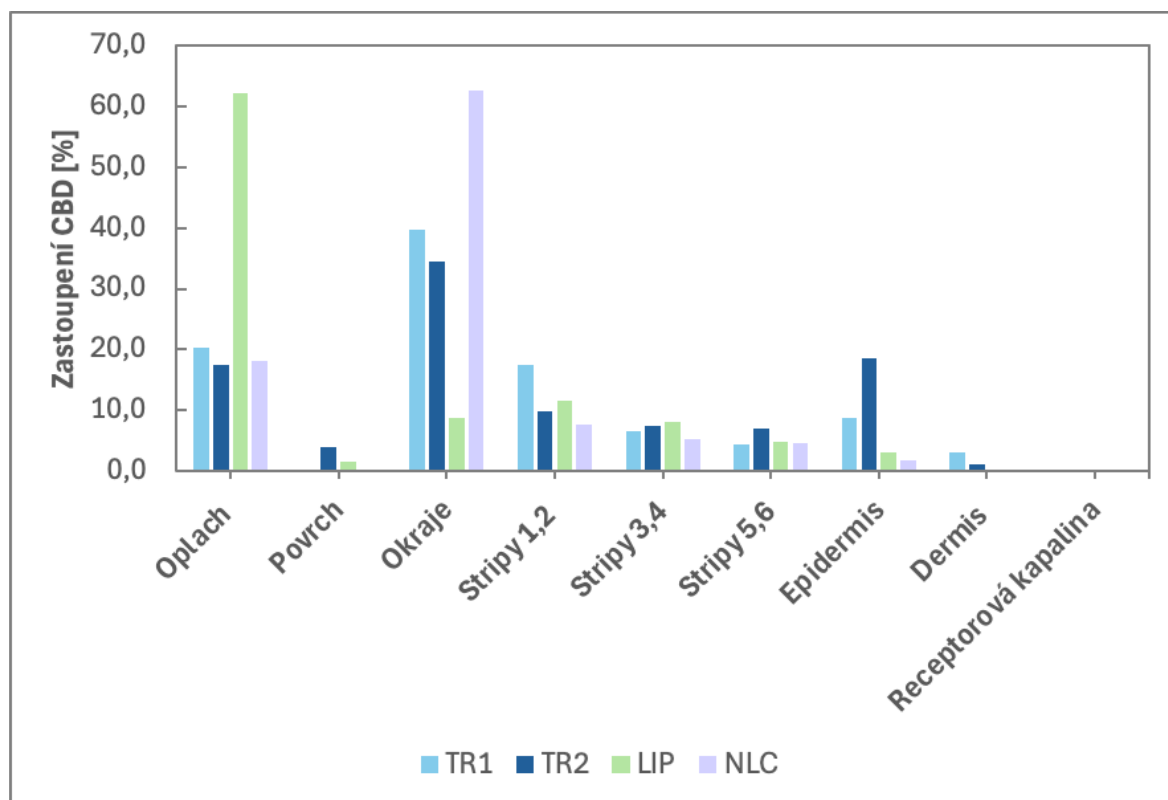
8.5 Transdermální penetrace

Transdermální absorpce aktivní látky CBD enkapsulované do připravených formulací lipidových nosičů byla testována na modelu prasečí kůže pomocí Franzových difúzních komůrek. Koncentrace aktivní látky CBD v jednotlivých vrstvách kůže byla stanovena pomocí metody HPLC. Po vyhodnocení výsledků byl sledován vliv jednotlivých lipidových

formulací na jejich schopnost transportovat CBD do kůže. Výsledné hodnoty koncentrací CBD a návratnost byly vybrány ze dvou paralelních měření a jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledné koncentrace CBD ve vrstvách kožního vzorku pro studované formulace (TR1, TR2, LIP, NLC) po transdermální absorpci a návratnost CBD

Zastoupení CBD [µg/ml]	TR1	TR2	LIP	NLC
Počáteční obsah CBD [µg]	75	75	50	54
Oplach	11,20	11,57	18,56	9,78
Povrch	0,00	2,66	0,45	0,00
Okraje kůže	21,86	22,93	2,65	33,61
Stripy 1,2	9,57	6,55	3,44	4,10
Stripy 3,4	3,56	4,88	2,44	2,77
Stripy 5,6	2,40	4,65	1,46	2,52
<i>Epidermis</i>	4,78	12,37	0,90	0,90
<i>Dermis</i>	1,66	0,77	0,00	0,00
Receptorová kapalina	0,00	0,00	0,00	0,00
Návratnost [%]	73	89	60	99



Obrázek 21: Procentuální zastoupení CBD v jednotlivých vrstvách kožního vzorku u studovaných formulací (TR1, TR2, LIP, NLC)

Z Obrázku 21 je patrné, že lipidové formulace mají vliv na prostup CBD vzorkem kůže. Nejvyšší procentuální zastoupení CBD na povrchu donorové části Franzovy komůrky (Oplach) bylo zaznamenáno u disperze liposomů (LIP), což může být způsobeno nižší schopností tohoto nosiče udržet CBD ve své struktuře nebo horším prostupem CBD liposomů do vrstev kůže. Velmi malé množství CBD pak bylo přítomno na povrchu kožních vzorků, kde u TR1 a NLC bylo množství nulové, což prokazuje jejich dobrou schopnost absorbovat se do kůže. Větší procentuální zastoupení CBD bylo zaznamenáno u disperzí TR1, TR2 a NLC, které prostoupily do okrajů kůže mimo plochu kontaktu kožního vzorku s receptorovou kapalinou (okraj Franzovy difúzní komůrky). Tento fakt lze objasnit vyšší deformovatelností a pohybem transferosomálních disperzí a lepší stabilitou NLC, které mají nižší schopnost agregovat, a tak mohou migrovat do okrajů mimo Franzovu komůrku.

Co se týká srovnání množství CBD, které z jednotlivých vzorků prostoupilo do *Stratum corneum*, tak bylo nejvyšší u disperze TR1. Do prvních dvou vrstev (Stripy 1,2) prošlo 17,4 %. Následně se množství CBD po dalším stripování snížilo na 4,4 %. Obdobné chování, tedy postupné snižování prošlého množství CBD do hlubších vrstev *Stratum corneum* bylo pozorováno i pro ostatní formulace. V *Epidermis* bylo nejvyšší zastoupení CBD prokázáno

u vzorku TR2 (18,7 %), což může být vysvětleno přítomností vyššího obsahu aktivátoru hran (Tween 80) v lipidové membráně, který zvyšuje flexibilitu vezikul. Deformovatelné vezikuly dokážou proniknout skrz *Stratum corneum* a mají vysokou povrchovou hydrofilitu, což jim umožňuje prostoupit skrz transkutánní kanály do hlubších vrstev kůže [43]. Nízké procento CBD bylo naměřeno u vzorků TR1 a TR2 také v hlubší vrstvě *Dermis* (3 a 1 %). U formulací LIP a NLC bylo množství CBD v *Dermis* nulové. V receptorové kapalině již nebylo detekováno žádné množství CBD. Tento fakt naznačuje, že lipidové nosiče s aktivní látkou nepenetrují do systémového oběhu.

Návratnost CBD u vzorků TR1, TR2 a LIP byla 73, 89 a 60 %. Tyto hodnoty jsou nižší v porovnání s pravidly OECD 428 o kožní absorpci pomocí *in vitro* metody, kde požadovaná návratnost činí nejméně 90 %. Jediná formulace s aktivní látkou CBD, která splnila tento požadavek byla NLC (99 %). Výsledky studie jsou v souladu s publikovanými daty [42], která rovněž prokázala, že NLC významně zlepšily penetraci CBD (ve srovnání s neenkapsulovaným CBD) do hlubších vrstev kůže, včetně *Epidermis* a *Dermis*, kam je pro samotné CBD obvykle obtížné proniknout.

ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřena na stanovení transdermální penetrace aktivních látek z lipidových nosičů. Jejím cílem bylo připravit transferosomy s různým obsahem aktivátoru hran (TR1, TR2), liposomy (LIP) a nanostrukturované lipidové částice (NLC) s aktivní látkou CBD, otestovat jejich vlastnosti a určit stabilitu daných formulací v čase. V práci byly pomocí analytických metod stanoveny velikosti částic lipidových nosičů, jejich distribuce velikosti (index polydisperzity – PDI) a zeta potenciál v průběhu 5 týdnů skladování. Sledována byla také antioxidační stabilita zhášením ABTS radikálů

Na základě vyhodnocení velikosti vezikul, PDI a zeta potenciálu lze označit připravené lipidové formulace za stabilní. Mírné snížení velikosti vezikul vykazovala formulace NLC, kde ze 129 ± 1 nm se vezikuly zmenšily na 120 ± 1 nm.

Antioxidační aktivita nosičů s CBD byla ověřena pomocí ABTS testu. Silná antioxidační aktivita byla prokázána u transferosomálních disperzí (TR1, TR2) a formulace NLC, které vykazovaly dobrou schopnost zhášet více než 90 % volných radikálů. U liposomální disperze (LIP) byla antioxidační vlastnost menší jak 50 %, což bylo zřejmě způsobeno nižším obsahem CBD v této formulaci.

Schopnost vyrobených lipidových formulací s CBD penetrovat přes kůži byla testována pomocí Franzových difúzních komůrek. Z výsledků lze zjistit, že na povrchu kožního vzorku bylo po 24 hodinách testu přítomno jen malé množství CBD. Tento fakt nasvědčuje tomu, že formulace mají dobrou schopnost absorbovat se do jednotlivých vrstev kůže. Všechny testované formulace s CBD procházely nejdále do vrstvy *Epidermis*, přičemž u vzorků TR1 a TR2 proniklo malé množství CBD (1 a 3 %) i do vrstvy *Dermis*. To je s velkou pravděpodobností důsledkem vyšší deformovatelnosti těchto vezikul způsobené přítomností aktivátoru hran. Návratnost CBD z celkového množství podané látky, požadovaná pravidly OECD 428 (> 90 %), byla splněna jen u formulace NLC (99 %).

Výsledky bakalářské práce ukazují, že dané lipidové formulace jsou vhodnými nosiči aktivní látky CBD. Typ nosiče a množství enkapsulovaného CBD pak ovlivňují hloubku průniku a koncentraci aktivní látky v jednotlivých vrstvách kůže.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DHIMAN, Neerupma; AWASTHI, Rajendra; SHARMA, Bhupesh; KHARKWAL, Harsha a KULKARNI, Giriraj T. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. Online. *Frontiers in Chemistry*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.580118>. [cit. 2025-03-27].
- [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. 2025-03-29].
- [3] RICCARDI, Domenico; BALDINO, Lucia a REVERCHON, Ernesto. Liposomes, transfersomes and niosomes: production methods and their applications in the vaccinal field. Online. *Journal of Translational Medicine*. 2024, roč. 22, č. 1. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05160-4>. [cit. 2025-03-29].
- [4] ALAVI, Mehran; KARIMI, Naser a SAFAEI, Mohsen. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017, roč. 7, č. 1, s. 3-9. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>. [cit. 2025-03-29].
- [5] LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. Online. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012, roč. 1, č. 2, s. 147-168. ISSN 2164-9634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>. [cit. 2025-03-29].
- [6] RAJAN, Reshmy; JOSE, Shoma; BIJU MUKUND, VP a VASUDEVAN, DeepaT. Transfersomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. Online. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2011, roč. 2, č. 3. ISSN 2231-4040. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2231-4040.85524>. [cit. 2025-03-29].
- [7] GARG, Unnati a JAIN, Karuna. Dermal and Transdermal Drug Delivery through Vesicles and Particles: Preparation and Applications. Online. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2021. ISSN 2228-5881. Dostupné z: <https://doi.org/10.34172/apb.2022.006>. [cit. 2025-03-29].
- [8] FERNÁNDEZ-GARCÍA, Raquel; LALATSA, Aikaterini; STATTS, Larry; BOLÁS-FERNÁNDEZ, Francisco; BALLESTEROS, M. Paloma et al. Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, roč. 573. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>. [cit. 2025-03-29].
- [9] LI, Zhen; LIN, Xiaohong; YU, Li; LI, Xinwei; GENG, Fei et al. Effects of Chloramphenicol on the Characterization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers. Online. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2009, roč. 30, č. 7, s. 1008-1014. ISSN 0193-2691. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01932690802701663>. [cit. 2025-03-30].
- [10] AKHOOND ZARDINI, Ali; MOHEBBI, Mohebbat; FARHOOSH, Reza a BOLURIAN, Shadi. Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. Online.

- Journal of Food Science and Technology*. 2018, roč. 55, č. 1, s. 287-298. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2937-5>. [cit. 2025-03-30].
- [11] SHIRODKAR, Rupesh K.; KUMAR, Lalit; MUTALIK, Srinivas a LEWIS, Shaila. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Emerging Lipid Based Drug Delivery Systems. Online. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019, roč. 53, č. 5, s. 440-453. ISSN 0091-150X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02017-9>. [cit. 2025-03-30].
- [12] AMOABEDINY, Ghasem; HAGHIRALSADAT, Fateme; NADERINEZHAD, Samira; HELDER, Marco N.; AKHOUNDI KHARANAGHI, Elham et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. Online. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2017, roč. 67, č. 6, s. 383-400. ISSN 0091-4037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1332623>. [cit. 2025-03-30].
- [13] IQBAL, Md Asif; MD, Shadab; SAHNI, Jasjeet Kaur; BABOOTA, Sanjula; DANG, Shweta et al. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. Online. *Journal of Drug Targeting*. 2012, roč. 20, č. 10, s. 813-830. ISSN 1061-186X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845>. [cit. 2025-03-30].
- [14] SELVAMUTHUKUMAR, Subramanian a VELMURUGAN, Ramaiyan. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. Online. *Lipids in Health and Disease*. 2012, roč. 11, č. 1. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-159>. [cit. 2025-03-30].
- [15] SILVA, Ana C. a LOUREIRO, Joana A. A Simple Method for the Preparation and Characterization of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) Formulations for Cutaneous Use. Online. *Journal of Chemical Education*. 2024, roč. 101, č. 10, s. 4333-4338. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.4c00503>. [cit. 2025-03-30].
- [16] GARG, Gopal; SARAF, Shailendra a SARAF, Swarnlata. Cubosomes: An Overview. Online. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007, roč. 30, č. 2, s. 350-353. ISSN 0918-6158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1248/bpb.30.350>. [cit. 2025-03-30].
- [17] PALMA, Amanda Santos; CASADEI, Bruna Renata; LOTIERZO, Mayra Cristina; DE CASTRO, Raphael Dias a BARBOSA, Leandro Ramos Souza. A short review on the applicability and use of cubosomes as nanocarriers. Online. *Biophysical Reviews*. 2023, roč. 15, č. 4, s. 553-567. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01089-y>. [cit. 2025-03-30].
- [18] BASWAN, Sudhir M; KLOSNER, Allison E; GLYNN, Kelly; RAJGOPAL, Arun; MALIK, Kausar et al. PTherapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders/p. 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. 2024-11-16].
- [19] FRIDE, Ester; FEIGIN, Cfir; PONDE, Datta E.; BREUER, Aviva; HANUŠ, Lumír et al. (+)-Cannabidiol analogues which bind cannabinoid receptors but exert peripheral activity only. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2004, roč. 506, č. 2, s. 179-188. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.049>. [cit. 2025-03-30].
- [20] WHITE, C. Michael. A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. Online. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2019, roč. 59, č. 7, s. 923-934. ISSN 0091-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcph.1387>. [cit. 2024-11-16].

- [21] VOLMAJER VALH, Julija; PERŠIN, Zdenka; VONČINA, Bojana; VREZNER, Kaja; TUŠEK, Lidija et al. Microencapsulation of Cannabidiol in Liposomes as Coating for Cellulose for Potential Advanced Sanitary Material. Online. *Coatings*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2079-6412. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/coatings11010003>. [cit. 2024-11-16].
- [22] BARTOSOVA, L. a BAJGAR, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, roč. 19, č. 27, s. 4671-4677. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/092986712803306358>. [cit. 2025-03-31].
- [23] PATHAN, IB a SETTY, CM. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems. Online. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009, roč. 8, č. 2. ISSN 1596-9827. Dostupné z: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v8i2.44527>. [cit. 2025-03-31].
- [24] JAMPILEK, Josef a BRYCHTOVA, Katerina. Azone analogues: classification, design, and transdermal penetration principles. Online. *Medicinal Research Reviews*. 2012, roč. 32, č. 5, s. 907-947. ISSN 0198-6325. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/med.20227>. [cit. 2025-03-31].
- [25] NAFISI, Shohreh; SCHÄFER-KORTING, Monika a MAIBACH, Howard I. Perspectives on percutaneous penetration: Silica nanoparticles. Online. *Nanotoxicology*. 2014, roč. 9, č. 5, s. 643-657. ISSN 1743-5390. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.958115>. [cit. 2025-04-03].
- [26] HMINGTHANSANGA, Victor; SINGH, Nidhi; BANERJEE, Suparna; MANICKAM, Sivakumar; VELAYUTHAM, Ravichandiran et al. Improved Topical Drug Delivery: Role of Permeation Enhancers and Advanced Approaches. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 12. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122818>. [cit. 2025-03-31].
- [27] JESSY, Shaji; SHRIPAD, Marathe a MANSI, Shah. Transdermal Penetration Enhancers. Online. *Current Drug Therapy*. 2007, roč. 2, č. 2, s. 133-142. ISSN 15748855. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/157488507780619040>. [cit. 2025-03-31].
- [28] PARK, Juhyun; LEE, Hyowon; LIM, Guei-Sam; KIM, Nayoung; KIM, Dongwon et al. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Sonophoresis and Simultaneous Application of Sonophoresis and Iontophoresis. Online. *AAPS PharmSciTech*. 2019, roč. 20, č. 3. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1309-z>. [cit. 2025-03-31].
- [29] MATHUR, Vineet; SATRAWALA, Yamini a RAJPUT, MithunSingh. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. Online. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2010, roč. 4, č. 3. ISSN 0973-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0973-8398.72115>. [cit. 2025-03-31].
- [30] CHEN, Jun; JIANG, Qiu-Dong; WU, Ye-Ming; LIU, Pei; YAO, Jun-Hong et al. Potential of Essential Oils as Penetration Enhancers for Transdermal Administration of Ibuprofen to Treat Dysmenorrhoea. Online. *Molecules*. 2015, roč. 20, č. 10, s. 18219-18236. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules201018219>. [cit. 2025-03-31].
- [31] VASYUCHENKO, Ekaterina P.; OREKHOV, Philipp S.; ARMEEV, Grigoriy A. a BOZDAGANYAN, Marine E. CPE-DB: An Open Database of Chemical Penetration Enhancers. Online. *Pharmaceutics*. 2021, roč. 13, č. 1. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010066>. [cit. 2025-03-31].

- [32] 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. 2025-04-01].
- [33] AVIELLO, Gabriella; ROMANO, Barbara; BORRELLI, Francesca; CAPASSO, Raffaele; GALLO, Laura et al. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. Online. *Journal of Molecular Medicine*. 2012, roč. 90, č. 8, s. 925-934. ISSN 0946-2716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0856-x>. [cit. 2025-04-01].
- [34] URITS, Ivan; BORCHART, Matthew; HASEGAWA, Morgan; KOCHANSKI, Justin; ORHURHU, Vwaire et al. An Update of Current Cannabis-Based Pharmaceuticals in Pain Medicine. Online. *Pain and Therapy*. 2019, roč. 8, č. 1, s. 41-51. ISSN 2193-8237. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40122-019-0114-4>. [cit. 2025-04-01].
- [35] WATT, Georgia a KARL, Tim. In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2017, roč. 8. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00020>. [cit. 2025-04-01].
- [36] JURGELANE, Inga; EGGLE, Karina; GRAVA, Andra; GALKINA, Dana; BRANTE, Margarita et al. Exploring the effects of cannabidiol encapsulation in liposomes on their physicochemical properties and biocompatibility. Online. *Drug Delivery*. 2025, roč. 32, č. 1. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10717544.2025.2460666>. [cit. 2025-04-03].
- [37] MOQEJWA, Thope; MARIMUTHU, Thashree; KONDIHAH, 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. 2025-04-03].
- [38] XIE, Yang; LI, Peng; FU, Dong; YANG, Fan; SUI, Xin et al. CBD-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Optimization, Characterization, and Stability. Online. *ACS Omega*. 2024, roč. 9, č. 39, s. 40632-40643. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04771>. [cit. 2025-04-03].
- [39] MOCHŤÁKOVÁ, Kateřina. *Elastické liposomy pro enkapsulaci kanabidiolů*. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2024.
- [40] POTISUWAN, Sasawat; APICHATWATANA, Nutsawadee a RUJIVIPAT, Soravoot. Improved skin permeation of transfersomes containing Eulophia macrobulbon extract. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, roč. 229. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113474>. [cit. 2025-04-07].
- [41] PAULOVÁ, Hana; BOCHOŘÁKOVÁ, Hana a TÁBORSKÁ, Eva. *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro: Orgán České chemické společnosti pro vědu a průmysl*. Praha, 2004. ISSN 0366-6832.
- [42] CALIENNI, Maria Natalia; SCAVONE, Mirian Ana; SANGUINETTI, Ana Paula; CORLETO, Merlina; DI MEGLIO, Magalí Rocío et al. Lipid Nanoparticle Formulations for the Skin Delivery of Cannabidiol. Online. *Pharmaceutics*. 2024, roč. 16, č. 12. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16121490>. [cit. 2025-05-11].
- [43] SUDHAKAR, Kalvatala; FULORIA, Shivkanya; SUBRAMANIYAN, Vetriselvan; SATHASIVAM, Kathiresan V.; AZAD, Abul Kalam et al. Ultraflexible Liposome

Nanocargo as a Dermal and Transdermal Drug Delivery System. Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 10. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano11102557>. [cit. 2025-05-05].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura liposomu [3] – <i>upraveno</i>	14
Obrázek 2: Struktura transferosomu [3] - <i>upraveno</i>	16
Obrázek 3: Chemický vzorec kanabidiolu [19]	19
Obrázek 4: Cesty průniku kůží [25] - <i>upraveno</i>	22
Obrázek 5: Vizualizace tenkého lipidového filmu pomocí barviva na stěnách baňky před samotným hydratováním disperze.....	33
Obrázek 6: Příprava kožních štěpů	36
Obrázek 7: Franzova difúzní komůrka s kožním vzorkem.....	37
Obrázek 8: Vzhled formulací (TR1, TR2, LIP a NLC) po přípravě.....	39
Obrázek 9: Vliv jednotlivých formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na velikosti vezikul při prvním měření.....	40
Obrázek 10: Vliv formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na PDI ihned po jejich výrobě	41
Obrázek 11: Distribuce velikostí lipidových formulací po jejich výrobě. TR1 – červená čára, TR2 – zelená čára, LIP – modrá čára, NLC – černá čára	41
Obrázek 12: Vliv jednotlivých formulací (TR1, TR2, LIP, NLC) na hodnotu jejich zeta potenciálu po přípravě	42
Obrázek 13: Grafické znázornění velikosti částic připravených formulací v čase (1., 2., 3., 4., 5. týden)	43
Obrázek 14: Vizualizace lipidových formulací po 5. týdnu skladování.....	44
Obrázek 15: Změny distribuce velikosti částic u formulace TR1 po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára).....	45
Obrázek 16: Změny distribuce velikosti částic u formulace TR2 po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára).....	45
Obrázek 17: Změny distribuce velikosti částic u formulace LIP po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára).....	46
Obrázek 18: Změny distribuce velikosti částic u formulace NLC po přípravě (červená čára), ve 3. týdnu (zelená čára) a 5. týdnu (modrá čára).....	46
Obrázek 19: Grafické znázornění hodnot zeta potenciálu připravených formulací v daném časovém období [1., 2., 4., 5. týden).....	47
Obrázek 20: Grafická závislost radikálové inhibice (RI) vzorků (antioxidační aktivity) v čase (1, 2, 4 a 6 hodin).....	49
Obrázek 21: Procentuální zastoupení CBD v jednotlivých vrstvách kožního vzorku u studovaných formulací (TR1, TR2, LIP, NLC).....	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Množství základních komponent pro přípravu transferosomů (10 ml disperze)	32
Tabulka 2: Množství základních komponent pro přípravu liposomů (10 ml disperze)	33
Tabulka 3: Množství základních komponent pro výrobu NLC	34
Tabulka 4: Stabilita jednotlivých formulací v čase hodnocená ze změn velikostí vezikul..	43
Tabulka 5: Výsledné hodnoty zeta potenciálu u daných lipidových formulací	47
Tabulka 6: Výsledné koncentrace CBD ve vrstvách kožního vzorku pro studované formulace (TR1, TR2, LIP, NLC) po transdermální absorpci a návratnost CBD	50

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SUV	Malé unilamelární vezikuly
LUV	Velké unilamelární vezikuly
MLV	Multilamelární vezikuly
MVV	Multivezikulární vezikuly
SLN	Tuhé lipidové nanočástice
NLC	Nanostrukturované lipidové nosiče
CBD	Kanabidiol
PCB	Fytokanabinoidy
ECP	Endokanabinoidy
SC	Syntetické kanabinoidy
THC	Tetrahydrokanabinol
ESC	Endokanabinoidní systém
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSPC	Distearoylfosfatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylfosfatidylcholin
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamine-N-[karbonyl-amino(polyethylene glycol)-4300]
SPC	Sójový fosfatidylcholin
AP	Askorbyl palmitát
CHOL	Cholesterol
PDI	Index polydisperzity
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
UPW	Ultra čistá voda
OF	Olejová fáze
VF	Vodná fáze

PBS Fosfátový pufr s fyziologickým solným roztokem

DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl