

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Skin Barrier Research Group



**Studium látek ovlivňujících
propustnost kožní bariéry**

Disertační práce

Mgr. Anna Nováčková

2021

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

V Hradci Králové

Anna Nováčková

Poděkování

Poděkování patří mé školitelce doc. Mgr. Jarmile Zbytovské, Dr. rer. nat za její cenné rady během studia a při psaní této disertační práce. Zároveň bych velmi ráda poděkovala prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za její pomoc během studia.

Poděkování patří i všem současným i bývalým kolegům ze *Skin Barrier Research Group* za příjemné pracovní prostředí a spolupráci během celého studia. Za spolupráci na publikacích potom jmenovitě: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D., PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D., PharmDr. Monika Kopečná, Ph.D., PharmDr. Michaela Sochorová, Ph.D., Dr. Irene Sagrafena, Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D., Anupma Dwivedi, Ph.D., Anisha Mazumder, Ph.D. Za spolupráci na přípravě formulací pro doručení lipidů do rekonstruované epidermis děkuji PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. Za odborné vedení na začátku studia děkuji PharmDr. Barboře Švecové, Ph.D. Zvláštní poděkování patří Eleni Panoutsopoulou za pomoc při permeacích s dendrimery a lekcích řečtiny.

Dále děkuji kolegům z VŠCHT v Praze, prof. Ing. Petru Slepíčkovi, Ph.D. za měření a hodnocení AFM a RNDr. Jaroslavu Maixnerovi, CSc. za měření XRD. Za měření IR spekter děkuji Ivě Vencovské z Katedry organické a bioorganické chemie. Za spolupráci na publikacích děkuji i kolegům z Německa z výzkumné skupiny prof. Sarah Hedtrich, Ph.D. a Dr. Ute Wölfle, Ph.D.

Ráda bych poděkovala i assoc. prof. Nathalie Jonca, Ph.D. za všestrannou pomoc během stáže a zasvěcení do problematiky modelů rekonstruované epidermis a Marie-Claire Mechin za praktické rady ke kultivaci modelů. Prof. Rogeru Sandhoffovi, Ph.D. pak děkuji za LC/MS-MS analýzu lipidů.

Také děkuji všem členům Katedry farmaceutické technologie a Vědeckého oddělení za zázemí během studia.

Za pomoc a trpělivost děkuji své rodině a kamarádům, speciální poděkování pak patří mému partnerovi, který mi byl velkou oporou.

Práce vznikla za finanční podpory Univerzity Karlovy (SVV 260 547, GA UK 184217, 936216, 332119, 1156120), Grantové agentury České republiky (19-09135J, 19-09600S) a programu Erasmus+.

Obsah

Abstrakt	11
Abstract	13
Seznam zkratk	15
Úvod a cíle práce	17
Teoretický úvod	19
1. Funkce a struktura zdravé lidské kůže	19
2. Kožní bariéra	22
2.1 Lipidová kožní bariéra	22
2.1.1 Ceramidy	22
2.1.1.1 Struktura a názvosloví ceramidů	22
2.1.1.2 Biosyntéza ceramidů a jejich prekurzorů	25
2.1.2 Cholesterol	26
2.1.3 Volné mastné kyseliny.....	27
2.1.4 Transport lipidů do SC.....	27
2.1.5 Uspořádání lipidové matrix	29
3. Faktory a látky ovlivňující propustnost kožní bariéry	32
3.1 Vliv pH	32
3.2 Patofyziologické aspekty	32
3.2.1 Atopická dermatitida.....	32
3.2.2 Ichtyózy	33
3.2.3 Psoriáza	33
3.2.4 Syndromy	33
3.3 Enhancery kožní permeace a (trans)dermální podávání léčiv	33
4. Modely pro výzkum kožní bariéry	35
4.1 Monovrstevné a multivrstevné modely lipidů SC a jejich hodnocení.....	35
4.1.1 Langmuirovy monovrstvy	35
4.1.2 Multivrstevné modely	37
4.2 <i>In vitro</i> modely	38
4.2.1 Rekonstruovaná lidská epidermis (<i>Reconstructed human epidermis</i> , RHE)...	38
4.2.2 Rekonstruovaná lidská kůže (<i>Reconstructed human skin</i> , RHS).....	39
4.3 <i>Ex vivo</i> modely.....	39
4.3.1 Permeační pokusy	39
4.3.2 Kultivace lidské kůže (<i>Human skin organ culture</i> , HSOC).....	40

Experimentální část	41
1. Materiál a chemikálie	41
1.1 Lipidy	41
1.2 Permeanty a enhancery kožní permeace	41
1.3 Chemikálie pro přípravu pufrů, subfází a detekčních roztoků	41
1.4 Kultivační media, suplementy	42
1.5 Chemikálie, proteiny a protilátky pro elektroforézu a její hodnocení	42
1.6 Rozpouštědla	42
1.7 HPLC kolony	42
1.8 Pomocný materiál pro přípravu modelů	42
1.9 Lidská kůže a izolace lipidů	42
2. Přístrojové vybavení	43
2.1 Monovrstvy a jejich hodnocení	43
2.2 Multivrstvy a jejich hodnocení, HPTLC	43
2.3 Kultivace a hodnocení RHE	43
2.4 Permeace	43
2.5 Zpracování grafů a statistické hodnocení	44
3. Experimenty na připravených modelech	45
3.1 Lipidové modely	45
3.1.2 Metody	46
3.1.2.1 Langmuirovy monovrstvy a jejich hodnocení	46
3.1.2.2 Multivrstevné modely a jejich hodnocení	47
3.1.3 Výsledky a diskuze	49
(1) Vliv pH na uspořádání lipidů a tvorbu multivrstev při formování kožní bariéry 49	
(2) Interakce enzymu β-glukosidáza s kožními lipidy	56
(3) Interakce PAMAM dendrimerů s kožními lipidy	57
3.2 <i>In vitro</i> modely	61
3.2.1 Metody	61
3.2.1.1 Příprava RHE	61
3.2.1.2 Analýza SC získaného z RHS	62
3.2.2 Výsledky a diskuze	63
(1) RHE jako nástroj pro studium kožních onemocnění a jejich léčby	63
(2) Vliv fibroblastů na homeostázu kožní bariéry	69
3.3 <i>Ex vivo</i> modely	72
3.3.1 Metody	72

3.3.1.1	Permeační experimenty	72
3.3.2	Výsledky a diskuze	73
(1)	Estery terpenů jako enhancery kožní permeace	73
(2)	Permeace s dendrimery.....	75
Závěr		79
Reference		82
Seznam odborných publikací		99
1.	Publikace zahrnuté v této disertační práci	99
2.	Ostatní publikace nezahrnuté v této práci	101
Aktivní účast na konferencích		103
1.	Přednášky	103
2.	Posterová sdělení	104
Přílohy		105

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra

Katedra farmaceutické technologie

Kandidát

Mgr. Anna Nováčková

Školitel

doc. Mgr. Jarmila Zbytovská, Dr. rer. nat.

Název disertační práce

Studium látek ovlivňujících propustnost kožní bariéry

Kožní bariéra hraje zásadní roli v ochraně lidského organismu a umožňuje tak savcům suchozemský život. Hlavní bariérovou funkci má epidermis díky několika vrstvám buněk, které se postupně diferencují do svého konečného stádia, rohové vrstvy (*stratum corneum*, SC). SC je tvořeno zrohovatělými keratinocyty (tzv. korneocyty) obklopenými lipidovou matrix. Tato mezibuněčná hmota se skládá z přibližně ekvimolárního množství ceramidů, volných mastných kyselin a cholesterolu. Jsou to látky velmi specifické, tvořené v epidermis z prekurzorů během diferenciaci keratinocytů a jejich správné uspořádání do multivrstevných lamel je zásadní pro nepropustnost kožní bariéry. Některé látky nebo faktory však mohou kožní bariéru narušit. Většinou se jedná o narušení nežádoucí, kdy dochází k nerovnováze lipidů, což zapříčiní poruchy a onemocnění kožní bariéry. Avšak existují i látky, které byly cíleně vyvinuty pro reverzibilní narušení kožní bariéry (tzv. enhancery), aby umožnily průnik léčiv při (trans)dermálním podávání.

Cílem této práce bylo studovat obě tyto skupiny látek a jejich vliv na kožní bariéru za použití vhodných modelů kožní bariéry. Byly využity především modely lipidické, jejichž výhoda spočívá ve snadné modifikovatelnosti a oddělení ostatních biochemických procesů probíhajících v kůži. Díky tomu bylo možné studovat vliv prekurzoru ceramidů a měnícího se pH při vzniku kožní bariéry. Byla objevena nová funkce kyselého pH v kožní bariéře, a to přímý vliv na formování multivrstevných útvarů v mezibuněčné matrix. Dále byly pomocí lipidických modelů sledovány interakce lipidů kožní bariéry s potencionálními enhancery – dendrimery. Do budoucna se jedná o zajímavou metodu pro charakterizaci látek interagujících s kožními lipidy. Dalším využitým modelem byly 3D buněčné modely epidermis nebo kůže, které lze geneticky modifikovat a vytvořit tak model simulující onemocnění kůže nebo pozorovat vliv jednotlivých složek kůže v komplexnějším měřítku. Takto byla připravena rekonstruovaná lidská epidermis s defektem v syntéze ω -O-acylceramidu, který byl pak do epidermis dodáván pomocí lipidických formulací a byl pozorován jeho efekt na regeneraci kožní bariéry. Byly porovnány dva typy modelů a vyvinut protokol pro aplikaci těchto formulací na modely. Modely rekonstruované lidské kůže byly připraveny kolegy z Německa za účelem pozorování interakcí mezi buňkami epidermis (keratinocyty) a dermis (fibroblasty). Bylo zjištěno, že přítomnost fibroblastů je důležitá pro diferenciaci keratinocytů do kožní bariéry, čemuž napomohly i analýzy lipidů SC provedené u nás v laboratoři. Posledním v této práci využitým modelem byly kožní štěpy *ex vivo*. Je to svým složením model nejkomplexnější, který však nelze modifikovat jako ty předchozí. Na druhou stranu je často využíván pro svou dokonalou bariérovou funkci pro testování permeability látek. V této práci byl využit pro testování v naší výzkumné skupině nově syntetizovaných

enhancerů kožní permeace. Byly zjištěny výhodné vlastnosti esterů terpenů na doručení léčiva cidofovir do kůže bez nežádoucích vedlejších účinků. Dále byl zjišťován vliv generace a koncentrace dendrimerů na (trans)dermální doručení 5-fluorouracilu, kdy se jako nejvýhodnější jevíly nižší koncentrace třetí generace syntetizovaných dendrimerů.

Byly tedy objeveny nové poznatky z oblasti látek ovlivňujících kožní bariéru a zároveň bylo prokázáno, že modely mají nezastupitelnou roli v jejich výzkumu. Je třeba zmínit, že není možné vybrat jeden univerzální model, ale vždy je potřeba ho přizpůsobit zamýšlenému výzkumu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department

Department of Pharmaceutical Technology

Candidate

Mgr. Anna Nováčková

Supervisor

doc. Mgr. Jarmila Zbytovská, Dr. rer. nat.

Title of Doctoral Thesis

Study of substances affecting permeability of the skin barrier

The skin barrier plays a vital role in protecting the human body and enables mammals' life on dry land. The epidermis has the primary barrier function due to several cells' layers, which gradually differentiate to their final stage, the *stratum corneum* (SC). SC is formed by stratified keratinocytes (known as corneocytes) surrounded by a lipid matrix. This intercellular matrix consists of an approximately equimolar ratio of ceramides, free fatty acids and cholesterol. These are particular substances formed in the epidermis from their precursors during the keratinocyte's differentiation, and their arrangement into the multilamellar structure is essential for the impermeability of the skin barrier. However, some substances or factors can disrupt the skin barrier. It is usually an undesirable process of lipid disbalance resulting in disorders or diseases of the skin barrier. On the other hand, specific substances have been developed for a reversible disruption of the skin barrier (so-called enhancers) to allow drug penetration in (trans)dermal drug delivery.

The aim of this work was to study both groups of these substances and their effect on the skin barrier using appropriate skin barrier models. Lipid models have been used for their advantage of easily modifiable structure, as well as the possibility to separate other biochemical processes that occur in the skin. These advantages allowed to study the effect of the ceramide precursor and the changing of the pH during the skin barrier formation. A new function of acidic pH in the skin barrier was discovered, more specifically, a direct influence of pH on the formation of the unique multilayer structure in the lipid matrix. Furthermore, interactions of skin barrier lipids with potential enhancers - dendrimers - were monitored using lipid models. It could be an interesting method for characterizing substances that interact with skin lipids in future use. Next, 3D cell models of the epidermis or skin were used. These models can be genetically modified to simulate skin diseases. Another advantage is the possibility to observe the effect of individual skin components on a more complex scale. It was prepared a reconstructed human epidermis with a defect in the synthesis of ω -O-acylceramide and using lipid formulations was observed effect of ω -O-acylceramide's delivery on skin barrier regeneration. Two types of models were compared, and a protocol for formulations application was developed. Reconstructed human skin models were prepared by colleagues in Germany to observe interactions between cells of the epidermis (keratinocytes) and dermis (fibroblasts). It was found that the presence of fibroblasts is essential for the differentiation of keratinocytes into the skin barrier, which was also achieved through SC lipids analyzes performed in our laboratory. The last model used in this work were *ex vivo* skin grafts. Thanks to its composition, it is the most complex model but without the possibility of being modified (like the previously described models). Nevertheless, it is often used

for its barrier function. In this work, it was used for testing in our research group newly synthesized skin permeation enhancers. Advantageous properties of terpene esters to deliver cidofovir to the skin without adverse side effects were found. Furthermore, the effect of generation and concentration of dendrimers on (trans)dermal delivery of 5-fluorouracil was investigated. Surprisingly, the lower tested concentrations of the third generation of synthesized dendrimers appeared to be the most suitable.

Thus, new findings in the field of substances affecting the skin barrier were discovered, and at the same time, it was proved that the models have an irreplaceable role in their research. It should be mentioned that it is not possible to choose one universal model, but it is always necessary to adapt it to the intended research.

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
ACN	acetonitril
AFM	mikroskopie atomárních sil (<i>atomic force microscopy</i>)
ARCI	autozomální recesivní kongenitální ichtyóza (<i>autosomal recessive congenital ichthyosis</i>)
B-DAK	bornyl 6-(dimethylamino)hexanoát
β -GlcCer-áza	β -glukocerebrozidáza
BAM	Brewsterův úhlový mikroskop (<i>Brewster angle microscopy</i>)
C-DAK	citronellyl 6-(dimethylamino)hexanoát
CDV	cidofovir
Cer	ceramid
Ci-DAK	cinnamyl 6-(dimethylamino)hexanoát
CLE	korneocytární lipidová obálka (<i>corneocyte lipid envelope</i>)
CoA	koenzym A
DHPC	dihexanoylfosfatidylcholin
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
ELOVL	elongáza mastných kyselin (<i>elongation of very long fatty acids</i>)
FAS	syntáza mastných kyselin (<i>fatty acid synthase</i>)
G(<i>n</i>)	<i>n</i> generace PAMAM dendrimerů (např. G1 je první generace)
G(<i>n</i>)-HCl	chlorovodíková sůl <i>n</i> generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii
GlcCer	glukosylceramid
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPTLC	vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (<i>high performance thin layer chromatography</i>)
HSOC	organová kultura lidské kůže (<i>human skin organ culture</i>)
Chol	cholesterol
CholE	cholesteryl palmitát

CholS	cholesteryl sulfát
(FT)IR	infračervená spektroskopie (s metodou Fourierovy transformace)
KGF	keratinocytový růstový faktor (<i>keratinocyte growth factor</i>)
LA	kyselina lignocerová (<i>lignoceric acid</i>)
LBms	formulace simulující lamelární tělíska (<i>lamellar bodies mimetic systems</i>)
LBs	lamelární tělíska (<i>lamellar bodies</i>)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LPP	dlouhá lamelární fáze (<i>long periodicity phase</i>)
(V)MK	(volná) mastná kyselina
MMA	teoretická plocha jedné molekuly (<i>mean molecular area</i>)
PAMAM	poly(amidoamin) dendrimery
PG	propylenglykol
RHE	rekonstruovaná lidská epidermis (<i>reconstructed human epidermis</i>)
RHS	rekonstruovaná lidská kůže (<i>reconstructed human skin</i>)
SAP	protein aktivující sfingolipidy (<i>sphingolipid activator protein</i>)
SC	rohová vrstva epidermis (<i>stratum corneum</i>)
SD	směrodatná odchylka (<i>standart deviation</i>)
SG	zrnitá vrstva epidermis (<i>stratum granulosum</i>)
shRNA (204/207)	<i>short hairpin</i> RNA použitá pro transdukcii keratinocytů (typ 204/207)
SM	sřingomyelin
SP	povrchový tlak (<i>surface pressure</i>)
SPP	krátká lamelární fáze (<i>short periodicity phase</i>)
TDCH	taurodeoxycholát
TEWL	ztráta vody přes kůži nebo membránu (<i>transepidermal water loss</i>)
XRD	rentgenová difrakce (<i>X-ray diffraction</i>)

Úvod a cíle práce

Kožní bariéra se nachází v nejvrchnější vrstvě kůže (*stratum corneum*), díky své ochranné funkci **brání lidský organismus** před vstupem nežádoucích látek a mikroorganismů a zároveň proti nežádoucím ztrátám vody. Skládá se z odumřelých kožních buněk (korneocytů) a **mezibuněčné lipidové matrix** (přibližně ekvimolární směs ceramidů, mastných kyselin, cholesterolu).^{1, 2} Doposud však není přesně jasná její struktura, konkrétně uspořádání lipidů v extracelulární matrix.³ Naopak je známo, že mnoho látek může **ovlivňovat integritu a propustnost kožní bariéry**. Ve většině případů je takové narušení nežádoucí, dochází k **nerovnováze** v kůži přirozeně se vyskytujících látek, což zapříčiní poruchy nebo **onemocnění** kožní bariéry.^{4, 5} Avšak existují i látky, které byly **cíleně** vyvinuty, aby **dočasně narušily** bariérovou funkci. Tyto látky tak pomáhají léčivu proniknout přes kůži v případě **(trans)dermálních** formulací a nazývají se **enhancery** kožní permeace.^{6, 7} Může se zdát, že pro studium látek a faktorů ovlivňujících lidskou kůži a její permeabilitu by bylo ideální využít lidskou kůži. To však nemusí být pokaždé možné a mnohdy ani vhodné, jak bude vysvětleno v této práci. Proto je jedním z požadavků na výzkum kožní bariéry potřeba vyvinout **modely**, které napodobují kůži, kožní bariéru nebo její část. Každý model má svá specifika a je třeba **dobře zvážit jeho využití** podle zamýšlených experimentů, aby bylo co nejefektivnější.^{8, 9}

Cílem této práce je **hodnotit vliv látek a faktorů na kožní bariéru pomocí vhodného modelu**. Mezi dílčí cíle patří:

- **Sledování vlivu prekursoru ceramidů (glukosylovaného ceramidu) a dalších podmínek na uspořádání lipidů ve *stratum corneum***. Bude provedeno postupné nahrazení prekursoru za ceramid a následné experimenty s enzymem β -glukocerebrozidáza a jejich vliv na uspořádání lipidů. Je známo, že se během tohoto procesu v epidermis mění **pH** od neutrálního po kyselé, což má mimo jiné vliv na aktivaci enzymů důležitých pro přeměnu prekursorů na lipidy.¹⁰ Je tedy otázkou, jestli je tato změna pH důležitá pro samotné lipidy a jejich uspořádání.
- **Hodnocení vlivu ω -O-acylCer na regeneraci rekonstruované epidermis s navozeným defektem v syntéze tohoto lipidu**. V nedávné době bylo prokázáno, že jedním z faktorů poškozené kožní bariéry u vzácného ichtyotického kožního onemocnění (autozomální recesivní kongenitální ichtyóza) je snížená exprese genu pro enzym PNPLA1.^{11, 12} Bylo také navrženo, že dodání syntetických ω -O-acylCer do kůže pacientů by mohlo pomoci v léčbě tohoto onemocnění.¹³ Ve spolupráci s pracovištěm ve Francii bude připravena rekonstruovaná lidská epidermis s defektem PNPLA1, která bude simulovat narušení kožní bariéry při tomto onemocnění. Na takto připravených modelech pak bude hodnocen vliv formulace s obsahem ω -O-acylCer.
- **Vliv fibroblastů na správný vývin kožní bariéry**. Bylo zjištěno, že v kůži probíhá na buněčné úrovni tzv. *cross-talk* mezi keratinocyty v epidermis a fibroblasty

v dermis.¹⁴ Není však jasné, jaký vliv mají tyto interakce na diferenciaci kožní bariéry a její fungování. Ve spolupráci s kolegy z Německa bude sledován vliv fibroblastů na diferenciaci kožní bariéry v modelech rekonstruované kůže. Bude hodnocen několika metodami, včetně infračervené spektroskopie a vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (obsah lipidů ve *stratum corneum*).

- **Testování enhancerů kožní permeace.** Budou testovány látky nově syntetizované v naší výzkumné skupině (**estery terpenů a dendrimery**) na jejich schopnost zlepšit dodání léčiv do/přes kůži *ex vivo*. Zároveň budou hodnoceny interakce komerčně dostupných dendrimerů s lipidy kožní bariéry. Tyto látky již byly jako enhancery využity, ale doposud není objasněn jejich mechanismus účinku.^{15, 16}

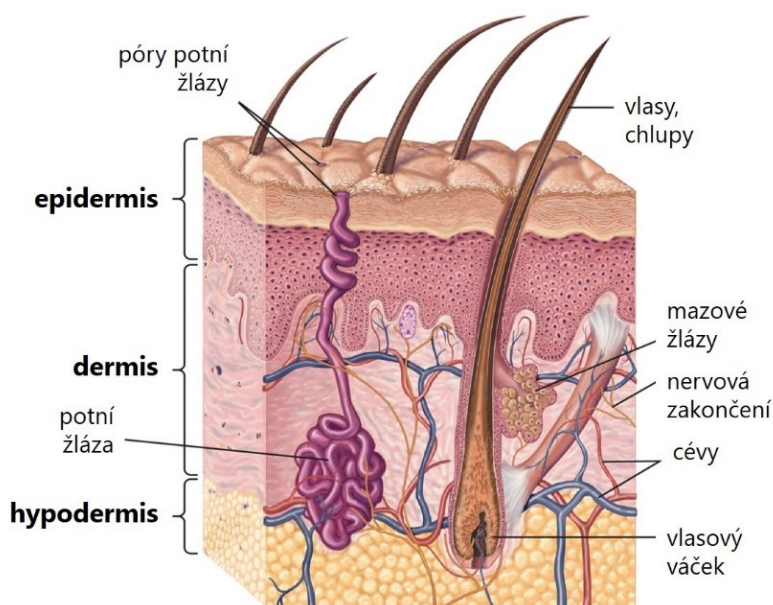
V práci jsou tedy nejprve popsána doposud známá fakta o kožní bariéře a látkách ji ovlivňujících. Dále je uveden popis jednotlivých modelů, jejich výhody, nevýhody a možnosti využití. Experimentální část pak vysvětluje, proč byly jednotlivé modely použity pro konkrétní projekt a popisuje metodiku přípravy a hodnocení modelů. V další části jsou shrnuté výsledky publikovaných i nepublikovaných prací.

Teoretický úvod

V teoretickém úvodu je popsána kožní bariéra, její složení a funkce. Dále se práce zabývá přehledem faktorů a látek, které mají na správně fungující kožní bariéru vliv. Protože byl vliv látek na funkčnost kožní bariéry studován pomocí modelů, jsou popsány typy modelů od nejjednodušších lipidových monovrstev až po kožní štěpy. Každý model má své výhody a nevýhody a je třeba dobře zvážit jeho využití podle zamýšlených experimentů, aby bylo co nejefektivnější.

1. Funkce a struktura zdravé lidské kůže

Kůže (řec. *derma*) je největší lidský orgán, který u dospělého jedince dosahuje přibližně 2 m² a 5 kg. Hlavní funkcí lidské kůže je **chránit lidský organismus**, a to nejen před vnějšími vlivy, ale také před ztrátou důležitých látek zevnitř z organismu.^{2, 17} Lidská kůže se dělí na tři hlavní vrstvy (podkoží, škára, pokožka), z nichž každá hraje v ochraně organismu nezastupitelnou roli¹ (**Obrázek 1**). **Podkoží** (řec. *hypodermis*) díky přítomnosti tukových buněk chrání organismus před ztrátami tepla a pomáhá tlumit poranění.^{1, 17} **Škára** (řec. *dermis*) díky kolagenním a elastinovým vláknům poskytuje ochrannou vrstvu v ní uloženým cévám, nervovým zakončením a žlázám. Nejvrchnější vrstva **pokožka** (řec. *epidermis*) má především **bariérovou funkci** a poskytuje ochranu před průnikem xenobiotik, mikroorganismů, UV záření a zároveň brání ztrátám vody a elektrolytů z organismu.^{1, 2} Na pokožce se dále nachází slabá vrstva lipidů původem především z mazových žláz (triglyceridy, estery vosků, skvalen).¹⁸ Důležitou ochrannou součástí lidské kůže je i kožní mikrobiom, neboli soubor mikrobů, který osidluje povrch lidské pokožky v homeostáze s lidským organismem (nejhojněji jsou zastoupeny bakterie rodu *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Staphylococcus*).¹⁹

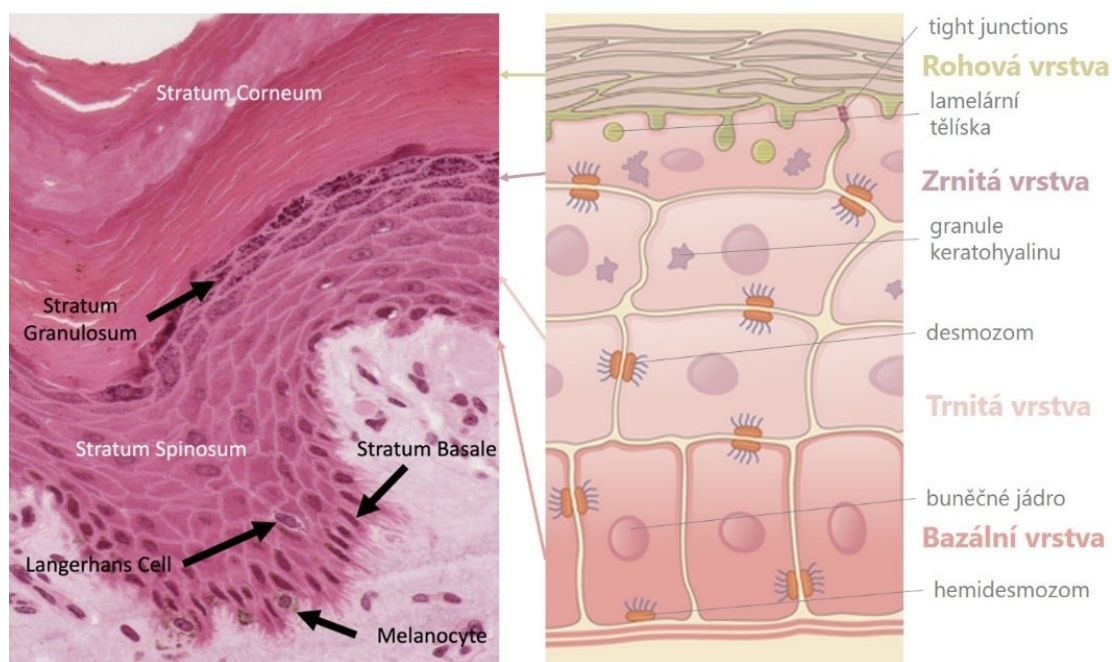


Obrázek 1 Základní vrstvy lidské kůže. Převzato a upraveno z britannica.com.²⁰ Lidská kůže se dělí na *epidermis*, *dermis* a *hypodermis*. Je zobrazeno i uložení kožních adnex (vlasové folikuly, potní a mazové žlázy).

Pokožka je cyklicky se obnovující tkáň tvořena z více než 90 % **keratinocyty**.^{17, 21} Dále lze v pokožce najít i pigmentové buňky melanocyty, Langerhansovy buňky imunitního systému či mechanoreceptorové Merkelovy buňky. Keratinocyty se vyvíjejí a postupně migrují k povrchu pokožky, až dojde k jejich odloučení. Tento vývojový cyklus (rohovatění, **keratinizace**) trvá přibližně 2-4 týdny a postupně během něj dochází ke změně tvaru, struktury i funkce keratinocytů.²¹ Během keratinizace buňky syntetizují proteiny důležité pro správný průběh tohoto procesu. Jedná se například o rozdílné typy keratinu, involucrin, lorikrin a filaggrin. Keratinocyty se postupně zplošťují, dochází ke ztrátě jejich buněčného jádra, vyvinutí proteinové obálky a odloučení odumřelých buněk (**deskvamaci**).²² Díky tomu lze pokožku dělit na živou epidermis a rohovou vrstvu. Konkrétně se podle vývojového stádia keratinocytů v pokožce rozlišují čtyři hlavní vrstvy (**Obrázek 2**):

- bazální vrstva (*stratum basale*)
- trnitá vrstva (*stratum spinosum*)
- zrnitá vrstva (*stratum granulosum*)
- rohová vrstva (*stratum corneum*).

Na některých částech těla (především ve vyšší míře zrohovatělých, jako například dlaně či chodidla) lze rozeznat i vrstvu pátou (*stratum lucidum*), která se nachází mezi vrstvou zrnitou a rohovou.



Obrázek 2 Základní vrstvy lidské pokožky podle stádia diferenciaci keratinocytů. Porovnání histologického řezu a schematického znázornění (převzato a upraveno z ubwp.buffalo.edu,²³ accessmedicine.mhmedical.com²⁴). Nejnižší uložena je bazální vrstva (*stratum basale*), následuje trnitá vrstva (*stratum spinosum*), zrnitá vrstva (*stratum granulosum*) a rohová vrstva (*stratum corneum*). Na histologickém řezu jsou znázorněny i další buňky přítomné v pokožce (melanocyty a Langerhansovy buňky); schéma znázorňuje navíc buněčné spoje (hemidesmozomy, desmozomy, *tight junction*) aj.

Bazální vrstva je tvořena jednovrstevným kubickým epitelem keratinocytů, které jsou pevně propojeny s bazální laminou hemidesmozomy a mezi sebou **desmozomy** (tyto buněčné spoje jsou pozorovány v celé živé epidermis).^{21, 25} V bazální vrstvě jsou buňky mitoticky aktivní, dělí se a migrují do vyšších vrstev. V zrnité vrstvě jsou pozorovatelné zrnité struktury o rozměrech v řádu mikrometrů – granule keratohyalinu. Keratohyalin je prekurzorem proteinu filaggrin, který pomáhá v agregaci keratinových filament později v rohové vrstvě a také se podílí na hydrataci kůže. S postupem do horní části zrnité vrstvy, kde dochází k přechodu na vrstvu rohovou, jsou pozorovány také menší struktury o velikosti 100-300 nm. Tyto organely se nazývají Odlandova nebo také lamelární tělíska a hrají klíčovou roli ve formování lipidické kožní bariéry.^{17, 21} Rohová vrstva je tvořena kompletně keratinizovanými buňkami (**korneocyty**), které jsou bezjaderné, vyplněné agregovanými keratinovými filamenti a ohraničené proteinovou obálkou.^{26, 27} Rohová vrstva je detailně popsána v následující kapitole.

2. Kožní bariéra

Již v 19. století bylo prokázáno, že mezi epidermis a dermis je značný rozdíl v permeabilitě, ale až následné pokusy během 20. století dokázaly, že hlavní bariéra se nachází v nejvrchnější rohové vrstvě, **stratum corneum (SC)**.²⁸⁻³⁰ Tuto funkci SC plní díky své struktuře tvořené 18-21 vrstvami korneocytů obklopenými **lipidovou matrix**.^{3,31,32} Podpůrnou bariérovou roli hrají i ostatní vrstvy kůže, jako příklad lze uvést těsné spoje, *tight junctions*, nacházející se v zrnité vrstvě, **stratum granulosum (SG)**. Tyto proteinové struktury se podílí především na ochraně před ztrátou vody a iontů zevnitř z organismu.^{2,33}

2.1 Lipidová kožní bariéra

Mezibuněčná lipidová směs je tvořena velmi specificky uspořádanými lipidy, z nichž největší podíl tvoří **ceramidy (Cer, až 50 % wt)**, **cholesterol (Chol, 25 % wt)** a **volné mastné kyseliny (VMK, 15 % wt)**. V přepočtu na molární poměr je zastoupení Cer/Chol/VMK 1:1:1, a dané **ekvimolární** složení je důležité pro fungující kožní bariéru.^{34, 35} Kromě těchto tří základních složek, se zde nachází malé množství esterů cholesterolu, především cholesteryl sulfát (CholS, 5 % wt).^{36,37} Role CholS zatím není plně objasněna, ale jednou z hypotéz je jeho vliv na kohezi a deskvamaci korneocytů.³⁸

2.1.1 Ceramidy

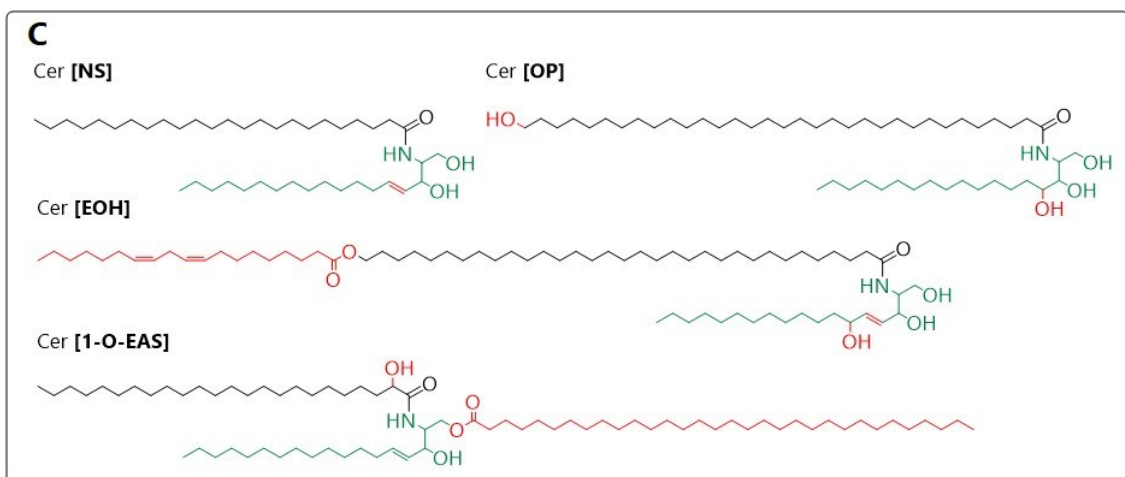
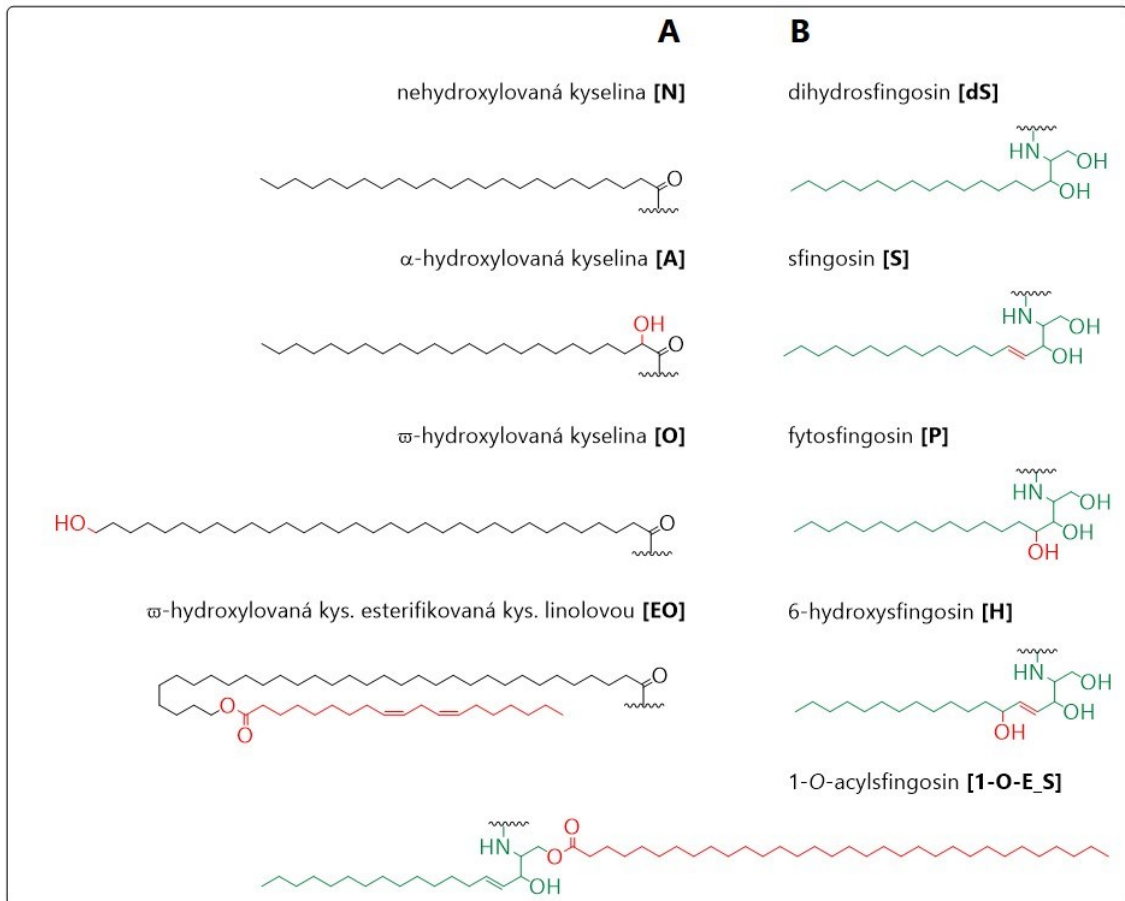
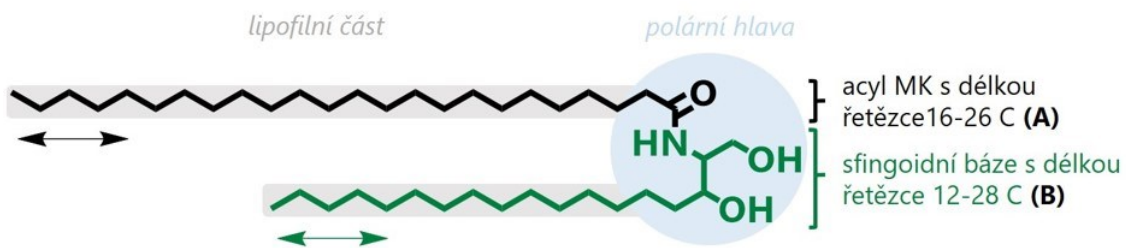
Ceramidy jsou považovány za **klíčové pro bariérovou funkci SC**. Kromě toho plní i funkci **signálních molekul** a podílí se na proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk v epidermis.³⁹ V lidském SC bylo dodnes popsáno 18 typů Cer, které mohou být buď volné, nebo navázané na proteinovou obálku korneocytů.⁴⁰

2.1.1.1 Struktura a názvosloví ceramidů

Jelikož Cer patří do skupiny **sfgingolipidů**, lze v jejich struktuře rozlišit sfgingoidní bázi a acylový řetězec mastné kyseliny (MK).⁴⁰

- **Acylová část** je navázána na primární amin sfgingoidní báze a může mít 16-26 uhlíků (nejčastěji 24), v případě tzv. ultradlouhých Cer 28-38 uhlíků (nejčastěji 30-32).^{39, 40} Obvykle se jedná o nasycenou **nehydroxylovanou MK [N]**, dále **α -hydroxylovanou MK [A]**, **ω -hydroxylovanou MK [O]** nebo **ω -hydroxylovanou MK esterifikovanou dále kyselinou linolovou [EO] (Obrázek 3A)**. Pokud je ω -hydroxylovaná MK navázána na proteinovou obálku korneocytů, jedná se o kovalentně vázané Cer.^{34, 40}
- **Sfgingoidní báze** je chemicky aminoalkohol s dlouhým řetězcem (12-28 uhlíků, nejčastěji 18) a v lidské kůži lze najít nejčastěji **sfgingosin [S]**, dále **dihydrosfgingosin [dS]**, **fytosfgingosin [P]**, **6-hydroxysfgingosin [H]** či posledně objevený dihydroxysfginganin [T].⁴¹ Báze se liší umístěním hydroxylových skupin a dvojných vazby. Přehled sfgingoidních bází nejčastěji tvořící Cer v lidském SC je schematicky znázorněn na **Obrázku 3B**.

Kombinací acylů MK a sfingoidních bází s různou délkou řetězce tak může vzniknout velké množství Cer, pro jejich rozlišení bylo v roce 1998 Mottou a kol. navrženo názvosloví.⁴² To je založeno na kombinaci výše uvedených zkratk. Např. sfingosin (označení [S]) s navázaným řetězcem kyseliny lignocerové (nehydroxylovaná MK, označení [N]) se označuje jako Cer[NS]. S objevem nových typů Cer pak bylo názvosloví dále rozšiřováno.⁴⁰ Například lze rozlišit Cer, které mají ve své struktuře další acyl (esterifikace sfingosinu na primární hydroxyskupině), tzv. 1-O-acylsfingosin [1-O-E_S].⁴³ Příklady Cer, které mohou být takto tvořeny, jsou na **Obrázku 3C**.

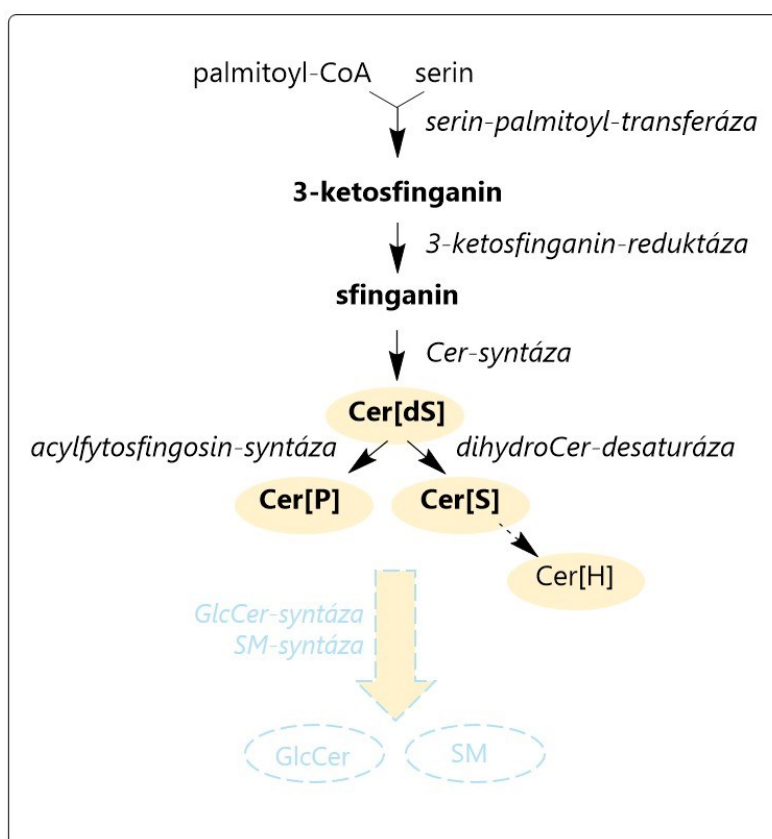


Obrázek 3 Struktura Cer. V horní části je schematicky zobrazena molekula Cer, která se vyznačuje polární hlavou a lipofilní částí s různou délkou řetězců. Ve struktuře Cer lze rozlišit acyl MK (černě, panel A) a sfingoidní bázi (zeleně, B). Na panelu C jsou zobrazeny příklady Cer, které vznikají jejich kombinací.

2.1.1.2. Biosyntéza ceramidů a jejich prekurzorů

Kožní Cer jsou syntetizovány *de novo* v keratinocytech živé epidermis. Prvním, a zároveň syntézu limitujícím krokem, je kondenzace L-serinu a palmitoyl-koenzymu A (CoA) enzymem serin-palmitoyl-transferázou. Vzniká 3-ketosfinganin, který je dále redukován na **sfinganin** pomocí 3-ketosfinganin-reduktázy. Acylací aminoskupiny sfinganinu enzymem **Cer-syntázou** vzniká dihydroCer (tj. Cer odvozený od báze [dS]).⁴⁴ Další typy Cer pak vznikají z Cer[dS] následovně:

- Hydroxylací v poloze 4 enzymem acylfytosfingosin-syntázou vzniká Cer[P].
 - Desaturací enzymem dihydroCer-desaturázou vzniká Cer[S].⁴⁵ Z něj pak pravděpodobně vzniká hydroxylací v poloze 6 Cer[H], jehož syntéza doposud nebyla plně objasněna.⁴⁶
- Biosyntéza Cer *de novo* je shrnuta na **Obrázku 4**.



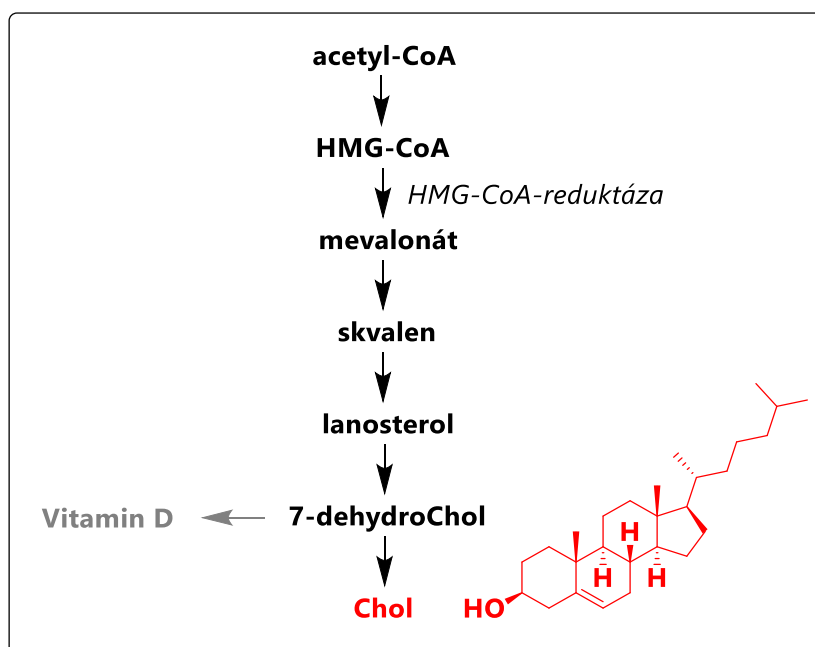
Obrázek 4 Biosyntéza Cer probíhá v keratinocytech. Ihned po syntéze jsou přeměněny na polární formu glukosylovaný Cer (GlcCer) a sfingomyelin (SM). Enzymy jsou na obrázku vyznačeny kurzívou.

Kvůli své biologické aktivitě jsou Cer ihned po syntéze přeměněny v Golgiho aparátu keratinocytů na glukosylovaný Cer (GlcCer) a sfingomyelin (SM) pomocí enzymů GlcCer-syntáza, respektive SM-syntáza.^{39, 47} V této polární formě jsou skladovány a doručeny do SC, kde jsou enzymaticky rozloženy na Cer (detailně popsáno v kapitole 2.1.4 *Transport lipidů do SC*). GlcCer slouží jako prekurzor pro všechny typy Cer, zatímco SM pouze pro Cer typu NS a AS.^{48, 49}

2.1.2 Cholesterol

Cholesterol (Chol) je hlavní sterol přítomný v lidském SC. Kromě něj je zde přítomno i malé množství jeho derivátů (převážně CholS), které vznikají esterifikací nenasycenými MK. Chol je důležitý pro správné uspořádání lipidů a pro udržení jejich fluidity.⁴⁰

Malé množství Chol je přijímáno z krevního oběhu přes LDL-receptory bazálních keratinocytů a je využito především pro regulaci *de novo* syntézy Chol.³⁵ Biosyntéza Chol probíhá v keratinocytech (hlavní kroky jsou shrnuty na **Obrázku 5**), především v nižších vrstvách epidermis.⁵⁰ Klíčový meziprodukt 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) vzniká kondenzací tří molekul acetyl-CoA. Následuje redukce tohoto meziproduktu enzymem **HMG-CoA-reduktázou** na mevalonát. Další kaskáda enzymatických reakcí vede ke vzniku skvalenu, který je dále podroben cyklizaci a je převeden (mj. přes lanosterol a 7-dehydroChol) na Chol.⁵¹ Část 7-dehydroChol je v epidermis pomocí slunečního záření přeměněna na vitamin D.⁵²



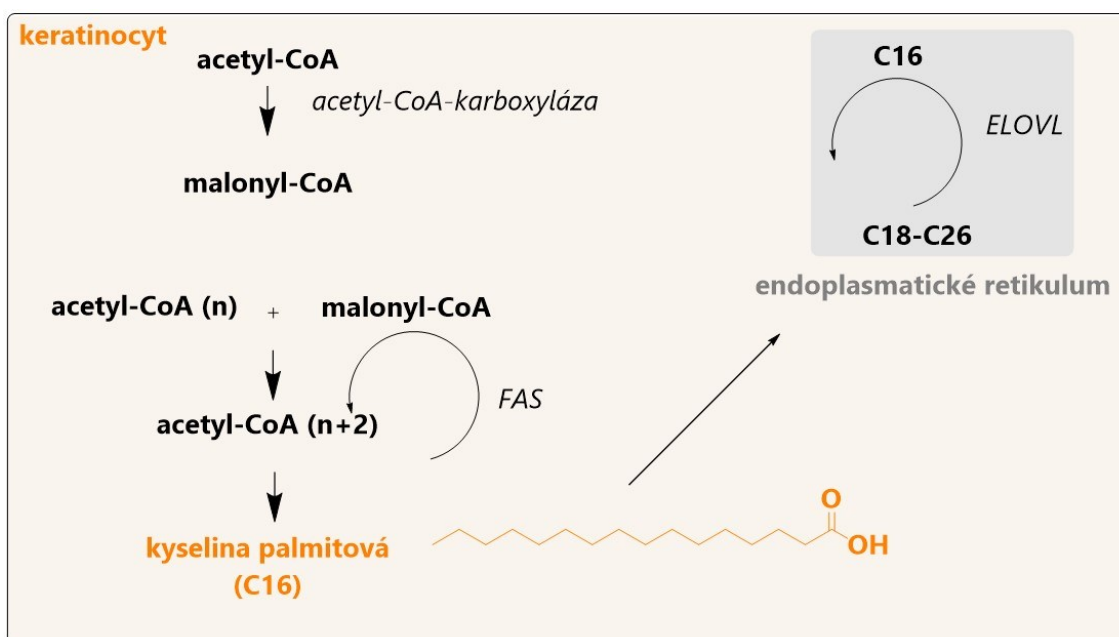
Obrázek 5 Shrnutí hlavních kroků *de novo* syntézy Chol; probíhá v keratinocytech a klíčovým enzymem je HMG-CoA-reduktáza.

Klíčovým enzymem biosyntézy Chol je HMG-CoA-reduktáza. Po laboratorně navozeném poškození kožní bariéry u myši bylo prokázáno, že obnova Chol v epidermis je způsobená zvýšením aktivity enzymu HMG-CoA-reduktáza jako reakce na toto poškození.^{50, 53} Pro bariérovou funkci je taktéž důležitá rovnováha mezi Chol a CholS (tzv. epidermální CholS cyklus).⁵⁴ Chol je v živé epidermis přeměňován pomocí enzymu cholesterolsulfo-transferázy (SULT2b1b) na CholS, aby byl ve SC opět přeměněn na Chol enzymem steroid-sulfatázou. Tento koloběh je důležitý pro regulaci diferenciaci keratinocytů, bariérovou funkci a správné odlupování horních vrstev SC.⁵⁵

2.1.3 Volné mastné kyseliny

V lidském SC se vyskytují zejména nasycené VMK s dlouhým uhlíkatým řetězcem (14-34 C), nejhojněji kyselina lignocerová (LA, 24 C).⁵⁶ VMK se podílejí na správné struktuře SC, mají signální funkci a také okyselují SC.⁵⁷ Tím mimo jiné pomáhají udržovat nízké pH SC (tzv. kyselý plášť, z angl. *acid mantle*), které je důležité pro správnou funkci kůže (viz kapitola 3.1 *Vliv pH*).⁵⁸

VMK obsažené v epidermis jsou buď přijímány z potravy, nebo jsou *de novo* syntetizovány v keratinocytech.⁵⁷ V cytoplasmě keratinocytů nejprve vznikají kratší VMK, které jsou pak v endoplasmatickém retikulu prodlouženy. Nejprve dochází k přeměně acetyl-CoA na malonyl-CoA enzymem acetyl-CoA-karboxylázou. Následuje cyklická kondenzace malonyl-CoA na acetyl-CoA, takže se acetyl-CoA postupně prodlužuje o 2 uhlíky. Komplex enzymů, které se na tomto kroku podílejí, se označuje jako syntáza MK (**FAS**, z angl. *fatty acid synthase*)^{59, 60} Takto vznikají MK s délkou řetězce do 16 uhlíků (kyselina palmitová), které jsou pak dále prodlužovány enzymy z rodiny elongáz, tzv. **ELOVL** (z angl. *elongation-of-very-long-fatty-acids*).⁶⁰ Proces je schematicky zobrazen na **Obrázku 6**. Význam ELOVL pro fungující kožní bariéru byl prokázán v experimentech na myších, kdy při depleci ELOVL nedocházelo k syntéze nejen dlouhých VMK, ale také od nich odvozených Cer a jejich prekurzorů, a tedy vznikala defektní kožní bariéra.^{61, 62}

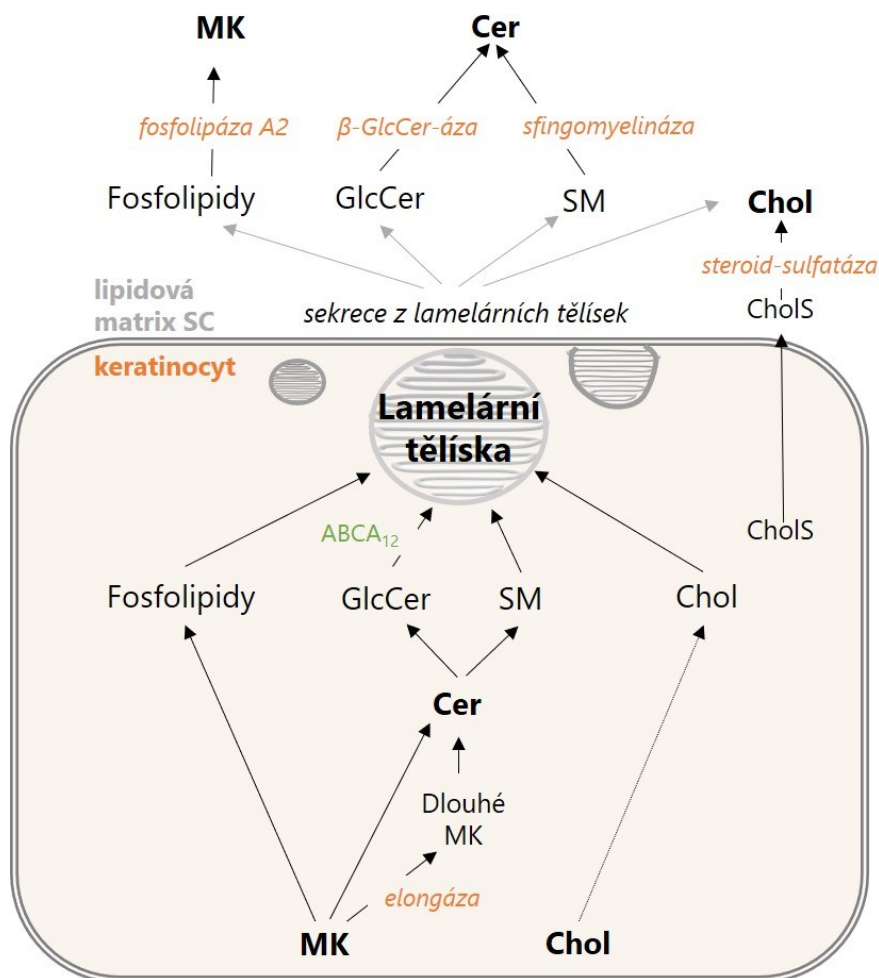


Obrázek 6 Schematické znázornění syntézy VMK. *De novo* syntéza kratších MK (do C16) probíhá v cytosolu keratinocytů, řetězec je prodloužen v endoplasmatickém retikulu. Enzymy jsou zvýrazněny kurzívou. (FAS=syntáza MK, ELOVL=elongáza MK)

2.1.4 Transport lipidů do SC

Protože buňky SC jsou již odumřelé, nejsou schopny syntézy potřebných lipidů. Ty musí být tedy doručeny (buď přímo, nebo ve formě prekurzorů) do SC ze živých vrstev epidermis. K tomu slouží již zmíněné specializované organely ovoidního tvaru, tzv. Odlandova neboli

lamelární tělíska (LBs).⁶³ Začínají být pozorována ve vrchní části *stratum spinosum* a největší počet jich lze najít ve SG. Kromě kožních lipidů a jejich prekurzorů (Chol, GlcCer, SM, fosfolipidy) obsahují i katabolické enzymy, proteiny či antimikrobní peptidy. Doručením těchto látek se tedy podílí na tvorbě lipidové bariéry, správné kohezi a deskvamaci korneocytů i antimikrobní ochraně SC. Obsah LBs je vyloučen na pomezí SG a SC, kde následuje přeměna na lipidy SC.^{63, 64} Tento „koloběh lipidů“ v epidermis je schematicky znázorněn na **Obrázku 7**.



Obrázek 7 Transport bariérových lipidů do SC. Převzato a upraveno dle Feingold et al.⁶⁵ Lipidy vznikající v živých keratinocytech (Cer, resp. MK) jsou přeměněny na svou polárnější formu (GlcCer, SM, resp. fosfolipidy), ve které jsou doručeny v LBs do SG. Na rozhraní SG/SC jsou vyloučeny a enzymaticky rozloženy na bariérové lipidy. Enzymy jsou označeny oranžově a kurzívou, transportéry zeleně.

LBs vznikají v Golgiho aparátu keratinocytů, jejich tvorba je podmíněna kyselým pH (regulováno aniontovým kanálem, tzv. *Golgi pH regulator*) a přítomností transportních proteinů.^{39, 66} Ty nejspíš hrají roli ve **vstupu** kožních lipidů a jejich prekurzorů do LBs, avšak tento proces není doposud plně objasněn.⁶⁶ Bylo navrženo, že na transportu GlcCer do LBs se částečně podílí **ABCA12** transportéry (membránové transportéry lipidů). Ve studiích na myších s navozeným deficitem tohoto transportéru⁶⁷ nebo keratinocytech izolovaných z pacientů trpících onemocněním spojeným s mutací v genu pro ABCA12⁶⁸ bylo pozorováno hromadění GlcCer a nedostatek Cer ve SC. Hypotézou pro vstup Chol do LBs je využití transportéru ABCG1

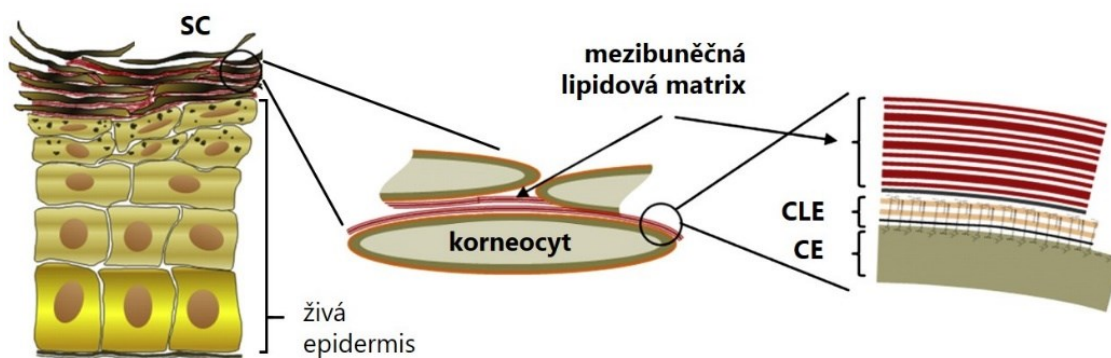
(v lidském těle slouží hlavně jako přenašeč Chol do HDL částic), jejichž úbytek byl pozorován při abnormální tvorbě LBs.⁶⁹ Nicméně vstup fosfolipidů (prekurzory VMK) do LBs zůstává nejasný.

K **exocytóze** LBs dochází mezi SG a SC (konkrétně z keratinocytů SG do mezibuněčného prostoru SC). Sekreci regulují proteiny (CLIP170, Tmem79 atd.)⁶³ a hladina vápenatých iontů (Ca^{2+}).⁶⁴ V epidermis se nachází tzv. **gradient Ca^{2+} iontů**; v bazální vrstvě je hladina extracelulárních Ca^{2+} nejnižší a s diferenciací keratinocytů postupně stoupá. Nízká hladina Ca^{2+} napomáhá buněčnému dělení, a naopak vysoká koncentrace Ca^{2+} podporuje diferenciaci a stratifikaci keratinocytů a sekreci LBs.^{64, 70}

Po vyloučení obsahu LBs dochází k **rozkladu** GlcCer (pomocí enzymu **β -glukocerebrosidáza**; β -GlcCer-áza) a SM (pomocí enzymu **kyselá sfingomyelináza**) na Cer, zatímco fosfolipidy jsou přeměněny na VMK (pomocí enzymu **fosfolipáza A_2**).³ Enzym β -GlcCer-áza rozkládá GlcCer na Cer a glukózu a v lidském těle vykazuje nejvyšší aktivitu ve vrchních vrstvách epidermis a při kyselém pH.³³ Pro jeho aktivaci je nezbytná přítomnost kofaktoru, proteinu z rodiny saposinů (SAP, z angl. *sphingolipid activator protein*) SAP-C.⁷¹ SM v epidermis degraduje kyselá sfingomyelináza na Cer a fosforylcholin, při optimálním pH 4-5.⁷² Fosfolipidy jsou enzymaticky přeměněny v epidermis fosfolipázou A_2 na VMK, což způsobí okyselení SC.^{73, 74} Protože fosfolipáza A_2 má optimum spíše při neutrálním pH (6-7,5),⁷⁵ nabízí se hypotéza, že níže ve SG/SC nejprve dochází ke vzniku VMK, což okyselí SC, a tím pádem se zlepší podmínky pro funkčnost enzymů přeměňujících SM a GlcCer na Cer.⁷⁶

2.1.5 Uspořádání lipidové matrix

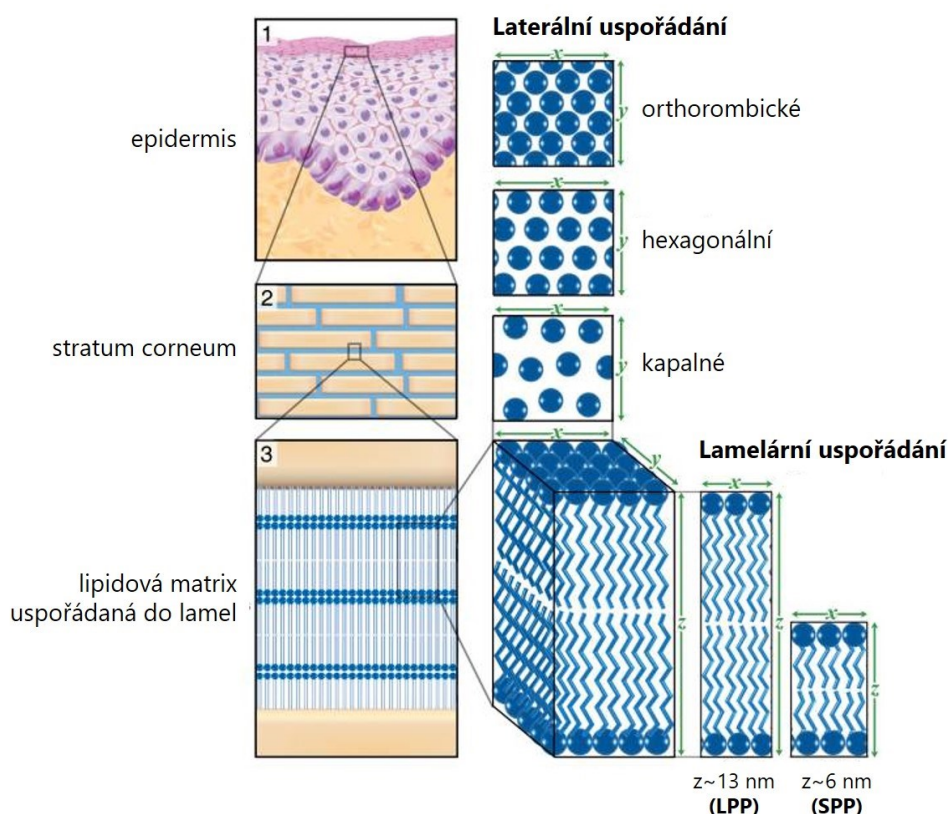
Na proteinovou obálku korneocytů (konkrétně na glutaminové zbytky involucrinu) je **kovalentně** navázána monovrstva lipidů tvořená ultradlouhými Cer a VMK, která se nazývá **korneocytární lipidová obálka** (CLE; z angl. *corneocyte lipide envelope*;²⁷ **Obrázek 8**).



Obrázek 8 Stavba rohové vrstvy (SC). Převzato a upraveno dle Krieg et al.⁷⁷ SC je tvořeno korneocyty, na jejichž povrchu je proteinová korneocytární obálka (na obr. označena jako CE). Na ni je kovalentně vázána monovrstva lipidů (CLE), která slouží zřejmě jako templát pro lamelární uspořádání lipidové matrix.

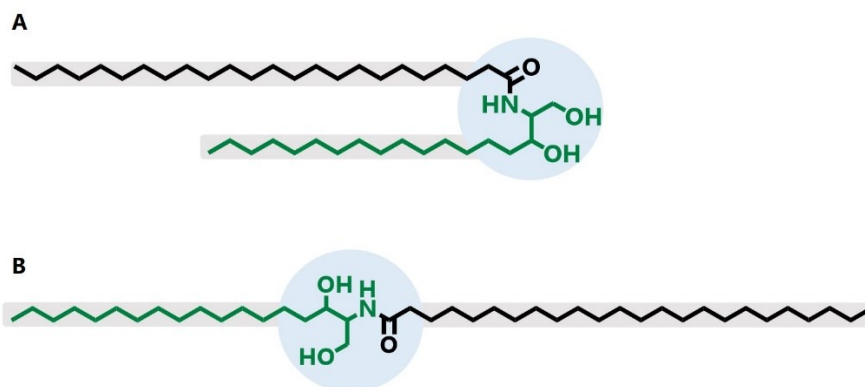
Doposud není jasné, jakou funkci má CLE. Mezi hypotézy patří její důležitost pro kohezi SC⁷⁸, funkce polopropustné membrány klíčové pro hydrataci SC⁷⁹, nebo že slouží jako templát pro uspořádání bariérových lipidů v mezibuněčném prostoru keratinocytů.⁸⁰

Lipidy v mezibuněčné matrix tvoří multivrstevné útvary, které si lze představit jako na sebe navrstvené dvojvrstvy lipidů, ve kterých se lipidy orientují podle polaritě (polární hlavy vs. nepolární řetězce; **Obrázek 9**). Toto uspořádání se nazývá **lamelární** a v lidském SC lze rozlišit tři různé fáze, které se liší délkou mezirovinné vzdálenosti lamel (d).³⁴ Dlouhá lamelární fáze (LPP, z angl. *long periodicity phase*) vykazuje opakující se vzdálenost 11,9–13,1 nm a pro její vznik je nezbytná přítomnost dlouhých acylCer.^{81–84} Dále byla ve SC popsána krátká lamelární fáze (SPP, z angl. *short periodicity phase*; $d=5,3–6,4$ nm.) a fáze separovaného Chol ($d\sim 3,4$ nm).^{83, 85, 86} Při pohledu na multivrstevné útvary jako na trojrozměrnou soustavu, kde pomyslnou svislou osou (z) je mezirovinná vzdálenost lamel (d , **Obrázek 9**), lze pak pozorovat uspořádání lipidů v jednotlivých lamelách (osa x vs. osa y). Toto uspořádání se nazývá **laterální** a předpokládá se, že lipidy v lidském SC koexistují ve třech odlišných konformacích.^{34, 83} Nejtěsněji uspořádané jsou v konformaci **orthorombické** (krystalické) díky tomu, že acylové řetězce Cer a VMK jsou v *all-trans* konformaci a molekuly jsou tak v kosočtverečné krystalické mřížce. Tuto konformaci zaujímá většina lipidů SC a je důležitá pro udržení fungující kožní bariéry.⁸⁷ V **hexagonální** (gelové) konformaci jsou molekuly lipidů uspořádány do šesterečné krystalické mřížky, tedy volněji, kvůli přítomnosti *gauche* konformerů. Tato konformace se v lidském SC vyskytuje v menší míře, přítomna je především ve SC pacientů s poruchami kožní bariéry.⁴ Malé množství lipidů ve SC také tvoří neuspořádanou **kapalně-krystalickou fázi** s převahou *gauche* konformerů.^{87, 88}



Obrázek 9 Uspořádání lipidové matrix. Převzato a upraveno dle Janssens et al.⁸⁹ Lipidy jsou v mezibuněčné matrix uspořádány do lamel; v lidském SC se vyskytují lamely s délkou kolem 13 nm (LPP) a 6 nm (SPP). Při pohledu na lamelu „shora“ pak lze rozlišit orthorombické, hexagonální a kapalně uspořádání lipidů, které udává „těsnost“ uspořádání v dané lamele.

Cer díky své struktuře, tvořené dvěma lipofilními řetězci a polární hlavou, mohou v lamelách zaujímat buď uzavřenou nebo otevřenou konformaci. V **uzavřené** neboli vlásenkové (z angl. *hairpin*) konformaci, jsou oba lipofilní řetězce vedle sebe (**Obrázek 10A**). Naopak v **otevřené** (tzv. *splayed*) konformaci, jsou řetězce uspořádány každý na opačnou stranu (**Obrázek 10B**).^{90, 91} Nejnovější výzkum navrhuje, že Cer ve SC preferují otevřenou konformaci a zároveň je možné, že mění svou konformaci během vzniku kožní bariéry (tzn. od nejnižších vrstev epidermis směrem k povrchu) z uzavřené do otevřené. Ostatní lipidy SC jsou pak vmezeřeny mezi molekuly Cer^{91, 92}



Obrázek 10 Možné konformace Cer v kožní bariéře. Na panelu a je uzavřená (tzv. *hairpin*) a na panelu B otevřená (tzv. *splayed*) konformace Cer.

3. Faktory a látky ovlivňující propustnost kožní bariéry

Správná funkce kožní bariéry je důležitá pro fyzické i psychické zdraví jedince.⁹³ Její narušení může v lehčích případech způsobit iritaci kůže, avšak poškození kožní bariéry u některých geneticky podmíněných **onemocnění** nejsou slučitelná se životem.^{17, 94} Zdravá kožní bariéra může být narušena několika faktory, jako například změna pH, poranění, záněty nebo stres. U onemocnění kožní bariéry často dochází k dysbalanci bariérových lipidů a jejich špatnému uspořádání.^{4, 95} Jediný případ, kdy je porušení kožní bariéry žádoucí, je **(trans)dermální aplikace léčiv**. V tomto případě se ale musí jednat o narušení reverzibilní.⁶ V této kapitole budou detailně popsány některé z mnoha faktorů a látek, které ovlivňují propustnost kožní bariéry, na které byla zaměřena tato práce.

3.1 Vliv pH

Fyziologické pH kůže se liší v různých vrstvách kůže, konkrétně lze hovořit o **gradientu pH**. Na povrchu kůže (SC) je pH kyselé (~5), přičemž přesné hodnoty se liší podle místa těla, kde je měřeno.^{96, 97} Směrem do hlubších vrstev epidermis se pH zvyšuje a blíží se k pH neutrálnímu.⁷⁴ Kyselé pH způsobují především tři hlavní faktory: přeměna fosfolipidů na VMK, vznik *trans*-urokanové kyseliny z filaggrinu (přes meziproduct histidin) a transport H⁺ přes membránu keratinocytů (Na⁺/H⁺ antiport).¹⁰ Při narušení fyziologického pH může docházet k hromadění mikroorganismů, produkci prozánětlivých cytokinů či aktivaci serin-proteáz (a následnému odbourávání korneodesmosomů). Kromě toho hraje kyselé pH důležitou roli v procesu transportu lipidů do SC i jejich následné přeměně, což nejspíš souvisí s narušením permeability kožní bariéry či její nedokonalé regeneraci při změnách pH.^{10, 76}

3.2 Patofyziologické aspekty

Onemocnění kožní bariéry většinou souvisí s nerovnováhou kožních lipidů a jejich metabolismu, což vyústí v nefunkční uspořádání lipidové matrix. Jednotlivé poruchy jsou popsány níže s přihlédnutím k vlivu látek, které je způsobují.

3.2.1 Atopická dermatitida

Toto chronické zánětlivé onemocnění se manifestuje ekzémem, suchou a svědicí kůží a postihuje až 20 % dětské a 3 % dospělé populace. Vzniká na genetickém podkladě (mutace genu pro filaggrin, zvýšená funkce enzymů degradujících prekursorů Cer atd.), a narušení kožní bariéry je dále způsobeno vlivy imunologickými a vlivem životního prostředí. Cyklicky se objevují zánětlivá a svědivá ložiska, která jsou náchylnější k prostupu dráždivých látek, tím se dále aktivuje imunitní odpověď a zánět se zhoršuje.^{98, 99} V kůži pacientů s atopickou dermatitidou je snížené celkové množství lipidů SC a zároveň narušen jejich poměr. To je částečně způsobeno nadměrnou expresí enzymů degradujících prekursorů Cer (GlcCer-deacyláza, respektive SM-deacyláza), které odbourávají GlcCer, respektive SM na glukosyl-sfingosin, respektive sfingosyl-fosforylcholin.^{100, 101} Obecně dochází k poklesu některých tříd Cer, například CerEOS, CerNP nebo kovalentně vázaných ω -hydroxyCer a tedy narušení správného laterálního i lamelárního uspořádání lipidů.^{89, 102, 103}

3.2.2 Ichtyózy

Pacienti trpící ichtyózou mají obecně kůži suchou, ztvrdlou a nadměrně se odlupující. Průběh závisí především na typu ichtyózy, ale všechny typy mají společné snížené množství lipidů SC.¹⁰⁴ Nejčastějším a nejmírnějším je typ *ichthyosis vulgaris*, který je způsobený mutací genu pro filaggrin. Další typy ichtyóz se řadí mezi vzácná onemocnění. Patří mezi ně například X chromozomálně recesivně vázaná ichtyóza vznikající na podkladě defektu steroid sulfatázy, a tedy hromadění CholS a nedostatku Chol ve SC.⁵⁵ Nejhorší průběh mívají tzv. autosomálně recesivní kongenitální ichtyózy (ARCI) způsobené mutací několika genů, například *ABCA12* (defekt transportu GlcCer do LBs), rodiny *ALOX* (defekt enzymatické přeměny kyseliny arachidonové a následné tvorby transmembránových transportérů) či *PNPLA* (defekt v syntéze acylCer, a tedy vzniku CLE). Řadí se mezi ně lamelární ichtyóza, kongenitální ichtyosiformní erythrodermie a harlekýnská ichtyóza. U těchto onemocnění je pozorováno snížené množství acylCer a kovalentně vázaných ω -hydroxyCer.^{12, 94, 105}

3.2.3 Psoriáza

Jedná se o autoimunitní onemocnění na genetickém podkladě, které se projevuje zánětlivými ložisky, ztlustělou kůží a jejím nadměrným odlupováním. Kvůli chronickému zánětu v kůži dochází ke stimulaci proliferace keratinocytů a defektnímu procesu keratinizace (korneocyty si zachovávají buněčné jádro).¹⁰⁶ U pacientů s psoriázou byla pozorována i porušená bariérová funkce kůže, konkrétně zvýšený přestup vody přes kožní bariéru (TEWL, z angl. *transepidermal water loss*). To bylo vysvětleno pozměněným spektrem Cer, kdy celkový obsah Cer zůstává srovnatelný se zdravou kůží, avšak dochází ke zvýšení koncentrace Cer se sfingosinovou bází na úkor Cer s fytosfingosinovou bází.⁴²

3.2.4 Syndromy

Defektní metabolismus lipidů způsobuje i řadu vzácných syndromů, u několika z nich způsobuje i kožní příznaky. **Gaucherova** choroba (podtyp 2) je genetické onemocnění způsobené nedostatkem či úplnou absencí enzymu β -GlcCer-áza, kdy nedochází k přeměně GlcCer na Cer. Kožním projevem je ichtyóza; kvůli nárůstu GlcCer na úkor Cer se tvoří defektní lamelární struktura SC a dochází ke ztrátám vody přes kůži.^{107, 108} **Niemann-Pickova** choroba je vrozený nedostatek kyselé sfingomyelinázy, dochází tedy k nedostatečnému zpracování SM na Cer. Kožní projevy jsou vzácné a spočívají ve snížené schopnosti regenerace kožní bariéry po jejím narušení.¹⁰⁹ **CHILD** syndrom (z angl. *Congenital hemidysplasia with ichthyosis and limb defects*) je narušená biosyntéza Chol a projevuje se ichtyotickými lézemi.¹¹⁰

3.3 Enhancery kožní permeace a (trans)dermální podávání léčiv

Jak bylo řečeno v úvodu této kapitoly, narušení kožní bariéry může být i žádoucí. Toho se využívá při **(trans)dermálním podávání léčiv**, kde je potřeba doručit aktivní látku do některé z vrstev kůže (topické, dermální podání) či přes kůži do krevního oběhu (transdermální podání). Transdermální podání léčiv nabývá na oblíbenosti nejen díky zjednodušení užívání léčiv pro pacienty (nebolestivost, dlouhá doba působení léčiva), ale nespornou výhodou je vyloučení *first-pass* efektu (nežádoucí degradace léčiva při průchodu játry).¹¹¹ Aby mohlo být léčivo dodáno do

oběhu přes kůži, mělo by splňovat následující podmínky: molekulová hmotnost <500 g/mol, logP = 1-5, vysoká potence (dávkování <10 mg/den), bod tání <250 °C.⁶

Enhancery (neboli akceleranty, urychlovače) kožní permeace/penetrace jsou látky, které umožňují, případně ulehčují a urychlují, vstup látek přes kožní bariéru. Měly by umožňovat vstup látky do organismu, ale zamezit úniku endogenních látek z organismu. Dále musí splňovat **požadavky** jako je reverzibilita účinku, kompatibilita s ostatními léčivými/pomocnými látkami a zároveň nesmí být toxické, dráždivé a mít vlastní farmakologický efekt.¹¹²

Jako enhancery se využívají **chemické** látky (respektive molekuly), které mohou ovlivňovat vlastnosti léčiva (rozpuštěnost, rozdělovací koeficient) nebo interagovat se složkami SC.^{6, 113} Při interakci s intercelulárními lipidy dochází k narušení lamelárního a laterálního uspořádání lipidů buď díky interakcím molekul s polární hlavou kožních lipidů (narušení vodíkových vazeb; například ethanol v malé koncentraci) nebo vmezeřením amfifilní molekuly enhanceru do lamel (například MK, azon). Pokud je enhancerem rozpouštědlo (například ethanol, dimethylsulfoxid), dochází k extrakci kožních lipidů.^{113, 114} Enhancery kožní permeace na bázi organických sloučenin jsou studovány již mnoho let a jsou i součástí komerčně dostupných přípravků.^{6, 115}

Jiným přístupem je využití látek s **nadmolekulární** strukturou, jako jsou nanočástice^{116, 117}, nano/mikroemulze¹¹⁸, liposomy, transferosomy, ethosomy¹¹⁹⁻¹²¹, dendrimery^{122, 123} a další. Využívá se jejich vlastností jako je malá velikost či případně měnitelná konformace a tvar (liposomy, transferosomy, ethosomy, dendrimery).^{102, 113} Většinou jsou připraveny na bázi biodegradabilních polymerů nebo lipidů, aby se dosáhlo jejich nízké toxicity.^{124, 125} Tyto látky mají různé mechanismy účinku závislé na jejich struktuře a složení. Léčivo v nich může být enkapsulované nebo navázané na jejich povrch. Mohou buď přímo pronikat do SC s enkapsulovaným/navázaným léčivem, zvyšovat rozpustnost léčiva nebo tvořit na povrchu okluzivní nanočásticový film, pod kterým se léčivo lépe vstřebává. Mnohdy však přesný mechanismus účinku není znám.^{111, 116, 122} Jako pokročilé systémy lze využít i kombinaci těchto látek. Například kombinací liposomů s dendrimery bylo docíleno vyšší enkapsulační efektivity a pozvolného uvolňování léčiva z formulace v porovnání se samotnými liposomy.¹²⁶

4. Modely pro výzkum kožní bariéry

Modely kožní bariéry mohou sloužit pro základní výzkum, kdy napomáhají pochopit základní charakteristiky kožní bariéry (uspořádání lipidů, mechanismus onemocnění kožní bariéry) a jejich vliv na permeabilitu. Další možností je jejich využití v aplikovaném výzkumu, kdy se na komplexnějších modelech testují léčiva či formulace určené pro (trans)dermální podání (permeabilita, iritabilita aj.). Je tedy důležité vybrat vždy pro zamýšlený výzkum vhodný model. Tato kapitola shrnuje modely od těch nejjednodušších lipidových až po kultivaci kožních štěpů.

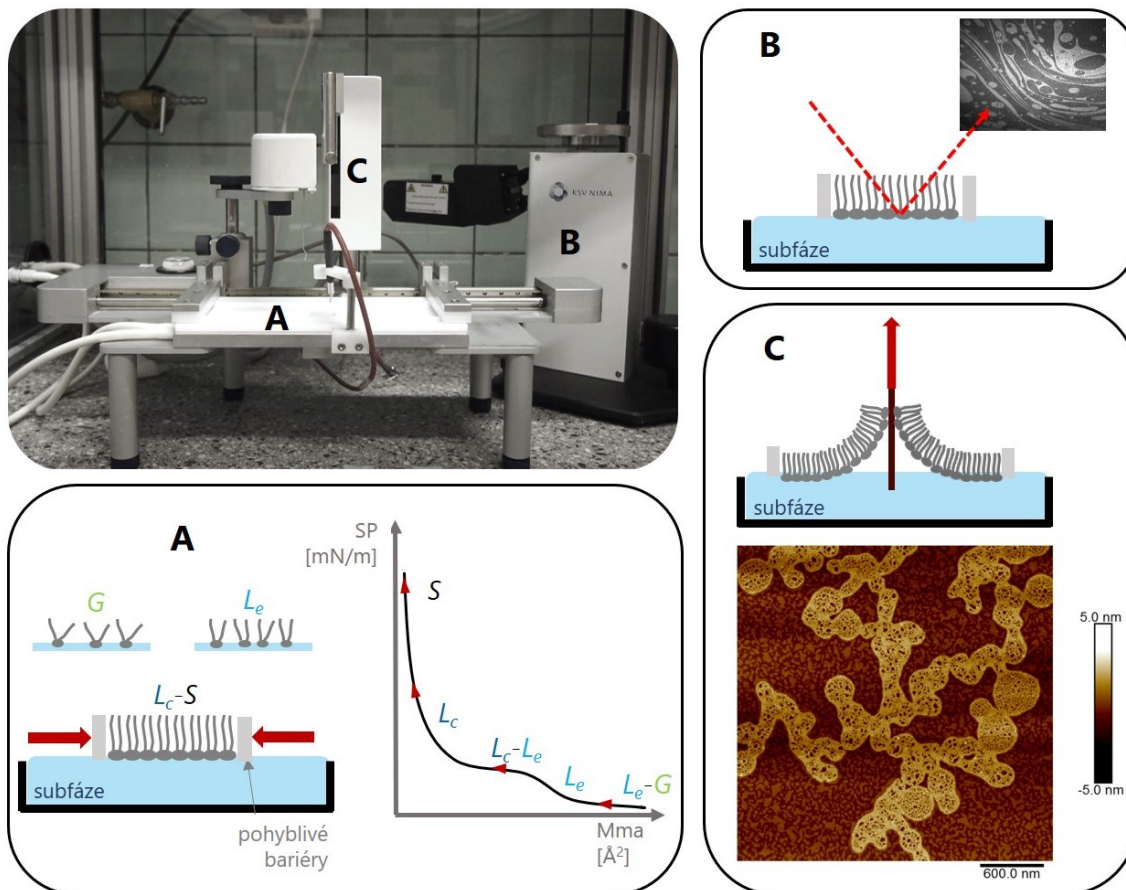
4.1 Monovrstevné a multivrstevné modely lipidů SC a jejich hodnocení

Jedny z nejjednodušších modelů jsou **modely lipidové matrix**. Jejich výhodou je možnost snadno pozměnit obsah lipidů, a tím simulovat různá kožní onemocnění. Nejčastěji se využívají tři hlavní bariérové lipidy (Cer, VMK a Chol), které se smísí v ekvimolárním poměru, aby jejich množství odpovídalo fyziologickému složení, případně s 5% wt přídavkem CholS. Lze využít i Cer izolované z lidského SC doplněné o VMK a Chol.⁸⁸ Dále je možné studovat vliv jednotlivých podtříd lipidů a připravit model například pouze s LA či CerNS.^{127, 128} Kromě toho je možné bariérové lipidy nahradit jejich prekurzory nebo degradačními produkty, čímž se simuluje vznik kožní bariéry nebo onemocnění s deficitem příslušných lipidů.¹²⁹ Z takto připravených vzorků se dále mohou připravit modely **monovrstevné** nebo **multivrstevné**. V této práci byly využity především monovrstevné modely, proto jsou dále detailněji popsány.

4.1.1 Langmuirovy monovrstvy

Pomocí monovrstevných modelů (nazývány také Langmuirovy monovrstvy či Langmuirovy filmy) lze studovat laterální uspořádávání lipidů, tedy jejich interakce v oblasti polární hlavy či hydrofobních řetězců.¹³⁰ Měření probíhá na mezifázi kapalina-vzduch a monovrstevný film je vytvořen nanesením vzorku s amfifilními vlastnostmi na kapalnou subfázi. Molekuly se tak orientují polární hlavou směrem do subfáze, zatímco nepolární řetězce směrem ven. Základní vybavení pro přípravu monovrstev je Langmuirova vanička z hydrofobního materiálu, pohyblivé hydrofilní bariéry a Wilhelmyho destička (*Wilhelmy plate*; platinový plíšek pro měření povrchového tlaku) zavěšený na elektronických mikrováhách.¹³¹

Základní charakteristikou je **izoterma**, tedy křivka závislosti **povrchového tlaku** (SP, *Surface Pressure*) na teoretické **ploše jedné molekuly** (MMA, *Mean Molecular Area*; **Obrázek 11A**). SP je v průběhu měření zvyšován přibližováním bariér a zaznamenáván Wilhelmyho destičkou. Počáteční MMA je vypočítána z molekulové hmotnosti vzorku. Z izotermy lze vyvodit další charakteristiky, například plochu měřené směsi při určitém povrchovém tlaku, kompresibilitu (stlačitelnost) či fázové přechody. **Kompresibilita** je hodnocena jako Modul kompresibility (C_s^{-1}) a určuje elasticitu monovrstvy. **Fázové přechody** jsou na křivce znatelné jako mírná zalomení (**Obrázek 11A**), a lze rozlišit 4 základní fáze, kterými monovrstva prochází: plynná (G, *gaseous*), kapalně-expandovaná (LE neboli L1, *liquid-expanded*), kapalně-kondenzovaná (Lc neboli L2, *liquid-condensed*) a pevná fáze (S, *solid*).^{131, 132}



Obrázek 11 Langmuirovy monovrstvy. Na panelu A je zobrazena monovrstva na rozhraní voda-vzduch. Během stlačování pohyblivých bariér prochází monovrstva fázovými přechody, které jsou zachyceny vpravo na izotermě jako mírná zakřivení. Panel B schematicky představuje odraz laserového paprsku od monovrstvy, což je základem měření pomocí Brewsterova úhlového mikroskopu. Na panelu C je pak znázorněn přenos monovrstvy na pevný podklad; takový vzorek je podroben měření na AFM, což umožní pozorovat domény lipidů.

Další technikou pro pozorování monovrstev na rozhraní kapalina-vzduch je **Brewsterův úhlový mikroskop** (BAM, *Brewster angle microscope*), který je umožňuje sledovat v reálném čase. Přístroj vyzářuje pod úhlem 53° (Brewsterův úhel pro vodné roztoky) laserový paprsek, který prochází čistou subfází, ale pokud je na povrchu subfáze monovrstva, odrazí se od ní (**Obrázek 11B**).^{133, 134} Výstupem je mikrograf o velikosti v řádu mm, který zobrazuje domény lipidů, případně na něm lze pozorovat fázové přechody.¹²⁸

Monovrstvy lze přenést na pevný podklad a dále je hodnotit pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM, *Atomic force microscopy*). Pokud je monovrstva vytvořena na polární kapalně subfázi a je méně rigidní, je vhodné pro přenos použít techniku **Langmuir-Blodgett**, kdy podklad (nejčastěji slídové sklíčko) prochází vertikálně monovrstvou (**Obrázek 11C**). Díky interakcím sklíčka s polární hlavou lipidů dojde k zachycení monovrstvy. Dále je možné monovrstvu přenést technikou Langmuir-Schaefer, kdy je monovrstva zachycena přes svou hydrofobní část na hydrofobní podklad.¹³⁵ Monovrstvu je vhodné přenést v L_c fázi (což obvykle odpovídá $SP\ 20-40\ mN/m$)¹³² a substrát je vytahován konstantní rychlostí pomocí přídatného automatického zařízení. Po přenosu je vzorek skladován v inertním prostředí (pod dusíkem) až

do měření. **AFM** umožňuje pozorovat laterální uspořádání lipidů ve vysokém rozlišení v řádu desítek nm. Pro pozorování lipidů se nejčastěji používá kontaktní mód, kdy hrot na kantilevru skenuje povrch měřeného vzorku. Díky interakcím na bázi atomárních sil mezi hrotem a vzorkem se ohýbá kantilevr, od něj se odrážející laserový paprsek je detekován a vzniká mikrograf.^{136, 137}

Velkou výhodou monovrstevných modelů je možnost využít je pro studium **interakcí** látek s membránami.^{138, 139} V tomto případě se k připravené monovrstvě přidá studovaná látka (do subfáze či shora, záleží na studovaných interakcích a fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky) a změny se hodnotí pomocí zaznamenávání SP/MMA a jejich změn, BAM či AFM.¹³⁹⁻¹⁴¹ Díky tomu je možné studovat interakce s proteiny (například enzymy, které se podílejí na tvorbě kožní bariéry)^{142, 143} nebo potencionálními enhancery či nanočásticemi.^{139, 144}

4.1.2 Multivrstevné modely

Tyto modely jsou komplexnější, tedy bližší uspořádání lipidů ve SC. Roztok (nebo suspenze) lipidů je **sprejován** pomocí Linomatu v několika vrstvách na podklad (např. filtr) a díky následné hydrataci a řízenému zahřívání (nad teplotu tání lipidů) a chlazení se lipidy organizují do lamel.^{8, 145} Takto připravené membrány se upevní do Franzových difúzních cel a mohou být podrobeny studiu na **permeabilitu** modelových permeantů, ztrátu vody (TEWL) nebo prostup iontů (elektrická impedance). **TEWL** je v dermatologii široce využívaná metoda, která slouží jako marker funkčnosti kožní bariéry. Je založena na stanovení množství vody vypařované z organismu přes epidermis (v případě modelových membrán přes membránu) za určitý čas.^{146, 147} Pomocí **elektrické impedance** se hodnotí odpor membrány nebo SC pro elektrický proud.¹⁴⁸

Uspořádání lipidů je pozorováno pomocí infračervené spektroskopie (IR, z angl. *infrared spectroscopy*) a rentgenové difrakce (XRD, z angl. *X-ray diffraction*). Obě metody jsou nedestruktivní, a kromě membrán je lze použít i pro SC případně celou epidermis. **IR** umožňuje odvodit laterální uspořádání lipidů.¹⁴⁹ Emitované infračervené záření je absorbováno molekulami a mění tak jejich energetický stav. To se projeví jako vibrace ve spektru. Pro lipidy jsou charakteristické valenční vibrace methylenových skupin (symetrická 2848–2854 cm^{-1} a asymetrická 2915–2924 cm^{-1}) reflektující konformaci acylových řetězců. Pokud je hodnota nižší než 2850 cm^{-1} , lze předpokládat orthorombické či hexagonální uspořádání, tudíž správné bariérové vlastnosti kožních lipidů.^{150, 151} Další sledovanou oblastí je oblast karboxylu VMK (1710–1690 cm^{-1}) a tzv. amid I (1690–1610 cm^{-1}) typický pro Cer.^{150, 152} Deformační vibrace (nůžková 1462–1474 cm^{-1} a kývavá 728–720 cm^{-1}) vypovídají o laterálním uspořádání lipidů. Nachází-li se v těchto oblastech spektra (~1468 cm^{-1} ; ~720 cm^{-1}) dublet (rozdvojený peak), lze z toho vyvodit orthorombické uspořádání lipidů. Naopak singlet značí uspořádání hexagonální.^{149, 150} Při studiu lipidů se využívá také deuterace, tedy záměny vodíku za těžší izotop deuterium, který vykazuje jiné vlnočty. Výhodou je, že lze pak pozorovat chování deuterovaných řetězců, aniž by interferovaly s vlnočty řetězců vodíkových.^{150, 153} **XRD** umožňuje studovat lamelární uspořádání lipidů, konkrétně mezirovinné vzdálenosti (d) jednotlivých lamel a rozlišit tak LPP, SPP a fázi separovaného Chol. Rentgenový paprsek o určité vlnové délce (λ) dopadá na vzorek pod Braggovým úhlem (θ). Pokud paprsek dopadá na pravidelně se opakující struktury

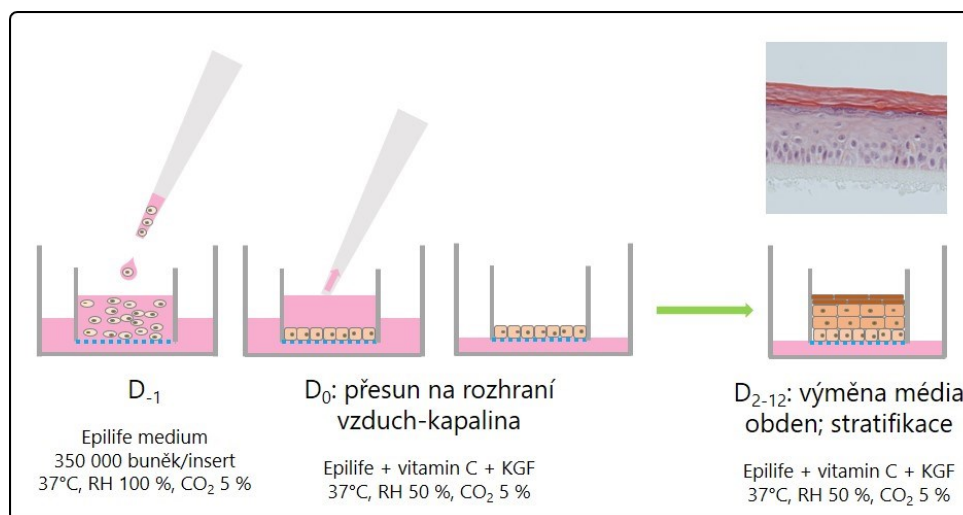
a je splněna Braggova rovnice $2d\sin\theta=n\lambda$, paprsek interferuje a na difraktogramu jsou pozorovány reflexe (peaky). Hodnota d pak odpovídá mezivinné vzdálenosti jednotlivých lamel, respektive její tloušťce v nm.^{83, 127}

4.2 *In vitro* modely

In vitro modely neboli 3D buněčné modely, jsou vytvořené kultivací kožních buněk. Je možné připravit modely pouze **epidermis** či **celé kůže**. Výhodou je možnost získat modely upravené genovým inženýrstvím či z keratinocytů pacientů s různými onemocněními, které pak slouží k simulaci poruch kožní bariéry.^{154, 155} Nevýhodou je časová a finanční náročnost a variabilita modelů způsobená odběrem primárních buněk od pacientů. Takto získané modely lze následně využít pro testování léčiv (permeabilita, iritabilita, toxicita, hojení ran atd.).^{9, 156} S výhodou jsou využívány i při testování kosmetických produktů a složek v nich používaných, a to kvůli zákazu testování těchto látek na zvířatech.¹⁵⁷ V dnešní době jsou 3D buněčné modely i komerčně dostupné.⁹

4.2.1 Rekonstruovaná lidská epidermis (*Reconstructed human epidermis*, RHE)

Jedná se o 3D buněčný model **kultivovaných** diferenciováných **keratinocytů**. Primární buňky jsou získány z kůže dárců (nejčastěji předloktí, předkožka) po chirurgických zákrocích. Díky postupné změně podmínek kultivace (médium, vlhkost, vystavení vzduchu atd.; **Obrázek 12**) je vytvořen stratifikovaný model lidské epidermis. Po validaci modelu (viabilita, morfologické a bariérové vlastnosti), může být dále testován například na permeabilitu či iritabilitu léčiv/lékových forem.¹⁵⁸ Primární keratinocyty je možné dále geneticky modifikovat a navodit onemocnění kožní bariéry.^{12, 154}



Obrázek 12 Příprava rekonstruované epidermis. Na obrázku je schematicky znázorněna příprava RHE dle Frankart et al.¹⁵⁸ Primární keratinocyty jsou nasazeny do insertů s polopropustnou membránou, díky změně vnějších faktorů, dochází k jejich dělení a diferenciaci. Výsledné RHE je dosaženo přibližně dvanáctý den (D12), kdy je již dosaženo stratifikace. V pravém horním rohu je snímek histologického řezu RHE. (RH=relativní vlhkost, KGF=keratinocytový růstový faktor.)

4.2.2 Rekonstruovaná lidská kůže (*Reconstructed human skin, RHS*)

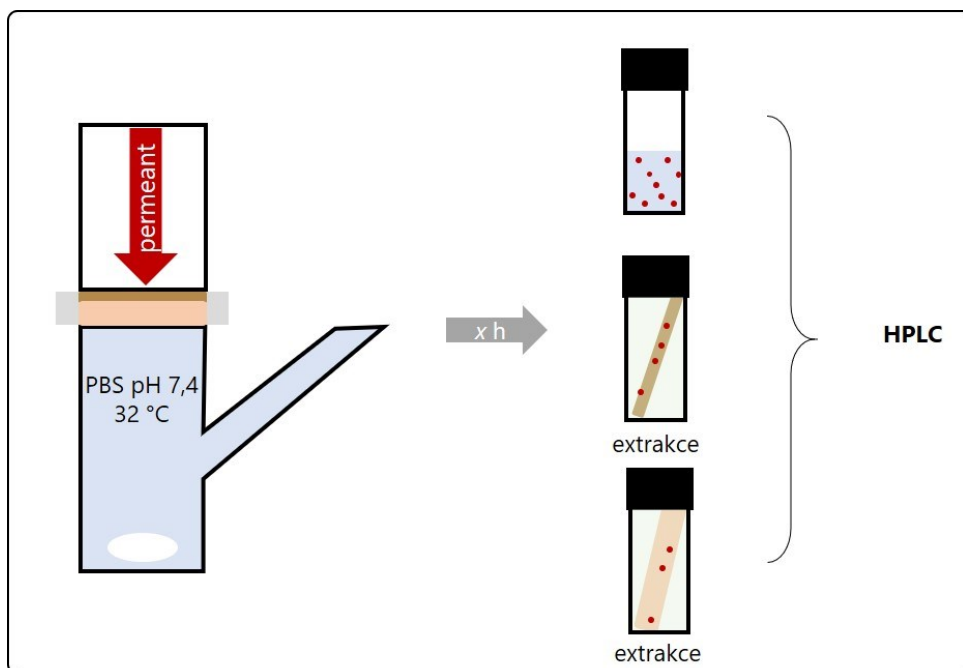
RHS je komplexnější model, který díky přítomnosti dermálního kompartmentu obsahuje kromě keratinocytů i dermální buňky **fibroblasty** a kolagen. Díky tomu jsou umožněny interakce mezi fibroblasty a keratinocyty, což je důležité pro udržení homeostázy kůže.¹⁴ Fibroblasty jsou nejprve kultivovány v kolagenové matrix a po několika dnech jsou na ně nasazeny keratinocyty.¹⁵⁹ Dále je provedeno hodnocení modelů; kromě biochemických a histologických zkoušek může být provedeno i **hodnocení lipidů** ve SC pomocí analytických metod.¹⁶⁰ SC modelu je odstraněno a hodnoceno nejprve na uspořádání lipidů pomocí IR. Poté jsou lipidy ze SC extrahovány a analyzovány pomocí např. vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC, z angl. *high performance thin layer chromatography*).^{99, 160} HPTLC umožňuje přesně kvantifikovat bariérové lipidy (jednotlivé skupiny Cer, MK, Chol) i jejich polárnější prekurzory (GlcCer, SM, fosfolipidy, CholS) díky rozdílné afinitě látek ke silikagelu HPTLC desek a zvolené mobilní fázi. Pro dosažení dostatečného rozdělení látek je potřeba zvlášť kvantifikovat bariérové lipidy a zvlášť jejich polární prekurzory (jiná mobilní fáze, viz *Experimentální část 3.2.1.2 Analýza SC získaného z RHS*). Analyzované látky jsou na desky nanášeny společně se standardy, ze kterých je pak sestavena kalibrační křivka pro výpočet koncentrace vzorků.⁹⁹

4.3 *Ex vivo* modely

Ex vivo experimenty na kůži lze využít například pro stanovení účinnosti a bezpečnosti léčiv, výzkum hojení ran, stárnutí kůže atd.^{161, 162} Mohou být prováděny na kůži zvířecí či lidské. Často je využívána prasečí kůže, a to pro svoji dostupnost a podobnost s kůží lidskou.¹⁶³ Při využití lidské kůže jsou kožní štěpy nejčastěji získané od dárců podstupující plastické operace v oblasti břicha či prsou a je nutné mít tento proces schválený etickou komisí. Nevýhodou *ex vivo* modelů je variabilita kůže od různých dárců. Zároveň není možné modifikovat složení či morfologii modelů, tak jak tomu bylo u předchozích dvou skupin.

4.3.1 Permeační pokusy

Pro permeační pokusy není většinou potřeba udržet kůži biochemicky aktivní, důležitá je její bariérová funkce. Kůži je tedy možné zmrazit a uchovávat po operaci delší dobu až do permeace.^{164, 165} Po odstranění podkožního tuku se využívá buď kůže plně tloušťky (angl. *full-thickness skin*, přibližná tloušťka 0,9–1,2 mm) nebo kůže upravená na specifickou tloušťku pomocí dermatomu (tzn. částečné odříznutí dermis, tloušťka nejčastěji 0,2–0,5 mm).^{166, 167} Permeační pokusy probíhají v modifikovaných **Franzových difúzních celách**, kde je napnuta kůže epidermis nahoru (**Obrázek 13**). Vrchní část cely (**donorová**) slouží pro aplikaci permeantu, respektive formulace, spodní (**akceptorová**) simuluje vnitřní prostředí organismu.¹⁶⁸ Po proběhnutí permeace je pomocí vhodné analytické metody (většinou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, **HPLC**) sledována koncentrace permeantu v jednotlivých kompartmentech. Akceptorová fáze je odebírána v daných časových intervalech a je přímo analyzována. Kůže se po ukončení experimentu oddělí na epidermis a dermis a léčivo je extrahováno do extrakčního činidla, které je analyzováno. Během pokusu lze také sledovat propustnost kůže pro vodu (TEWL) nebo ionty (elektrická impedance), čehož se využívá především při studiu reverzibility účinku enhancerů.^{147, 169}



Obrázek 13 Schéma permeačního experimentu. Vlevo je modifikovaná Franzova difúzní cela; skládá se z horní donorové části (aplikace permeantu), držáků, které upevňují kůži a vymezují permeační plochu a spodní akceptorové části naplněné fosfátovým pufrům (míchaný magnetickým míchadlem). Tyto cely jsou umístěny ve vodní lázni s teplotou udržovanou na 32 °C. Během experimentu jsou raménkem odebírány vzorky akceptorové fáze. Po ukončení pokusu je z kůže odstraněna formulace a po vyseknutí permeační plochy je oddělena epidermis od dermis. Permeant je z jednotlivých vrstev kůže extrahován do daného činidla a všechny získané roztoky jsou podrobeny HPLC analýze.

4.3.2 Kultivace lidské kůže (*Human skin organ culture*, HSOC)

Kultivaci lidské kůže lze v odborné literatuře nalézt pod anglickými pojmy *human skin organ culture* (HSOC), *human skin explant* nebo *ex vivo skin*.^{170, 171} Hlavní výhodou HSOC je komplexnost a biochemická aktivita, ze všech uvedených modelů je tento nejbližší klinické realitě. HSOC obsahuje na rozdíl od 3D buněčných modelů celé spektrum kožních buněk a proteinů a díky přítomnosti dermálních papil, které spojují epidermis a dermis, je oproti 3D modelům daleko **mechanicky odolnější**. To usnadňuje manipulaci během kultivace i následných experimentů.¹⁷⁰ Na HSOC lze například navodit zánět, poškození UVB zářením nebo mechanické poškození.^{171, 172} Díky tomu je pak možné testovat vliv protizánětlivých léčiv, prostředků na ochranu kůže před UVB zářením nebo hojení ran.¹⁷¹⁻¹⁷³ HSOC se kultivuje za stálé teploty a vlhkosti (37 °C, 5% RH) v médiu obvykle zvoleném podle typu kůže. Pro kůži získanou z abdominální plastiky se nejčastěji používá DMEM (*Dubelco's modified eagle medium*). HSOC lze kultivovat 7-9 dní, je však potřeba průběžně provádět testování viability a monitorovat metabolickou aktivitu. Po delší době kultivace dochází i k morfologickým změnám, jako je oddělování epidermis od dermis nebo jednotlivých vrstev epidermis. Nevýhodou kultivace HSOC je různorodost dárců, je tedy vhodné zařadit do experimentu kůži více jedinců.^{170, 171, 174}

Experimentální část

V experimentální části je nejprve **souhrnně uveden seznam chemikálií, materiálu a přístrojů** použitých v této práci. Následuje **dělení experimentů podle modelů**, které byly ke studiu látek ovlivňujících kožní bariéru využity. Tato část poskytuje informace o konkrétních metodách a shrnuje publikované či popisuje nepublikované výsledky práce. Pokud se jednalo o spolupráci, je také v textu vysvětleno mé zapojení do projektů.

1. Materiál a chemikálie

1.1 Lipidy

CerAP, CerAS, CerNP, CerNS, GlcCer, dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC) a dihexanoylfosfatidylcholin (DHPC), (Avanti Polar Lipids, USA).

CerEOS, CerEOP, deuterovaný CerNS (dCerNS), (syntéza Dr. Opálka, Farmaceutická fakulta, UK^{153, 175}).

Cholesterol z lanolinu (Chol), cholesteryl sulfát (CholS), cholesteryl palmitát (CholE), kyseliny palmitová, stearová, arachidonová, behenová a lignocerová (LA), sfingomyelin (SM) z hovězího mozku, fosfolipidy z vaječného bílku, (Merck, Německo).

Deuterované analogy kyselin (dVMK), (C/D/N isotopes, Kanada).

1.2 Permeanty a enhancery kožní permeace

Cidofovir (CDV), 5-fluorouracil (5-FU), Luciferová žluť, propylenglykol (PG), (Merck, Německo).

Bornyl 6-(dimethylamino)hexanoát (B-DAK), citronellyl 6-(dimethylamino)hexanoát (C-DAK), cinnamyl 6-(dimethylamino)hexanoát (Ci-DAK), (syntéza Dr. Kopečná, Farmaceutická fakulta, UK¹⁷⁶).

Polyamidoaminodendrimery s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii (nultá až třetí generace, chlorovodíkové soli: G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl, G3-HCl), (syntéza Dr. Paraskevopoulos, Mgr. Houšková a Mgr. Chladová, Farmaceutická fakulta UK^{177, 178}).

1.3 Chemikálie pro přípravu pufrů, subfází a detekčních roztoků

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, gentamicin sulfát, β -glukosidáza z mandlí, taurodeoxycholát sodný (TDCH), komerčně dostupné PAMAM dendrimery první až čtvrté generace (G1-G3), dispáza (Merck, Německo).

Chlorid sodný, hydroxid sodný, chlorid draselný, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, kyselina fosforečná, síran měďnatý (Lachema, ČR).

Nylonové filtry (0,45 μ m), (Fisher Scientific, EU).

1.4 Kultivační media, suplementy

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Fisher Scientific, EU).

Dermalife, Epilife (CellSystems, Germany).

Chlorid vápenatý, keratinocytový růstový faktor (KGF), vitamin C (Merck, Německo).

1.5 Chemikálie, proteiny a protilátky pro elektroforézu a její hodnocení

Glycerol, glycin, 2- merkaptoetanol, dodecylsulfát sodný, bromfenolová modř, tris-báze, akrylamid, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin, persulfát amonný, Ponceau S, ECL Prime kit®, Tween 20, králičí protilátka proti PNPLA1, (Merck, Německo).

Myší protilátka proti aktinu 1501 (Millipore, USA).

S peroxidázou konjugované sekundární protilátky proti králičí (SouthernBiotech, USA) a myší primární protilátce (Bethyl Laboratories, USA).

1.6 Rozpouštědla

Rozpouštědla v HPLC kvalitě (Merck, Německo).

Voda byla deionizovaná, destilovaná a filtrovaná systémem Millipore Q (Farmaceutická fakulta, UK).

1.7 HPLC kolony

SeQuant™ ZIC®-HILIC (5 µm, 200 Å) 150-4,6 mm, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), LiChroCART® 250-4 (Merck, Německo).

1.8 Pomocný materiál pro přípravu modelů

Slídová skříčka (15 × 15 mm), (SPI Supplies, USA).

Krycí skříčka (22 × 22 mm), (Erie Scientific LLC, USA).

Polykarbonátové membrány (0,015 µm), (Whatman, UK).

Polykarbonátové inzerty (průměr 0,63 cm², velikost pórů 0,4 µm), (Millipore, USA).

6 a 96jamkové destičky, Petriho misky (průměr 3,5 cm), (Merck, Německo).

1.9 Lidská kůže a izolace lipidů

Lidská kůže z abdominoplastik; Sanus první privátní chirurgické centrum (Hradec Králové, ČR). Schváleno Etickou komisí při Sanus první privátní chirurgické centrum a prováděno dle Helsinské deklaráce. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Trypsin z prasečí slinivky, hliníkové TLC desky se silikagelem 60 F 254, skleněné HPTLC desky se silikagelem (20 × 10 cm), (Merck, Německo).

2. Přístrojové vybavení

2.1 Monovrstvy a jejich hodnocení

Langmuirova vanička KN 1003 (*medium*), Langmuir-Blodgett vanička KN 2001 (*small*), delrinové bariéry KN 0040, platinová Wilhelmyho destička KN 0002, Brewsterův úhlový mikroskop MicroBAM, softwarare (KSV NIMA, Finsko).

Mikroskop atomárních sil VEECO CP II, kontaktní mód, CONT20A-CP Si sonda, Veeco DI SPMLab NT 6.0.2 software; Dimension ICON, silikonová sonda, SCANASYST-AIR, NanoScope Analysis software (Bruker Corp., Billerica, USA).

2.2 Multivrstvy a jejich hodnocení, HPTLC

Linomat V, automatická vyvíjecí komora ADC2, Scanner 3, software VisionCats (Camag, Švýcarsko).

IR spektrometr Nicolet 6700 (ThermoFisher, USA) vybavený krystalem MIRacle ATR ZnSe (PIKE Technologies, USA). K vyhodnocení byl využit software Bruker OPUS.

Rentgenový difraktometr X'Pert PRO θ - θ (PANalytical B.V., Nizozemsko) s Bragg-Brentano geometrií, za použití $\text{CuK}\alpha$ radiace, detektorem PIXCEL a softwarem X'Pert Data Viewer software (PANalytical B.V., Nizozemsko).

2.3 Kultivace a hodnocení RHE

Inverzní mikroskop EVOS, epiteliální voltmetr EVOM2m se sondou ENDOHM 12, fluorimetr Varioskan Flash (ThermoFisher, USA).

Modulární systém pro vertikální elektroforézu na dvou gelech Criterion™, zdroj PowerPac™, Quantity One 1-D software pro analýzu (Bio-Rad, USA).

Světelný a fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i vybavený fotoaparátem DXM 1200 a softwarem NIS Elements AR (Nikon, Japonsko).

Zařízení pro *tape-stripping* D'Squame® se 7 mm disky (Monaderm, Francie).

Vybavení pro LC-MS/MS analýzu Aquity I-class UPLC a Xevo TQ-S “triple-quadrupole” (Waters, USA).

2.4 Permeace

Skleněné modifikované Franzovy difúzní cely s objemem 6-7 ml (permeační plocha 0,5-1 cm²) nebo 10-12 ml (permeační plocha 2 cm²).

Vyhřívaná vana na permeace (Memmert, Německo) s magnetickou vícemístnou míchačkou VARIOMAG (ThermoFisher, USA).

HPLC Schimadzu Prominence (Schimadzu, Japonsko) skládající se z: pumpy LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, termostatu kolony CTO-20AC, UV detektoru SPD-M20A, modulu CBM-20A a softwaru LCsolutions 1.22.

TEWL-metr Aquaflux™ AF200 Evaporimeter (Biox, Velká Británie).

2.5 Zpracování grafů a statistické hodnocení

Program GraphPad Prism, verze 8.2.1 (GraphPad Software, USA)

3. Experimenty na připravených modelech

3.1 Lipidové modely

Lipidové modely simulují extracelulární matrix ve SC a byly využity díky možnosti jednoduše modifikovat složení lipidů. Pro pozorování lipidů lze použít **monovrstevné** modely a pozorovat tak laterální uspořádání lipidů nebo **multivrstevné** a zaměřit se na lamelární uspořádání. Tyto dvě techniky je vhodné **kombinovat**, protože každá z nich dokáže odhalit jiné změny v lipidovém modelu. Lipidové modely jsou ze všech modelů uvedených v této práci nejjednodušší (nejvzdálenější od opravdové struktury kůže). Avšak dokážou simulovat důležitou část kožní bariéry – **lipidovou matrix**. Díky tomu lze sledovat **izolovaně** vlivy různých faktorů nebo látek pouze na tuto důležitou část kožní bariéry. Bylo tedy ideální použít tyto modely při **(1)** testování vlivu kyselého pH na schopnost lipidů tvořit multivrstevné útvary důležité pro bariérovou funkci kůže (prvoautorská publikace **Nováčková et al 2021**,¹⁷⁹ **Příloha 1**). Při využití biochemicky aktivních 3D buněčných kultur, kožních štěpů nebo dokonce geneticky upravených myši by bylo složité oddělit vliv pozměněného pH na enzymatické pochody probíhající v kůži (syntéza Cer z prekurzorů) od vlivu na uspořádání lipidů. Dále byly lipidové modely využity k pozorování interakcí lipidů **(2)** s enzymem β -glukosidáza (nepublikovaná data) nebo **(3)** s potencionálními permeačními enhancery (PAMAM dendrimery, nepublikovaná data), kde lze pozorovat vliv látek na uspořádání lipidů do monovrstvy.

V této kapitole je tedy uvedena nejprve metodika pro přípravu lipidových vzorků (včetně izolace lipidů SC) a následuje příprava monovrstev a multivrstev a jejich hodnocení (izotermie, AFM, BAM; FTIR). Další část prezentuje získané výsledky rozdělené do tří projektů uvedených v textu výše.

3.1.1 Příprava vzorků

Vzorky ze **syntetických** lipidů byly připraveny rozpuštěním jednotlivých lipidů v koncentraci 1 mg/ml ve směsi rozpouštědel chloroform/methanol 3:1 (v/v) a smísením do požadovaných směsí. **Izolované** lipidy byly získány z kůže pacientů podstupujících plastické operace podle již validovaných metod. Stručně, podkožní tuk byl odstraněn skalpelem a epidermis byla oddělena od dermis tepelně (při 60 °C). Epidermis byla inkubována (24 h, 32 °C) s trypsinem pro získání SC.¹⁸⁰ Lipidy byly ze SC extrahovány postupně směsí rozpouštědel chloroform/methanol 2:1, 1:1, 1:2 (v/v) po dobu dvou hodin, zfiltrány, rozpouštědlo bylo odpařeno a lipidy vysušeny pod vakuem.¹⁸¹ Nakonec byly lipidy přečištěny pomocí sloupcové chromatografie podle dříve publikované metody,¹²⁷ s využitím následujících mobilních fází: chloroform/kyselina octová 99:1 (v/v), chloroform, chloroform/methanol 100:1, 50:1, 10:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 (v/v), methanol. Na vakuové odparce bylo odstraněno rozpouštědlo a lipidy byly dosušeny pod vakuem. Složení získaných lipidů bylo ověřeno pomocí HPTLC analýzy podle již validovaného postupu.^{99,160}

Složení jednotlivých vzorků bylo pro monovrstvy (a) ekvimolární směs lipidů (**GlcCer/VMK/Chol**), kde byl GlcCer postupně nahrazován (25, 50, 75, 90, 95,100 %) CerNS; (b) ekvimolární směs **CerNS/LA/Chol** a 5% wt **CholS** (c) **lipidy izolované z lidského SC**. Pro

multivrstvy byla využita (d) ekvimolární směsi lipidů (**CerNS/VMK/Chol**), kde VMK nebo VMK a CerNS byly deuterovány. Pro přehlednost je rozdělení vzorků pro jednotlivé experimenty uvedeno v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Složení jednotlivých vzorků a přehled experimentů.

	Složení směsi (molární podíl)	Provedené experimenty
monovrstvy	(a) GlcCer/VMK/Chol (1:1:1)	(1) Vliv pH na uspořádání lipidů
	GlcCer/CerNS/VMK/Chol (0,75:0,25:1:1)	(2) Interakce s enzymem β -glukosidáza
	GlcCer/CerNS/VMK/Chol (0,5:0,5:1:1)	
	GlcCer/CerNS/VMK/Chol (0,25:0,75:1:1)	
	GlcCer/CerNS/VMK/Chol (0,1:0,9:1:1)	
	GlcCer/CerNS/VMK/Chol (0,05:0,95:1:1)	
	CerNS/VMK/Chol (1:1:1)	
(b) CerNS/LA/Chol + CholS (1:1:1 + 5 % wt)	(3) Interakce s dendrimery	
multivrstvy	(c) Lipidy izolované z lidského SC	(1) Vliv pH na uspořádání lipidů
		(3) Interakce s dendrimery
multivrstvy	(d) CerNS/VMK/Chol (1:1:1)	(1) Vliv pH na uspořádání lipidů (hodnocení pomocí IR)
	CerNS/dVMK/Chol (1:1:1)	
	dCerNS/dVMK/Chol (1:1:1)	

3.1.2 Metody

3.1.2.1 Langmuirovy monovrstvy a jejich hodnocení

Langmuirovy monovrstvy byly využity v publikaci **Nováčková et al 2021¹⁷⁹ (Příloha 1)**, kde byly připraveny monovrstvy ze syntetických směsí a s pomocí Dr. Růžičkové monovrstvy z lipidů izolovaných z lidského SC. Dále byly využity při nepublikovaných experimentech s enzymem β -glukosidázou a pilotní studii s PAMAM dendrimery. Je zde tedy rozepsána metodika týkající se těchto experimentů.

Langmuirovy monovrstvy na **rozhraní kapalina-vzduch** byly připraveny na základě již validovaných metod,¹⁸² při použití vaničky KN 2001 (aplikace 10 μ l vzorku) nebo KN 1003 (30 μ l vzorku). Měření probíhalo při teplotě 32 °C a pH 5,5 (10mM isotonický octanový pufr) nebo 7,4 (10mM isotonický fosfátový pufr). Na povrch subfáze byl nanesen vzorek a po 15minutovém odpaření rozpouštědla byly přibližovány bariéry (10-20 mm/min) a zaznamenány SP/MMA izotermy. Po dokončení měření byla vanička vyčištěna a postup zopakován. Při využití BAM byla zvolena vanička KN 1003, jinak se podmínky nelišily. **Langmuir-Blodgett** technika pro přenos monovrstev na pevný podklad byla provedena na KN 2001 se slídovým sklíčkem zanořeným do

subfáze. Po stlačení bariér na 20 mN/m byla monovrstva ekvilibrována na 15 min, sklíčko bylo vertikálně vytaženo (2 mm/min) a uchováváno pod dusíkem do měření na AFM. Na AFM byl využit kontaktní mód a probíhalo na VŠCHT v Praze (prof. Slepíčka).

Pokusy s **enzymem** (β -glukosidáza) probíhaly na rozhraní kapalina-vzduch. Enzym byl nejprve testován ve vialkách na svou aktivitu (jednalo se o β -glukosidázu z mandlí). Do subfáze o pH 5,5 byl přidán TDCH, který slouží jako aktivátor enzymu *in vitro*.¹⁸³ Roztok obsahoval enzym o koncentraci 5 μ g/ml s přídavkem TDCH v koncentraci 0,1 mg na 1 mg enzymu. Na povrch vialky bylo nanášeno 15 μ l GlcCer a po určitém časovém intervalu (0-24 h), kdy byly vzorky inkubovány při 37 °C, byl experiment ukončen přidáním chloroformu. Lipidy byly vytřepány do směsi organických rozpouštědel chloroform/methanol 2:1 (v/v) a extrakt byl odpařen. Vysušený extrakt byl naředěn na 90 μ l v chloroform/methanol 2:1 (v/v) a najednou nastříknut na **HPTLC** desku pro kvantitativní hodnocení lipidů. Jako standardy pro tvorbu kalibrační křivky byla použita směs CerNS (100 μ g/ml), GlcCer (100 μ g/ml), TDCH (200 μ g/ml), Chol (200 μ g/ml) a LA (200 μ g/ml). Roztok standardů byl Linomatem pod proudem dusíku nanášen na desku zároveň se vzorky. Desky byly vyvinuty v automatické komoře ADC2 do výšky 85 mm pomocí mobilní fáze rozdílné pro eluci GlcCer (chloroform/methanol 5:1, v/v) a CerNS (chloroform/methanol/kyselina octová 95:4,5:0,75, v/v/v). Lipidy byly derivatizovány a kvantifikovány podle již validované metody.⁹⁹ Stručně popsáno, tato metoda spočívá v ponoření desky do detekční směsi (7,5% síran měďnatý, 8% kyselina fosforečná a 10% methanol ve vodě) na 10 s a následnému zahřátí na 160 °C po dobu 20-30 min. Dále je deska densitometricky převedena skenerem do softwaru a vyhodnocena. Pro pokusy na Langmuirově vaničce byl enzym vpraven injekční stříkačkou pod monovrstvu stlačenou na 12 \pm 3 mN/m a byly hodnoceny (a) změna SP (Δ SP) a (b) chování domén pomocí BAM. Kvůli aktivaci enzymu experiment probíhal při 37 °C po dobu 8 h (speciálně upravená vanička proti vypařování subfáze).

Interakce lipidů s **dendrimery** byly sledovány na rozhraní kapalina-vzduch za přítomnosti dendrimerů v subfázi. Komerčně dostupný roztok rozdílných generací PAMAM dendrimerů (G2-G4) byl pipetován v koncentraci 2,5; 5; 10 nebo 20 μ M do předem připraveného isotonického octanového pufru o pH 5,5. Na takto připravenou subfázi bylo nanášeno 10 μ L lipidového vzorku a při teplotě 32 °C probíhalo pozorování monovrstev pomocí izoterm podle výše popsaného postupu.

3.1.2.2 Multivrstevné modely a jejich hodnocení

Multivrstevné modely byly využity v publikaci **Nováčková et al 2021**¹⁷⁹ (**Příloha 1**). Syntetické směsi, které byly částečně deuterované, byly podrobeny IR analýze (popsáno dále v textu). Dále byly spoluautory Dr. Sagrafena, Dr. Pullmannovou, Dr. Paraskevopoulosem, Dr. Mazumder a Dr. Dwivedí provedeny experimenty s lipidy izolovanými z lidského SC a samotným izolovaným SC (permeační studie a XRD hodnocení). Je zde tedy uvedena podrobná metodika k přípravě modelů ze syntetických lipidů a jejich hodnocení pomocí IR. Detailní popis metodiky k izolovaným lipidům a samotnému izolovanému SC je uveden v publikaci.

Lipidy byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel hexan/ethanol 2:1 (v/v) na koncentraci 1 mg/200 μ l). Pomocí Linomatu byl roztok o objemu 100 μ l **sprejován** pod proudem dusíku (tlak

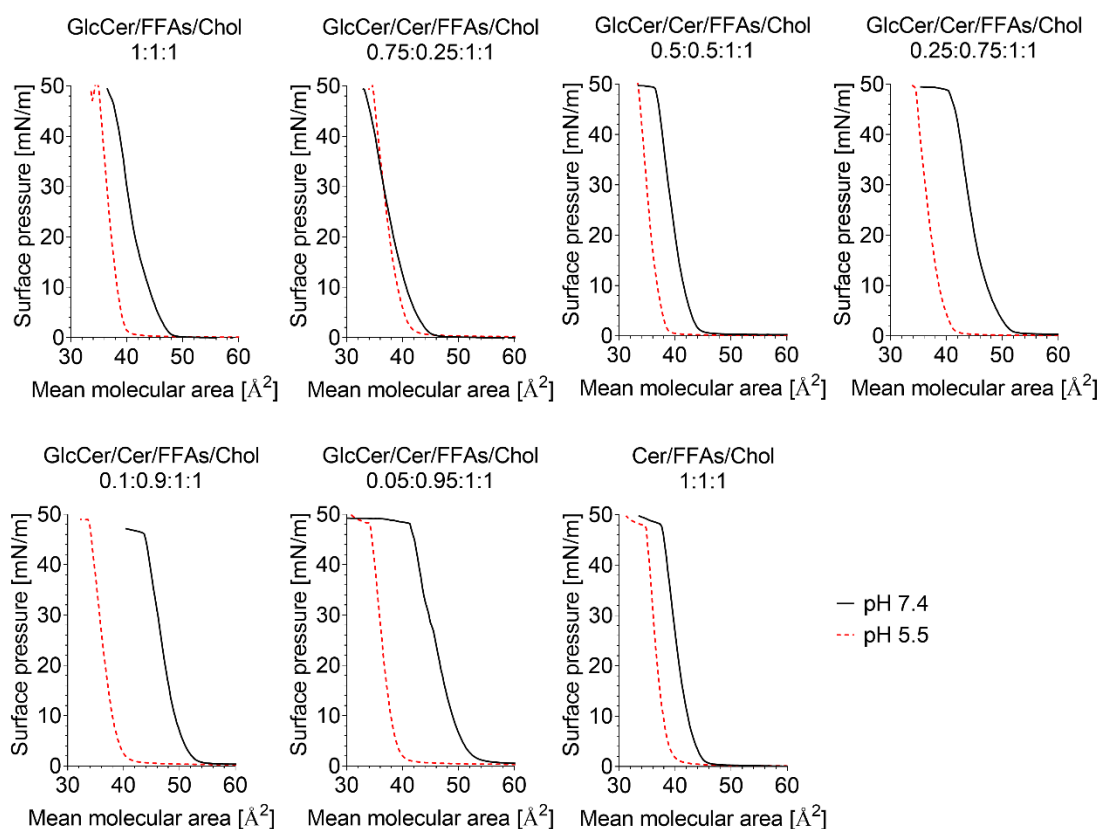
5 bar) na podkladová sklíčka vždy dvakrát, a to při rychlosti 10,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, na plochu 10 mm^2 . Mezi jednotlivým sprejováním bylo vždy sklíčko otočeno po směru hodinových ručiček, aby došlo k rovnoměrnému nástřiku. Nasprejované vzorky byly přes noc hydratovány při teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$ při dvou rozdílných pH (5,5 nebo 7,4) ponořením do pufrů, které byly připraveny stejným způsobem jako pro monovrstvy. Sklíčka byla ekvilibrována do druhého dne při laboratorní teplotě a podrobeny IR analýze. **IR** analýza probíhala pomocí metody Fourierovy transformace (FTIR) za laboratorní teploty. Vzorek byl seškrábnut ze sklíčka, nanesen na ATR krystal a bylo provedeno 256 skenů při rozlišení 2 cm^{-1} .

3.1.3 Výsledky a diskuze

(1) Vliv pH na uspořádání lipidů a tvorbu multivrstev při formování kožní bariéry

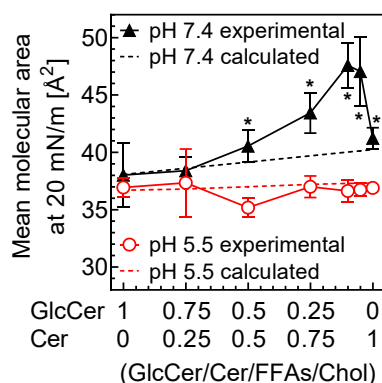
Výsledky jsou shrnuty v publikaci Nováčková *et al* 2021¹⁷⁹ (Příloha 1). Tomuto výzkumu jsem se věnovala během celého studia a jedná se o hlavní výstup této práce. Publikace vznikla ve spolupráci s kolegy ze *Skin Barrier Research Group* a z VŠCHT v Praze, podíl na publikaci je uveden v příloze. V podkapitole (2) jsou pak popsány experimenty s enzymem, které s touto prací také souvisí, ale dosud nebyly publikovány.

Cílem práce bylo *in vitro* simulovat vznik kožní bariéry a odhalit faktory, které tento proces ovlivňují. Nejprve byl sledován vliv **prekurzoru GlcCer** na uspořádání lipidů do monovrstvy. GlcCer byl obsažen v ekvimolární směsi lipidů, kde ho postupně nahrazoval CerNS, na který se při vzniku kožní bariéry enzymaticky přeměňuje. Zároveň bylo měření provedeno za **neutrálního a kyselého pH**, což simuluje změny v jednotlivých částech SC. Na **Obrázku 14** jsou reprezentativní izotermie jednotlivých směsí při pH 7,4 (černá) a pH 5,5 (červená). Z izoterm vyplývá, že pH ovlivňuje uspořádání lipidů do monovrstev – při kyselém pH zaujímají molekuly lipidů menší plochu, což je pravděpodobně způsobeno VMK, které nejsou ionizované.¹⁸⁴



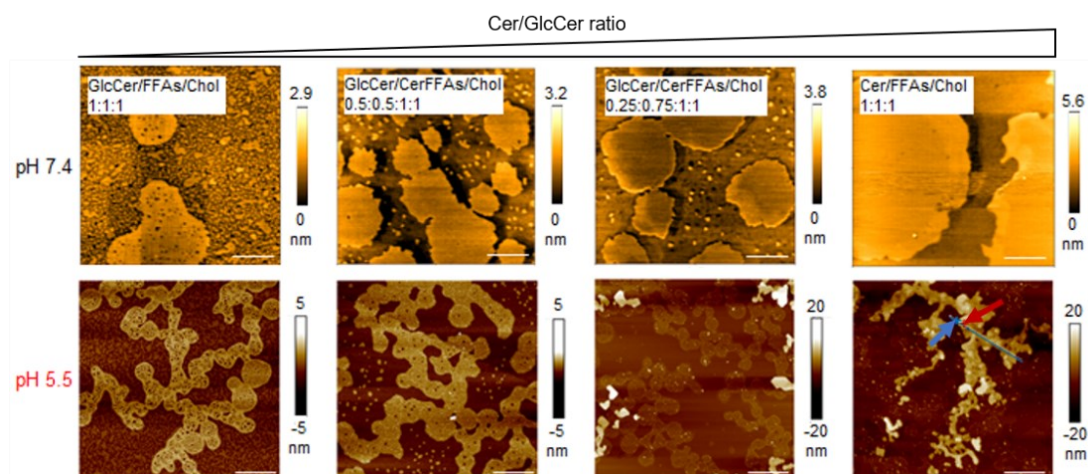
Obrázek 14 Izotermie lipidických směsí s postupnou náhradou GlcCer za Cer. Grafy jsou seřazeny podle postupně ubývajícího GlcCer, který je nahrazován CerNS. Černě jsou značeny izotermie nahrávané při pH 7,4; červeně při pH 5,5. (Reprezentativní izotermie, $n \geq 4$.)

Když koncentrace Cer ve vzorcích převýšila koncentraci prekurzoru GlcCer, lipidy při neutrálním pH zaujímaly daleko **vyšší plochu jedné molekuly** (MMA) v porovnání s teoretickou MMA (vypočítaná z MMA individuálních lipidů; **Obrázek 15**). Naopak při kyselém pH MMA směsi odpovídala teoretické MMA. Tato data naznačují, že vlastnosti lipidů SC se mění během keratinizace v závislosti na pH.



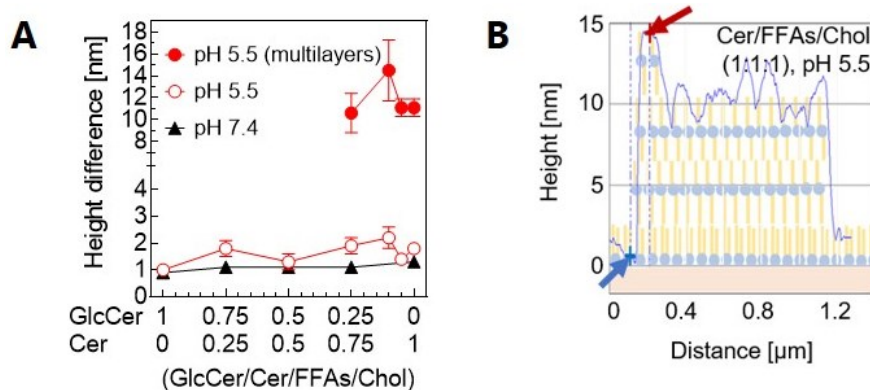
Obrázek 15 Teoretická vs. experimentální plocha jedné molekuly (MMA) při povrchovém tlaku 20 mN/m. Na ose x je vyznačena měnící se koncentrace GlcCer/Cer. Černě jsou značeny hodnoty při pH 7,4; červeně při 5,5. Symbols označují experimentální plochu, zatímco přerušovaná čára značí teoretickou plochu, která byla vypočítána z MMA jednotlivých lipidů. (Průměrné hodnoty \pm SD, $n \geq 4$, * značí signifikantní rozdíl mezi pH 5,5 a 7,4, $p < 0,05$, nepárový Mann-Whitney test.)

Pro lepší pochopení na izotermách pozorovaného chování byly monovrstvy přeneseny na slídová sklička. Pomocí AFM bylo prokázáno, že při neutrálním pH lipidové filmy tvoří dvě hlavní domény (rozdíl $\sim 1,1$ nm), bez ohledu na obsah GlcCer (**Obrázek 16**; grafické znázornění výšky domén je na **Obrázku 17A**). Avšak při kyselém pH se takto chovaly jen směsi s vysokým obsahem GlcCer.



Obrázek 16 AFM mikrofotografie směsí přenesených na pevný podklad. V horní řadě jsou směsi při pH 7,4; v dolní řadě při 5,5. Složení směsi je popsáno v bílém obdélníku, vzorky jsou řazeny dle přibývajících množství Cer ve směsích (znázorněno klínem v horní části obrázku). Na mikrofotografu vzorku bez prekurzoru při kyselém pH je šipkami vyznačena oblast, která byla podrobena sekční analýze znázorněné na **Obrázku 17B**. (Reprezentativní mikrofotografie, $n=3$.)

Když obsah Cer převýšil obsah GlcCer, byly pozorovány světlé ostrůvky převyšující primární vrstvu o 10-14 nm. Tento **výškový rozdíl** odpovídá čtyřem na sebe navrstveným monovrstvám (**Obrázek 17B**), což koreluje s výsledky z XRD naší výzkumné skupiny provedenými na multivrstevných modelech směsí se složením Cer/VMK/Chol.¹⁸⁵

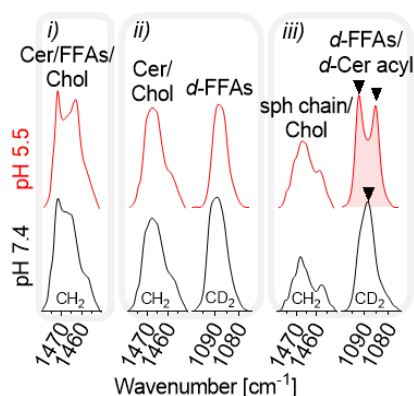


Obrázek 17 Výškové rozdíly jednotlivých fází zobrazených pomocí AFM. Na panelu A je přehled jednotlivých směsí (označeno na ose x). Černě jsou značeny rozdíly výšek fází při neutrálním pH, červené prázdné kolečko značí výškový rozdíl při kyselém pH a červené plné kolečko označuje výškový rozdíl při kyselém pH v případě, že byla pozorována tvorba multivrstev. (Průměrné hodnoty \pm SD, n=10.) Na panelu B je pak výškový profil vybrané směsi (směs bez prekurzoru při kyselém pH) a naznačení vzniku multivrstev. Šipky označují místo na snímku (viz Obrázek 16), které bylo podrobena sekční analýze.

Uspořádávání lipidů do multivrstev při kyselém pH může být opět vysvětleno **ionizací** VMK, které při pH 7,4 monovrstvu stabilizují. Tomu odpovídá i v literatuře nalezené chování liposomů z lipidů SC, které vykazovaly vyšší stabilitu pouze při vyšších hodnotách pH.¹⁸⁶ Bylo navrženo, že mechanismem pro tento jev by mohla být hydrofobní **nekompatibilita** rigidních Cer acylových **řetězců** a pohyblivých řetězců sfingosinových řetězců Cer, která způsobuje energetické znevýhodnění uzavřené (*hairpin*) konformace Cer.⁹¹ Kvůli této nekompatibilitě pak nejspíš dochází k remodelaci membrány do multivrstev, kde Cer je v otevřené konformaci se sdruženými rigidními a mobilními řetězci.⁹²

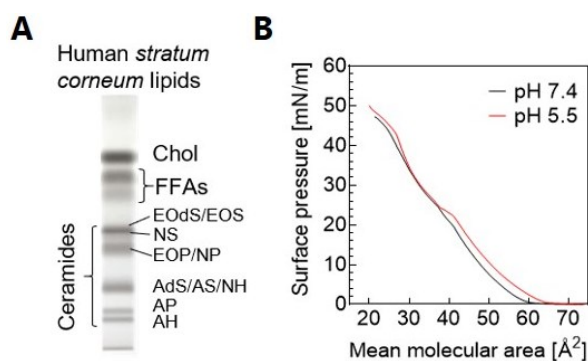
Pro potvrzení této hypotézy, byla směs Cer/VMK/Chol po nastříknutí Linomatem, hydratována pufrům o pH 5,5 či 7,4 a podrobena FTIR měření. Při kyselém pH byla většina lipidů v dobře uspořádané orthorombické konformaci, což se projevilo jako dublet v nůžkové vibraci (dublet je způsoben díky těsnému uspořádání řetězců, které umožňuje *coupling* vibrací mezi nimi, **Obrázek 18i**). Naopak **deuterace** VMK způsobila CH₂ a CD₂ singlet v oblasti nůžkové vibrace (**Obrázek 18ii**). To navrhuje dobrou mísitelnost VMK a Cer, protože *coupling* vibrací, který způsobuje vznik dubletu, se nevyskytuje mezi C-H a C-D vazbami.¹⁵³ Při deuteraci VMK a zároveň Cer (deuterace na acylu) byl dublet posunut do CD₂ oblasti (**Obrázek 18iii**), což značí sdružování acylu Cer a VMK bez narušení Chol nebo sfingosinovým řetězcem Cer (nedeuterované řetězce by oslabily tuto reflexi). Z toho lze usoudit, že **Cer upřednostňují otevřenou konformaci**, kde je jejich acylový řetězec sdružený s neionizovanou VMK, zatímco sfingosinový řetězec se sdružuje s Chol, což je v souladu s již publikovanými daty.^{91, 153} Na druhou stranu, při neutrálním pH byly ve všech deuterovaných vzorcích viditelné singlety

v oblasti nůžkových vibrací, které naznačují mísení deuterovaných a nedeuterovaných lipidů. Okyselení tedy způsobuje sdružování VMK a acylových řetězců Cer, které by mohlo být klíčovým momentem ve vzniku lipidových multivrstev.



Obrázek 18 FTIR spektra směsí v multivrstevném modelu po deuteraci jednotlivých složek. Černě jsou vyznačeny výřezy z reprezentativních spekter při neutrálním pH, červeně při kyselém pH. Vzorky se lišily deuterací jednotlivých složek: i) nedeuterovaná směs Cer/VMK/Chol, ii) deuterace VMK, iii) deuterace VMK a acylu Cer.

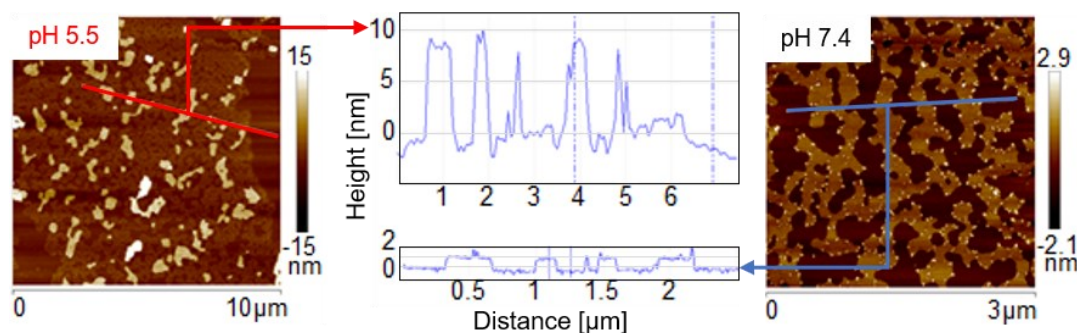
Měření monovrstev bylo opakováno i s lipidy **izolovanými** z lidského SC, tedy směsí bližší fyziologickému složení SC. Izolované lipidy byly chromatograficky přečištěny a jejich složení bylo ověřeno pomocí HPTLC (Obrázek 19A). Poté byly nanášeny na subfázi o pH 5,5 nebo 7,4. Izotermy izolovaných lipidů byly v porovnání se syntetickými lipidy méně strmé a na izotermě byl viditelný fázový přechod kolem 22-23 mN/m, který byl více znatelný při kyselém pH (Obrázek 19B). V porovnání se syntetickými lipidy měly monovrstvy z izolovaných lipidů daleko nižší modul kompresibility (<100 mN/m vs. Cer/VMK/Chol pH 7,4 = 385 mN/m oproti pH 5,5 = 513 mN/m), to může být způsobeno komplexností směsi, především přítomnosti acylCer.^{187, 188}



Obrázek 19 Složení izolovaných lipidů a příslušné izotermy. Složení směsi je znázorněno na výřezu HPTLC desky (panel A). Izotermy (panel B) byly nahrávány při neutrálním pH (černě) a kyselém pH (červeně). (Reprezentativní izotermy, n=8.)

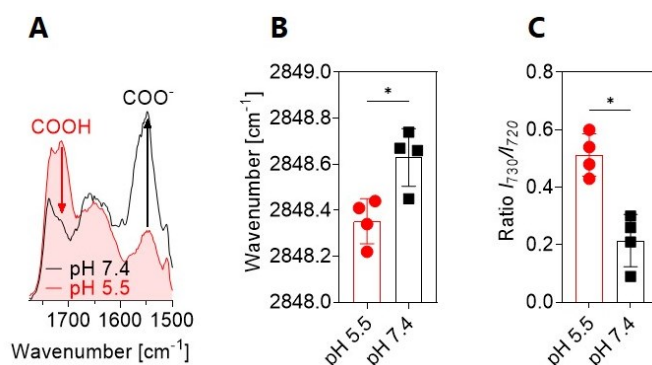
Při přenesení těchto monovrstev na pevný podklad a podrobení AFM, bylo při neutrálním pH pozorováno formování dvou hlavních domén (výškový rozdíl 1,8 nm), kde vyšší fáze byla spojitá a zabírala přibližně 45 % měřené plochy. Při kyselém pH byla tato vyšší doména nespojitá a místy se objevovaly světlé ostrůvky s výškou přibližně 11 nm. Tato hodnota je velice **blízká**

opakované vzdálenosti lipidových lamel v lidském SC ($d=12-13$ nm^{189, 190} nebo 11 nm^{92, 191}). Zajímavé je porovnání s výsledky uvedenými v diplomové práci Dr. Šrámové¹⁹², které jsem byla konzultantkou, kde byly studovány pomocí monovrstev směsi složené z lidských izolovaných Cer, ale ostatní složky byly přidány syntetické (VMK, Chol, Chols). V této práci nebyl pozorován ani na izotermách fázový přechod, ani tvorba multivrstev při přenosu na pevný podklad. To naznačuje **důležitost celého lipidového spektra** (nejspíš především VMK) pro tento proces. Zároveň důležitou roli hraje i teplota, která zde byla udržována na 32 °C (fyziologická teplota kůže), avšak v podobné studii, kde byla teplota nastavena na 21 °C nebyl při přenosu pozorován vznik multivrstev.¹⁹³



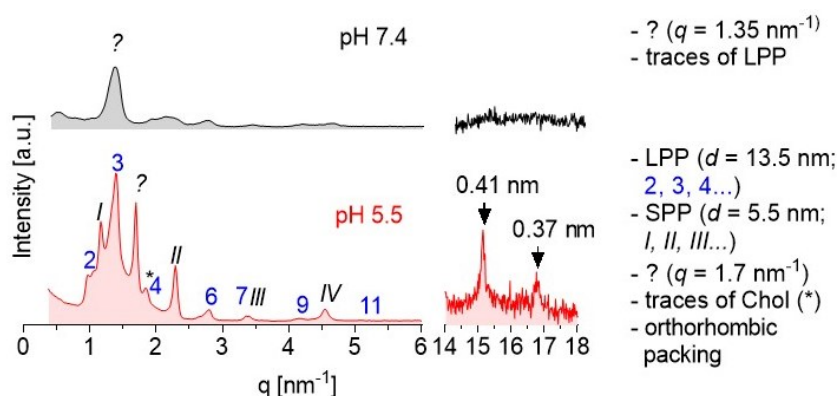
Obrázek 20 AFM mikrografy izolovaných lipidů a jejich výškový profil. V levé části je mikrograf vzorku přeneseného při kyselém pH, kde červená úsečka značí oblast sekční analýzy, která je uvedena uprostřed. V pravé části je mikrograf vzorku přeneseného při neutrálním pH s modře vyznačenou oblastí sekční analýzy uvedené uprostřed. (Reprezentativní mikrografy, $n=3$.)

Pro lepší pochopení remodelace monovrstev na multivrstevné útvary byly lipidy izolované z lidského SC nasprejovány na sklíčka a hydratovány za stejných podmínek jako deuterované lipidy. FTIR prokázalo (částečnou) ionizaci VMK při neutrálním pH (**Obrázek 21A**) a vyšší hodnoty vlnočtu methylenové symetrické vibrace v porovnání s kyselým pH, což značí **nižší míru uspořádanosti lipidových řetězců při neutrálním pH** (**Obrázek 21B**). Poměr intenzit při 730 cm^{-1} / 720 cm^{-1} graficky znázorněný na **Obrázku 21C** ukazuje na snížený podíl lipidů v orthorombickém uspořádání při neutrálním pH.¹⁹⁴



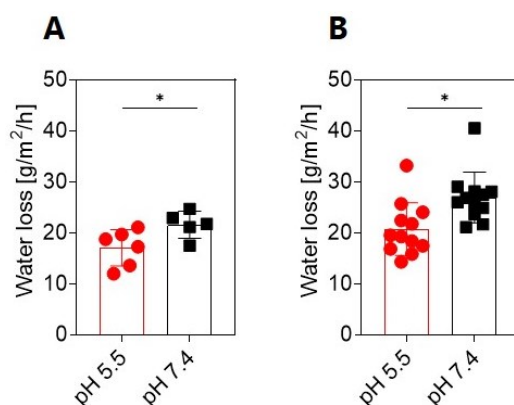
Obrázek 21 FTIR měření multivrstevných modelů lipidů izolovaných z lidského SC. Červená barva označuje modely hydratované při kyselém pH, černá při neutrálním pH. Na panelu A je výřez spektra s vibracemi charakteristickými pro VMK, kde je vidět jejich ionizace. Panel B graficky znázorňuje hodnoty vlnočtu methylenové symetrické vibrace a panel C poměr intenzit (Průměrné hodnoty \pm SD, $n=4$, * značí signifikantní rozdíl, $p<0,05$, nepárový Mann-Whitney test.)

Při kyselém pH byla pomocí XRD odhalena přítomnost LPP ($d = 13.53 - 13.72$ nm) a SPP ($d = 5.56 - 5.60$ nm). Rovněž byly pozorovány opakované mezirovinné vzdálenosti 0,41 nm a 0,37 nm, což jsou reflexe charakteristické pro orthorombické uspořádání a byly v lidském SC nalezeny již dříve.^{190, 195} Při hydrataci za **neutrálního pH lipidy nevykazovaly uspořádání charakteristické pro SC**, byly pozorovány pouze stopy LPP (**Obrázek 22**).



Obrázek 22 XRD difraktogram multivrstevných modelů lipidů izolovaných z lidského SC. Lipidy byly hydratovány při neutrálním (černá barva) a kyselém (červená) pH. Arabské číslice označují LPP, římské SPP, * značí stopy Chol. (Reprezentativní difraktogramy, $n=4$).

Důsledkem nesprávného uspořádání lipidů při neutrálním pH byla **zvýšená propustnost membrán pro vodu** (zvýšený TEWL; **Obrázek 23A**). Vliv pH na propustnost modelů byl také ověřen na trypsinem izolovaném SC, které bylo hydratováno za stejných podmínek jako lipidy. Opět došlo k větší propustnosti SC hydratovaného při neutrálním pH (**Obrázek 23B**).



Obrázek 23 Ztráta vody přes membránu. Panel A graficky vyjadřuje rozdílné hodnoty TEWL modelových multivrstevných membrán lipidů izolovaných ze SC, panel B lidského trypsinem izolovaného SC při rozdílném pH pufry, ve kterém byly hydratovány. Červená barva značí kyselý, černá neutrální pH. (Průměrné hodnoty \pm SD, $n \geq 5$, * značí signifikantní rozdíl, $p < 0,05$, nepárový Mann-Whitney test.)

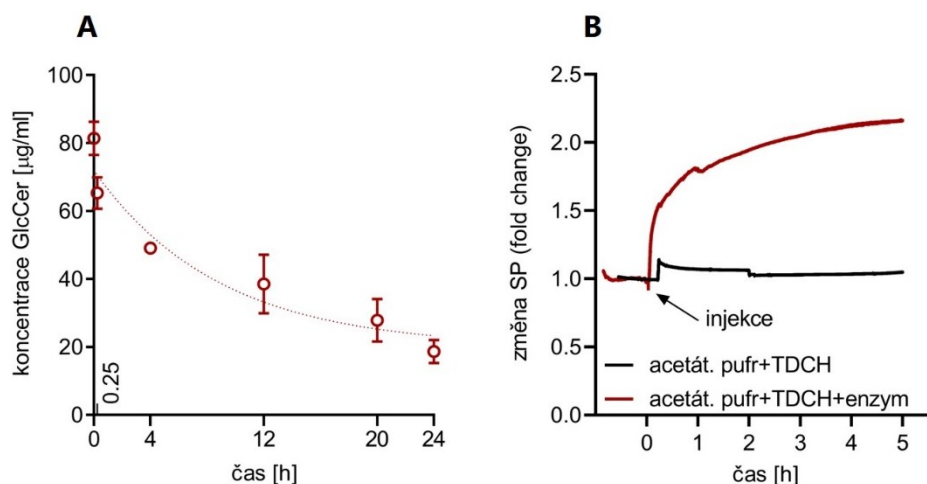
Narušení oxyselení SC bylo popsáno u novorozenců, starších lidí či pacientů s atopickou dermatitidou.^{10, 74, 196} Ve všech případech byla pozorována porucha uspořádání lipidů ve SC a zvýšený TEWL, což vedlo ke zvýšené náchylnosti k narušené kožní bariéře. Tyto poruchy byly dosud přisuzovány nedostatku Cer nebo kumulaci GlcCer v důsledku nesprávné či chybějící

enzymatické přeměny na Cer. Jak již bylo řečeno v úvodu, k aktivaci tohoto enzymu je potřebné kyselé pH. V této studii však bylo dokázáno, že **kyselé pH** má další funkce a **přímo ovlivňuje** mimo jiné i jedinečné **uspořádání lipidů do multivrstevných útvarů ve SC**.

(2) Interakce enzymu β -glukosidáza s kožními lipidy

Enzym β -GlcCer-áza hraje důležitou roli v přeměně GlcCer na Cer. Proto byl testován jeho vliv na GlcCer monovrstvu. Tato studie navazovala na experimenty publikované v Nováčková *et al* 2021¹⁷⁹ (Příloha 1), kde byla tato přeměna simulována úbytkem GlcCer a nahrazením Cer ve směsích.

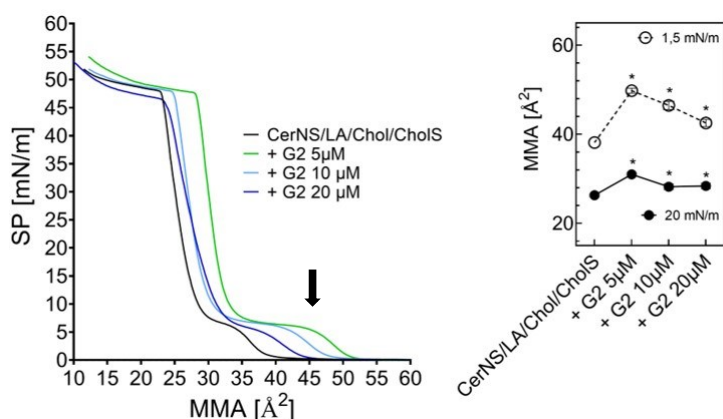
Dalším krokem bylo tedy testování enzymu na rozklad GlcCer přímo na monovrstevných modelech. Nejprve byla provedena pilotní studie ve vialkách, která potvrdila, že **koncentrace GlcCer v čase klesá**. Pomocí HPTLC byla kvantifikována koncentrace GlcCer, hodnoty byly následující: $c_{0\text{ h}} = 81,41 \pm 2,45 \mu\text{g/ml}$, $c_{0,25\text{ h}} = 65,28 \pm 1,75 \mu\text{g/ml}$, $c_{4\text{ h}} = 49,07 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$, $c_{12\text{ h}} = 38,54 \pm 6,08 \mu\text{g/ml}$, $c_{20\text{ h}} = 27,84 \pm 4,42 \mu\text{g/ml}$, $c_{24\text{ h}} = 18,68 \pm 2,39 \mu\text{g/ml}$, graficky vyjádřeno na **Obrázku 24A**. Bohužel se nepotvrdil rozklad na Cer, ten se ani po změně mobilní fáze na méně polární nepovedlo ve vzorcích pomocí HPTLC detekovat, respektive odlišit od nečistot. Bylo tedy potvrzeno, že GlcCer je enzymem rozkládán, avšak nepodařilo se pomocí zvolené metody detekovat jeho rozkladný produkt. Vstříknutí enzymu pod stlačenou monovrstvu lipidů se nejprve projevilo jako mírné zvýšení SP, které bylo pozorováno i u kontrolního roztoku bez obsahu enzymu (**Obrázek 24B**). Poté však SP u pokusu s enzymem v subfázi dále rostlo, což u kontroly pozorováno nebylo. Zvýšení SP může být způsobeno buď adhezí enzymu k monovrstvě nebo strukturálními změnami spojenými s přeorganizováním lipidů v monovrstvě.^{140, 197} Monovrstva byla v obou případech pozorována pomocí BAM, avšak nebyly potvrzeny žádné opakovatelné rozdíly v doménách.



Obrázek 24 Koncentrace GlcCer stanovená pomocí HPTLC (panel A) a změna povrchového tlaku (SP) po vpravení enzymu pod stlačenou monovrstvu (panel B). Na panelu A je graficky znázorněně ubývající množství GlcCer v čase. Šipka na panelu B značí čas, ve kterém byl vpraven buď čistý roztok pufru s TDCH (černá barva) nebo roztok enzymu ve stejném rozpouštědle (červená).

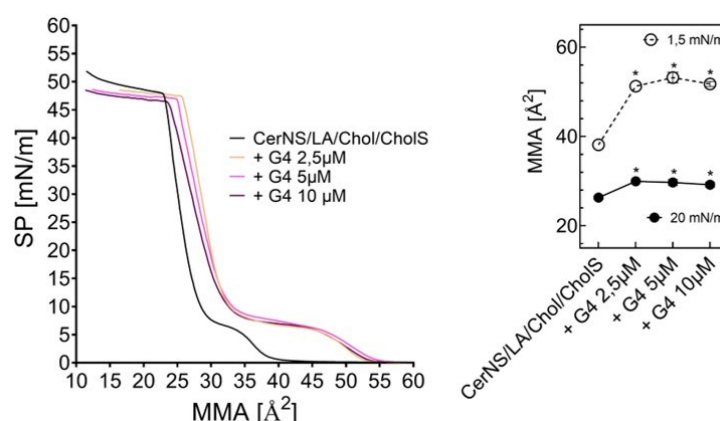
(3) Interakce PAMAM dendrimerů s kožními lipidy

Komerčně dostupné PAMAM dendrimery byly v minulosti využity pro zvýšení prostupnosti léčiv (indometacin, 5-fluorouracil, ketoprofen) do kůže nebo přes kůži, avšak doposud není znám jejich mechanismus účinku.¹⁵ Studium interakcí dendrimerů s lipidy kožní bariéry pomocí monovrstevných modelů by tento mechanismus mohlo pomoci přiblížit. Byly testovány druhá (G2), třetí (G3) a čtvrtá (G4) generace PAMAM dendrimerů na lipidické směsi (CerNS/LA/Chol/CholS) a lipidech izolovaných ze SC. Izotermy prokázaly, že při tvorbě monovrstev na subfázi s přidávkem G2 dochází k posunu k vyšším hodnotám teoretické plochy jedné molekuly (MMA; Obrázek 25) – izotermy nastupují v porovnání s kontrolou dříve a zdá se, že lipidy setrvávají delší dobu v LE fázi (označeno šipkou). Zajímavá je závislost na koncentraci, kdy po přidání nejnižší testované koncentrace (5 μM) je posun nejvíce znatelný. V pravém horním rohu Obrázku 25 jsou hodnoty MMA při SP 1,5 a 20 mN/m odečtené z izoterm. Na subfázi s přidávkem dendrimerů je plocha, kterou lipidy zaujímají, signifikantně vyšší. Může to být způsobeno buď vmezeřením dendrimerů mezi lipidy nebo interakcemi s lipidy. Je známo, že při nižším SP (1,5 mN/m) je uspořádání lipidů ovlivněno především interakcemi mezi polárními hlavami a vodnou subfází.¹³⁰ To by potvrdzovalo předešlou hypotézu, že zvýšené MMA je způsobeno interakcí lipidů, respektive jejich polárních částí, s dendrimery v subfázi. Rovněž by to objasňovalo, proč se zřejmě nejedná o pouhé vmezeření dendrimerů do monovrstvy. V tomto případě (při zvyšování koncentrace, a tedy množství dendrimerů v subfázi) by totiž rostla MMA v závislosti na zvyšující se koncentraci dendrimerů. Při vyšších tlacích (kdy se jedná především o interakci mezi hydrofobními řetězci lipidů) mezi jednotlivými koncentracemi dendrimerů v subfázi není tak velký rozdíl, avšak v porovnání s kontrolní směsí jsou hodnoty MMA signifikantně zvýšené. Podobné zvýšení MMA bylo nalezeno v literatuře ve studii peptidových dendrimerů, které byly přidány do subfáze pod fosfolipidovou monovrstvu.¹⁹⁸ V této práci bylo chování vysvětleno inkorporací dendrimerů do monovrstvy. Během komprese pak došlo k opětovnému snížení MMA, které bylo vysvětleno vytlačením dendrimerů z monovrstvy. Avšak to zde pozorováno nebylo.



Obrázek 25 Izotermy lipidické směsi po přidání G2 dendrimerů do subfáze. Černá izoterma značí kontrolní směs, barevně jsou pak odlišeny izotermy směsí po přidání druhé generace (G2) dendrimerů do subfáze v různé koncentraci. V pravém horním rohu jsou extrahované hodnoty MMA. (Reprezentativní izotermy, průměrné hodnoty $\pm\text{SD}$, $n=3$, * značí signifikantní rozdíl mezi kontrolní monovrstvou a monovrstvami s dendrimery v subfázi, $p<0,05$, ANOVA-Dunnettův test.)

Při testování vlivu **G4** dendrimerů v subfázi byl opět pozorován posun izoterm k **vyšším hodnotám MMA** a **prodloužení LE fáze** oproti kontrolnímu vzorku (**Obrázek 26**). Na rozdíl od G2 však nebyl zjištěn rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi. Hodnoty MMA při 1,5 a 20 mN/m byly signifikantně vyšší v porovnání s kontrolou, výrazný rozdíl byl pozorován opět při MMA 1,5 mN/m, což opět ukazuje na **interakce dendrimerů s polárními hlavami lipidů**. V literatuře byly nalezeny interakce PAMAM dendrimerů s fosfolipidovými membránami, kde byla prokázána interakce aminoskupin dendrimerů s polárními hlavami lipidů.¹⁹⁹ Tyto interakce však mohou být ovlivněny iontovými interakcemi fosfolipidů s dendrimery, které u lipidů SC při pH 5,5 nebudou tolik výrazné.

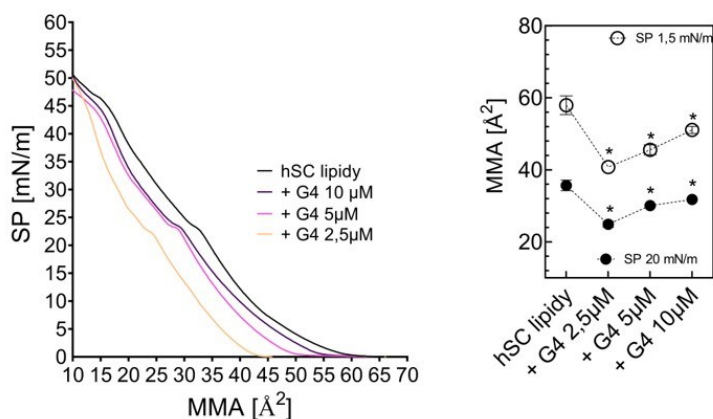


Obrázek 26 Izotermy lipidické směsi po přidání **G4** dendrimerů do subfáze. Černá izoterma značí kontrolní směs, barevně jsou pak odlišeny izotermy směsí po přidání čtvrté generace (**G4**) dendrimerů do subfáze v různé koncentraci. V pravém horním rohu jsou extrahované hodnoty MMA. (Reprezentativní izotermy, průměrné hodnoty \pm SD, $n=3$, * značí signifikantní rozdíl mezi kontrolní monovrstvou a monovrstvami s dendrimery v subfázi, $p < 0,05$, ANOVA-Dunnnettův test.)

Protože byly využity PAMAM dendrimery s funkčními primárními aminoskupinami, byl také sledován jejich vliv. S rostoucí generací dendrimerů roste i počet aminoskupin ($G_2=16$, $G_3=32$, $G_4=64$ atd.), takže pro porovnání byly zvoleny odpovídající koncentrace rozdílných generací: G_4 2,5 μ M - G_2 10 μ M a G_4 5 μ M - G_2 20 μ M. Pokud by se jednalo o vliv aminoskupin, měly by tyto dvojice vykazovat podobné chování. To se však nepotvrdilo, izotermy těchto dvojic byly rozdílné. Výsledky jsou prezentovány jako z izoterm získané hodnoty MMA při 1,5 mN/m, jako reprezentativní byla vybrána dvojice G_4 5 μ M - G_2 20 μ M a společně s ostatními parametry generací jsou shrnuty na konci kapitoly v **Tabulce 2**.

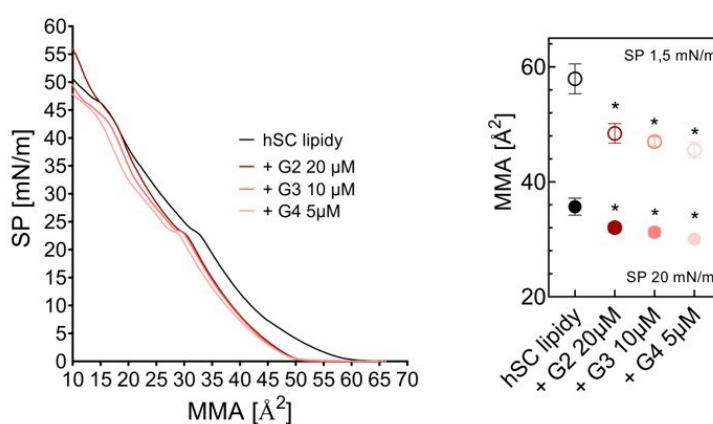
Pro složení bližší fyziologickému SC byl vliv dendrimerů testován i na lipidech izolovaných z lidského SC. Screening koncentrací generací bude předmětem budoucího výzkumu. Zatím se podařilo porovnat pouze různé koncentrace **G4** a jednotlivé generace v odpovídajících koncentracích pro zjištění vlivu primárních aminoskupin. Izoterma izolovaných lipidů byla oproti syntetickým podle očekávání méně strmá. Po přidání **G4** v koncentraci 2,5 μ M došlo k velkému posunu MMA, avšak na rozdíl od syntetických směsí byl tento **posun k nižším hodnotám MMA** (**Obrázek 27**). Při zvyšování koncentrace hodnota MMA rostla, avšak byla signifikantně nižší než MMA kontrolního vzorku. Tento trend byl pozorován při SP 1,5 mN/m i dále při vyšších SP. Posun k nižším MMA by mohl být příčinou interakcí dendrimerů s lipidy

(z důvodů zmíněných u syntetických směsí nepravděpodobně) nebo **solubilizace** lipidů z monovrstvy do vodné subfáze (zvýšení rozpustnost lipidů ve vodě).²⁰⁰



Obrázek 27 Izotermny izolovaných lipidů ze SC po přidání G4 dendrimerů do subfáze. Černá izoterma značí kontrolní vzorek, barevně jsou pak odlišeny izotermny po přidání čtvrté generace (G4) dendrimerů do subfáze v různé koncentraci. Vpravo jsou extrahované hodnoty MMA. (Reprezentativní izotermny, průměrné hodnoty \pm SD, n=4, * značí signifikantní rozdíl mezi kontrolní monovrstvou a monovrstvami s dendrimery v subfázi, $p < 0,05$, ANOVA-Dunnnettův test.)

Dále byl studován vliv primárních aminoskupin na uspořádání lipidů po přidání G2, G3 a G4 PAMAM dendrimerů. V závislosti nárůstu aminoskupin s generací byla snižována koncentrace dendrimerů tak, aby odpovídalo množství aminoskupin v roztoku: G2 (20 μ M), G3 (10 μ M) a G4 (5 μ M). V porovnání s kontrolními lipidy byl u všech generací pozorován posun doleva (k nižším hodnotám MMA) a nebyl znatelný rozdíl mezi izotermami jednotlivých generací (**Obrázek 28**). Hodnoty MMA byly oproti kontrole signifikantně nižší a mezi jednotlivými generacemi nebyl signifikantní rozdíl. To by mohlo značit **vliv primárních aminoskupin na uspořádání lipidů do monovrstvy**. Parametry jednotlivých generací jsou shrnuty v **Tabulce 2**.



Obrázek 28 Izotermny lipidů izolovaných z lidského SC po přidání G2, G3 a G4 dendrimerů do subfáze. Černá izoterma značí lipidy izolované z lidského SC (hSC lipidy), barevně jsou pak odlišeny izotermny po přidání G2, G3 a G4 do subfáze ve 20, 10 a 5 μ M koncentraci. Vpravo jsou extrahované hodnoty MMA. (Reprezentativní izotermny, průměrné hodnoty \pm SD, n=4, * značí signifikantní rozdíl mezi kontrolní monovrstvou a monovrstvami s dendrimery v subfázi, $p < 0,05$, ANOVA-Dunnnettův test.)

Tabulka 2 Parametry generací G2, G3 a G4

	G2	G3	G4
Mw [g/mol]	3 256,0	6 909,0	14 215,0
Velikost [nm]	2,9	3,6	4,5
Počet primárních aminoskupin	16,0	32,0	64,0
MMA při 1,5 mN/m [\AA^2]*	42,5 \pm 0,8	-	53,2 \pm 1,20
MMA při 1,5 mN/m [\AA^2]**	48,4 \pm 1,7	47,0 \pm 0,8	45,6 \pm 1,4

Hodnoty MMA byly odečteny z izoterm a pro zjištění vlivu funkční skupin byly vybrány odpovídající koncentrace G2 (5 μ M), G3 (10 μ M) a G4 (20 μ M). Hvězdičkou (*) je označena MMA při 1,5 mN/m pro směs Cer/LA/Chol/CholS, dvě hvězdičky (**) značí lidské izolované lipidy. (Průměrné hodnoty \pm SD, $n > 3$.)

Může být tedy shrnuto, že dendrimery v subfázi nejspíš interagují s polárními hlavami lipidů, což se projevuje jako změna v MMA. Další hypotézou je, že u izolovaných lipidů by pokles MMA mohl být způsobený solubilizací lipidů z monovrstvy v subfázi. Vliv funkčních aminoskupin na povrchu dendrimerů by mohl stát za srovnatelnou MMA při tlaku 1,5 mN/m u monovrstev z izolovaných lipidů na subfázi s rozdílnými generacemi dendrimerů v odpovídající koncentraci. Je však potřeba využít k hodnocení i další metody. Pro lepší pochopení interakcí dendrimerů s lipidy budou provedeny experimenty s přidáním roztoku dendrimerů k již stlačené monovrstvě. Díky tomu bude možné pozorovat nárůst/pokles MMA v reálném čase, případně pozorovat změny pomocí BAM. AFM mikroskopie monovrstev by mohla odhalit rozdíl v tvorbě domén mezi monovrstvami na čisté subfázi a monovrstvami na subfázi s dendrimery. Všechny tyto studie by mohly pomoci objasnit vliv dendrimerů na laterální uspořádání lipidů. Pro lepší pochopení chování v komplexnějším multivrstevném modelu, budou využity vícevrstevné modely, kdy budou dendrimery přidány přímo do směsi sprejovaných lipidů. Takto připravené vzorky pak budou podrobeny IR a XRD.

Závěrem je potřeba dodat, že v kombinaci s lipidy kožní bariéry se jedná o poměrně málo prozkoumanou metodu. Již dříve byla využita k hodnocení enhancerů na bázi ury a taurinu,²⁰¹ neionických surfaktantů,²⁰² nebo lipidických nanočástic¹³⁹ na modelech simulujících SC. Avšak při prohledání literatury nebyla nalezena zmínka o interakcích monovrstev lipidů SC s dendrimery. Je tedy známo, že se tato metoda využívá (v kombinaci s dalšími metodami) pro možnost odhalení mechanismu účinku enhancerů a do budoucna bude zajímavé se jí věnovat.

3.2 *In vitro* modely

V této kapitole je popsána příprava 3D buněčných modelů neboli **rekonstruované lidské epidermis** (RHE) a **kůže** (RHS). Tyto modely obsahují na rozdíl od lipidických i buněčnou složku, tedy **keratinocyty**, případně **fibroblasty**. Jsou to tedy komplexnější modely a lze je využít pro hodnocení vlivu látek na epidermis/kůži bez nutnosti řešení etických problémů spojených s klinickým hodnocením *in vivo*. Velkou výhodou je jejich modifikovatelnost a možnost navodit různá onemocnění. Toho bylo využito při přípravě **RHE (1)**, která vznikla ve spolupráci s assoc. prof. Jonca (Inserm, Toulouse, Francie) a byla zvolena jako model se sníženou expresí genu pro protein PNPLA1, který způsobuje onemocnění **ARCI**. Na takto upravené RHE pak byly testovány formulace obsahující **ω -O-acylCer**, protože syntéza tohoto lipidu je v epidermis pacientů s ARCI snižena a jeho dodání do epidermis by mohlo pomoci při regeneraci kožní bariéry.¹¹ Z etického hlediska je však velmi složité testovat formulace přímo na pacientech nebo získat od pacientů poškozené keratinocyty, ze kterých by se modely pěstovaly. Proto byla využita metoda genové transdukcce pomocí *short hairpin* RNA (shRNA). Byl tak způsoben *knockdown* (snížená exprese) genu pro protein PNPLA1.¹² Protože porucha u pacientů s ARCI je lokalizovaná v epidermis, nebylo potřeba využít model celé kůže a kvůli lepšímu porozumění vlivu formulací na epidermis byla využita RHE. Modely **RHS (2)** vznikly ve spolupráci s výzkumnou skupinou prof. Hedtrich (Freie Universität Berlin, Německo). Jedná se o komplexnější model, kde jsou kromě keratinocytů obsaženy i **fibroblasty** (dermální buňky). Byl zvolen kvůli zamýšlenému sledování interakcí (přenosu buněčných signálů, tzv. *crossstalk*) mezi keratinocyty (epidermis) a fibroblasty (dermis). RHS byla zvolena také díky snadné modifikovatelnosti, kdy byla vypěstována RHS s nebo bez fibroblastů.

Tato podkapitola tedy zahrnuje dva projekty. Nejprve je uvedena pilotní studie s RHE, při které jsem pomáhala v rámci výzkumné stáže vyvinout metodiku pro aplikaci formulací na RHE. Druhá část popisuje přípravu a hodnocení RHS, je zaměřena především na hodnocení lipidů izolovaných ze SC modelů, které jsem prováděla. Tato práce je shrnuta v publikaci **Jevtic et al 2020²⁰³ (Příloha 2)**.

3.2.1 Metody

3.2.1.1 Příprava RHE

Pro přípravu kontrolních RHE byly použity zmražené primární keratinocyty extrahované z lidské předkožky nebo předloktí. Byla využita metoda dle Frankart et al.¹⁵⁸ Stručně, buňky byly rozmrazeny a kultivovány 24 h v médiu Dermalife, poté v Epilife do dosažení 60-70% konfluence. Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány a nasazeny do inzertů v počtu 350 000 buněk na inzert. Buňky byly inkubovány při 37 °C, vlhkosti 100 % a 5 % CO₂. Po 48 h byly buňky přesunuty na rozhraní médium-vzduch a inkubovány za stejných podmínek, avšak snížené vlhkosti (50 %). Médium bylo měněno po 48 h po dobu 12 dnů. Pro přípravu RHE s *knockdown* pro protein PNPLA1 byly využity zmražené již geneticky upravené keratinocyty (transdukcce pomocí shRNA) podle již publikované procedury,¹⁵⁴ proces přípravy jinak zůstal stejný jako pro kontrolní RHE. Po 12 dnech byla změřena transepiteliární elektrická rezistence (TEER)²⁰⁴ a aplikováno 80 μ l čerstvě připravené formulace. Formulace byla připravena podle publikované procedury²⁰⁵ s mírnými modifikacemi. Nejprve byl připraven tenký film obsahující

fosfatidylcholin, lysofosfatidylcholin a kyselinu stearovou. Tento film byl dále hydratován připravenými disky (DPPC/DHPC + CholS/CholE/CerEOS), které se od složení uvedeného ve zmíněné publikaci lišily obsahem CerEOS místo CerNP. Po odstranění formulace byl povrch RHE očištěn a opět změřena TEER. Vybrané RHE byly dále hodnoceny na permeabilitu pro Luciferovou žluť. Po nanesení roztoku barviva na povrch RHE byly odebírány vzorky z média po 4, 6 a 24 h a hodnoceny spektrofotometricky. Po ukončení kultivace byla RHE vysekuta z inzertu a dále hodnocena. Pomocí světelné mikroskopie byly sledovány histologické řezy, které byly připraveny po fixaci RHE formaldehydem a parafínem.¹² V případě RHE po aplikaci Luciferové žluti byl vzorek připraven stejným způsobem a hodnocen pomocí fluorescenční mikroskopie.¹⁵⁴ Další vzorky byly využity pro analýzu proteinů. Nejprve byl k RHE přidán Laemmliho pufr a vzorky byly zahřáty dvakrát na 100 °C. Proteiny byly rozděleny pomocí elektroforézy na akrylamidových gelech a detekovány imunologicky podle již popsaných metod.¹⁵⁴ Poslední část vzorků byla připravena pro LC/MS-MS analýzu a pro hodnocení poslána do Německa (prof. Sandhoff, German Cancer Research Center, Německo). Epidermis byla oddělena od polykarbonátové membrány pomocí enzymu dispáza, vysušena a skladována při -20 °C. Na dalších vzorcích byl proveden *tape-stripping* (odloupnutí jednotlivých vrstev epidermis) pomocí disků (náplastí) D'Squame®, a to celkem 4× na každém modelu.^{12, 206} Zbylá epidermis byla mikroskopicky hodnocena pro ověření odběru vrstev.

3.2.1.2 Analýza SC získaného z RHS

RHS byly připraveny kolegy v Německu dle již validovaných metod, model bez fibroblastů byl připraven odstraněním fibroblastů z připravené dermis osmotickým šokem.^{207, 208} Dále pak byly modely podrobeny standardním biochemickým, histologickým a permeačním hodnocením. Pro analýzu lipidů bylo SC odděleno pomocí trypsinu a do dalších analýz uchováváno při -20 °C.¹⁸⁰ Po přepravení do naší laboratoře bylo SC hydratováno a podrobeno IR analýze. Hydratace probíhala přes noc za stálé teploty 32 °C pomocí výparů vody. IR bylo měřeno pomocí **FTIR** za laboratorní teploty. SC bylo nanášeno na ATR krystal a bylo provedeno 256 skenů při rozlišení 2 cm⁻¹. Poté bylo SC vysušeno pod vakuem a byly z něj extrahovány lipidy směsí rozpouštědel chloroform/methanol 2:1 (v/v), dvakrát po dobu 1,5 h. Extrakt byl zfiltrován, rozpouštědla byla odpařena pod dusíkem a vzorek dosušen pod vakuem a skladován do analýzy při -20 °C. Lipidy byly naředěny na koncentraci 1 mg/200 µl a pomocí Linomatu sprejovány v přesném objemu (20 µl) na **HPTLC** desky spolu se standardy podle již validované metody.⁹⁹ Stručně, desky byly vyvinuty v automatické vyvíjecí komoře do 85 mm, jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel (a) chloroform/methanol/kyselina octová 190:9:1,5 (v/v/v) pro oddělení Cer/Chol/VMK (dvakrát) (b) chloroform/methanol/kyselina octová/voda 66:25:6:3 (v/v/v/v) pro oddělení polárních lipidů (CholS, GlcCer, SM, fosfolipidy). Lipidy byly vizualizovány pomocí derivatizace (ponoření do derivatizačního roztoku se složením 7,5% síran měďnatý, 8% kyselina fosforečná a 10% methanol ve vodě) a zahřátí na 160 °C po dobu 20-30 min. Deska byla převedena denzitometrickým skenem do softwaru, kde byly kvantifikovány jednotlivé skupiny lipidů.

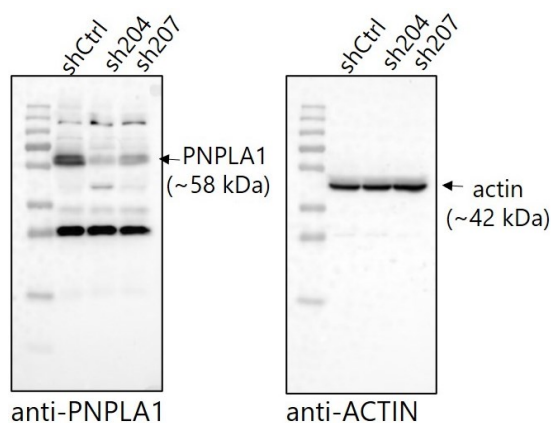
3.2.2 Výsledky a diskuze

(1) RHE jako nástroj pro studium kožních onemocnění a jejich léčby

Této práci jsem se věnovala během výzkumné stáže v laboratoři UDEAR (Inserm Toulouse, Francie) pod vedením assoc. prof. Jonca. Naučila jsem se připravovat modely RHE a vyvinula protokol pro aplikaci formulací na RHE.

Byly připraveny modely **zdravé RHE a RHE s defektem enzymu PNPLA1**, a tedy nedostatečnou syntézou ω -O-acylCer, které sloužily jako modely ichtyotické epidermis (ARCI). Léčba ARCI je dosud pouze symptomatická, ale v nedávné studii byla navržena možnost léčby pomocí ω -O-acylCer.¹³ Proto bylo cílem této studie testovat systémy s obsahem ω -O-acylCer, které by pomohly obnovit bariérovou funkci SC. Jednalo se o systémy připomínající lamelární tělíska (tzv. *lamellar bodies mimetic system*, LBms), které byly již dříve vyvinuty výzkumnou skupinou Dr. Lopéz (Biophysics of lipids and interfaces, Barcelona).²⁰⁵ Pro účely této práce byly tyto systémy ve spolupráci s výzkumnou skupinou Dr. Lopéz upraveny pro **doručení ω -O-acylCer (konkrétně CerEOS) do SC**.

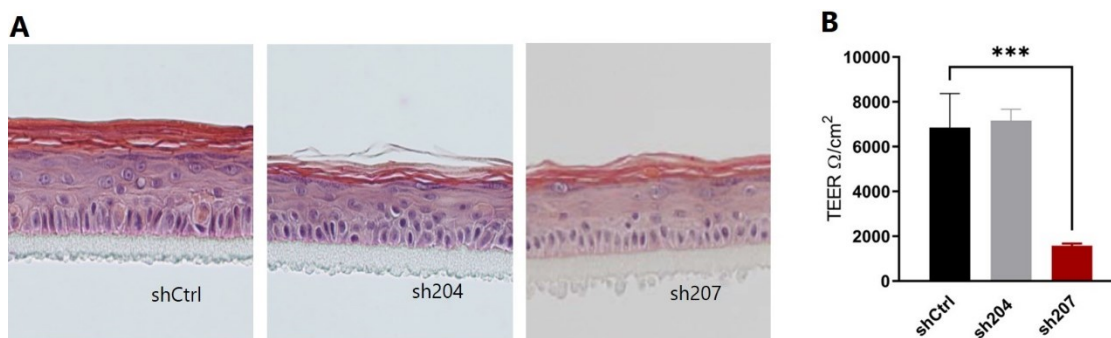
Samotná kultivace modelů probíhala z primárních keratinocytů, které byly v případě simulace částečného defektu PNPL1 (*knockdown*) geneticky upraveny transdukcí pomocí shRNA. Protože byly nově ke kultivaci RHE využity zmražené již transdukované buňky, bylo nejdříve ověřeno, jestli je *knockdown* dostatečný, a to na primárních keratinocytech (shCtrl) a primárních keratinocytech po transdukcii dvěma typy shRNA (sh204 a sh207). Buňky byly kultivovány po dobu 7 dní a po rozdělení proteinů pomocí elektroforézy bylo kvantifikováno množství PNPLA1, pro kontrolu obsahu proteinů na vzorek sloužil aktin (**Obrázek 29**). Bylo potvrzeno, že množství PNPLA1 je v porovnání se shCtrl sníženo na 18,1 % u buněk sh204 a na 31,9 % u sh207.



Obrázek 29 Western-blokt analýza proteinů. Vlevo je analýza proteinu PNPLA1, vpravo kontrolní protein aktin. Kontrolní vzorek je označen jako shCtrl a transdukované keratinocyty jako sh204 a sh207.

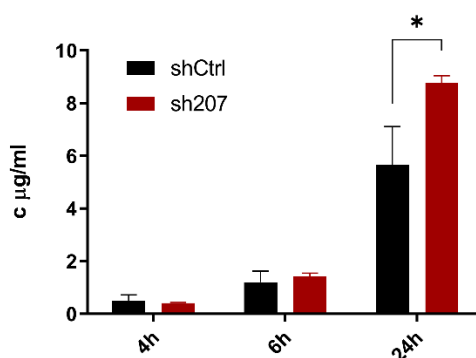
Dále pak byly připraveny shCtrl-RHE, sh204-RHE a sh207-RHE a byla hodnocena jejich morfologie a TEER. Na histologických řezech byla pozorována morfologie jednotlivých modelů a byl porovnán vliv transdukcí keratinocytů na výslednou RHE. U kontrolní RHE byly pozorovány všechny vrstvy epidermis s kompaktním SC (**Obrázek 30A**). V porovnání

s kontrolou byly obě sh-RHE tenčí, všechny vrstvy včetně SC byly méně vyvinuté. Zároveň u sh204-RHE nebylo SC celistvé a odlupovalo se. Dále byl zjišťován odpor RHE pro ionty pomocí TEER, a tím byla ověřena kompaktnost tkáně a správně vyvinuté mezibuněčné spoje takto kultivovaných modelů.^{204, 209} Hodnota TEER u kontrolních RHE dosáhla průměrných hodnot přibližně $7000 \Omega/\text{cm}^2$ (**Obrázek 30B**), což potvrzuje hodnoty uvedené v literatuře pro model RHE kultivovaný 12 dní.¹⁵⁸ Překvapením byly srovnatelné hodnoty pro sh204-RHE, které nebyly konzistentní s histologicky zjištěným ztenčením RHE. Viditelné snížení bylo pozorováno u sh207-RHE, kde hodnoty klesly až pod $\sim 2000 \Omega/\text{cm}^2$.



Obrázek 30 Porovnání morfologie histologických řezů jednotlivých RHE a TEER. Kontrolní RHE je označena jako shCtrl a RHE připravené z transdukovaných keratinocytů jako sh204 a sh207. Na panelu A jsou histologické řezy, panel B ukazuje graf TEER. (* značí signifikantní rozdíl mezi kontrolní RHE a sh-RHE, $p < 0,0001$, ANOVA-Dunnettův test. TEER byl měřen na každém RHE dvakrát, $n_{\text{CtrlRHE}}=8$, $n_{\text{sh204}}=4$, $n_{\text{sh207}}=4$.)

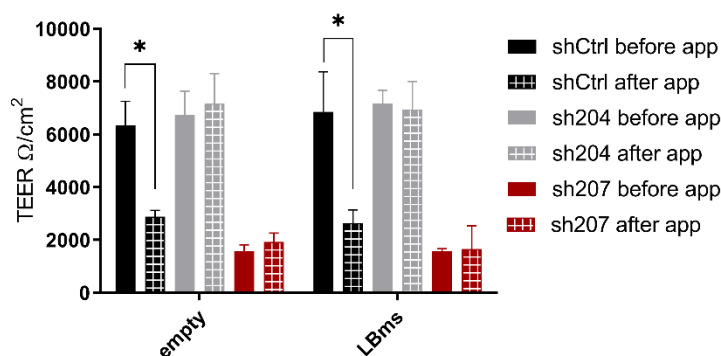
Část vzorků pak byla testována na permeabilitu pro Luciferovou žlutí. Byl vybrán model sh207-RHE, kvůli nižším hodnotám TEER, a tedy předpokládané vyšší permeabilitě. Po vyhodnocení průniku Luciferové žlutí do média po 4, 6 a 24 h (**Obrázek 31**) bylo zjištěno, že koncentrace barviva v médiu se s postupem času zvyšuje. Po 24 h byla pozorována signifikantně zvýšená koncentrace barviva v médiu sh207-RHE v porovnání s kontrolou.



Obrázek 31 Koncentrace Luciferové žlutí v médiu. Černě jsou značeny kontrolní RHE, červeně sh207-RHE. (* značí signifikantní rozdíl mezi jednotlivými vzorky v daných časových intervalech, $p < 0,05$, nepárový t-test.)

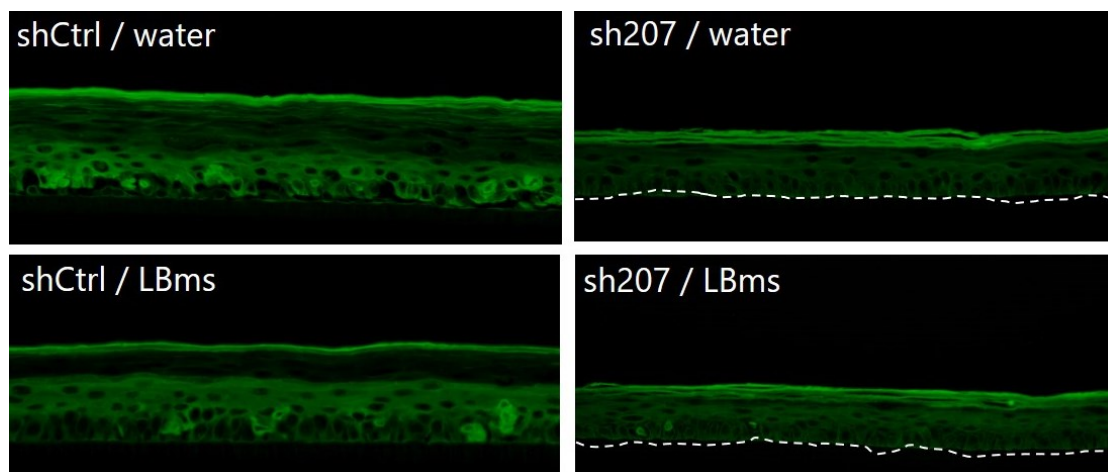
Nakonec byl vyvinut protokol pro aplikaci LBms na RHE. Aplikace proběhla dvanáctý den kultivace, po vyměnění média a změření TEER. Bylo aplikováno takové množství formulace, aby byl povrch RHE pokrytý (80 μl). Jako kontrolní vzorek sloužila sterilní voda a prázdné LBms

(bez obsahu disků, tzn. bez Cer) ve stejném množství (80 μ l). Po nanesení byly RHE opět umístěny do inkubátoru. Po 20 h byl zbytek formulací odstraněn mikropipetou a povrch RHE byl opatrně oplachován vodou, dokud nebyly odstraněny zbytky formulace. Poslední oplach byl proveden fosfátovým pufrům (pH 7,4). Inserty se pak nechaly oschnout v inkubátoru přibližně 1 h a následně byl opět změřen TEER. Na **Obrázku 32** je graf, který porovnává hodnoty před aplikací a po aplikaci, pro přehlednost bylo vybráno porovnání LBms s prázdnými LBms (*empty*). U kontrolního RHE došlo po aplikaci LBms i prázdných formulací ke signifikantnímu snížení TEER. To by mohlo značit poškození RHE odstraňováním formulace, avšak nic podobného nebylo pozorováno u sh-RHE. U sh-RHE byl znát trend k mírnému zvýšení TEER po aplikaci, avšak nebyl pozorován rozdíl mezi aplikací LBms a prázdných formulací. Experimenty budou opakovány, avšak zdá se, že TEER zřejmě není vhodnou metodou k pozorování změn po aplikaci. Je to však výhodná metoda pro vyloučení RHE, které nejsou vhodné pro další experimenty. Díky tomu byly RHE s příliš nízkou/odlišnou hodnotou TEER vyloučeny z dalšího hodnocení.



Obrázek 32 TEER před a po aplikaci LBms a kontrolní formulace (*empty*). Barevně jsou rozlišeny jednotlivé RHE: kontrolní RHE je označena černě (shCtrl), šedě je vyznačena sh204 a červeně sh207. Je zobrazen TEER před aplikací (plná barva, *before app*) a po aplikaci („čtverečkovaně“, *after app*). (* značí signifikantní rozdíl mezi TEER před a po aplikaci, $p < 0,05$, nepárový t-test. TEER byl měřen na každém RHE dvakrát, $n=4$.)

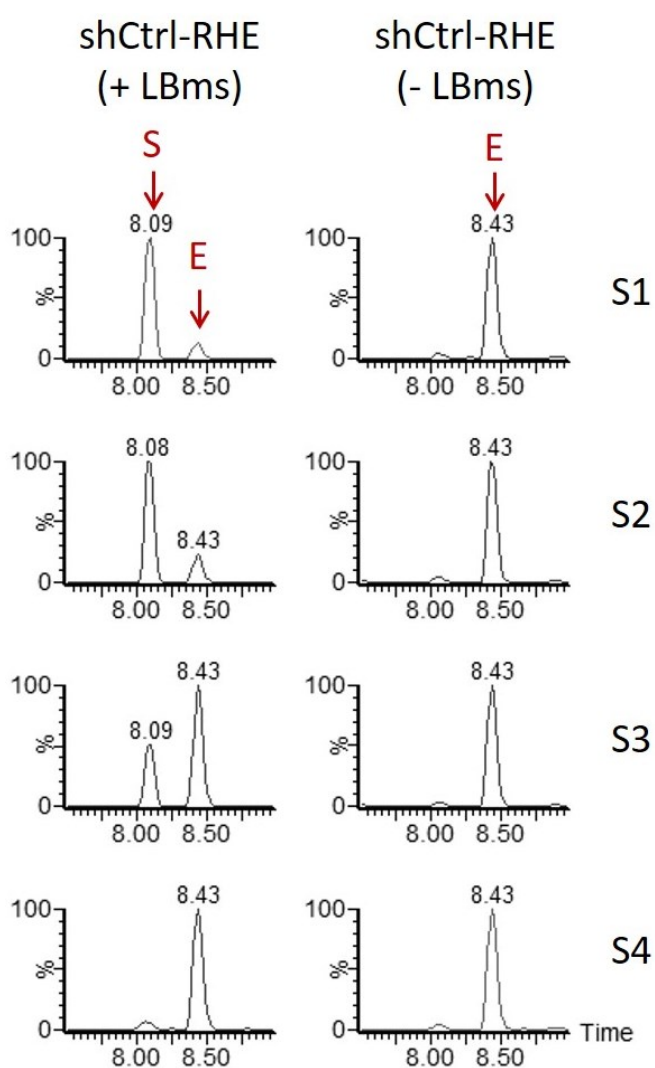
Část vybraných vzorků pak byla opět podrobena testování permeability, zbylé RHE byly vyseknuty z inzertů a byly připraveny na histologii, analýzu proteinů a analýzu lipidů. V průniku Luciferové žluti v čase nebyl pozorován rozdíl mezi jednotlivými formulacemi. Po 24 h pak byl vzorek připraven k hodnocení průniku barviva do jednotlivých vrstev epidermis pomocí fluorescenční mikroskopie (**Obrázek 33**).



Obrázek 33 Hodnocení permeability pomocí fluorescenční mikroskopie. V levé části jsou kontrolní vzorky, vpravo pak sh207-RHE. V horní řadě jsou snímky po aplikaci vody, dole pak po aplikaci LBms.

Bylo zjištěno, že u kontrolní RHE proniklo barvivo do vrchní vrstvy SC, avšak u sh-RHE bylo v celém SC. Fluorescence byla pozorována u kontrolního vzorku i ve spodních vrstvách epidermis, což bylo později vyhodnoceno jako vliv exspirované přísady v médiu (v budoucích experimentech byly pozorovány i další problémy s kompletním odloučením epidermis od insertu). Co se týče jednotlivých formulací, nebyl pozorován rozdíl mezi aplikací vody/prázdných formulací/LBms. Došlo tedy k potvrzení výsledků získaných během měření koncentrace barviva v médiu v čase. Histologie potvrdila, že aplikace formulací a jejich omývání nepoškodilo RHE, morfologie zůstala zachována u shCtrl-RHE i sh-RHE.

Pomocí LC/MS-MS byl nejprve proveden screening profilu ceramidů izolovaných z kontrolních RHE. Byly nalezeny základní podskupiny Cer s různým typem sfingoidní báze v kombinaci s různou délkou acylového řetězce (nehydroxylovaný, α -, ω -hydroxy acylový řetězec), které se nacházejí v lidské epidermis. Dále pak byl analyzován CerEOS přítomný v aplikovaných formulacích. Je důležité zmínit, že do LBms byl enkapsulován CerEOS s nefyziologickou délkou řetězce (C29), aby bylo možné ho odlišit od endogenního CerEOS (C30). Bylo porovnáno zastoupení syntetického C29-CerEOS (**Obrázek 34**, označení S; retenční čas ~8,1 min) i endogenního CerEOS (**Obrázek 34**, označení E; retenční čas ~8,4 min). Na obrázku je analýza kontrolní RHE, vlevo po aplikaci LBms, vpravo po aplikaci prázdných formulací. Jsou zde vyznačeny jednotlivé vrstvy, které byly odebrány pomocí metody *tape-stripping* (S1 nejvyšší, S4 nejnižší vrstva). Hodnoty jsou uvedeny jako % relativní intenzity (osa Y).



Obrázek 34 LC/MS-MS analýza lipidů – porovnání množství syntetického a endogenního CerEOS. Jedná se o lipidy izolované z jednotlivých vrstev SC, vrstvy odebrány metodou *tape-stripping*, které jsou označeny jako S1 (nejvyšší) až S4 (nejnižší vrstva). Vlevo je analýza RHE po aplikaci LBms, vpravo po aplikaci prázdných formulací. S označuje syntetický CerEOS, E endogenní. Na ose Y je relativní intenzita v % a na ose X retenční čas v minutách.

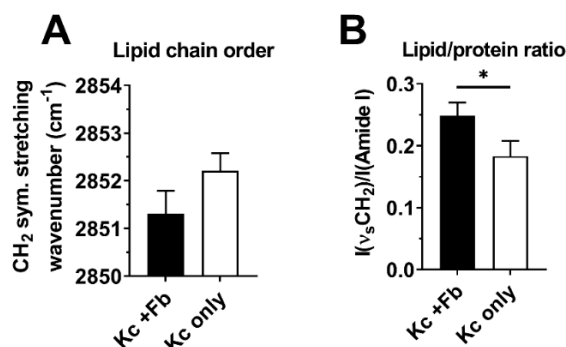
Syntetický C29-CerEOS byl nejvíce zastoupen ve vrchních vrstvách SC, ale penetroval i do nižších vrstev. Endogenní CerEOS byl naopak nejvíce zastoupen v nižších vrstvách SC. Zároveň bylo zjištěno, že RHE sama o sobě produkuje malé množství C29-CerEOS (bylo pozorováno v RHE po aplikaci prázdných formulací). V budoucnu budou analyzovány i lipidy ze sh-RHE.

Závěrem je tedy možné shrnout, že byla potvrzena možnost využití takto připravených modelů pro simulaci onemocnění ARCI, avšak je otázkou, jestli je tento defekt dostatečný. V budoucnu by bylo vhodné zaměřit se na optimalizaci modelu, možností by bylo využití nezmražených shRNA keratinocytů, případně využít jinou techniku pro vyřazení genu *PNPLA1* (např. technologii Crispr-Cas9) a imortalizované linie keratinocytů. Důležitým výsledkem je hlavně zajištění proveditelnosti přípravy LBms ve francouzské laboratoři a vyvinutí protokolu pro aplikaci formulací na RHE.

(2) Vliv fibroblastů na homeostázu kožní bariéry

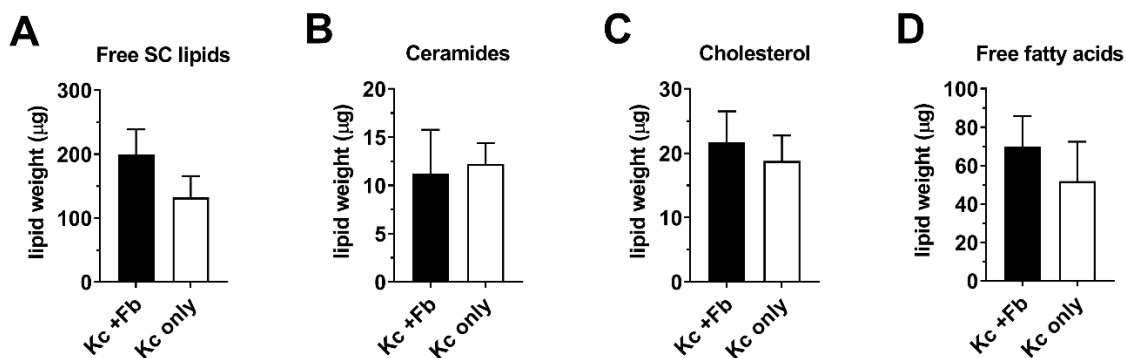
Tato studie probíhala ve spolupráci s laboratoří prof. Hedtrich (Freie Universität Berlin, Německo). V Německu byly připraveny a hodnoceny modely RHS, ze kterých bylo odstraněno SC a zasláno k analýze do naší laboratoře. Detaily k části provedené v Německu jsou uvedeny v publikaci **Jevtic *et al* 2020²⁰³ (Příloha 2)**. Podílela jsem se na přípravě vzorků na IR a jejich vyhodnocení, extrakci lipidů, HPTLC analýze lipidů, vyhodnocení, grafickému znázornění dat a přípravě manuskriptu.

Cílem bylo sledovat vliv mezibuněčných **interakcí mezi keratinocyty a fibroblasty** a důležitost přítomnosti fibroblastů v RHS. I když je známo, že k těmto interakcím dochází, není doposud znám dopad na diferenciaci lidské epidermis.²¹⁰ Z morfologického hlediska bylo zjištěno, že v RHS bez fibroblastů dochází k **nedokonalé diferenciaci**, keratinocyty byly tenčí a protáhlého tvaru a jednotlivé vrstvy epidermis nebyly plně rozlišitelné. Na histologických řezech bylo SC modelů s fibroblasty tvořeno především korneocyty (pozorováno jako odumřelé buňky vyplněné keratinem), avšak v případě modelů bez fibroblastů obsahovalo kromě nich i buňky, které nebyly plně keratinizované. Dále byla u modelů bez fibroblastů zjištěna **snížená exprese proteinů filaggrin** (protein charakteristický pro diferenciované keratinocyty) a **claudin** (protein tvořící buněčné spoje *tight junctions*). Zároveň byla pozorována zvýšená exprese proteinu **involukrin** (protein důležitý v tvorbě korneocytární lipidové obálky), což je zřejmě kompenzační reakce na snížení filaggrinu.^{160, 207} Co se týče bariérových vlastností, byla pozorována **zvýšená permeabilita** RHS bez fibroblastů pro hydrofilní i lipofilní látky (Luciferová žluť, testosteron, kofein). To by mohlo souviset s horším uspořádáním bariérových lipidů⁸⁷, případně s jejich nižším zastoupením v RHS bez fibroblastů. To bylo potvrzeno FTIR hodnocením SC, kde u ekvivalentů bez fibroblastů byla tendence k **horšímu uspořádání** lipidových řetězců (mírně vyšší hodnoty methylenové symetrické vibrace, **Obrázek 35A**). Zároveň byl zjištěn **snížený obsah lipidů (Obrázek 35B)** ve SC modelů bez fibroblastů. Obsah lipidů byl vztažen na proteiny a byl vypočítán jako poměr intenzit (výška peaku) methylenové symetrické vibrace (charakteristická pro lipidy) a amid I vibrace (charakteristická pro proteiny).¹⁴⁹



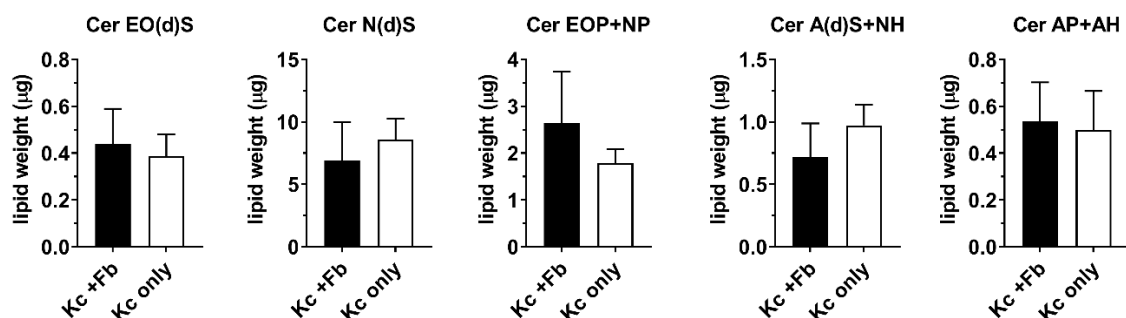
Obrázek 35 FTIR analýza SC izolovaného z RHS. Černě jsou zobrazeny ekvivalenty kůže s fibroblasty (Kc + Fb), bílá značí modely bez fibroblastů (Kc only). Na grafu A jsou hodnoty vlnočtu methylenové symetrické vibrace, tedy uspořádání lipidových řetězců. Na grafu B je poměr intenzit methylenové symetrické vibrace a amid I vibrace, která charakterizuje poměr lipidů a proteinů ve SC. (Průměrné hodnoty ±SEM, n=5, * značí signifikantní rozdíl, p<0,05, párový t-test.)

Dále byl pomocí HPTLC stanoven obsah lipidů extrahovaných ze SC. Množství bylo kvantifikováno jako absolutní hmotnost lipidů ve SC ekvivalentů. Celkové množství volných lipidů (tzn. všechny lipidy detekované pomocí HPTLC ve SC kromě kovalentně vázaných lipidů, které nejsou při takto nastavené extrakci izolovány)^{99, 211} je vidět na **Obrázku 36A**. Byl pozorován trend ke zvýšení množství lipidů v ekvivalentech s fibroblasty, což souhlasí s výsledky získanými pomocí FTIR analýzy. Při analýze hlavních bariérových lipidů bylo zjištěno, že oba ekvivalenty kůže obsahují všechny hlavní bariérové lipidy (Cer, VMK, Chol, **Obrázek 36B-D**), bez velkých rozdílů mezi ekvivalenty.



Obrázek 36 HPTLC analýza lipidů extrahovaných ze SC RHS. Černě jsou zobrazeny ekvivalenty kůže s fibroblasty (Kc + Fb), bílá značí modely bez fibroblastů (Kc only). Na grafu A jsou všechny volné lipidy izolované ze SC kvantifikované pomocí HPTLC. Grafy B-D zobrazují množství Cer (B), Chol (C) a VMK (D). (Průměrné hodnoty \pm SEM, n=5, byl proveden párový t-test bez nalezení signifikantních rozdílů mezi skupinami.)

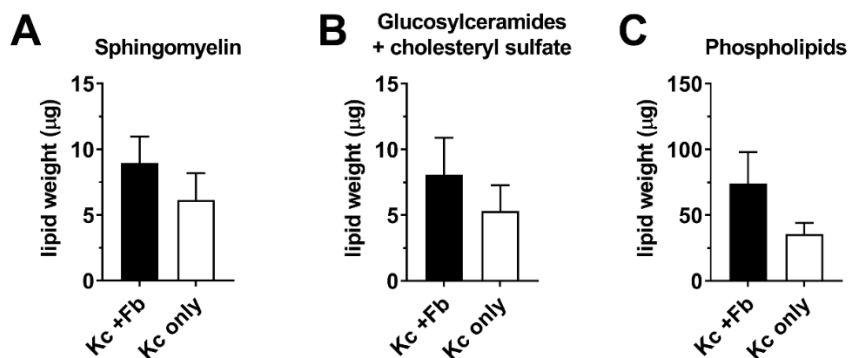
Dále byly analyzovány jednotlivé skupiny Cer, ale ani zde nebyl pozorován signifikantní rozdíl v závislosti na modelu (**Obrázek 37**). Jak již bylo řečeno, RHS lze upravit do požadovaného modelu různými způsoby (změna podmínek kultivace, přítomnost určitých buněk, *knockdown* genů atd.). Kvůli tomu nelze tedy jednoduše srovnat množství Cer s dostupnou literaturou, protože jejich množství je na těchto faktorech závislé.^{160, 207, 212, 213}



Obrázek 37 Kvantifikace podskupin Cer pomocí HPTLC. Černě jsou zobrazeny ekvivalenty kůže s fibroblasty, bílá značí modely bez fibroblastů. Postupně jsou uvedeny jednotlivé kožní Cer. (Průměrné hodnoty \pm SEM, n=5, při $p < 0,05$ párový t-test neprokázal signifikantní rozdíl.)

Poslední skupinou analyzovanou HPTLC byly polární lipidy. Jedná se o prekurzory hlavních bariérových lipidů a v lidské kůži jsou detekovány především v nižších vrstvách epidermis. Ve SC se nalézají pouze v malém množství, protože dochází k jejich enzymatické přeměně (viz

kapitola 2.1.4 *Transport lipidů do SC*). V kožních modelech pak bývá většinou nalezeno vyšší množství těchto lipidů^{212,213}, jako se potvrdilo i zde (**Obrázek 38A-C**). To by mohlo ukazovat na neúplnou postsekreční enzymatickou přeměnu lipidů v takto připravených modelech. Byl pozorován určitý trend ke snížení těchto lipidů v modelech bez fibroblastů, avšak rozdíl nebyl statisticky signifikantní. GlcCer a Chol se nepodařilo přesně oddělit, jsou tedy uvedeny dohromady.



Obrázek 38 HPTLC analýza prekurzorů hlavních bariérových lipidů extrahovaných ze SC RHS. Černě jsou zobrazeny ekvivalenty kůže s fibroblasty (Kc + Fb), bílá značí modely bez fibroblastů (Kc only). Na jednotlivých grafech je množství SM (prekurzor Cer; graf A), GlcCer a CholS (prekurzor Cer, resp Chol; graf B) a fosfolipidů (prekurzory VMK; graf C). (Průměrné hodnoty \pm SEM, n=5, při $p < 0,05$ párový t-test neprokázal signifikantní rozdíl.)

Závěrem je tedy důležité zmínit, že pokud nebyly fibroblasty v modelu přítomny, docházelo k poruchám rohovatění SC v důsledku nedokonalé diferenciaci keratinocytů. Dále bylo zjištěno, že přítomnost fibroblastů je důležitá pro syntézu kožních lipidů. Celkové množství lipidů bylo v modelech bez fibroblastů signifikantně sníženo a lipidové řetězce měly tendenci hůře se uspořádat. Nebyl však pozorován rozdíl v množství jednotlivých podskupin lipidů. Může být tedy shrnuto, že **fibroblasty hrají klíčovou roli během diferenciaci a zrání kožní bariéry.**

3.3 Ex vivo modely

Jak již bylo řečeno, testování látek na kožních štěpech je nejbližší klinickému testování. Jsou využívány všechny výhody, jako je komplexnost složení nebo mechanická odolnost. Pro permeační pokusy byla použita lidská kůže pro její bariérové schopnosti. Byl na ní hodnocen prostup léčiv CDV (**1**) a 5-FU (**2**) přes kůži za využití enhancerů kožní permeace syntetizovaných v naší výzkumné skupině - derivátů terpenů (**Kopečná et al 2019¹⁷⁶, Příloha 3**) a dendrimerů (nepublikovaná data). Byly také provedeny pilotní experimenty s kultivací HSOC, ale nebyl získán dostatek dat, takže tyto pokusy nejsou v práci komentovány.

3.3.1 Metody

3.3.1.1 Permeační experimenty

Permeace probíhaly podle již validované metody.¹⁶⁸ Po operaci byla z kůže oddělena hypodermis a kůže byla skladována při -20 °C. Před samotným experimentem se kůže nechala volně rozmrazit, byla nařezána na čtverce o velikosti přibližně 2 × 2 cm a upevněna do cel s fosfátovým pufrům (10mM, pH 7,4 s přidavkem gentamicinu 0,0005 %) jako akceptorovou fází. Po ekvilibraci na teplotu 32 °C byly aplikovány testované formulace. Během pokusu byly odebírány vzorky z akceptorové fáze v daných časových intervalech. Akceptorová fáze byla přímo analyzována pomocí HPLC. Po ukončení experimentu byla formulace z povrchu kůže očištěna, cely byly rozebrány a byla vyseknuta permeační plocha a tepelně oddělena epidermis od dermis. Části kůže byly zváženy a léčivo z nich bylo extrahováno do extrakčního činidla po dobu 24 h. Extrakt byl zfiltrován a analyzován pomocí HPLC. Detaily metod jednotlivých permeačních experimentů jsou pro přehlednost uvedeny v **Tabulce 3**.

Tabulka 3 Detaily permeačních experimentů.

	Estery terpenů	Dendrimery	
Léčivo	CDV	5-FU	
Formulace	Roztok	Roztok	
Enhancery	B-DAK, C-DAK, Ci-DAK (30 mM)	G0-HCL, G1-HCL, G2-HCL, G3-HCL (5, 10, 20 mg/ml)	
Extrakční činidlo	75% ACN/50 mM octan amonný (v/v)	ACN	
HPLC metoda		<i>Epidermis/dermis</i>	<i>Akceptorová fáze</i>
Mobilní fáze	75% ACN/50 mM octan amonný (v/v)	95% ACN/2,5 mM octan. pufr (pH 4, v/v)	5% metanol/voda (v/v)
Kolona	ZIC® -HILIC 150-4,6 mm (5 µm)	ZIC® -HILIC 150-4,6 mm (5 µm)	LiChrospher® RP-18 250-4 mm (5 µm)
Teplota (°C)	30	45	35
Nástřík (µl)	10	50	50
Průtok (ml/min)	2	0,75	1
Doba analýzy (min)	7,5	15/30	30
UV detekce (nm)	274	264	265
Retenční čas (min)	6,3	5,3	3,6
Kalibrační křivka (µg/ml)	0,1 – 100 (r ² ≥ 0,999, p <0,001)	0,01 – 5 (r ² ≥ 0,999, p <0,001)	0,05 – 50 (r ² ≥ 0,999, p <0,001)

CDV=cidofovir, 5-FU=5-fluorouracil, ACN=acetonitril

3.3.2 Výsledky a diskuze

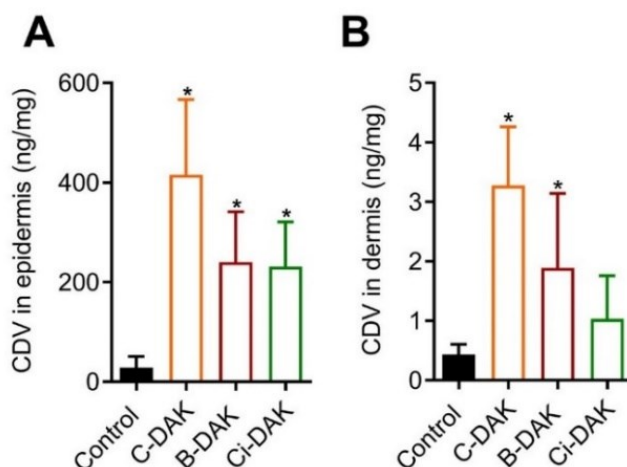
(1) Estery terpenů jako enhancery kožní permeace

V této práci byly hodnoceny vlastnosti nově syntetizovaných derivátů terpenů jako enhancerů kožní permeace. Tyto látky byly syntetizovány a hodnoceny Dr. Kopečnou, v rámci spolupráce jsem se zapojila do permeačních pokusů s CDV, zpracování dat a přípravy manuskriptu. Detaily experimentů, které předcházely permeaci s CDV jsou uvedeny v publikaci **Kopečná *et al* 2019¹⁷⁶ (Příloha 3)**.

Byly navrženy látky, které ve své struktuře využívají výhody molekul terpenů a derivátů aminokyselin. Oboje jsou látky přírodního původu bez velké dráždivosti s prokázanou schopností zlepšovat propustnost léčiv přes kůži.^{214, 215} Konkrétně se jednalo o estery terpenů (citronelol, geraniol, nerol, farnesol, linalool, perilylalkohol, menthol, borneol, carveol, cinamylalkohol) s 6-(dimethylamino)hexanovou kyselinou. Výhodou esterů netoxických přírodních látek je jejich biodegradabilita, a tedy rozklad esterázami na metabolity s nízkou toxicitou.^{215, 216} Po syntéze byl testován vliv enhancerů na permeabilitu modelových léčiv (teofylin a hydrokortison) do kůže a přes kůži. Byly zjištěny velmi dobré výsledky některých enhancerů, například flux léčiv přes kůži byl při použití enhanceru C-DAK až 47× vyšší pro teofylin a 50× vyšší pro hydrokortison. Dále byly na základě tohoto screeningu vybrány tři nejúčinnější enhancery: **C-DAK, B-DAK a Ci-DAK**. Ty byly dále testovány na buněčnou toxicitu, reversibilitu účinku, interakce s proteiny a lipidy SC a schopnost doručit antivirotikum CDV do/přes lidskou kůži *ex vivo*. Buněčná toxicita všech testovaných enhancerů byla velmi nízká, což bylo očekávatelné, protože u strukturně podobných látek byla již dříve pozorována jejich hydrolyza v živé epidermis.²¹⁷ Tím se potvrdila vhodnost záměru kombinace netoxických přírodních látek. Pomocí TEWL a elektrické impedance byla prokázána **reverzibilita** účinku všech tří enhancerů. I přes to, že byl TEWL po aplikaci enhancerů zvýšen (3-4×) a elektrická impedance mírně snížena, po 24 h od aplikace se hodnoty opět vrátily do normálu. Po aplikaci enhancerů na SC bylo vyhodnoceno pomocí IR, že látky nemají vliv na proteiny SC (amid I vibrace), avšak ovlivňují uspořádání lipidových řetězců (posun k vyšším hodnotám methylenových vibrací).^{149, 194} Jako mechanismus účinku enhancerů byla navržena **fluidizace lipidů ve SC**.

Nakonec pak byl zjišťován vliv enhancerů na ukládání léčiva CDV do kůže a jeho vstup přes kůži. Pro permeační pokusy byla použita formulace obsahující 1% roztok CDV v citrátovém pufru (pH 6) s 30 mM přídatkem testovaných enhancerů. Jako kontrola sloužil roztok stejného složení, avšak bez enhancerů. Toto médium bylo vybráno díky velmi vysoké rozpustnosti CDV (> 100 mg/ml), která byla potvrzena v dřívější studii.¹⁶⁸ Na kůži bylo naneseno vždy 150 µl dané formulace a byl sledován průnik CDV do jednotlivých kožních kompartmentů (po 48 h) a do akceptorové fáze (po 24, 40, 44, 48, 52, 64, 68 a 72 h). Jako akceptorová fáze byl využit fosfátový pufr, díky vysoké rozpustnosti CDV (> 100 mg/ml) nebyl nutný přídatek kosolventů.

Bylo zjištěno, že do kůže **formulace s enhancery** doručily **signifikantně vyšší množství CDV** v porovnání s kontrolním roztokem (graficky znázorněno na **Obrázku 39**).



Obrázek 39 Vliv vybraných látek na koncentraci CDV v jednotlivých kožních kompartmentech. Na panelu A je koncentrace CDV v epidermis, na panelu B v dermis. Barevně jsou rozlišeny jednotlivé formulace s obsahem C-DAK (oranžová), B-DAK (červená), Ci-DAK (zelená), kontrola je značená černě. (Průměrné hodnoty \pm SD, $n=5$, * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolou, $p<0,05$, ANOVA-Dunnettův test.)

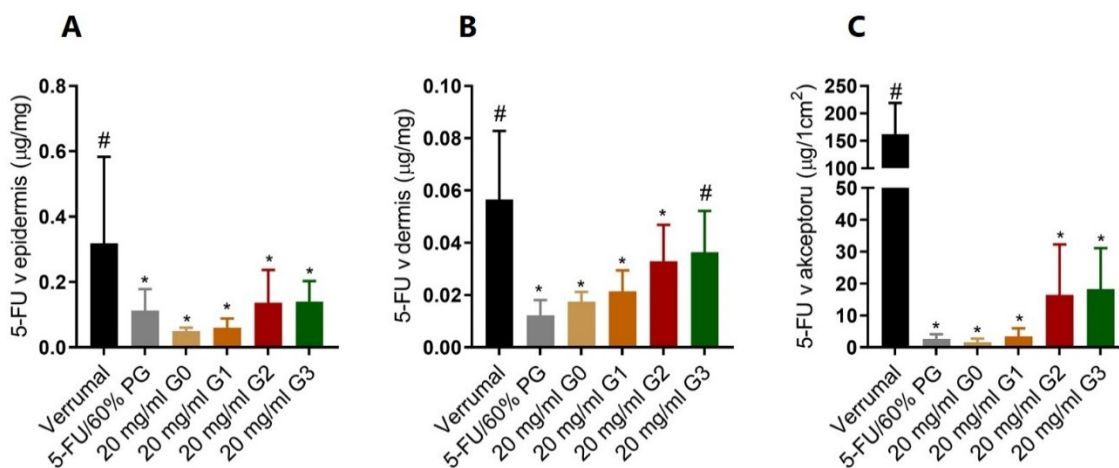
Konkrétně do epidermis bylo bez enhancerů doručeno $28,4 \pm 22,5$ ng CDV/mg tkáně, zatímco formulace s C-DAK, B-DAK, Ci-DAK zapříčinily 15 \times , 9 \times , respektive 8 \times vyšší množství CDV v epidermis. V dermis bylo nalezeno bez enhancerů $0,44 \pm 0,17$ ng CDV/mg tkáně, ale při použití C-DAK a B-DAK byly hodnoty signifikantně zvýšené 8 \times , respektive 4 \times . Množství CDV v akceptorové fázi bylo u formulací s obsahem i bez obsahu enhancerů pod/na hranici detekčního limitu, proto ani nebylo možné stanovit flux léčiva. To bylo již dříve pozorováno u CDV,^{168, 218} ale i u podobných léčiv jako je adefovir²¹⁹ nebo 2,6-diaminopurinová antivirotika.²²⁰ Obecně je u velmi hydrofilních léčiv jako je CDV ($\log P = -3,9^{221}$) očekáván nízký přestup přes kůži.^{111, 222}

Závěrem je tedy možné shrnout, že C-DAK, B-DAK a Ci-DAK jsou schopny doručit (trans)dermálně jak modelová léčiva (teofylin, hydrokortison), tak i klinicky relevantní CDV. Díky testovaným enhancerům se podařilo zadržet CDV v kůži (pomohly zvýšit detekované množství CDV v epidermis až 15 \times a v dermis až 8 \times), avšak nepodařilo se překonat kompletně kožní bariéru, což je vidět z nízkých hodnot doručeního CDV v dermis a téměř nulových v akceptorové fázi. Tento fakt závisí na použitém léčivu, jak již bylo řečeno výše, koncentrace modelových léčiv byla po použití enhancerů signifikantně vyšší ve všech kompartmentech. Zároveň v experimentech předcházejících permeaci bylo zjištěno, že tyto nově navržené estery terpenů nemají nežádoucí vedlejší účinky, byla u nich prokázána nízká buněčná toxicita a jejich účinek byl reverzibilní. Jako mechanismus účinku byla navržena fluidizace lipidů ve SC. Bylo tedy prokázáno, že testované nově syntetizované látky splňují požadavky na enhancery kožní permeace.

(2) Permeace s dendrimery

V rámci diplomových prací Mgr. Houškové¹⁷⁷ a Mgr. Chladové¹⁷⁸ byly navrhnuty, syntetizovány a testovány nové polyamidoaminodendrimery s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii. Jako konzultantka prací jsem se zapojila do permeačních studií a jejich vyhodnocení.

Syntetizované dendrimery jsou strukturně podobné PAMAM dendrimerům, které již v minulosti byly používány jako enhancery kožní permeace.²²³ Avšak díky své menší molární hmotnosti by měly být vhodnější pro transdermální podávání léčiv. Zároveň byly zvoleny aminoskupiny na periférii díky lepším výsledkům doručení léčiv do kůže v porovnání s jinými funkčními skupinami.¹²² Byly tedy syntetizovány nultá až třetí generace (G0-G3) dendrimerů a následně podrobeny permeačním studiím. Vybraným léčivem byl 5-FU používaný v terapii kožních poruch vyvolaných hyperproliferaací keratinocytů²²⁴, jako enhancery byly zkoušeny chlorovodíkové soli syntetizovaných dendrimerů nulté až třetí generace (G0-HCl, G1-HCl, G2-HCl, G3-HCl). Formulace byly ve formě roztoků, jako vehikulum byl použit 60% PG ve vodě s přídatkem dendrimerů v určité koncentraci (popsáno dále). Léčivo (5-FU) bylo přidáno do roztoku v koncentraci 4,75 mg/ml, což odpovídá přípravku Verrumal dostupném na českém trhu. Jako kontrolní roztok byl zvolen 5-FU v 60% PG a Verrumal. Pro **screening generací** bylo nanášeno 100 µl formulace o koncentraci dendrimerů **20 mg/ml** na 24 h. Množství doručeno 5-FU do jednotlivých kompartmentů vykazovalo rostoucí trend v závislosti na rostoucí generaci dendrimerů (**Obrázek 40**).



Obrázek 40 Vliv generace dendrimerů na permeaci 5-FU do jednotlivých kompartmentů kůže *ex vivo*. Na panelech A-C jsou postupně zobrazeny jednotlivé kompartmenty: epidermis (A), dermis (B), akceptorová fáze (C). Černě je značena kontrola Verrumal, šedě kontrola 5-FU v 60% PG. Běžová barva značí formulaci, která obsahovala jako enhancer nultou generaci dendrimerů (G0), oranžová formulaci s první generací dendrimerů (G1), červená formulaci s druhou generací dendrimerů (G2) a zelená formulaci s třetí generací dendrimerů (G3). Koncentrace dendrimerů ve všech formulacích byla 20 mg/ml. (Průměrné hodnoty ±SD, n=5, * značí signifikantní rozdíl mezi jednotlivými vzorky a Verrumalem, # signifikantní rozdíl mezi jednotlivými vzorky a 5-FU v 60% PG, p<0,05, ANOVA-Dunnettův test.)

V porovnání s komerčně dostupným roztokem obsahující 5-FU doručily formulace s dendrimery do kůže i přes kůži (do akceptorové fáze) signifikantně nižší množství účinné látky. Verrumal je určen k použití na zrohovatělou kůži, tudíž obsahuje keratolytickou kyselinu salicylovou a enhancery kožní permeace (dimethylsulfoxid, ethylacetát, ethanol).^{115, 225} Kvůli tomu byl tento účinek očekávaný a formulace byly porovnány také s roztokem 5-FU v PG, který sloužil jako relevantnější kontrola. V epidermis i v akceptorové fázi bylo v porovnání s 5-FU v PG nalezeno srovnatelné množství 5-FU. Signifikantně vyšší množství léčiva v porovnání s kontrolním roztokem 5-FU v PG bylo detekováno v dermis za použití formulace s **obsahem G3-HCl**. Protože mezi ostatními formulacemi obsahujícími dendrimery a roztokem 5-FU v PG nebyl signifikantní rozdíl, není možné rozlišit mezi vlivem PG jako enhanceru¹¹⁵ a vlivem dendrimerů. Je potřeba zdůraznit, že Verrumal sice doručil v porovnání s dendrimery vyšší množství 5-FU do kůže, ale zároveň i mnohem vyšší množství přes kůži, což je v případě cílení léčby do epidermis (místo účinku 5-FU²²⁶) nežádoucí.

V literatuře byly nalezeny studie, kde PAMAM dendrimery zvyšovaly (trans)dermální permeaci hydrofilních i lipofilních léčiv.^{122, 223, 227} Bylo zjištěno, že nižší generace (G2) PAMAM dendrimerů byly v doručení 5-FU účinnější, což bylo přičítáno nižší molární hmotnosti.²²³ Zdá se tedy, že úprava molární hmotnosti byla v případě nových formulací úspěšná, protože i vyšší generace (G3) úspěšně doručily léčivo do cílových částí kůže. V uvedené publikaci bylo zjištěno, že vyšší koncentrace dendrimerů doručily přes kůži vyšší množství 5-FU, avšak lepší retence léčiva v kůži byla dosažena při použití nižších koncentrací dendrimerů.²²³ Protože místem účinku 5-FU je epidermis²²⁶, byla v následných experimentech zvolena nižší koncentrace dendrimerů kvůli zacílení 5-FU do epidermis.

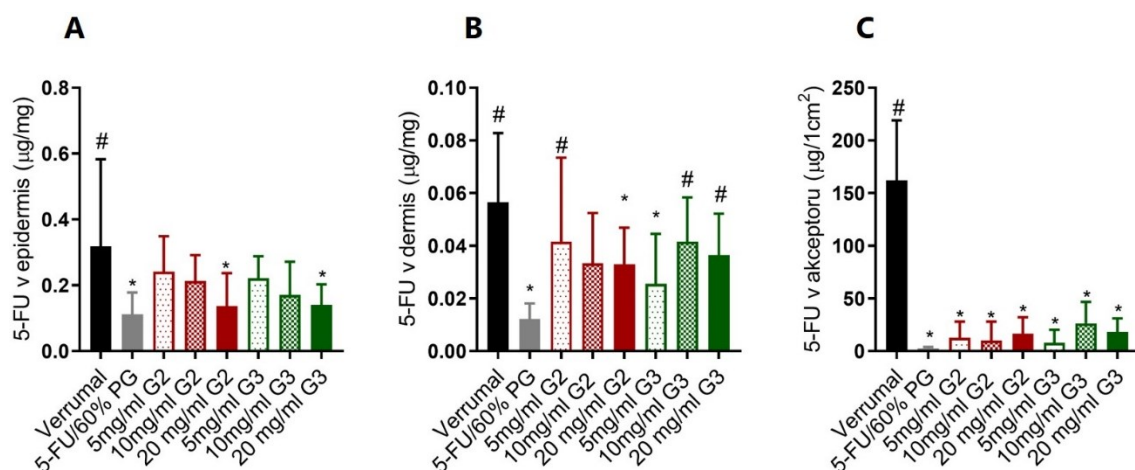
Byly vybrány **účinnější generace (G2-HCl a G3-HCl)**, které byly aplikovány na kůži stejným způsobem, avšak ve dvou různých **koncentracích (5 a 10 mg/ml)**. Výsledky pak byly srovnány s předchozí permeací (koncentrace 20 mg/ml) a data z obou experimentů jsou shrnuta v **Tabulce 4**.

Tabulka 4 Množství léčiva detekované v jednotlivých kompartmentech

	epidermis [µg/mg]	dermis [µg/mg]	akceptorová fáze [µg/cm ²]
Verrumal	0,32 ± 0,26	0,06 ± 0,03	162,10 ± 56,89
5-FU/PG	0,11 ± 0,07	0,01 ± 0,01	2,64 ± 1,50
G0 20 mg/ml	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,61 ± 1,15
G1 20 mg/ml	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01	3,47 ± 2,51
G2 20 mg/ml	0,14 ± 0,10	0,03 ± 0,01	16,46 ± 15,80
10 mg/ml	0,21 ± 0,08	0,03 ± 0,02	10,14 ± 17,85
5 mg/ml	0,24 ± 0,11	0,04 ± 0,03	12,77 ± 15,17
G3 20 mg/ml	0,14 ± 0,06	0,04 ± 0,01	18,26 ± 12,86
10 mg/ml	0,17 ± 0,10	0,04 ± 0,02	26,41 ± 20,40
5 mg/ml	0,22 ± 0,07	0,03 ± 0,02	8,01 ± 12,37

V tabulce jsou uvedena souhrnná data z více permeací. (Průměrné hodnoty ±SD.)

Co se týče epidermis, formulace obsahující G2-HCl o koncentraci 5 mg/ml, respektive 10 mg/ml doručily do epidermis 1,7×, respektive 1,1× vyšší množství 5-FU v porovnání s formulací o koncentraci G2-HCl 20 mg/ml. V případě G3 došlo k podobnému navýšení: formulace s G3-HCl v koncentraci 5 mg/ml, respektive 10 mg/ml pomohly zvýšit detekované množství 5-FU v epidermis 1,6×, respektive 1,2× v porovnání s koncentrací 20 mg/ml. Rovněž rozdíl mezi množstvím 5-FU v epidermis doručeném těmito formulacemi nebyl signifikantně rozdílný v porovnání s Verrumalem (**Obrázek 41**). Do dermis nižší koncentrace 5 mg/ml G2-HCl pomohla doručit srovnatelné množství s Verrumalem. Nebyl pozorován ani signifikantní rozdíl mezi Verrumalem a G2-HCl 10 mg/ml a dále G3-HCl o koncentraci 10 a 20 mg/ml. Velmi slibné je oproti Verrumalu signifikantně nižší množství 5-FU v dermis v případě G3-HCl 5 mg/ml. Jak již bylo řečeno, místem účinku 5-FU v kůži je epidermis, je tedy žádoucí doručit účinnou látku do epidermis, bez zvýšeného průniku přes kůži. Tato výhoda všech testovaných formulací se projevila i v posledním sledovaném kompartmentu – akceptorové fázi. Zde bylo množství 5-FU až 20× nižší v porovnání s Verrumalem pro formulaci s obsahem G3-HCl 5 mg/ml. Obecně všechny generace a koncentrace dendrimerů pomohly doručit léčivo do epidermis a zároveň zabránit nechtěnému průniku do akceptorové fáze. Co se týče koncentrace, bylo tedy prokázáno, že v porovnání s vyšší koncentrací byly nižší koncentrace dendrimerů účinnější.



Obrázek 41 Vliv koncentrace vyšších generací (G2 a G3) dendrimerů na permeaci 5-FU do jednotlivých kompartmentů kůže *ex vivo*. Na panelech A-C jsou postupně zobrazeny jednotlivé kompartmenty: epidermis (A), dermis (B), akceptorová fáze (C). Černě je značena kontrola Verrumal, šedě kontrola 5-FU v 60% PG. Červená barva značí formulace, které obsahovaly jako enhancer druhou generaci dendrimerů v koncentraci 5-20 mg/ml. Zelená barva značí formulace, které obsahovaly jako enhancer třetí generaci dendrimerů v koncentraci 5-20 mg/ml. (Průměrné hodnoty \pm SD, n=5, * značí signifikantní rozdíl mezi jednotlivými vzorky a Verrumalem, # signifikantní rozdíl mezi jednotlivými vzorky a 5-FU v 60% PG, $p < 0,05$, ANOVA-Dunnnettův test.)

Můžeme tedy shrnout, že se potvrdila výhodnost snížení molární hmotnosti dendrimerů oproti komerčně dostupným PAMAM dendrimerům pro (trans)dermální podání. U nově syntetizovaných dendrimerů pomohly pro doručení léčiva do kůže i vyšší generace (G3-HCl). Dále bylo potvrzeno, že nižší koncentrace se jeví jako vhodnější pro cílení 5-FU do epidermis, což je z hlediska mechanismu účinku požadovaná tkáň. Pro zjištění efektu v živé epidermis (a tedy keratinocytů schopných dělení) by bylo vhodné doplnit experimenty o *tape-stripping*

(metoda používaná pro odstranění zrohovatělých buněk SC). Co se týče porovnání formulací s komerčně dostupným Verrumalem, testované dendrimery pomohly doručit do epidermis srovnatelné množství 5-FU, avšak bez nežádoucího průniku látky přes kůži. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u formulací s obsahem **G3-HCl o koncentraci 5 mg/ml**, kde bylo doručené množství do epidermis porovnatelné s Verrumalem, a zároveň průnik do akceptorové fáze byl 20× nižší. Do budoucna by bylo vhodné zaměřit se na studium cytotoxicity a reverzibility účinku dendrimerů na kůži.

Závěr

V této práci jsou shrnuty poznatky, které byly získány studiem vlivu **látek a faktorů** na tvorbu kožní bariéry. Podle zjišťovaných vlastností byl vždy vybrán **odpovídající model**, který se jevil pro daný projekt jako nejvhodnější.

- **Pro studium vlivu prekurzoru Cer (GlcCer) a pH na vznik multivrstevných lamel důležitých pro správnou bariérovou funkci byl využit monovrstevný a multivrstevný model.** Ty byly vybrány díky své modifikovatelnosti, kdy je možné měnit složení lipidů (nahrazení GlcCer za Cer, deuterace lipidů). Protože se jedná o model pouze lipidové extracelulární matrix kožní bariéry, lze navíc oddělit vliv ostatních biochemických vlivů probíhajících v kůži na uspořádání lipidů. Toho bylo využito při sledování vlivu pH na uspořádání lipidů SC (oddělení vlivu enzymatických přeměn odehrávajících se v kůži/buněčných modelech). Při přípravě monovrstevné směsi syntetických lipidů izotermy odhalily rozdílné chování směsi při pH 5,5 a 7,4. Rovněž byl po přenesení na pevný podklad pozorován rozdíl mezi tvorbou fází. Směsi, kde obsah Cer převýšil GlcCer začaly tvořit multivrstevné útvary (10-14 nm), avšak pouze při kyselém pH. Podobné chování bylo pozorováno i u lipidů izolovaných ze SC, kde pouze při kyselém pH byla pozorována tvorba vyšší fáze ~ 11 nm. Toto chování bylo přičítáno konformaci řetězců Cer, která je při fyziologickém pH zřejmě otevřená (kvůli nekompatibilitě rigidních acylových a pohyblivých sfingosinových řetězců). To bylo potvrzeno deuterací složek směsi, kde bylo pozorováno sdružování acylových řetězců Cer s neionizovanou VMK, zatímco sfingosinové řetězce se sdružovaly s Chol, a to pouze za kyselého pH. Důležitost kyselého pH byla potvrzena dalšími experimenty (nesprávné lamelární uspořádání a zvýšený TEWL při neutrálním pH). **Byl tedy prokázán přímý vliv kyselého pH na uspořádání lipidů ve SC, jejich remodelaci do multivrstevných útvarů, a tedy správnou bariérovou funkci lipidové kožní bariéry.**
- **Monovrstevný model byl dále využit při studiu interakcí enzymu β -GlcCer-áza a PAMAM dendrimerů s lipidy.** V tomto případě je výhodou možnost pozorovat přímo laterální uspořádání lipidů a jejich ovlivňování látkami v subfázi. Díky tomu je možné přiblížit mechanismus účinku těchto látek. To se bohužel nepodařilo při pozorování aktivity enzymu β -GlcCer-áza, kdy byla potvrzena pouze adsorpce enzymu na monovrstvu tvořenou kožními lipidy, avšak přímý rozklad prokázán nebyl. **Pilotní testování PAMAM dendrimerů navrhuje, že PAMAM dendrimery interagují s polárními hlavami lipidů.** Pravděpodobně v těchto interakcích hrají roli aminokupiny na periférii molekul dendrimerů. To však musí být v budoucnu potvrzeno dalšími metodami (AFM, multivrstevné modely). **V kombinaci s lipidy kožní bariéry se jedná o novou metodu, která by mohla v budoucnu usnadnit pochopení fungování nanosíčovských systémů pro (trans)dermální doručení a má tak do budoucna slibné využití.**

- **Modely RHE byly vybrány díky možnosti navodit v keratinocytech defekt enzymu PNPLA1 (snížená syntéza ω -O-acylCer), a tím simulovat onemocnění ARCI.** Jedná se o 3D buněčné modely, které byly připraveny během výzkumné stáže na pracovišti Inserm, Toulouse, pod vedením assoc. prof. Jonca. Byla to první možnost využít shRNA-RHE jako modelu onemocnění ARCI (metoda vyvinutá v laboratoři ve Francii) pro testování LBms s obsahem ω -O-acylCer (formulace vyvinutá u nás v laboratoři). V rámci stáže byla provedena pilotní studie na modelech, které budou v budoucnu sloužit jako preklinický model pro léčbu onemocnění kožní bariéry pomocí lipidických formulací. Data potvrdila, že bylo získáno u obou typů shRNA dostačující umlčení genu pro protein PNPLA1 (70-80 %). Avšak zdá se, že to není dostačující pro navození defektu kožní bariéry, jaký je přítomný u pacientů s touto mutací nebo *Pnpla1 knockout* myši (úplně „vypnutí“ genu). **I když tedy tyto modely budou muset být dále optimalizovány, nespornou výhodou bylo zajištění technické proveditelnosti přípravy formulací na pracovišti ve Francii a vyvinutí protokolu pro aplikaci formulace na RHE.** To bude do budoucna důležité pro opakovatelnost experimentů ve Francii a obecně pro spolupráci mezi našimi laboratořemi. Dále bylo prokázáno, že formulace nemají nežádoucí vliv na viabilitu a morfologii RHE.
- **Modely RHS byly vybrány díky přítomnosti dermálního kompartmentu a mohly tak být sledovány interakce mezi keratinocyty a fibroblasty a jejich vliv na správně fungující kožní bariéru.** Tyto 3D buněčné modely byly připraveny kolegy v Německu (Freie Universität Berlin, Německo, prof. Hedtrich). Po biologickém hodnocení modelů bylo odstraněno SC a zasláno k nám do laboratoře. SC pak bylo charakterizováno pomocí IR a obsah lipidů byl stanoven HPTLC. Byla prokázána důležitost interakcí mezi keratinocyty a fibroblasty pro správnou diferenciaci epidermis, včetně morfologie a složení lipidů SC. **Při nepřítomnosti fibroblastů se keratinocyty nevyvíjely správně, RHS byla více propustná a obsahovala snížený celkový obsah bariérových lipidů, které měly tendenci se hůře uspořádat.** Nebyl však pozorován vliv přítomnosti fibroblastů na syntézu jednotlivých podskupin lipidů, hlavně pak Cer.
- **Poslední skupinou v této práci využívaných modelů byly lidské kožní štěpy, neboli lidská kůže *ex vivo*, které byly využity k testování enhancerů kožní permeace.** Jsou to modely nejbližší klinickému testování, výhodou je jejich komplexnost, mechanická odolnost nebo možnost zachování biochemické aktivity. Tyto modely však nelze modifikovat jako ty výše uvedené a nelze je tedy využít pro simulaci kožních onemocnění. Kožní štěpy byly využity především pro permeační studie, díky své schopnosti dokonale modelovat bariérovou funkci kožní bariéry. Testovány byly v naší výzkumné skupině nově syntetizované **enhancery kožní permeace na bázi terpenů (B-DAK, C-DAK, Ci-DAK) a polyamidoaminodendrimery s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periferii.** B-DAK, C-DAK a Ci-DAK pomohly překonat kožní bariéru pro léčivo CDV, kdy při permeačních pokusech na lidské kůži *ex vivo* zvýšily ukládání léčiva až 15× (epidermis), respektive 8× (dermis). Zároveň byla prokázána jejich reverzibilita a nízká toxicita. Ve druhé studii byl testován vliv

chlorovodíkových solí dendrimerů na propustnost kožní bariéry pro léčivo 5-FU. Byl sledován vliv generací a koncentrací dendrimerů a bylo zjištěno, že účinnější jsou vyšší generace (G2-HCl a G3-HCl) v nižších koncentracích (5 a 10 mg/ml). Ze všech nejvýhodnější se jevila formulace s obsahem G3-HCl o koncentraci 5 mg/ml. Ta doručila do epidermis srovnatelné množství 5-FU s komerčně dostupným přípravkem, avšak bez nežádoucího průniku do akceptorové fáze (signifikantně nižší doručené množství 5-FU v porovnání s kontrolou).

Výsledky této práce tedy pomohly porozumění kožní bariéry v mnoha aspektech. Nejdůležitějším zjištěním bylo **objevení nové důležité role pH** nejen jako doposud známého „kyselého pláště,“ ale jeho přímý vliv na uspořádání lipidů ve SC. Využití monovrstevného modelu kožních lipidů pro interakce s potencionálními enhancery se zdá být **do budoucna zajímavou technikou pro hledání mechanismu účinku** látek interagujících s kožní bariérou. Významnou součástí práce bylo **vyvinutí protokolu pro aplikaci lipidových formulací na RHE** s defektem enzymu PLNPLA1 v laboratoři ve Francii. Je to důležitým prvním krokem v preklinickém hodnocení těchto formulací a umožní budoucí spolupráci našich pracovišť. Analýza lipidů SC u modelů RHS s/bez fibroblastů pomohla prokázat **další roli fibroblastů při tvorbě kožní bariéry** a byla tak umožněna spolupráce mezinárodního týmu a kombinace několika metod. Díky permeačním experimentům na lidské kůži *ex vivo* byly ověřeny schopnosti nově syntetizovaných **enhancerů** kožní permeace (esterů terpenů a dendrimerů) **doručit účinnou látku přes kůži či do kůže**. To je podstatným krokem ve vývoji nových látek, které by mohly sloužit jako enhancery. Jak je vidět, neexistuje jeden univerzální model, který by byl použitelný pro hodnocení látek ovlivňujících kožní bariéru. Pokaždé je důležité dobře zvážit všechna známá fakta a zamýšlené hypotézy v kontextu se složením modelů. Závěrem je potřeba dodat, že modely mají ve výzkumu kožní bariéry a látek ji ovlivňujících nezastupitelnou roli a jsou nezbytným nástrojem v mnoha farmaceutických vědách, včetně farmaceutické technologie.

Reference

1. Elias, P. M., Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug Dev. Res.* **1988**, *13* (2-3), 97-105.
2. Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M., The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17* (12), 1063-1072.
3. Feingold, K. R.; Elias, P. M., Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 280-294.
4. Pilgram, G. S. K.; Vissers, D. C. J.; van der Meulen, H.; Koerten, H. K.; Pavel, S.; Lavrijsen, S. P. M.; Bouwstra, J. A., Aberrant Lipid Organization in Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and Lamellar Ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117* (3), 710-717.
5. Elias, P. M., Feingold, K. R., *Skin Barrier*. Taylor & Francis Group: New York, 2006.
6. Kováčik, A.; Kopečná, M.; Vávrová, K., Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17* (2), 145-155.
7. Williams, A. C.; Barry, B. W., Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (5), 603-618.
8. Groen, D.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4168-4175.
9. Mathes, S. H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U., The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69-70*, 81-102.
10. Fluhr, J. W.; Elias, P. M., Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exogenous Dermatol.* **2002**, *1* (4), 163-175.
11. Hirabayashi, T.; Anjo, T.; Kaneko, A.; Senoo, Y.; Shibata, A.; Takama, H.; Yokoyama, K.; Nishito, Y.; Ono, T.; Taya, C.; Muramatsu, K.; Fukami, K.; Muñoz-García, A.; Brash, A. R.; Ikeda, K.; Arita, M.; Akiyama, M.; Murakami, M., PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14609.
12. Pichery, M.; Huchénq, A.; Sandhoff, R.; Severino-Freire, M.; Zaafour, S.; Opálka, L.; Levade, T.; Soldan, V.; Bertrand-Michel, J.; Lhuillier, E.; Serre, G.; Maruani, A.; Mazereeuw-Hautier, J.; Jonca, N., PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26* (10), 1787-1800.
13. Grond, S.; Eichmann, T. O.; Dubrac, S.; Kolb, D.; Schmuth, M.; Fischer, J.; Crumrine, D.; Elias, P. M.; Haemmerle, G.; Zechner, R.; Lass, A.; Radner, F. P. W., PNPLA1 Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-O-Acylceramides. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137* (2), 394-402.
14. Marionnet, C.; Pierrard, C.; Vioux-Chagnoleau, C.; Sok, J.; Asselineau, D.; Bernerd, F., Interactions between Fibroblasts and Keratinocytes in Morphogenesis of Dermal Epidermal Junction in a Model of Reconstructed Skin. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126* (5), 971-979.

15. Sun, M.; Fan, A.; Wang, Z.; Zhao, Y., Dendrimer-mediated drug delivery to the skin. *Soft Matter* **2012**, *8* (16), 4301.
16. Venuganti, V. V.; Sahdev, P.; Hildreth, M.; Guan, X.; Perumal, O., Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (9), 2246-2260.
17. McGrath, J. A.; Uitto, J., Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology*, 8th ed.; Blackwell Publishing Ltd: 2010; Vol. 1, pp 1-53.
18. Downing, D. T.; Stewart, M. E.; Wertz, P. W.; Colton, S. W.; Abraham, W.; Strauss, J. S., Skin Lipids: An Update. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *88* (3), 2-6.
19. Schommer, N. N.; Gallo, R. L., Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol.* **2013**, *21* (12), 660-668.
20. Ebling, F. J. G.; Montagna, W. Human skin. *Encyclopedia Britannica* **2020** <https://www.britannica.com/science/human-skin> (dostupné online 11. 05. 2020).
21. Eckert, R. L., Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* **1989**, *69* (4), 1316-1346.
22. Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W., Cell death by cornification. *BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833* (12), 3471-3480.
23. Integument Histology. *Medical Histology – Jacobs School of Medicine* <https://ubwp.buffalo.edu/histology/integument-histology-notes/> (dostupné online 14. 05. 2020).
24. Proksch, E.; Jensen, J.-M. Chapter 47. Skin as an Organ of Protection. *Access Medicine* <https://accessmedicine.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=392§ionId=41138745> (dostupné online 19. 05. 2020).
25. Snell, R. S., The fate of epidermal desmosomes in mammalian skin. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **1965**, *66* (4), 471-487.
26. Haftek, M.; Teillon, M.-H.; Schmitt, D., Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *43* (3), 242-249.
27. Elias, P. M.; Gruber, R.; Crumrine, D.; Menon, G.; Williams, M. L.; Wakefield, J. S.; Holleran, W. M.; Uchida, Y., Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 314-318.
28. Elias, P. M., Feingold, K. R., Stratum Corneum Barrier Function: Definitions and Broad Concepts. In *Skin Barrier*, Taylor & Francis Group: New York, 2006; pp 1-3.
29. Bouwstra, J. A.; Ponc, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *BBA - Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 2080-2095.
30. Menon, G. K.; Cleary, G. W.; Lane, M. E., The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **2012**, *435* (1), 3-9.
31. Christophers, E.; Kligman, A. M., Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1964**, *42* (6), 407-409.
32. Menon, G. K., New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, S3-S17.

33. Brandner, J. M.; Schulzke, J. D., Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine. *Cell Tissue Res.* **2015**, *360* (3), 723-748.
34. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 295-313.
35. Wertz, P., Biochemistry of Human Stratum Corneum Lipids. In *Skin Barrier*, Taylor & Francis Group: New York, 2006; pp 33-42.
36. Yardley, H. J.; Summerly, R., Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol. Ther.* **1981**, *13* (2), 357-383.
37. Weerheim, A.; Ponc, M., Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* **2001**, *293* (4), 191-199.
38. Long, S. A.; Wertz, P. W.; Strauss, J. S.; Downing, D. T., Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* **1985**, *277* (4), 284-287.
39. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 422-434.
40. Vávrová, K.; Kováčik, A.; Opálka, L., Ceramides in the skin barrier. *Eur. Pharm. J.* **2017**, *64* (2), 28-35.
41. T'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K., Profiling and Characterizing Skin Ceramides Using Reversed-Phase Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 403-411.
42. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1993**, *1182* (2), 147-151.
43. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Gröne, H.-J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R., 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J. Lipid Res.* **2013**, *54* (12), 3312-3321.
44. Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784-790.
45. Merrill, A. H., De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (29), 25843-25846.
46. Mizutani, Y.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett.* **2004**, *563* (1-3), 93-97.
47. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (23), 5456-5466.
48. Uchida, Y.; Hara, M.; Nishio, H.; Sidransky, E.; Inoue, S.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Hamanaka, S., Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J. Lipid Res.* **2000**, *41* (12), 2071-2082.

49. Hamanaka, S.; Suzuki, A.; Hara, M.; Nishio, H.; Otsuka, F.; Uchida, Y., Human Epidermal Glucosylceramides are Major Precursors of Stratum Corneum Ceramides. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119* (2), 416-423.
50. Proksch, E.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Localization and regulation of epidermal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by barrier requirements. *BBA - Lipids and Lipid Metab.* **1991**, *1083* (1), 71-79.
51. Russell, D. W., Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1992**, *6* (2), 103-110.
52. Webb, A. R.; Decosta, B. R.; Holick, M. F., Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D3 by Causing Its Photodegradation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1989**, *68* (5), 882-887.
53. Proksch, E.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in murine epidermis. Modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85* (3), 874-882.
54. Epstein, E. H.; Williams, M. L.; Elias, P. M., The epidermal cholesterol sulfate cycle. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1984**, *10* (5, Part 1), 866-868.
55. Elias, P. M.; Williams, M. L.; Choi, E.-H.; Feingold, K. R., Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 353-361.
56. Van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J., Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (1), 70-79.
57. Lin, M.-H.; Khnykin, D., Fatty acid transporters in skin development, function and disease. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 362-368.
58. Fluhr, J. W.; Kao, J.; Ahn, S. K.; Feingold, K. R.; Elias, P. M.; Jain, M., Generation of Free Fatty Acids from Phospholipids Regulates Stratum Corneum Acidification and Integrity. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *117* (1), 44-51.
59. Chan, D.; Vogel, H., Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem J* **2010**, *430* (1), 1-19.
60. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jakobsson, A., Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45* (3), 237-249.
61. Li, W.; Sandhoff, R.; Kono, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Ding, B. C.-H.; Proia, R. L.; Deng, C.-X., Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, 120-128.
62. Vasireddy, V.; Uchida, Y.; Salem, N.; Kim, S. Y.; Mandal, M. N. A.; Reddy, G. B.; Bodepudi, R.; Alderson, N. L.; Brown, J. C.; Hama, H.; Dlugosz, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Ayyagari, R., Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16* (5), 471-482.
63. Menon, G. K.; Lee, S. E.; Lee, S.-H., An overview of epidermal lamellar bodies: Novel roles in biological adaptations and secondary barriers. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *92* (1), 10-17.

64. Elias, P.; Feingold, K. R.; Fartasch, M., The Epidermal Lamellar Body as a Multifunctional Secretory Organelle. In *Skin Barrier*, Taylor & Francis Group: New York, 2006; pp 261-272.
65. Feingold, K. R., Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis: Fig. 1. *J. Lipid Res.* **2007**, *48* (12), 2531-2546.
66. Feingold, K. R., Lamellar Bodies: The Key to Cutaneous Barrier Function. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (8), 1951-1953.
67. Akiyama, M., The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermatoendocrinol.* **2011**, *3* (2), 107-112.
68. Mitsutake, S.; Suzuki, C.; Akiyama, M.; Tsuji, K.; Yanagi, T.; Shimizu, H.; Igarashi, Y., ABCA12 dysfunction causes a disorder in glucosylceramide accumulation during keratinocyte differentiation. *J. Dermatol. Sci.* **2010**, *60* (2), 128-129.
69. Jiang, Y. J.; Lu, B.; Tarling, E. J.; Kim, P.; Man, M. Q.; Crumrine, D.; Edwards, P. A.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J. Lipid Res.* **2010**, *51* (11), 3185-3195.
70. Hennings, H.; Michael, D.; Cheng, C.; Steinert, P.; Holbrook, K.; Yuspa, S. H., Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. **1980**, *19* (1), 245-254.
71. Doering, T.; Holleran, W. M.; Potratz, A.; Vielhaber, G.; Elias, P. M.; Suzuki, K.; Sandhoff, K., Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (16), 11038-11045.
72. Bowser, P. A.; Gray, G. M., Sphingomyelinase in Pig and Human Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **1978**, *70* (6), 331-335.
73. Bergers, M.; Verhagen, D. R.; Jongerius, M.; Van Der Kerkhof, P. C. M.; Mier, P. D., A Unique Phospholipase A2 in Human Epidermis: Its Physiologic Function and Its Level in Certain Dermatoses. **1988**, *90* (1), 23-25.
74. Proksch, E., pH in nature, humans and skin. *J. Dermatol.* **2018**, *45* (9), 1044-1052.
75. Bergers, M.; Verhagen, A. R.; Jongerius, M.; Mier, P. D., A new approach to the measurement of phospholipase A2 in tissue homogenates and its application to human skin. *BBA - Lipids and Lipid Metab.* **1986**, *876* (2), 327-332.
76. Mauro, T.; Grayson, S.; Gao, W. N.; Man, M. Q.; Kriehuber, E.; Behne, M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch. Dermatol. Res.* **1998**, *290* (4), 215-222.
77. Krieg, P.; Fürstenberger, G., The role of lipoxygenases in epidermis. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 390-400.
78. Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T., The Role of the Corneocyte Lipid Envelopes in Cohesion of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *93* (1), 169-172.
79. Lin, T.-K.; Crumrine, D.; Ackerman, L. D.; Santiago, J.-L.; Roelandt, T.; Uchida, Y.; Hupe, M.; Fabrias, G.; Abad, J. L.; Rice, R. H.; Elias, P. M., Cellular Changes that Accompany Shedding of Human Corneocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (10), 2430-2439.

80. Behne, M.; Uchida, Y.; Seki, T.; De Montellano, P. O.; Elias, P. M.; Holleran, W. M., Omega-Hydroxyceramides are Required for Corneocyte Lipid Envelope (CLE) Formation and Normal Epidermal Permeability Barrier Function. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114* (1), 185-192.
81. Hou, S. Y. E.; Mitra, A. K.; White, S. H.; Menon, G. K.; Ghadially, R.; Elias, P. M., Membrane Structures in Normal and Essential Fatty Acid-Deficient Stratum Corneum: Characterization by Ruthenium Tetroxide Staining and X-Ray Diffraction. **1991**, *96* (2), 215-223.
82. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum-Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *88* (6), 714-718.
83. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Vanderspek, J. A.; Bras, W., Structural Investigations of Human Stratum-Corneum by Small-Angle X-Ray-Scattering. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *97* (6), 1005-1012.
84. de Sousa Neto, D.; Gooris, G.; Bouwstra, J., Effect of the ω -acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I). *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164* (3), 184-195.
85. Mojumdar, E. H.; Kariman, Z.; Van Kerckhove, L.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *BBA - Biomembranes* **2014**, *1838* (10), 2473-2483.
86. Schreiner, V.; Pfeiffer, S.; Lanzendörfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Gooris, G. S.; Proksch, E.; Bouwstra, J., Barrier Characteristics of Different Human Skin Types Investigated with X-Ray Diffraction, Lipid Analysis, and Electron Microscopy Imaging. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114* (4), 654-660.
87. Damien, F.; Boncheva, M., The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (2), 611-614.
88. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Ponec, M., Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J. Lipid Res.* **2001**, *42* (11), 1759-1770.
89. Janssens, M.; Van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* **2012**, *53* (12), 2755-2766.
90. Corkery, R. W., The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **2002**, *26* (1-2), 3-20.
91. Engberg, O.; Kováčik, A.; Pullmannová, P.; Juhaščík, M.; Opálka, L.; Huster, D.; Vávrová, K., The Sphingosine and Acyl Chains of Ceramide [NS] Show Very Different Structure and Dynamics That Challenge Our Understanding of the Skin Barrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (40), 17383-17387.
92. Narangifard, A.; Wennberg, C. L.; den Hollander, L.; Iwai, I.; Han, H.; Lundborg, M.; Masich, S.; Lindahl, E.; Daneholt, B.; Norlén, L., Molecular reorganization during formation of the human skin barrier studied in situ. *J. Invest. Dermatol.* **2020**.
93. Verhoeven, E.; Kraaimaat, F.; Van De Kerkhof, P.; Van Weel, C.; Duller, P.; Van Der Valk, P.; Van Den Hoogen, H.; Bor, J.; Schers, H.; Evers, A., Psychosocial well-being of

patients with skin diseases in general practice. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2007**, *0* (0), 070206173308001.

94. Elias, P. M.; Williams, M. L.; Holleran, W. M.; Jiang, Y. J.; Schmuth, M., Thematic review series: Skin Lipids. Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (4), 697-714.

95. Elias, P., Defensive Functions of the Stratum Corneum: Integrative Aspects. In *Skin Barrier*, Taylor & Francis Group: New York, 2006; pp 5-14.

96. Fluhr, J. W.; Pfisterer, S.; Gloor, M., Direct Comparison of Skin Physiology in Children and Adults with Bioengineering Methods. *Pediatr. Dermatol.* **2000**, *17* (6), 436-439.

97. Blank, I. H., Measurement of pH of the Skin Surface. *J. Invest. Dermatol.* **1939**, *2* (2), 75-79.

98. Leung, D. Y. M.; Boguniewicz, M.; Howell, M. D.; Nomura, I.; Hamid, Q. A., New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (5), 651-657.

99. Vavrova, K.; Henkes, D.; Struver, K.; Sochorova, M.; Skolova, B.; Witting, M. Y.; Friess, W.; Schreml, S.; Meier, R. J.; Schafer-Korting, M.; Fluhr, J. W.; Kuchler, S., Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (3), 746-753.

100. Ishibashi, M.; Arikawa, J.; Okamoto, R.; Kawashima, M.; Takagi, Y.; Ohguchi, K.; Imokawa, G., Abnormal expression of the novel epidermal enzyme, glucosylceramide deacylase, and the accumulation of its enzymatic reaction product, glucosylsphingosine, in the skin of patients with atopic dermatitis. *Lab. Invest.* **2003**, *83* (3), 397-408.

101. Okamoto, R.; Arikawa, J.; Ishibashi, M.; Kawashima, M.; Takagi, Y.; Imokawa, G., Sphingosylphosphorylcholine is upregulated in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis. *J. Lipid Res.* **2003**, *44* (1), 93-102.

102. Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A., Decreased Level of Ceramides in Stratum Corneum of Atopic Dermatitis: An Etiologic Factor in Atopic Dry Skin? **1991**, *96* (4), 523-526.

103. Macheleidt, O.; Sandhoff, K.; Kaiser, H. W., Deficiency of Epidermal Protein-Bound ω -Hydroxyceramides in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119* (1), 166-173.

104. Paige, D. G.; Morse-Fisher, N.; Harper, J. I., Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *Br. J. Dermatol.* **1994**, *131* (1), 23-27.

105. Richard, G., Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. In *GeneReviews*, University of Washington, Seattle: Seattle (WA), 2001.

106. Bowcock, A. M.; Krueger, J. G., Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **2005**, *5* (9), 699-711.

107. Sidransky, E.; Fartasch, M.; Lee, R. E.; Metlay, L. A.; Abella, S.; Zimran, A.; Gao, W.; Elias, P. M.; Ginns, E. I.; Holleran, W. M., Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease. *Pediatr. Res.* **1996**, *39* (1), 134-141.

108. Holleran, W. M.; Ginns, E. I.; Menon, G. K.; Grundmann, J. U.; Fartasch, M.; McKinney, C. E.; Elias, P. M.; Sidransky, E., Consequences of Beta-Glucocerebrosidase

Deficiency in Epidermis - Ultrastructure and Permeability Barrier Alterations in Gaucher Disease. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93* (4), 1756-1764.

109. Schmuth, M.; Man, M.-Q.; Weber, F.; Gao, W.; Feingold, K. R.; Fritsch, P.; Elias, P. M.; Holleran, W. M., Permeability Barrier Disorder in Niemann–Pick Disease: Sphingomyelin–Ceramide Processing Required for Normal Barrier Homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115* (3), 459-466.

110. Grange, D. K.; Kratz, L. E.; Braverman, N. E.; Kelley, R. I., CHILD syndrome caused by deficiency of 3-hydroxysteroid-8, 7-isomerase. *Am. J. Med. Genet.* **2000**, *90* (4), 328-335.

111. Prausnitz, M. R.; Langer, R., Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1261-1268.

112. Williams, A. C.; Barry, B. W., Penetration enhancers. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, *56* (5), 603-618.

113. Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Hrabálek, A., Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (19), 2273-91.

114. Marjukka Suhonen, T.; A. Bouwstra, J.; Urtti, A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release* **1999**, *59* (2), 149-161.

115. Lane, M. E., Skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447* (1-2), 12-21.

116. Jennings, V.; Gysler, A.; Schäfer-Korting, M.; Gohla, S. H., Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49* (3), 211-218.

117. Vidlářová, L.; Hanuš, J.; Veselý, M.; Ulbrich, P.; Štěpánek, F.; Zbytovská, J., Effect of lipid nanoparticle formulations on skin delivery of a lipophilic substance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *108*, 289-296.

118. Nastiti, C.; Ponto, T.; Abd, E.; Grice, J.; Benson, H.; Roberts, M., Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4), 37.

119. Trotta, M.; Peira, E.; Debernardi, F.; Gallarate, M., Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* **2002**, *241* (2), 319-327.

120. Zhang, Y.-T.; Shen, L.-N.; Wu, Z.-H.; Zhao, J.-H.; Feng, N.-P., Comparison of ethosomes and liposomes for skin delivery of psoralen for psoriasis therapy. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471* (1-2), 449-452.

121. Ascenso, A.; Batista, C.; Cardoso, P.; Mendes, T.; Praça, F.; Bentley, V.; Raposo, S.; Simões, S., Development, characterization, and skin delivery studies of related ultra-deformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 5837.

122. Chauhan, A. S.; Sridevi, S.; Chalasani, K. B.; Jain, A. K.; Jain, S. K.; Jain, N. K.; Diwan, P. V., Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* **2003**, *90* (3), 335-343.

123. Mutalik, S.; Shetty, P. K.; Kumar, A.; Kalra, R.; Parekh, H. S., Enhancement in deposition and permeation of 5-fluorouracil through human epidermis assisted by peptide dendrimers. *Drug Delivery* **2014**, *21* (1), 44-54.

124. Ammala, A., Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35* (2), 113-124.
125. Schaferkorting, M.; Mehnert, W.; Korting, H., Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (6), 427-443.
126. Gardikis, K.; Hatziantoniou, S.; Bucos, M.; Fessas, D.; Signorelli, M.; Felekis, T.; Zervou, M.; Screttas, C. G.; Steele, B. R.; Ionov, M.; Micha-Screttas, M.; Klajnert, B.; Bryszewska, M.; Demetzos, C., New Drug Delivery Nanosystem Combining Liposomal and Dendrimeric Technology (Liposomal Locked-In Dendrimers) for Cancer Therapy. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (8), 3561-3571.
127. Pullmannova, P.; Stankova, K.; Pospisilova, M.; Skolova, B.; Zbytovska, J.; Vavrova, K., Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *BBA - Biomembranes* **2014**, *1838* (8), 2115-2126.
128. Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (9), 2159-2165.
129. Sochorova, M.; Stankova, K.; Pullmannova, P.; Kovacik, A.; Zbytovska, J.; Vavrova, K., Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
130. Lofgren, H.; Pascher, I., Molecular Arrangements of Sphingolipids - Monolayer Behavior of Ceramides. *Chem. Phys. Lipids* **1977**, *20* (4), 273-284.
131. What and why: Langmuir films. *Biolin Scientific* <https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett> (dostupné online 17. 07. 2020).
132. Barnes, G. T.; Gentle, I. R., Insoluble monolayers and Langmuir-Blodgett films. In *Interfacial Science: an Introduction*, Oxford University Press Inc.: New York, 2011; pp 107-149.
133. Meunier, J., Why a Brewster angle microscope? *Colloids Surf., A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *171* (1-3), 33-40.
134. Imaging the Structure of Thin Films: Brewster Angle Microscopy. *Biolin Scientific* <https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett> (dostupné online 17. 07. 2020).
135. What and why: Langmuir-Blodgett films. *Biolin Scientific* <https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett> (dostupné online 17. 07. 2020).
136. ten Grotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; van Miltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A., Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophys. J.* **1996**, *71* (3), 1389-99.
137. Kada, G.; Kienberger, F.; Hinterdorfer, P., Atomic force microscopy in bionanotechnology. *Nano Today* **2008**, *3* (1-2), 12-19.
138. Brockman, H., Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9* (4), 438-443.

139. Villanueva, M. E.; Lanterna, A. E.; Vico, R. V., Hydrophobic silver nanoparticles interacting with phospholipids and stratum corneum mimic membranes in Langmuir monolayers. *J. Colloid Interf. Sci.* **2019**, *543*, 247-255.
140. Elderdfi, M.; Sikorski, A. F., Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions. *Chem. Phys. Lipids* **2018**, *212*, 61-72.
141. Ale, E. C.; Maggio, B.; Fanani, M. L., Ordered-disordered domain coexistence in ternary lipid monolayers activates sphingomyelinase by clearing ceramide from the active phase. *BBA - Biomembranes* **2012**, *1818* (11), 2767-2776.
142. Pieroni, G.; Gargouri, Y.; Sarda, L.; Verger, R., Interactions of Lipases with Lipid Monolayers - Facts and Questions. *Adv Colloid Interfac* **1990**, *32* (4), 341-378.
143. Jungner, M.; Ohvo, H.; Slotte, J. P., Interfacial regulation of bacterial sphingomyelinase activity. *BBA - Lipids and Lipid Metab.* **1997**, *1344* (3), 230-240.
144. Todosijevic, M. N.; Brezesinski, G.; Savic, S. D.; Neubert, R. H. H., Sucrose esters as biocompatible surfactants for penetration enhancement: An insight into the mechanism of penetration enhancement studied using stratum corneum model lipids and Langmuir monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *99*, 161-172.
145. Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.; Vavrysová, H.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2011**, *1811* (3), 129-137.
146. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Mellese, L.; Ghidoni, R.; Caputo, R., Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch. Dermatol.* **1994**, *130* (4), 452-6.
147. Grubauer, G.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J. Lipid Res.* **1989**, *30* (3), 323-33.
148. Fasano, W. J.; Hinderliter, P. M., The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18* (5), 725-729.
149. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *BBA - Biomembranes* **2008**, *1778* (5), 1344-1355.
150. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. **1998**, *96* (1-2), 141-157.
151. Rerek, M. E.; Chen; Markovic, B.; Van Wyck, D.; Garidel, P.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (38), 9355-9362.
152. J. Moore, M. E. R. D., Insights into the Molecular Organization of Lipids in the Skin Barrier from Infrared Spectroscopy Studies of Stratum Corneum Lipid Models. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80* (0), 16-22.
153. Školová, B.; Hudská, K.; Pullmannová, P.; Kováčik, A.; Palát, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vávrová, K., Different Phase Behavior and Packing of

Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (35), 10460-10470.

154. Pendaries, V.; Malaisse, J.; Pellerin, L.; Le Lamer, M.; Nachat, R.; Kezic, S.; Schmitt, A.-M.; Paul, C.; Poumay, Y.; Serre, G.; Simon, M., Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation. **2014**, *134* (12), 2938-2946.

155. Barker, C. L.; McHale, M. T.; Gillies, A. K.; Waller, J.; Pearce, D. M.; Osborne, J.; Hutchinson, P. E.; Smith, G. M.; Pringle, J. H., The Development and Characterization of an In Vitro Model of Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123* (5), 892-901.

156. Damour, O.; Augustin, C.; Black, A. F., Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. *Med. Biol. Eng. Comput.* **1998**, *36* (6), 825-832.

157. Lemper, M.; De Paepe, K.; Rogiers, V., Practical Problems Encountered during the Cultivation of an Open-Source Reconstructed Human Epidermis Model on a Polycarbonate Membrane and Protein Quantification. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2014**, *27* (2), 106-112.

158. Frankart, A.; Malaisse, J.; De Vuyst, E.; Míner, F.; De Rouvroit, C. L.; Poumay, Y., Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp. Dermatol.* **2012**, *21* (11), 871-875.

159. Reijnders, C. M. A.; Van Lier, A.; Roffel, S.; Kramer, D.; Scheper, R. J.; Gibbs, S., Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21* (17-18), 2448-2459.

160. Wallmeyer, L.; Lehnen, D.; Eger, N.; Sochorová, M.; Opálka, L.; Kováčik, A.; Vávrová, K.; Hedtrich, S., Stimulation of PPAR α normalizes the skin lipid ratio and improves the skin barrier of normal and filaggrin deficient reconstructed skin. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *80* (2), 102-110.

161. Ud-Din, S.; Bayat, A., Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair Regen.* **2017**, *25* (2), 164-176.

162. Godin, B.; Touitou, E., Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (11), 1152-1161.

163. Simon, G. A.; Maibach, H. I., The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2000**, *13* (5), 229-234.

164. Harrison, S. M.; Barry, B. W.; Dugard, P. H., Effects of freezing on human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* **1984**, *36* (4), 261-262.

165. Swarbrick, J.; Lee, G.; Brom, J., Drug Permeation through Human Skin: I. Effects of Storage Conditions of Skin. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78* (1), 63-66.

166. Wilkinson, S. C.; Maas, W. J. M.; Nielsen, J. B.; Greaves, L. C.; Van De Sandt, J. J. M.; Williams, F. M., Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2006**, *79* (5), 405-413.

167. Stepanov, D.; Canipa, S.; Wolber, G., HuskinDB, a database for skin permeation of xenobiotics. *Sci. Data* **2020**, *7* (1).

168. Kopečná, M.; Macháček, M.; Prchalová, E.; Štěpánek, P.; Drašar, P.; Kotora, M.; Vávrová, K., Galactosyl Pentadecene Reversibly Enhances Transdermal and Topical Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2017**, *34* (10), 2097-2108.
169. Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S., Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *J. Control. Release* **2006**, *110* (2), 307-313.
170. Vostalova, J.; Galandakova, A.; Zalesak, B.; Lichnovska, R.; Cizkova, K.; Ulrichova, J.; Svobodova, A. R., Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants. *J. Appl. Toxicol.* **2019**, *39* (5), 773-782.
171. Portugal-Cohen, M.; Soroka, Y.; Frušić-Zlotkin, M.; Verkhovsky, L.; Brégégère, F. M.; Neuman, R.; Kohen, R.; Milner, Y., Skin organ culture as a model to study oxidative stress, inflammation and structural alterations associated with UVB-induced photodamage. *Exp. Dermatol.* **2011**, *20* (9), 749-755.
172. Steinstraesser, L.; Rittig, A.; Gevers, K.; Sorokin, M.; Hirsch, T.; Kesting, M.; Sand, M.; Al-Benna, S.; Langer, S.; Steinau, H. U.; Jacobsen, F., A human full-skin culture system for interventional studies. *Eplasty* **2009**, *9*, e5.
173. Zhou, L.; Zhang, X.; Paus, R.; Lu, Z., The renaissance of human skin organ culture: A critical reappraisal. *Differentiation* **2018**, *104*, 22-35.
174. Neil, J. E.; Brown, M. B.; Williams, A. C., Human skin explant model for the investigation of topical therapeutics. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1).
175. Opalka, L.; Kovacik, A.; Sochorova, M.; Roh, J.; Kunes, J.; Lenco, J.; Vavrova, K., Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5456-5459.
176. Kopečná, M.; Macháček, M.; Nováčková, A.; Paraskevopoulos, G.; Roh, J.; Vávrová, K., Esters of terpene alcohols as highly potent, reversible, and low toxic skin penetration enhancers. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1).
177. Houšková, D. Vliv generace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020.
178. Chladová, P. Vliv koncentrace polyamidoaminodendrimerů s ethylendiaminovým jádrem a aminoskupinami na periférii na (trans)dermální podání 5-fluorouracilu. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020.
179. Nováčková, A.; Sagrafena, I.; Pullmannová, P.; Paraskevopoulos, G.; Dwivedi, A.; Mazumder, A.; Růžičková, K.; Slepicka, P.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Acidic pH is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids in Vitro. *J. Invest. Dermatol.* **2021**.
180. Kligman, A. M.; Christophel, E., Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch. Dermatol.* **1963**, *88* (6), 702-&.
181. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37* (8), 911-917.
182. Skolova, B.; Janusova, B.; Zbytovska, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepicka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624-33.

183. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Imokawa, G.; Jackson, S.; Lee, J. M.; Elias, P. M., Beta-Glucocerebrosidase Activity in Murine Epidermis - Characterization and Localization in Relation to Differentiation. *J. Lipid Res.* **1992**, *33* (8), 1201-1209.
184. Mimeault, M.; Bonenfant, D., FTIR spectroscopic analyses of the temperature and pH influences on stratum corneum lipid phase behaviors and interactions. *Talanta* **2002**, *56* (3), 395-405.
185. Pullmannová, P.; Ermakova, E.; Kováčik, A.; Opálka, L.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Kučerka, N.; Vávrová, K., Long and very long lamellar phases in model stratum corneum lipid membranes. *J. Lipid Res.* **2019**, *60* (5), 963-971.
186. Hatfield, R. M.; Fung, L. W., Molecular properties of a stratum corneum model lipid system: large unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **1995**, *68* (1), 196-207.
187. Pham, Q. D.; Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A.; Sparr, E.; Topgaard, D., Solid and fluid segments within the same molecule of stratum corneum ceramide lipid. *Q. Rev. Biophys.* **2018**, *51*.
188. Wang, E.; Klauda, J. B., Molecular Structure of the Long Periodicity Phase in the Stratum Corneum. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (42), 16930-16943.
189. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *88* (6), 714-8.
190. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Salomons-de Vries, M. A.; van der Spek, J. A.; Bras, W., Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study. *Int. J. Pharm.* **1992**, *84* (3), 205-216.
191. Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloëuf, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L., The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (9), 2215-25.
192. Šrámová, E. Studium vlivu koncentrace cholesterolu na monovrstevné modely. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2020.
193. Norlen, L.; Gil, I. P.; Simonsen, A.; Descouts, P., Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158* (3), 386-400.
194. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *BBA - Biomembranes* **2006**, *1758* (7), 923-33.
195. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W., Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *97* (6), 1005-12.
196. Elias, P. M., The how, why and clinical importance of stratum corneum acidification. *Exp. Dermatol.* **2017**, *26* (11), 999-1003.

197. Gabrielli, G.; Caminati, G.; Puggelli, M., Interactions and reactions of monolayers and Langmuir-Blodgett multilayers with compounds in the bulk phase. *Adv Colloid Interfac* **2000**, *87* (2-3), 75-111.
198. Ielasi, F.; Ledall, J.; Anes, A. P.; Fruchon, S.; Caminade, A. M.; Poupot, R.; Turrin, C. O.; Blanzat, M., Influence of PPH dendrimers' surface functions on the activation of human monocytes: a study of their interactions with pure lipid model systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (31), 21871-21880.
199. Berényi, S.; Mihály, J.; Wacha, A.; Tóke, O.; Bóta, A., A mechanistic view of lipid membrane disrupting effect of PAMAM dendrimers. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **2014**, *118*, 164-171.
200. Lind, T. K.; Zielińska, P.; Wacklin, H. P.; Urbańczyk-Lipkowska, Z.; Cárdenas, M., Continuous Flow Atomic Force Microscopy Imaging Reveals Fluidity and Time-Dependent Interactions of Antimicrobial Dendrimer with Model Lipid Membranes. *ACS Nano* **2014**, *8* (1), 396-408.
201. Mueller, J.; Oliveira, J. S. L.; Barker, R.; Trapp, M.; Schroeter, A.; Brezesinski, G.; Neubert, R. H. H., The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models. *BBA - Biomembranes* **2016**, *1858* (9), 2006-2018.
202. Strati, F.; Neubert, R. H. H.; Opálka, L.; Kerth, A.; Brezesinski, G., Non-ionic surfactants as innovative skin penetration enhancers: insight in the mechanism of interaction with simple 2D stratum corneum model system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *157*, 105620.
203. Jevtić, M.; Löwa, A.; Nováčková, A.; Kováčik, A.; Kaessmeyer, S.; Erdmann, G.; Vávrová, K.; Hedtrich, S., Impact of intercellular crosstalk between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on skin homeostasis. *BBA - Mol. Cell Res.* **2020**, *1867* (8), 118722.
204. Chen, S.; Einspanier, R.; Schoen, J., Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochem. Cell Biol.* **2015**, *144* (5), 509-515.
205. Moner, V.; Fernández, E.; Rodríguez, G.; Cócera, M.; Barbosa-Barros, L.; De La Maza, A.; López, O., Lamellar body mimetic system: An up-to-down repairing strategy of the stratum corneum lipid structure. *Int. J. Pharm.* **2016**, *510* (1), 135-143.
206. Van Smeden, J.; Hoppel, L.; Van Der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.* **2011**, *52* (6), 1211-1221.
207. Hönzke, S.; Wallmeyer, L.; Ostrowski, A.; Radbruch, M.; Mundhenk, L.; Schäfer-Korting, M.; Hedtrich, S., Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and β -Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents. *J. Invest. Dermatol.* **2016**, *136* (3), 631-639.
208. Coulomb, B.; Lebreton, C.; Dubertret, L., Influence of Human Dermal Fibroblasts on Epidermalization. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *92* (1), 122-125.
209. Hickman, J., Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices. *J. Rare Dis. Res. Treat.* **2016**, *1*, 46-52.
210. Tracy, L. E.; Minasian, R. A.; Caterson, E. J., Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv. Wound Care* **2016**, *5* (3), 119-136.

211. Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Covalently Bound Lipids of Human Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *92* (1), 109-111.
212. Vávrová, K.; Henkes, D.; Strüver, K.; Sochorová, M.; Školová, B.; Witting, M. Y.; Friess, W.; Schreml, S.; Meier, R. J.; Schäfer-Korting, M.; Fluhr, J. W.; Kückler, S., Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. **2014**, *134* (3), 746-753.
213. Hausmann, C.; Zoschke, C.; Wolff, C.; Darvin, M. E.; Sochorová, M.; Kováčik, A.; Wanjiku, B.; Schumacher, F.; Tigges, J.; Kleuser, B.; Lademann, J.; Fritsche, E.; Vávrová, K.; Ma, N.; Schäfer-Korting, M., Fibroblast origin shapes tissue homeostasis, epidermal differentiation, and drug uptake. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1).
214. Aqil, M.; Ahad, A.; Sultana, Y.; Ali, A., Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (23-24), 1061-1067.
215. Novotny, J.; Kovarikova, P.; Novotny, M.; Janusova, B.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Dimethylamino Acid Esters as Biodegradable and Reversible Transdermal Permeation Enhancers: Effects of Linking Chain Length, Chirality and Polyfluorination. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (4), 811-821.
216. Hirvonen, J.; Sutinen, R.; Paronen, P.; Urtti, A., Transdermal penetration enhancers in rabbit pinna skin: Duration of action, skin irritation, and in vivo/in vitro comparison. *Int. J. Pharm.* **1993**, *99* (2-3), 253-261.
217. Kopečná, M.; Kováčik, A.; Kučera, O.; Macháček, M.; Sochorová, M.; Audrlická, P.; Vávrová, K., Fluorescent Penetration Enhancers Reveal Complex Interactions among the Enhancer, Drug, Solvent, and Skin. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (2), 886-897.
218. Kopečná, M.; Macháček, M.; Prchalová, E.; Štěpánek, P.; Drašar, P.; Kotora, M.; Vávrová, K., Dodecyl Amino Glucoside Enhances Transdermal and Topical Drug Delivery via Reversible Interaction with Skin Barrier Lipids. *Pharm. Res.* **2017**, *34* (3), 640-653.
219. Vávrová, K.; Lorencová, K.; Novotný, J.; Holý, A.; Hrabálek, A., Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: Influence of pH, ion-pairing and skin species. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70* (3), 901-907.
220. Diblíková, D.; Kopečná, M.; Školová, B.; Krečmerová, M.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Transdermal Delivery and Cutaneous Targeting of Antivirals using a Penetration Enhancer and Lysolipid Prodrugs. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (4), 1071-1081.
221. PubChem Compound Summary for CID 60613, Cidofovir. *National Center for Biotechnology Information* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cidofovir> (dostupné online 16. 03. 2021).
222. Mitragotri, S., Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Release* **2003**, *86* (1), 69-92.
223. Venuganti, V. V. K.; Perumal, O. P., Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98* (7), 2345-2356.
224. Yen Moore, A., Clinical applications for topical 5-fluorouracil in the treatment of dermatological disorders. *J. Dermatol. Treat.* **2009**, *20* (6), 328-335.

225. Souhrn údajů o přípravku Verrumal. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0060890> (dostupné online 17. 02. 2021).
226. Emmert, S.; Schön, M. P.; Haenssle, H. A., Molecular Biology of Basal and Squamous Cell Carcinomas. In *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*, Reichrath, J., Ed. Springer New York: New York, NY, 2014; pp 234-252.
227. Venuganti, V. V.; Perumal, O. P., Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361* (1-2), 230-8.

Seznam odborných publikací

1. Publikace zahrnuté v této disertační práci

Příloha 1

Acidic pH is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids *in Vitro*

Nováčková, A.[#]; Sagrafena, I.[#]; Pullmannová, P.; Paraskevopoulos, G.; Dwivedi, A.; Mazumder, A.; Růžičková, K.; Slepíčka, P.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. [#]equal contribution

Journal of Investigative Dermatology **2021**, *in press*. (IF₂₀₂₁=7,143; D1)

DOI: [10.1016/j.jid.2021.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.02.014)

Podíl na publikaci:

- příprava monovrstev (syntetické směsi, izolované lipidy*) a jejich vyhodnocení
- nanášení vzorků na pevný podklad pro AFM, vyhodnocení dat
- příprava deuterovaných směsí na IR a jejich vyhodnocení
- grafické znázornění výsledků
- sepsání manuskriptu

*jako konzultantka diplomové práce PharmDr. Karolíny Růžičkové

Příloha 2

Impact of Intercellular Crosstalk between Epidermal Keratinocytes and Dermal Fibroblasts on Skin Homeostasis

Jevtić, M.; Löwa, A.; Nováčková, A.; Kováčik, A.; Kaessmeyer, S.; Erdmann, G.; Vávrová, K.; Hedtrich, S.

BBA Molecular Cell Research **2020**, *1867* (8):118722. (IF₂₀₂₀=4,739; Q1)

DOI: [10.1016/j.bbamcr.2020.118722](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118722)

Podíl na publikaci:

- příprava SC na IR a vyhodnocení dat
- extrakce lipidů SC, HPTLC analýza, kvantifikace a interpretace výsledků
- grafické znázornění výsledků, sepsání příslušné metodiky a výsledků, revize manuskriptu

Esters of Terpene Alcohols as Highly Potent, Reversible, and Low Toxic Skin Penetration Enhancers

Kopečná, M.; Macháček, M.; Nováčková, A.; Paraskevopoulos, G.; Roh, J.; Vávrová, K.

Scientific Reports **2019**, 9:14617. (IF₂₀₁₉=4,011; Q1)

DOI: [10.1038/s41598-019-51226-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51226-5)

Podíl na publikaci:

- permeační studie s cidofovirem, zpracování dat
- sepsání příslušné metodiky a výsledků, revize manuskriptu

2. Ostatní publikace nezahrnuté v této práci

***Gentiana lutea* Extract Modulates Ceramide Synthesis in Primary and Psoriasis-Like Keratinocytes**

Gendrisch, F.; Nováčková, A.; Sochorová, M.; Haarhaus, B.; Vávrová, K.; Schempp, C. M.; Wölfle, U.

Molecules **2020**, *25* (8):1832. (IF₂₀₂₀=**3,06**; Q2)

DOI: [10.3390/molecules25081832](https://doi.org/10.3390/molecules25081832)

V této publikaci byl hodnocen vliv extraktu z *Gentiana lutea* na syntézu Cer v primárních keratinocytech a keratinocytech s navozeným defektem simulujícím kožní onemocnění psoriáza. Byla využita stejná metodika pro hodnocení pomocí HPTLC jako v publikaci v **Příloze 2**, s rozdílem v tom, že se nejednalo o SC z kultivovaných modelů, avšak o samotné keratinocyty. V této studii bylo dokázáno, že extrakt z *Gentiana lutea* zvyšuje syntézu některých podskupin Cer a jejich prekurzorů, a tím pádem by mohl sloužit jako potencionální léčba onemocnění se sníženou syntézou Cer (jako je např. psoriáza).

Podíl na publikaci:

- extrakce lipidů z keratinocytů, HPTLC analýza, kvantifikace a interpretace výsledků
- grafické znázornění výsledků, sepsání příslušné metodiky a výsledků, revize manuskriptu

Investigation of TEMPO partitioning in different skin models as measured by EPR spectroscopy – Insight into the stratum corneum

Elpelt, A.; Ivanov, D.; Nováčková, A.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Saeidpour, S.; Teutloff, C.; Lohan, S. B.; Lademann, J.; Vávrová, K.; Hedtrich, S.; Meinke, M. C.

Journal of Magnetic Resonance **2020**, *310*:106637. (IF₂₀₂₀=**2,689**; Q2)

DOI: [10.1016/j.jmr.2019.106637](https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.106637)

V publikaci byl hodnocen rozdělovací koeficient látky 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl do jednotlivých kompartmentů kůže pomocí elektronové paramagnetické rezonance. Byl pozorován rozdíl mezi různými typy modelů (prasečí, lidská kůže, RHS), včetně korelace s obsahem lipidů. Pro analýzu lipidů byla využita stejná metodika pro FTIR a HPTLC jako v publikaci v **Příloze 2**. Technika byla vyhodnocena jako vhodná pro stanovení rozdílů mezi různými modely kůže a může tak doplňovat již stávající metody hodnocení SC.

Podíl na publikaci:

- příprava SC na IR, extrakce lipidů SC, HPTLC analýza, vyhodnocení a interpretace
- grafické znázornění výsledků, sepsání příslušné metodiky a výsledků, revize manuskriptu

Aktivní účast na konferencích

1. Přednášky

Interaction of PAMAM Dendrimers with Skin Barrier Lipids Studied by Monolayers

Nováčková, A.; Paraskevopoulos, G.; Vávrová, K.

11th Postgradual and 9th Postdoc Science Conference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (27.-28. 1. 2021)

Delivery of Skin Barrier Lipids to Reconstructed Human Epidermis

Nováčková, A.; Opálka, L.; Vávrová, K.; Jonca, N.

10th Postgradual and 8th Postdoc Science Conference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (22.-23. 1. 2020)

Liposomal Formulations for Topical Application of Imiquimod

Nováčková, A.; Švecová, B.; Hladký, P.; Tírala, P.; Zbytovská, J.; Vávrová, K.

9th Postgradual and 7th Postdoc Science Conference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (23.-24. 1. 2019)

Monolayer Study of Glucosylceramide-to-Ceramide Processing During Skin Barrier Formation

Nováčková, A.; Švecová, B.; Vávrová, K.; Zbytovská, J.

8th Postgradual and 6th Postdoc Science Conference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (24.-25. 1. 2018)

Monolayer Lipid Model of β -Glucocerebrosidase Deficiency in the Skin

Nováčková, A.; Školová, B.; Slepíčka, P.; Vávrová, K.; Zbytovská J.

7th Postgradual and 5th Postdoc Science Conference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (7.-8. 2. 2017)

Study of the Skin Barrier by Lipid Monolayers

Nováčková, A.; Slepíčka, P.; Vávrová, K.; Školová B.

XXIV. Studentská vědecká konference, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, Česká republika (27.-28. 4. 2016)

2. Posterová sdělení

Glucosylceramide-to-ceramide processing during skin barrier formation studied by monolayers

Nováčková, A.; Slepíčka, P.; Zbytovská, J.; Vávrová, K.

Skin and Formulation 5th Symposium & 17th Skin Forum, Remeš, Francie (23.-24. 9. 2019) – ocenění za poster

Novel formulations with imiquimod for topical application

Nováčková, A.; Švecová, B.; Hladký, P.; Tírala, P.; Zbytovská, J.; Vávrová K.

16th Skin Forum: Skin Health and Topical Formulation – new insights and perspectives, Tallinn, Estonsko (20. -21. 6. 2018)

Monolayer Study of Glucosylceramide-to-Ceramide Processing During Skin Barrier Formation

Nováčková, A.; Školová, B.; Vávrová, K.; Zbytovská, J.

Gordon Research Conferences, Barrier Function of Mammalian Skin: Convergence of Biological and Technological Frontiers of Skin Barrier, Waterville Valley, USA (13.-18. 8. 2017)

Monolayer Lipid model of β Glucocerebrosidase Deficiency in the Skin

Nováčková, A.; Vávrová, K.; Školová, B.

46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Mnichov, Německo (7.-8. 9. 2016)

Přílohy