

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



INTERAKCE CIDOFOVIRU A BRINCIDOFOVIRU S LIDSKOU KŮŽÍ IN VITRO

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Lenka Vencovská

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.
Konzultant: PharmDr. Monika Kopečná, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce prof. PharmDr. Kateřině Vávrové Ph.D., za poskytnuté informace, odborné rady a za milý a profesionální přístup při vypracování této práce. Za pečlivé vedení při experimentálních pokusech, cenné rady, trpělivost a za HPLC analýzu bych ráda poděkovala PharmDr. Monice Kopečné, Ph.D. Také chci poděkovat dalším pracovníkům katedry organické a bioorganické chemie a Ivě Vencovské za měření IČ spekter.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. 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 2024

Lenka Vencovská

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Lenka Vencovská

Školitel: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Název diplomové práce: Interakce cidofoviru a brincidofoviru s lidskou kůží in vitro

Brincidofovir (BCDV) je širokospektré antivirotické léčivo využívané pro léčbu různých virových infekcí. Jedná se o proléčivo, které je po dosažení cílového místa přeměňováno na cidofovir (CDV), jehož topická aktivita byla prostudována.

Aplikace léčiv do kůže, nebo přes kůži má oproti konvenčním cestám podání řadu předností. Komplikací u tohoto typu podání je neschopnost léčiv prostupovat přes kůži v dostatečném množství. Abychom zlepšili prostup do kůže, používáme látky nazývané akceleranty transdermální permeace. Pro tuto studii byl použit dodecylester kyseliny 6-dimethylamino-hexanové (DDAK).

V mé práci se zabývám studií prostupu BCDV do izolované lidské kůže, vlivem přidavku akceleraantu transdermální permeace na tento prostup a změnami, kterými léčivo může působit na kožní bariéru. Změny kožní bariéry jsou studovány za pomoci metod infračervené spektroskopie, elektrické impedance a ztráty vody přes kůži.

Výsledky práce ukazují, že na množství prošlé do epidermis nemá tak výrazný vliv zvýšení koncentrace léčiva jako přidání akceleraantu DDAK, a že po aplikaci těchto látek nedochází k trvalému poškození kožní bariéry.

I malá koncentrace BCDV (0,06%) by mohla být v kombinaci s DDAK výhodným řešením pro léčbu virových onemocnění kůže, bez systémových nežádoucích účinků a bez reverzibilního poškození kožní bariéry. Nízká koncentrace je výhodná i z ekonomického hlediska, kdy cena přípravku je často limitujícím faktorem u topických či transdermálních podání.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of organic and bioorganic chemistry

Lenka Vencovská

Supervisor: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Interaction of cidofovir and brincidofovir with human skin in vitro

Brincidofovir (BCDV) is a broad spectrum antiviral drug used for the treatment of various viral infections. This prodrug is after targeting the site converted to cidofovir (CDV), whose topical activity has been studied.

The application of drugs into or through the skin has a number of advantages over conventional routes of administration. The disadvantage of this type of administration is the inability of drugs to penetrate through the skin in sufficient quantities. To improve skin permeation, we use substances called transdermal permeation enhancers. 6-dimethylaminohexanoic acid dodecyl ester (DDAK) was used for this study.

In my thesis, I have studied the penetration of BCDV into isolated human skin, the effect of the addition of transdermal permeation enhancer on this permeation and the changes that the drug may exert on the skin barrier. The changes in the skin barrier have been studied by infrared spectroscopy, electrical impedance and water loss through the skin.

The results of the study show that the amount of drug passed into the epidermis is not as significantly affected by increasing the concentration of the drug as by the addition of the DDAK enhancer, and that there is no permanent damage on the skin barrier after the application of these substances.

Even a small concentration of BCDV (0.06%) in combination with DDAK could be an advantageous solution for the treatment of viral skin diseases, without systemic side effects and without reversible damage to the skin barrier. The low concentration is also advantageous from an economic point of view, where the price of the product is often a limiting factor for topical or transdermal administrations.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Stavba kůže.....	9
2.1.1	Epidermis.....	10
2.1.2	Dermis	11
2.1.3	Hypodermis	11
2.2	Kožní bariéra.....	11
2.2.1	Kožní lipidy	11
2.2.2	Ceramidy	12
2.2.3	Cholesterol a mastné kyseliny.....	12
2.3	Topické a transdermální podání léčiv	12
2.4	Akceleranty transdermální permeace	13
2.4.1	Mechanismu účinku akceleračních transdermálních permeací.....	14
2.4.2	DDAK	14
2.5	Cidofovir (CDV).....	15
2.5.1	Mechanismus účinku a farmakokinetické vlastnosti.....	15
2.5.2	Použití cidofoviru.....	15
2.6	Brincidofovir (BCDV).....	16
2.6.1	Mechanismus účinku.....	16
2.6.2	Použití BCDV	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1	Použité chemikálie	18
3.2	Kůže.....	18
3.3	Příprava donorů	18
3.3.1	Donorové vzorky pro studium permeability	18
3.3.2	Donorové vzorky pro studium reverzibility	19
3.3.3	Vzorky pro studium mikrostruktury pomocí IČ spektroskopie.....	19
3.4	Akceptorová fáze	19
3.5	Modifikované Franzovy difúzní cely	20
3.6	Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akceleračního DDAK na tento proces.....	21
3.6.1	Stripování	21
3.6.2	Epidermis, dermis a zbytek kůže	21
3.7	Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci BCDV, CDV a DDAK.....	21
3.7.1	Ztráta vody přes kůži (TEWL).....	22
3.7.2	Elektrická impedance (EI)	22
3.8	Analytické metody HPLC.....	22
3.9	Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie	23
3.10	Statistické zpracování dat	23
4	VÝSLEDKY.....	24

4.1	Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akcelorantu DDAK na tento proces.....	24
4.2	Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci CDV, BCDV a DDAK.....	30
4.3	Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie	32
5	DISKUZE	34
5.1	Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akcelorantu DDAK na tento proces.....	34
5.2	Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci CDV, BCDV a DDAK.....	35
5.3	Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie	35
6	ZÁVĚR	36
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	37
8	CITOVANÁ LITERATURA	38

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Brincidofovir (BCDV) je dlouhodobě působící antivirotikum vyvinuté společností Chimerix.¹ Je využíván pro jeho vysokou aktivitu po perorálním podání proti širokému spektru DNA virů. Podání léčiv přes kůži nabízí široký potenciál, snižuje riziko systémových nežádoucích účinků, zajišťuje stabilnější plazmatické koncentrace léčiva a také usnadňuje jeho aplikaci. Domníváme se, že kožní podání BCDV dává smysl, protože jako proléčivo je přeměňován na cidofovir (CDV), jehož topická aktivita byla již zkoumána, a to s nadějnými výsledky.²

Touto prací navazuji na moji předešlou práci³ z roku 2016 „Studium prostupu protivirového léčiva brincidofoviru do kůže“, kde bylo zjištěno, že poměrně malé množství BCDV přípravku v kombinaci s permeačním akcelerantem by mohlo být efektivním způsobem v terapii virových infekcí.

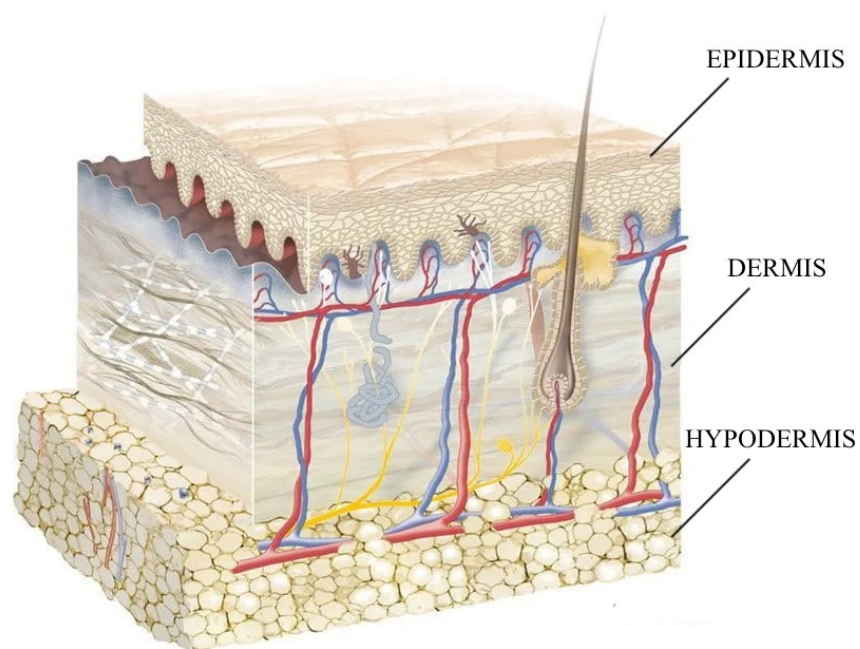
Cílem této nové studie bylo studovat prostup nižších koncentrací BCDV do lidské kůže a vliv akceleračních transdermálních permeací na prostup přes kůži. Do této práce byly vybrány 10krát nižší koncentrace léčiva, tedy 0,06% BCDV a 0,2% BCDV. Dále bylo potřeba prostudovat, jestli po kožním podání BCDV nebo CDV nedochází k trvalému poškození kožní bariéry, a sledovat interakce těchto léčiv se strukturami *stratum corneum* pomocí infračervené spektroskopie.

O topické aplikaci BCDV zatím nejsou ve vědecké literatuře žádné studie, dohledala jsem pouze jednu čínskou patentovou přihlášku⁴, která popisuje přípravu různých krémů s obsahem BCDV, ale nikoliv jeho účinnost. Účinnost BCDV byla poprvé studována námi (Skin barrier research group) na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stavba kůže

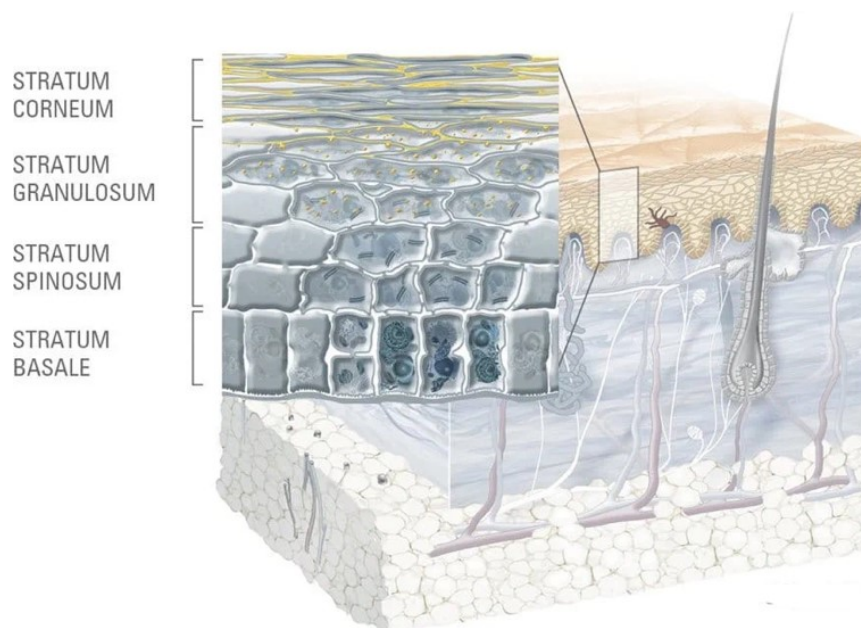
Kůže je největším orgánem lidského těla, jak plochou, tak i svojí hmotností, v dospělosti tvoří cca 7% celkové hmotnosti. Kůže plní několik funkcí, které jsou pro život nepostradatelné. Základní vlastností této přirozené bariéry je bránit vnitřní prostředí našeho organismu před okolním prostředím a zároveň před nadměrnými ztrátami vody a elektrolytů z organismu.^{5,6} Další funkce kůže zahrnují vnímání bolesti, tepla, chladu a regulaci tělesné teploty. Kůže se skládá ze tří hlavních vrstev. Svrchní a tenčí vrstva tvořená epiteliální tkání je epidermis. Hlubší, tlustší vrstva tvořená pojivovou tkání je dermis. Třetí vrstvu tvoří podkožní vazivo, hypodermis.⁵



Obr.1. Struktura kůže ⁷

2.1.1 Epidermis

Epidermis je vnější vrstva kůže. Je tvořena vrstveným dlaždicovým epitelem a není nijak cévně zásobena.^{5,7} Sestává ze čtyř vrstev – *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum corneum*. Tyto vrstvy jsou tvořeny různě diferencovanými buňkami, které prochází neustálým vývojem. Ukládá se do nich keratin a postupně se přeměňují a putují k povrchu kůže, aby nahradily buňky, které jsou ve vrstvě nad nimi. Tento vývoj epidermálních buněk, na jehož konci je kompetentní kožní bariéra, je nazýván keratinizace a trvá asi 30 dní.⁸



Obr. 2. Struktura epidermis⁷

- *Stratum basale*
Stratum basale je nejspodnější vrstva, která odděluje epidermis od dermis. Probíhá zde vznik a dělení nových buněk, keratinocytů.
- *Stratum spinosum*
Ve stratum spinosum keratinocyty rostou, získávají vřetenovitý tvar a dochází k jejich propojení s desmozomy.
- *Stratum granulosum*
V této vrstvě začíná proces keratinizace, tvoří se granula s obsahem prekurzoru keratinu a dále se diferencují. Buňky směrem k povrchu podléhají buněčné smrti, granule se přeměňují na keratin a epidermální lipidy.^{7,8}
- *Stratum corneum (SC)*
SC je nejzvnější vrstvou kůže, přichází tak do kontaktu s ostatními látkami a je zodpovědné za její bariérovou funkci.^{9,10} SC se skládá hlavně z ceramidů, volných mastných kyselin, cholesterolu a proteinů, hlavně keratinu obsaženého v korneocytech.^{11,12} Zbytek SC je tvořen organickými sloučeninami a vodou, tyto složky zajišťují, aby kůže zůstala poddajná a vláčná.⁹ SC je důležité při omezování pohybu vody přes kůži. Fyziologicky se denně přes kůži vypaří přibližně 0,2-0,4 l, což označujeme jako transepidermální ztrátu vody.^{13,14}

2.1.2 Dermis

Dermis je střední vrstva kůže, která je tvořena především kolagenovými a elastickými vlákny. Představuje fyziologickou podporu pro vnější epidermis. Průměrná tloušťka dermis dosahuje 3-5 mm. Díky bohatému prokrvení je tato vrstva klíčová pro udržení a regulaci tělesné teploty. Nachází se v ní velké množství nervových zakončení, cév, lymfatických žláz, tukových buněk, potních a mazových žláz a je také bohatě inervována. Dále obsahuje hladké svalstvo, jako vzpřimovače chlupů.^{8,15}

2.1.3 Hypodermis

Hypodermis je tvořena pojivovou tkání, vazivem a různě velkými tukovými buňkami. Slouží jako zásoba energie a mechanická obrana těla. Najdeme zde krevní a lymfatické cévy, které prostupují do dermis. Její tloušťka je okolo několika milimetrů.¹⁵ Význam hypodermis jako bariéry z hlediska průniku látek, je zanedbatelný, protože léčivo prostupující kůží vstupuje do oběhového systému dříve, než se dostane do podkoží, ačkoli tuková tkáň může sloužit jako zásobárna léčiv.¹¹

2.2 Kožní bariéra

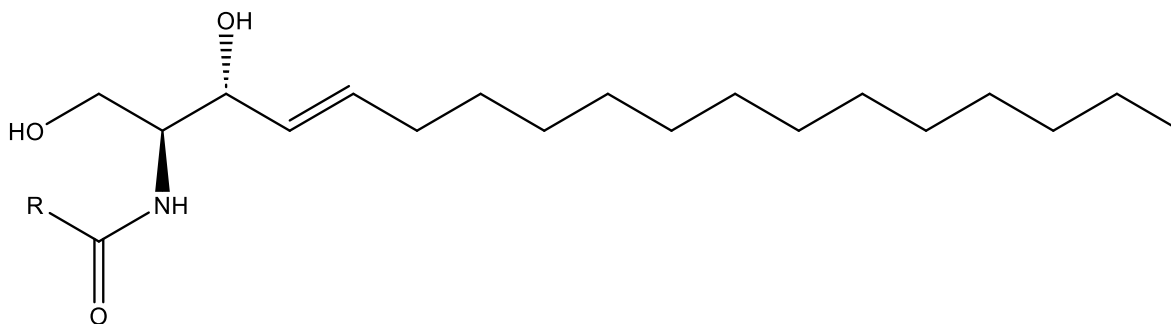
Kožní bariéra se u savců vyvinula kvůli jejich suchozemskému stylu života. Slouží jako ochrana organismu před mechanickým poškozením, patogenními mikroby, UV zářením ale také jako permeační bariéra, která chrání před ztrátami vody. Jak již bylo zmíněno, důležitou součástí kožní bariéry je SC, které je z velké části tvořeno korneocyty. Tyto do sebe zapadající ploché buňky obsahují protein keratin a jsou pevně obklopeny lipidovou matrix. Takové uspořádání je označováno jako struktura „cihly a malta“ a vytváří tak komplikovanou cestu pro průnik látek.^{8,16}

2.2.1 Kožní lipidy

Pro bariérovou funkci kůže je důležité složení lipidové matrix. Lipidovou matrix tvoří ceramidy (50%), cholesterol (25%) a volné mastné kyseliny (10%). Zbytek je tvořen estery cholesterolu, třeba např. cholesterol sulfátem.¹⁷ Tyto lipidy jsou uspořádány jako vícevrstvé minimálně hydratované lipidové lamely.^{18,19}

2.2.2 Ceramidy

Kožní ceramidy patří do skupiny sfingolipidů. Ceramidy mají amfifilní charakter, tvoří pouze dvojvrstvy, ale několikvrstvé struktury s velmi těsným uspořádáním. Strukturálně se jedná o amidy aminoalkoholu a mastné kyseliny. Bazickým alkoholem může být sfingosin, fytosfingosin, dihydrosfingosin nebo 6-hydroxysfingosin. Mastné kyseliny jsou na primární aminoskupinu v poloze 2 aminoalkoholu připojeny pomocí amidické vazby. Mezi hlavní funkce ceramidů patří snižovat prostupnost kůže pro vodu a udržovat homeostázu, proto jsou důležité pro správnou funkci kožní bariéry.^{8,9,20,21}



Obr. 3. Strukturální vzorec ceramidu

2.2.3 Cholesterol a mastné kyseliny

Další složkou lipidové matrix je cholesterol, který funguje jako stabilizátor lipidických struktur. Syntéza cholesterolu je nezbytná pro epidermální homeostázu.

Z mastných kyselin jsou ve SC zastoupeny nenasycené kyseliny. Délka jejich řetězce se pohybuje od 16 do 34 uhlíků. Nejčastěji kyselina behenová (C₂₂) a lignocerová (C₂₄), méně pak palmitová (C₁₆), stearová (C₁₈) aj. Díky přítomnosti těchto látek je vrstva SC odolná vůči chemickým i fyzikálním vlivům. Pokud by došlo k poklesu v koncentraci jakékoliv z těchto složek došlo by ke snížení funkčnosti kožní bariéry.^{8,9,22,23}

2.3 Topické a transdermální podání léčiv

Topické a transdermální podání jsou neinvazivní metody podávání léčiv. Topické podání je způsob aplikace léčiv do kůže k dosažení lokálních terapeutických účinků, bez systémové absorpce. V případě transdermálního podání je léčivo aplikováno přes kůži za účelem dosažení systémových hladin.^{24,25}

Obě tyto cesty podání nabízí mnoho výhod oproti podáním konvenčním, jako jsou:

- vyhnout se metabolismu prvního průchodu játry, což může vést k navýšení biologické dostupnosti léčiva a ke snížení potřebné dávky⁹
- vyhnout se prostředí gastrointestinálního traktu, kde může být léčivo degradováno
- stabilizace plazmatických hladin, díky kontinuálnímu dodávání léčiva
- nižší výskyt vedlejších systémových účinků
- snadné přerušení aplikace
- menší šance na předávkování
- lepší compliance pacienta.^{26,27}

Najdeme zde ale i několik nevýhod:

- omezené množství léčiva prošlé skrz kůži
- narušení nejsvrchnější vrstvy (*stratum corneum*)
- možnost dráždivé/alergické reakce pokožky v místě aplikace
- změny ve struktuře a stupni hydratace kůže
- neestetický vzhled přípravků.²⁸

Abychom léčivo mohli takto využít, musí být vysoce účinné, lipofilní (logP okolo 2-3) s relativně nízkou molární hmotností ($M < 500$ g/mol), s teplotou tání do 200 °C a v neionizované formě.^{9,29,30}

I přes to, že kůže je odolná bariéra, nabízí se zde několik možností, jak proniknout přes kůži do cévního řečiště. Pro průnik lze využít možnost transglandulárního prostupu (přes mazové a potní žlázy), nebo transfolikulárního prostupu (přes vlasové folikuly). Tyto dva prostupy jsou problematické kvůli malé ploše pórů a vývodních žlázek a také proto, že dochází ke kumulování léčiv v jejich okolí. Nejčastější prostup léčiv je přes SC. V tomto případě mluvíme o možnostech transcelulárního prostupu (přes korneocyty) a intercelulárního prostupu (přes lipidové lamely). I v případě transcelulárního prostupu bychom narazili na mírné problémy. Usnadnit tento přestup by bylo možné po navýšení množství vody ve SC a následnému nabobtnání korneocytů, které by vedlo k rozvolnění a porušení lipidových lamel. Nejčastěji využívaným průnikem je prostup intercelulární, a to díky poznání lipidové části vrstvy SC a objevu látek, které umožní i urychlit průnik léčiva přes kůži anebo do kůže. Tyto látky se nazývají akceleranty transdermální permeace.^{9,31}

2.4 Akceleranty transdermální permeace

Akceleranty transdermální permeace (dále jen akcelerant) jsou sloučeniny dočasně a reverzibilně zvyšující propustnost kožní bariéry. Byly vyvinuty proto, že většina léčiv sama o sobě není schopna proniknout přes kůži. Mohou usnadňovat průnik pro léčiva skrz kůži do organismu (transdermální podání, permeace léčiv), nebo napomáhat průniku pouze do hlubších vrstev, bez systémového účinku (dermální podání, penetrace do kůže). Na povahu těchto látek je kladena řada požadavků. Ideální akcelerant by měl být rychlý, předvídatelný. Měl by mít opakovatelný efekt na prostup léčiva skrz kůži. Sám o sobě by neměl mít farmakologický účinek. Měl by být netoxický, nedráždivý a nealergenní. Po odstranění akcelerantu by měly být znovu rychle obnoveny bariérové vlastnosti kožní bariéry, aby nedocházelo k nadměrným ztrátám vody. Také by měl být levný, snadno připravitelný a zpracovatelný, bez chutě, či zápachu a chemicky kompatibilní s léčivem.^{31,32}

2.4.1 Mechanismu účinku akcelera^tů transdermální permeace

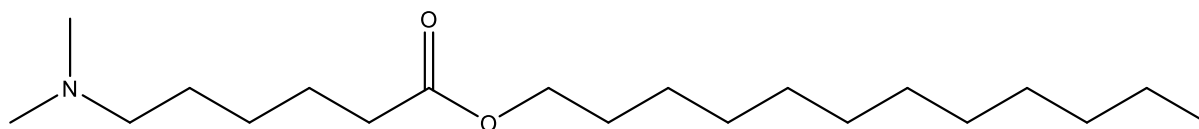
Jedná se o skupinu rozmanitých látek, jež mohou působit jedním ze tří hlavních mechanismů:

- narušení uspořádání lipidové struktury SC
- interakce s intracelulárními proteiny
- zvýšení hydratace kůže,

nebo působí kombinací těchto mechanismů.¹¹ Mezi akceleranty patří například alkoholy, močovina a její deriváty, laktamy, terpeny a sulfoxidy, mastné kyseliny, estery a amidy karboxylových kyselin.³¹ Jejich účinek je zkoumán na lidské nebo prasečí kůži ve Franzových difúzních celách.²⁶ Pro tuto práci byl vybrán akcelera^t nazývaný DDAK.

2.4.2 DDAK

DDAK (= dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové) je akcelera^t s prokázaným reverzibilním účinkem na snížení odolnosti bariérových funkcí kůže. Byl připraven a studován na Univerzitě Karlově, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové spojením dvou již známých akcelera^tů. Spojuje se zde polární hlava 2-dimethylaminopropanové kyseliny a pětiuhlíkatý řetězec mezi atomem dusíku a esterovou skupinou.^{33,34} Z obou těchto předloh má pak DDAK dodecylový řetězec. DDAK narušuje uspořádání lipidové struktury SC a zvyšuje tak propustnost kůže. Mezi jeho výhody patří nízká, až zanedbatelná toxicita, reverzibilní účinek na kožní bariéru a široké spektrum využití. Jeho účinnost byla již studována na velkém množství látek, jako např. theofillin, indometacin, adefovir a další.³⁵



Obr. 4. Strukturní vzorec DDAK

2.5 Cidofovir (CDV)

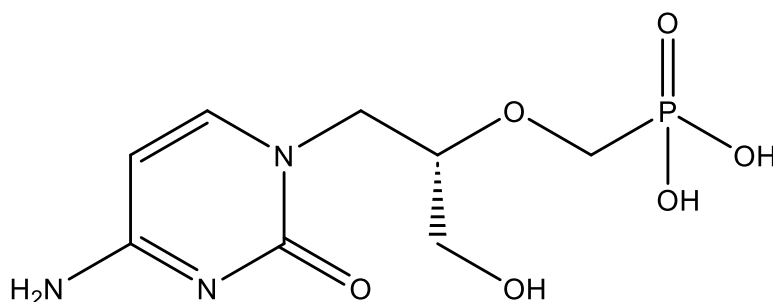
Cidofovir je acyklický nukleotidový analog se silnou aktivitou proti širokému spektru virů, včetně herpesvirů, poxvirů, papilomavirů a polyomavirů. Chemický název této látky je 1-[(S)-3-hydroxy-2-(fosfonylmetoxy)propyl]cytosin.³⁶

2.5.1 Mechanismus účinku a farmakokinetické vlastnosti

Cidofovir difosfát, aktivní metabolit cidofoviru, působí jako kompetitivní inhibitor DNA polymerázy, snižuje syntézu DNA a ukončuje prodlužování řetězce. Činidlo inhibuje virovou DNA polymerázu selektivněji než lidskou DNA polymerázu a její aktivace není závislá na thymidinkináze. Kompletní farmakokinetické vlastnosti u lidí byly popsány pouze u intravenózního podání. Obecně se jedná o dobře tolerované léčivo, mezi nejčastější nežádoucí účinky patří malátnost a lokální diskomfort. Až 90 % CDV se po jednorázové intravenózní dávce objeví v moči během 24 hodin. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je nefrotoxicita, které je možno předejít intravenózní hydratací, současným podáváním probenecidu a méně častým dávkovacím režimem CDV.^{2,37}

2.5.2 Použití cidofoviru

CDV je ve vodě rozpustná polární molekula, po perorálním podání dochází k nízké absorpci v gastrointestinálním traktu. V současné době nejsou k dispozici žádné perorální přípravky. Byl schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) i evropskou lékovou agenturou (EMA) pro intravenózní formulaci k léčbě cytomegalovirové rinitidy u pacientů s AIDS, znám jako Vistide®.² Jeho účinek byl popsán u lidských papilomavirů (papilomatóza laryngu, genitální bradavice, bradavice), infekcí způsobených virem herpes simplex, poxviry (neštovice, molusky) a Kaposiho sarkomu. V praxi je CDV využíván k léčbě virových infekcí, u kterých došlo k selhání ostatních antivirotik.^{2,38} Několik studií a kazuistik popisuje účinek CDV po úspěšném lokálním aplikování u několika virových kožních onemocnění. Aplikován byl v 0,3%, 1%, 3%, 4%, 5% koncentracích jako gel nebo krém.^{2,38,39} Zařazení do běžné léčby limituje jeho cena, která se pohybuje okolo 30€ za 5mg (v přepočtu cca 700 Kč).⁴⁰



Obr. 5. Strukturní vzorec CDV

2.6 Brincidofovir (BCDV)

Brincidofovir je širokospektrální lipidový konjugát cidofoviru, který se v organismu přeměňuje na aktivní antivirotikum, cidofovir difosfát. CDV má, jak bylo výše zmíněno, aktivitu proti širokému spektru virů, ale jeho použití je omezeno kvůli nefrotoxicitě. BCDV byl připraven spojením cidofoviru s lipofilní strukturou. Lipidová část BCDV je důležitá pro své farmakokinetické vlastnosti, ale nese také řadu výhod:

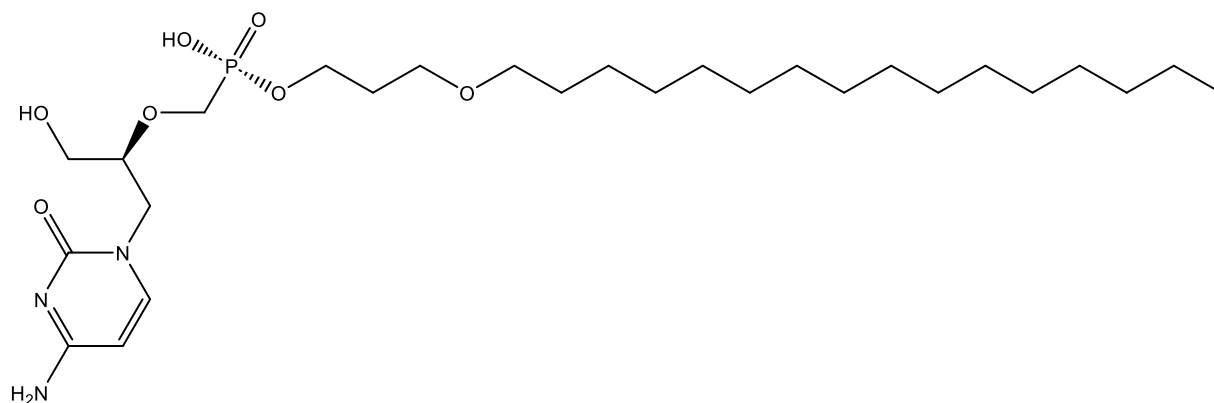
- vyšší *in vitro* účinnost ve srovnání s CDV a potenciálně vyšší odolnost vůči mutacím
- vyšší antivirová aktivita BCDV, která je přičítána zvýšenému buněčnému vychytávání a vysokým intracelulárním koncentracím aktivního léčiva (cidofovir difosfátu)
- pohodlné dávkování (jednou nebo dvakrát týdně), které vede k vyšší kompliance pacienta
- biologická dostupnost po perorálním podání
- není nefrotoxický a u pacientů s poruchou funkce ledvin není třeba upravovat dávku.^{1,41,42}

2.6.1 Mechanismus účinku

BCVD, jako proléčivo, je po dosažení cílového místa přeměněn (odštěpením lipidové skupiny) na CDV. CDV následně podléhá fosforylaci prostřednictvím intracelulárních kináz za vzniku aktivního cidofovir difosfátu. Studie prokázaly, že BCDV je přibližně 25–150krát účinnější než CDV.⁴¹

2.6.2 Použití BCDV

Účinek BCDV byl prokázán u infekcí způsobených cytomegaloviry, adenoviry, herpesviry, papilomaviry, polyomaviry a orthopoxviry.⁴³ BCDV byl jedním z několika experimentálních léčiv podávaných malému počtu pacientů k léčbě onemocnění způsobeného virem ebola, během epidemie v roce 2014.⁴⁴ Jeho aktivita byla zkoumána hlavně po perorálním podání. Topické podání BCDV má také smysl, protože jak vyplývá z jeho mechanismu účinku, je přeměňován na CDV, který byl pro topické podání zkoumán s nadějnými výsledky.



Obr. 6. Strukturní vzorec BCDV

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část byla rozdělena do tří pokusů:

- Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akceleračního DDAK na tento proces
- Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci BCDV, CDV a DDAK
- Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie

3.1 Použité chemikálie

Chemikálie použité pro přípravu pufrů byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (Schnelldorf, Německo). Superčistá voda pocházela ze systému Millipore Q purification. BCDV a CDV pocházel z laboratoře prof. Holého (M. Krečmerová, UOCHB AV ČR).

3.2 Kůže

Pro pokusy byla použita lidská kůže získaná z plastických operací břicha žen, které k tomu poskytly informovaný souhlas. Tento postup byl schválen Etickou komisí (3/11/2022) prvního soukromého chirurgického centra Sanus v České republice a byl prováděn v souladu s principy Helsinské deklarace. Z kůže byl pečlivě odstraněn podkožní tuk a do zahájení pokusu byly uskladněny při -20 °C.

Kůže pro pokusy permeability a reverzibility byly po rozmražení nařezány na cca 2 x 2 cm velké fragmenty a umístěny do modifikovaných Franzových difúzních cel mezi teflonová sklíčka epidermální stranou nahoru.

3.3 Příprava donorů

Všechny donorové vzorky jsou uvedeny v tabulce 1.

3.3.1 Donorové vzorky pro studium permeability

Donorové vzorky pro studium prostupu látek do kůže byly připraveny jako roztoky:

1. 0,2% BCDV v 60% vodném PG
2. 0,2% BCDV v 60% vodném PG s 1% DDAK
3. 0,06% BCDV v 60% vodném PG
4. 0,06% BCDV v 60% vodném PG s 1% DDAK

3.3.2 Donorové vzorky pro studium reverzibility

Donorové vzorky byly připraveny 24 h před zahájením pokusu následujícím způsobem:

1. roztok 2% BCDV v 60% vodném PG
2. roztok 2% BCDV v 60% vodném PG s 1% DDAK
3. suspenze 1% CDV v 60% vodném PG
4. suspenze 1% CDV v 60% vodném PG s 1% DDAK

Vzorky byly důkladně promíchány a inkubovány 12 h při teplotě 32 °C.

3.3.3 Vzorky pro studium mikrostruktury pomocí IČ spektroskopie

Vzorky pro měření IČ spektra *stratum corneum* byly připraveny jako:

1. roztok 2% BCDV v 60% vodném PG
2. suspenze 1% CDV v 60% vodném PG
3. roztok 1% DDAK v 60% vodném PG
4. roztok 60% PG jako kontrola

Látka	PERMEABILITA				REVERZIBILITA				IČ			
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
2% BCDV					✓	✓			✓			
0,2% BCDV	✓	✓										
0,06% BCDV			✓	✓								
1% CDV							✓	✓		✓		
1% DDAK		✓		✓		✓		✓			✓	
60% vodný PG	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

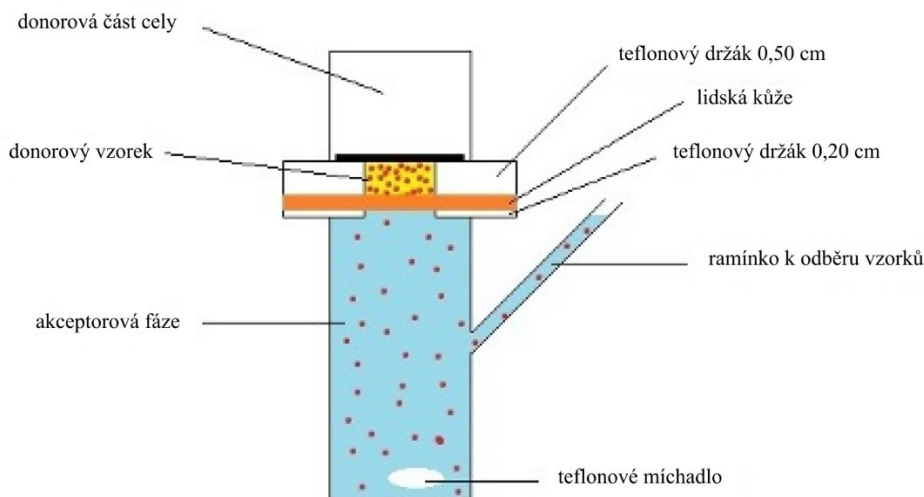
Tab. 1. Přehled použitých donorů v experimentech (č. 1.- 4 donorové vzorky)

3.4 Akceptorová fáze

Spodní, akceptorová část modifikované Franzovy difúzní cely byla v pokusech naplněna fosfátovým pufrům o pH 7,4; tedy pH lidské plazmy. Fosfátový pufr (PBS) byl připraven z 8,000 g NaCl, 2,865 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,201 g KCl a 0,312 g NaH₂PO₄·2 H₂O a doplněn ultra čistou vodou pro HPLC na celkový objem 1 litru pufru. Pro zajištění antimikrobiální nezávadnosti bylo přidáno 50 mg gentamicinu.

3.5 Modifikované Franzovy difúzní cely

Pro pokusy permeability a reverzibility jsme použili schematicky znázorněné modifikované Franzovy difúzní cely (obr. 7).



Obr. 7. Modifikovaná Franzova difúzní cela

Franzovy difúzní cely jsou skleněné nádoby, které se skládají ze dvou hlavních částí. Spodní, akceptorová část cely je plněna pufrem a opatřena teflonovým míchadlem. Součástí akceptorové části je také postranní ramínko, které slouží k odběru vzorků. Horní, donorová část cely je menší a využívá se k nanášení donorů/vzorků. Mezi horní a dolní částí cely jsou dva teflonové držáky o tloušťce 0,50 cm a 0,20 cm s vymezeným kruhovým výřezem definujícím plochu ($1 \text{ cm}^2/2 \text{ cm}^2$ v závislosti na typu pokusu) pro nanášení donorů. Mezi tyto teflonové držáky jsou umísťovány kůže epidermální stranou nahoru. Pro lepší fixaci a přilnavost kůže jsou teflonové držáky natřeny silikonovou vazelínou. Sestavené modifikované Franzovy difúzní cely jsou fixovány gumičkou a umístěny do vodní lázně vytemperované na $32 \text{ }^\circ\text{C}$ s mícháním zajišťujícím homogenní prostředí akceptorové fáze.

3.6 Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akcelerantu DDAK na tento proces

Pokus probíhal v modifikovaných Franzových difúzních celách (viz. kapitola 3.5.) Připravené kůže byly upevněny mezi teflonové držáky s kruhovým otvorem 2 cm². Akceptorová část cely opatřená míchadlem byla postranním raménkem naplněna PBS pufrem a objem akceptoru každé cely zaznamenán. Každá cela byla opět zkontrolována, aby v akceptorové části nezůstaly vzduchové bubliny. Připravené Franzovy difúzní cely byly umístěny do vodní lázně předehřáté na 32 °C a 2 h ponechány pro ustálení teploty na 32 °C. Po ustálení bylo na každou z kůží pipetou naneseno 40 µl příslušného donoru (1.- 4. viz tab. 1.). Nanesené vzorky byly přikryty plastovou mřížkou pro rovnoměrné rozprostření donoru po celé vymezené ploše kůže (2 cm²). Po 24 hodinách bylo do skleněných insertů ve vialkách odebráno 300 µl akceptorové fáze a stanoveno množství koncentrace metodou HPLC. Franzovy difúzní cely byly následně demontovány a kůže byla dále zpracována (viz níže). Pro zjištění množství léčiva ve vrstvě SC byla použita metoda stripování.

3.6.1 Stripování

Z plochy kůže (2 cm²) přes kterou prostupovalo léčivo byly pomocí lepící pásky strhávány vrstvy SC. Stripy byly extrahovány v 1 ml mobilní fáze pro BCDV na třepačce po dobu 12 h za laboratorní teploty. Množství léčiva ve vrstvách SC bylo analyzováno pomocí HPLC.

3.6.2 Epidermis, dermis a zbytek kůže

Po odstripování byla mechanicky vyseknuta permeační plocha (2 cm²). Vyseknutá tkáň byla zabalena do hliníkové fólie a zahřáta po dobu 1 min na 80 °C. Po vyjmutí tkáně z alobalu byla oddělena epidermis od dermis. Zbytky po vyseknutí kůže, epidermis i dermis byly umístěny do vialek, zváženy a extrahovány na třepačce po dobu 12 h při laboratorní teplotě. Zbytek kůže po vyseknutí epidermis a dermis byl extrahován v 5 ml mobilní fáze pro BCDV, epidermis byla extrahována v 1 ml mobilní fáze pro BCDV a dermis ve 2 ml mobilní fáze pro BCDV.

Tímto pokusem bylo určeno celkové množství léčiva prošlého přes kůži a také množství léčiva v jednotlivých vrstvách (po přepočtu na její hmotnost). Všechny vzorky byly analyzovány pomocí HPLC.

3.7 Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci BCDV, CDV a DDAK

Již připravené kůže (viz. 3.2.) byly upevněny do modifikovaných Franzových difúzních cel. Objem akceptoru byl u každé cely zvlášť zaznamenán do tabulky pro následující výpočty. Všechny cely (celkem 30) byly zkontrolovány, aby v akceptorové části nezůstaly vzduchové bubliny. Takto připravené modifikované Franzovy cely byly umístěny do vodní lázně předehřáté na 32 °C, odpovídající teplotě povrchu lidské kůže a za stálého míchání magnetickou míchačkou ponechány přes noc ustálit. Druhý den ráno, před nanesením vzorků byla změřena ztráta vody přes kůži a impedance pro zjištění bazálních hodnot a kontrolu integrity kožní bariéry.

3.7.1 Ztráta vody přes kůži (TEWL)

Pro měření hodnot ztráty vody přes kůži jsme použili přístroj AquaFlux AF (Biox Systems Ltd, VB). Naměřená hodnota ztráty vody přes kůži je definována jako ustálená hodnota toku vody přes kůži. Měření probíhalo po opatrném sejmutí horní části cely a přiložení měřicího senzoru těsně k horní hraně teflonového držáku, při relativní vlhkosti vzduchu 26 – 29 % za laboratorní teploty. Změřená hodnota byla zapsána do tabulky pro pozdější statistické hodnocení. Následně byla donorová část cely nasazena zpět a cela vrácena do vytemperované vany.

3.7.2 Elektrická impedance (EI)

Pro určení propustnosti membrány pro ionty byla měřena elektrická impedance pomocí digitálního multimetru LCR meter 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo). Stanovení EI navazovalo na měření TEWL. Do donorové části cely bylo nanášeno 0,5 ml PBS pufru a po ustálení systému (30 min) byla změřena elektrická impedance. Měření probíhalo ponořením jedné elektrody skrz ramínko do akceptorové části cely a druhé elektrody do donorové části cely s přidaným PBS pufrům.

Hodnoty elektrické impedance byly měřeny ve dvou opakováních. Po naměření počátečních hodnot ztráty vody přes kůži a elektrické impedance byla kůže osušena vatou a na každou kůži pipetou nanášeno 20 μ l donoru (1.- 4. viz tab. 1.). Nanášené vzorky byly přikryty plastovou mřížkou, aby došlo k rovnoměrnému rozprostření po celé ploše kůže (1 cm^2). Po 24 h byly do skleněných insertů ve vialkách odebrány vzorky (300 μ l) akceptorové fáze. V odebraných vzorcích byla pomocí HPLC metody změřena koncentrace léčiv prošlá skrz kůži do akceptoru. Po odběru akceptoru byly kůže opatrně opláchnuty od donorů a osušeny. Následně byla měřena ztráta vody přes kůži a impedance v časových intervalech 1 h, 4 h, 8 h, 12 h a 24 h od odstranění donorů, naměřené hodnoty byly zaznamenávány pro vyhodnocení pokusu.

3.8 Analytické metody HPLC

Získané vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. HPLC systém byl složený ze dvou vysokotlakých čerpadel LC-20 AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, kolonového termostatu CTO-20AC, diode array detektoru SPD-M20A s komunikačním modulem CBM20-A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Data byla analyzována pomocí integračního softwaru LC solutions verze 1.22. Analýza vzorků s přítomností BCDV probíhala na koloně LiChroCART C8 s náplní Purospher STAR RP-8e, 5 μ m s předkolonou. Jako mobilní fáze byla použita směs 55 % acetonitrilu a 45 % 50mM octanu amonného o průtoku 1 ml/min při teplotě 30 °C a tlaku ~9 MPa. BCDV byl stanovován při vlnové délce 274 nm. Nástřik vzorku byl 50 μ l.

Analýza vzorků CDV probíhala na koloně ZIC-HILIC 150-4,6 mm s náplní o porozitě 200 Å a velikostí částic 5 μ m (Merck, Německo). Jako mobilní fáze byla použita směs 75 % acetonitrilu a 25 % 50 mM octanu amonného o průtoku 2 ml/min při teplotě 30 °C a tlaku ~8,4 MPa. CDV byl stanovován při vlnové délce 274 nm. Nástřik vzorku byl 10 μ l.

3.9 Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie

Izolace SC pro měření IČ byla provedena ponořením nařezaných čtverců kůže (2x2cm) do destilované vody o teplotě 60 °C po dobu 1 min. Poté byla pomocí pinzet opatrně oddělena epidermis a opláchnuta ultračistou vodou. Následně byla epidermis vložena do Petriho misky naplněné 0,5% roztokem trypsinu v PBS pufriu s přídatkem gentamicinu. Epidermis byla ponechána v Petriho misce 12 h při teplotě 32 °C v inkubátoru. SC bylo izolováno působením trypsinu, který rozkládá živé vrstvy epidermis na jednotlivé buňky, kromě jediné – SC. Takto získané SC bylo následně opláchnuto PBS pufrem. Následně SC bylo rozprostřeno na Petriho misku a usušeno. Kousky izolovaného SC o ploše přibližně 0,5 cm² byly vloženy do Petriho misky a následně po dobu 12 h hydratovány nad parami vody v inkubátoru při teplotě 32 °C. Na hydratované SC bylo pipetou nanášeno 10 µl donoru (1.- 4. viz tab. 1.) tak, aby bylo SC donorem pokryto z obou stran. Každý vzorek byl přenesen do plastové komůrky. Celkem bylo do komůrek umístěno 16 vzorků s donory, 4 kontrolní vzorky s 60% vodným PG a 4 vzorky SC, na které nebyl nanášen žádný donor. Po 24 h bylo SC osušeno vatovou tyčinkou a umístěno na 1h zpět do inkubátoru zahřátého na 32 °C. Následně bylo změřeno IČ spektrum připravených vzorků po působení donoru na SC. Každý vzorek byl měřen na dvou odlišných místech. IČ spektra měřena na spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), na jednodrazovém MIRacle ATR ZnSe krystalem (PIKE Technologies, Madison, USA). Měření probíhalo za konstantní teploty a konstantního tlaku. Spektrum je výsledkem průměrování 256 skenů s rozlišením 2 cm⁻¹. Výsledná IČ spektra byla vyhodnocována pomocí softwaru OPUS (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA).

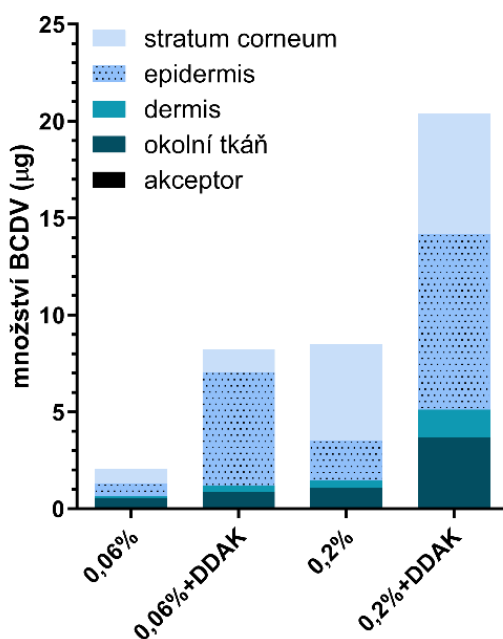
3.10 Statistické zpracování dat

Ke zpracování veškerých dat byl využit software GraphPad (GraphPad SoftwarePro, San Diego, USA). Pro statistické zpracování jsme použili test ANOVA pro analýzu 3 a více skupin a t-test pro analýzu 2 skupin. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetické průměry a ± SEM (standardní chyba).

4 VÝSLEDKY

4.1 Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akceleratoru DDAK na tento proces

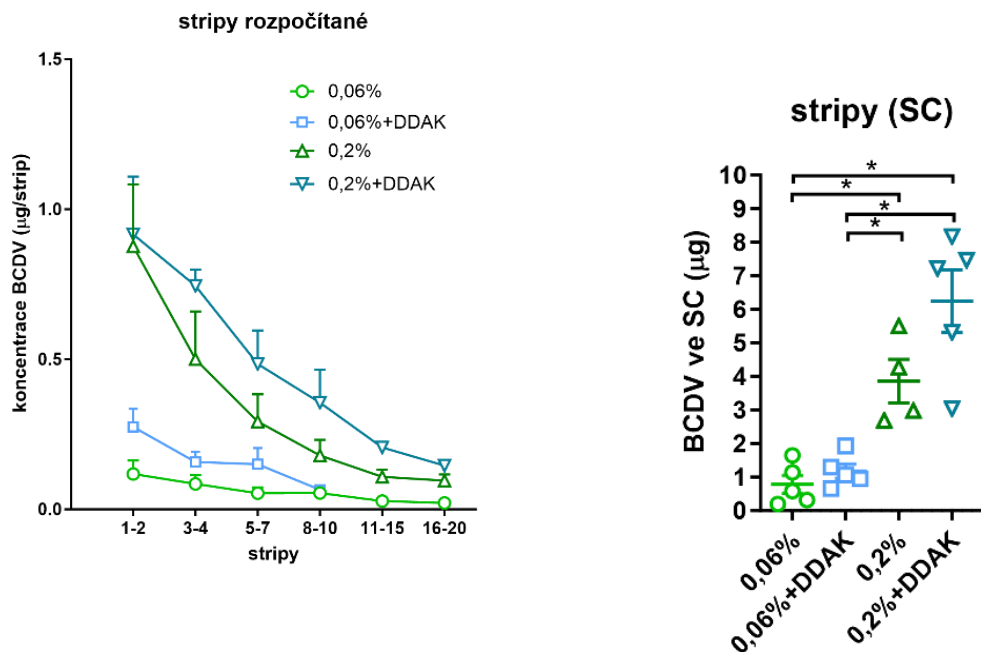
Tato studie navazuje na moji předchozí práci³, kde byly použity koncentrace 0,6% BCDV a 2% BCDV. Do této diplomové práce byly vybrány a zkoumány vzorky o 10krát nižší koncentraci, tedy 0,06% BCDV a 0,2% BCDV. Byl studován přístup léčiva BCDV do jednotlivých vrstev kůže a jeho vstřebávání za použití modifikovaných Franzových difúzních cel. Také byl studován vliv permeačního akceleratoru DDAK.



Graf 1. Celkové množství BCDV v kůži.
n ≥ 4

V grafu 1 je znázorněno celkové množství BCDV nahromaděného v jednotlivých vrstvách kůže. Výsledné hodnoty jsou aritmetickým průměrem ze čtyř samostatných opakování. Největší množství bylo naměřeno u obou koncentrací aplikovaného donoru ve vrstvách SC a epidermis. Nejvíce se ve SC kumulovaly vzorky 0,2% BCDV s obsahem $3,85 \pm 0,65 \mu\text{g}$, 2krát více 0,2% BCDV s 1% DDAK s obsahem $6,24 \pm 0,93 \mu\text{g}$. Ve vrstvě epidermis se prokazatelně nejvíce kumulovaly vzorky 0,6% BCDV s 1% DDAK a 0,2% BCDV s 1% DDAK s obsahem $5,85 \pm 0,46 \mu\text{g}$ a $9,05 \pm 1,06 \mu\text{g}$. V hlubší vrstvě, dermis, bylo naměřeno znatelně menší množství BCDV. Největšího množství zde dosahovala koncentrace 0,2% BCDV s 1% DDAK s obsahem $1,45 \pm 0,42 \mu\text{g}$. V akceptoru nebylo detekováno žádné množství BCDV, ani v jedné ze zkoumaných koncentrací. V případě obou koncentrací je znatelný vliv akceleratoru DDAK, nejen že se do kůže dostává více léčiva, ale i větší množství se ho kumuluje ve vrstvě epidermis, což je žádoucí.

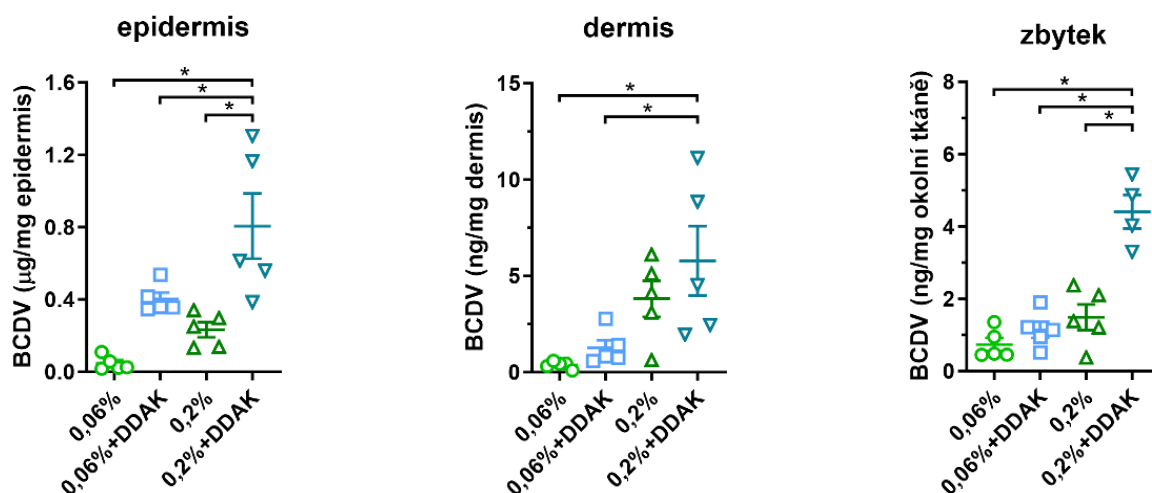
V následujících grafech jsou podrobně rozepsány koncentrace BCDV v jednotlivých vrstvách kůže včetně statistického srovnání jednotlivých skupin.



Graf 2. Přehled stripů v jednotlivých vrstvách SC (vlevo). Průměr ± SEM, $n \geq 1$. Součet hodnot BCDV v jednotlivých stripech SC (vpravo). Průměr ± SEM, $n \geq 4$, * značí statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$.

Pro zjištění koncentrace BCDV ve SC jsem použila metodu stripování. Pomocí lepicí pásky byli z kožního povrchu postupně strhávány jednotlivé vrstvy SC a následně stanovena koncentrace BCDV. Získané výsledky ukazují (vlevo), že nejvíce BCDV se hromadilo ve svrchnějších vrstvách SC (1-2) a jak se měnila koncentrace BCDV v závislosti na hloubce jednotlivých vrstev. Ve svrchnějších vrstvách (1-2) SC bylo detekováno 6-9krát více BCDV, než ve vrstvách hlubších (16-20). Při porovnání koncentrací můžeme říci, že koncentrace 0,06% BCDV nedosahovala významného množství ani v nejsvrchnějších vrstvách SC ($0,12 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{strip}$). Vliv v tomto případě nemělo ani DDAK ($0,27 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{strip}$). U koncentrace 0,2% BCDV a 0,2% BCDV s 1% DDAK byly naměřené vyšší hodnoty jak ve svrchnějších ($0,88 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{strip}$ vs $0,92 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{strip}$), tak i v hlubších vrstvách ($0,10 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{strip}$ vs $0,15 \pm 0,00 \mu\text{g}/\text{strip}$), ale nejsou zde patrné statisticky významné rozdíly.

Graf vpravo je ukazatelem celkového množství BCDV v μg nalezeného ve vrstvě SC. V případě koncentrace 0,06% BCDV bylo detekováno velmi malé množství BCDV $0,78 \pm 0,27 \mu\text{g}$. Významný vliv nemělo ani přidání DDAK k této koncentraci, kdy se hodnota zvýšila na $1,18 \pm 0,21 \mu\text{g}$. Při zvýšení koncentrace z 0,06% BCDV na 0,2% BCDV došlo ke zvýšení množství BCDV ve SC 5krát na hodnotu $3,85 \pm 0,65 \mu\text{g}$ a $6,24 \pm 0,93 \mu\text{g}$. Hodnota BCDV ve SC se po přidání DDAK k 0,2% BCDV zvýšila 1,6krát ($3,85 \pm 0,65 \mu\text{g}$ vs $6,24 \pm 0,93 \mu\text{g}$). Z pokusu vyplývá, že pokud zvýšíme koncentraci, tak se zvýší i množství BCDV ve SC.



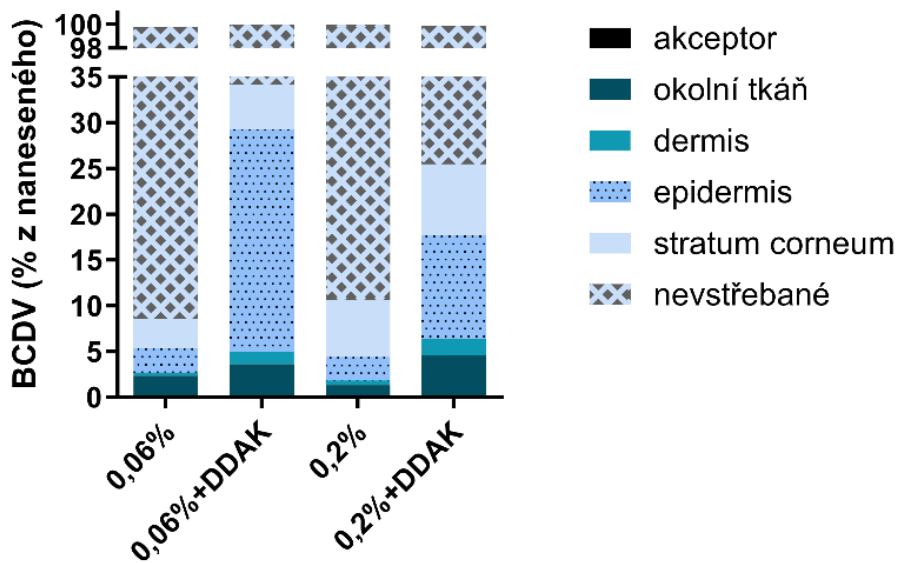
Graf 3. Rozpočítané samostatné vrstvy.

Průměr ± SEM, n ≥ 4, * značí statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti p < 0,05.

Množství BCDV vyjádřené v mikrogramech na miligram v jednotlivých vrstvách kůže. Největší obsah BCDV v epidermis byl naměřen při aplikaci 0,2% BCDV s 1% DDAK ($0,81 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$). Na množství BCDV ve vrstvě epidermis mělo statisticky významný vliv zvýšení koncentrace BCDV 3,3krát, tedy z 0,06% BCDV na 0,2% BCDV. Z grafu vidíme, že se množství BCDV v epidermis při koaplikaci 0,06% BCDV i 0,2% BCDV s 1% DDAK zvýšilo 2krát ($0,40 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $0,81 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$) oproti vzorkům bez DDAK, kde nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

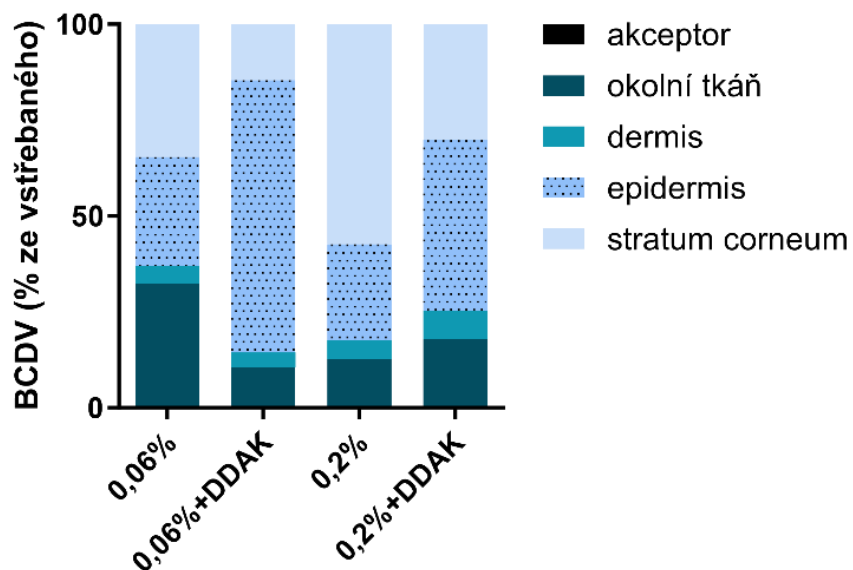
Ve vrstvě dermis bylo také detekováno největší množství BCDV při aplikaci 0,2% BCDV s 1% DDAK ($5,78 \pm 0,81 \mu\text{g}/\text{mg}$). Množství BCDV v dermis po aplikaci vzorků s DDAK bylo po zvýšení koncentrace zvýšeno 4,5krát ($1,27 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs $5,78 \pm 0,81 \mu\text{g}/\text{mg}$). U ostatních vzorků nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

Graf znázorňuje i množství nalezené ve zbytku kůže (po vyseknutí permeační plochy), použité na výše popsanou studii. Obsah léčiva nalezený v okolí vyseknuté části značí léčivo, které vlivem laterální difúze difundovalo do okolní kůže mimo vyznačenou permeační plochu.



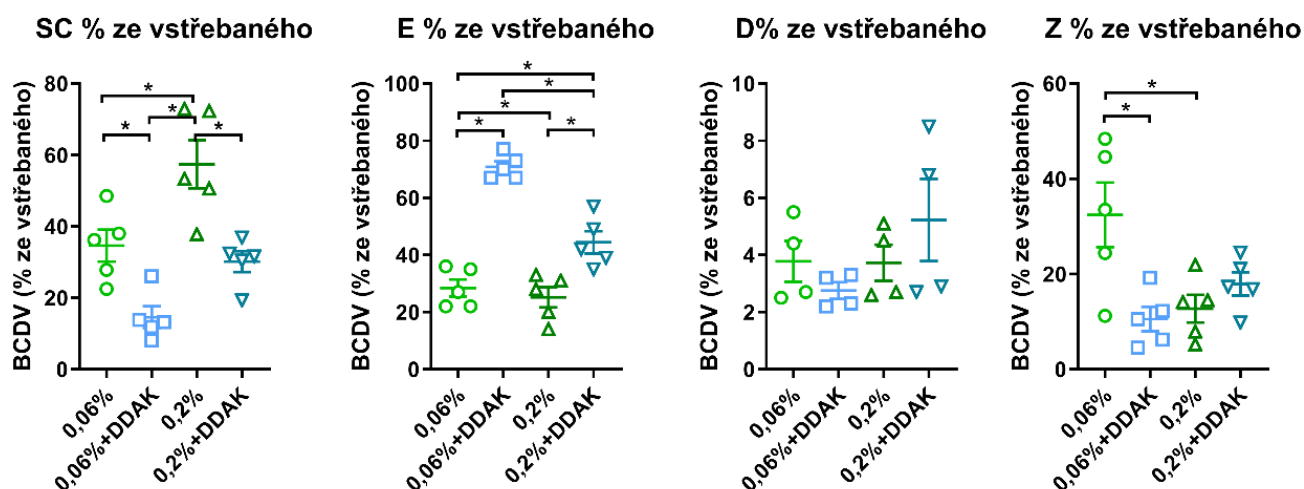
Graf 4. Souhrnný graf z naneseného BCDV (% z nanesené látky).
n≥4

Graf 4 znázorňuje kolik % z naneseného BCDV se během pokusu vstřebalo. Uvedené hodnoty jsou dány aritmetickým průměrem ze čtyř opakování. Nejvíce procent BCDV z celkově naneseného množství se do hlubších vrstev dostalo v případě 0,06% BCDV s 1% DDAK ($24,38 \pm 1,91$ %). Koncentrace BCDV v kůži byla mnohonásobně vyšší po přidání DDAK, než v případě samostatného BCDV. Nebyl zde zaznamenán vliv na zvýšení vstřebatelnosti po zvýšení koncentrace. Je také patrné, že nedochází ke 100% vstřebání, velká část léčiva zůstává nevstřebaná. Toto je potřeba zmínit, protože pokud se jedná o kožní podání, tak nevstřebané léčivo by se mohlo po umytí dostávat do odpadních vod.



Graf 5. Souhrnný graf vstřebaného BCDV (% ze vstřebané látky).
n≥4

Graf 5 prezentuje % rozdělení množství vstřebaného BCDV v jednotlivých vrstvách kůže. Uvedené hodnoty jsou aritmetický průměr ze čtyř samostatných opakování. Nejvyšší koncentrace BCDV byla u všech donorů detekována ve vrstvách epidermis a SC. Koncentrace naměřená v dermis byla značně nižší. Sám o sobě se BCDV dostává hlavně do SC a pouze částečně do epidermis. Znatelný je vliv po přidání DDAK k oběma koncentracím. BCDV se pak kumuloval hlavně v epidermis, což je žádoucí místo pro jeho působení. Jednotlivé vrstvy jsou popsány v následujících detailních grafech.



Graf 6. Jednotlivé vrstvy vstřebaného BCDV.
Průměr ± SEM, n ≥ 4, * značí statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti p < 0,05.

V grafu 6 je znázorněno množství detekovaného podílu ze vstřebaného množství BCDV v jednotlivých vrstvách.

V případě koncentrace 0,06% BCDV bez přídavku DDAK došlo ke kumulaci hlavně ve vrstvě SC ($34,60 \pm 4,47$ %) a méně pak v epidermis ($28,40 \pm 3,04$ %) a hlubších vrstvách ($3,80 \pm 0,72$ %). Po přidání DDAK k této koncentraci bylo naměřené množství v epidermis 2,5krát vyšší ($70,80 \pm 1,91$ %), zatímco ve SC se BCDV s přídavkem DDAK kumuloval méně ($14,60 \pm 3,03$ %). Ve vrstvě dermis nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

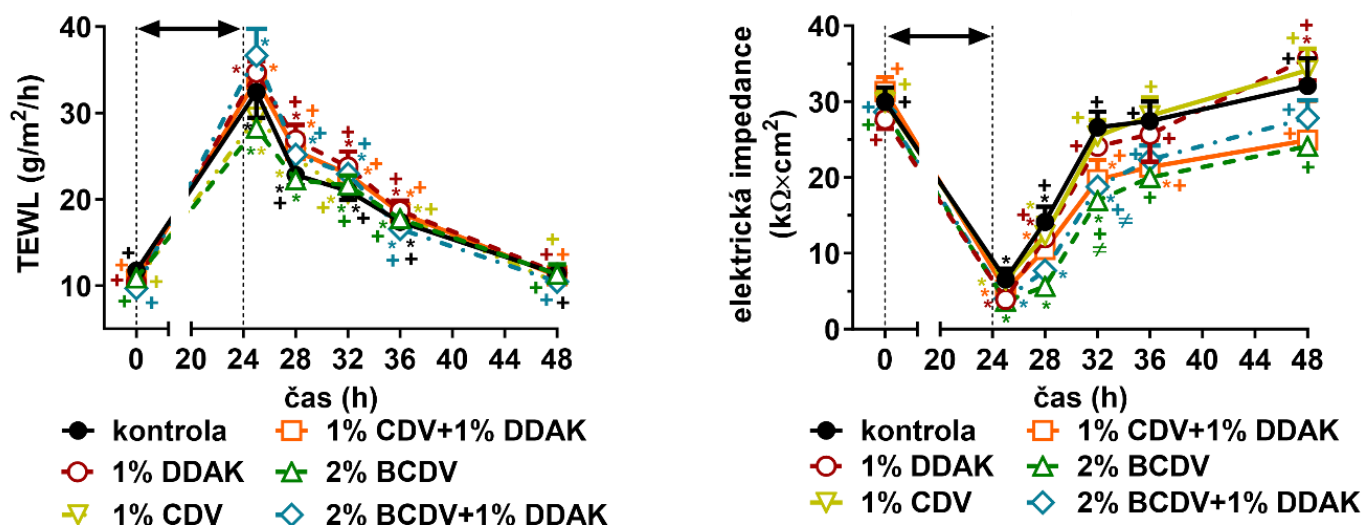
V případě koncentrace 0,2% BCDV bez DDAK vidíme 2krát vyšší kumulaci ve vrstvě SC ($57,40 \pm 6,74$ %) oproti epidermis ($25,20 \pm 3,57$ %). Po přidání DDAK můžeme opět sledovat téměř dvojnásobný nárůst množství BCDV kumulovaného v epidermis ($44,40 \pm 3,89$ %) a také téměř dvojnásobné snížení množství ve vrstvě SC ($30,10 \pm 2,92$ %). Do hlubších vrstev BCDV proniká méně, ať už s přidáním DDAK nebo bez ($5,20 \pm 1,44$ % vs $3,70 \pm 0,63$ %).

Graf pro zbylou tkáň ukazuje, kolik procent ze vstřebaného BCDV se vlivem laterální difúze dostalo během permeačního pokusu mimo vymezenou plochu.

Na množství prošlé do jednotlivých vrstev nemá až tak výrazný vliv zvýšení koncentrace BCDV. Výraznější vliv má přidání akceleračního činidla DDAK, kdy u obou koncentrací došlo k výraznému nárůstu ve vrstvě epidermis, která je žádoucím místem pro jeho působení.

4.2 Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci CDV, BCDV a DDAK

Studované vzorky byly aplikovány na kůži po dobu 24 h. Po odstranění byly měřeny hodnoty TEWL a EI, abychom zjistili, zda se bariérová funkce kůže vrací na původní hodnoty před aplikací těchto vzorků. TEWL umožňuje zjistit množství vody prošlé skrz kůži za jednotku času, čímž charakterizuje funkčnost kožní bariéry. Čím je hodnota ztráty vody větší, tím vyšší je propustnost, tedy i poškození bariérové funkce. EI je nepřímo úměrná prostupu nabitých částic kůží. Čím nižší je hodnota EI, tím větší je propustnost.^{45,46}



Graf 7. Hodnoty měření TEWL (vlevo), měření EI (vpravo). ↔ 24h přítomnost vzorků,
* statisticky významný rozdíl oproti hodnotě před nanesením, + statisticky významný rozdíl oproti hodnotě 1h po odstranění, ≠ statisticky významný rozdíl oproti hodnotě kontroly ve stejný čas na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$. $n \geq 3$ (TEWL), $n \geq 2$ (EI)

Ze znázorněného grafu 7 je patrné, že po nanesení došlo během prvních 24 h ke zvýšení propustnosti kožní bariéry u všech zkoumaných vzorků. Při měření TEWL u kontroly (60% vodný PG) došlo po 24h aplikaci téměř ke ztrojnásobení původní hodnoty (viz tab. 2.). Ačkoliv se hodnoty ztrojnásobily, během následujících 24 h došlo k návratu téměř na hodnotu před nanesením. V případě donorů 1% DDAK, CDV, CDV s 1% DDAK a BCDV byl nárůst v prvních 24 h také téměř trojnásobný. V následujících 24 h i v případě donorů došlo k návratu na téměř původní hodnoty (viz tab. 2.). Pouze v případě BCDV s 1% DDAK došlo během 24 h ke zvýšení hodnot téměř 4krát. I v tomto případě došlo během 24 h po odstranění donoru k návratu k původním hodnotám. Nebyl zaznamenán rozdíl oproti kontrole.

	Původní hodnoty	1 h po odstranění	24 h od odstranění
Kontrola (60% PG)	11,76 g/m ² /h (± 0,68)	32,44 g/m ² /h (± 2,99)	11,36 g/m ² /h (± 0,89)
1% DDAK	10,37 g/m ² /h (± 0,80)	34,70 g/m ² /h (± 1,32)	11,52 g/m ² /h (± 0,77)
CDV	10,53 g/m ² /h (± 0,63)	29,52 g/m ² /h (± 2,57)	10,36 g/m ² /h (± 0,49)
CDV s 1% DDAK	10,76 g/m ² /h (± 1,12)	33,85 g/m ² /h (± 3,02)	11,14 g/m ² /h (± 0,61)
BCDV	10,90 g/m ² /h (± 0,80)	28,26 g/m ² /h (± 0,70)	11,32 g/m ² /h (± 1,16)
BCDV s 1% DDAK	9,72 g/m ² /h (± 0,78)	36,66 g/m ² /h (± 3,08)	10,46 g/m ² /h (± 0,58)

Tab. 2. Hodnoty měření TEWL

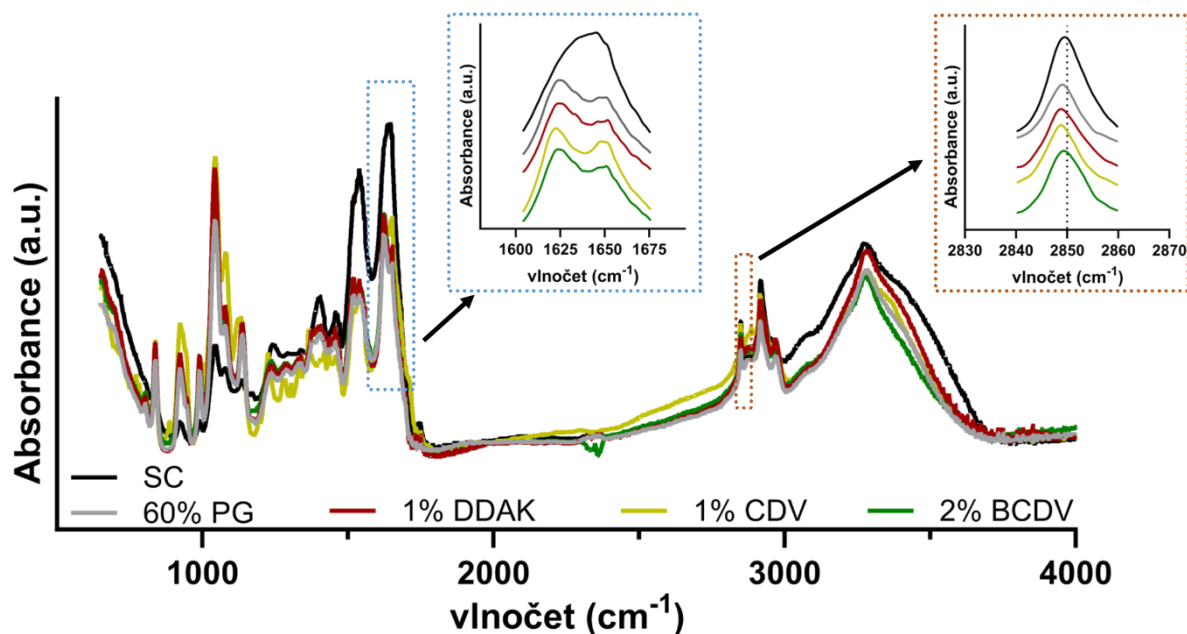
Při měření EI aplikace PG vedla v prvních 24 h ke snížení EI téměř 5krát z původní hodnoty (viz tab. 3.). V následujících 24 hodinách se hodnoty vrátily téměř k původním hodnotám. K podobnému poklesu (5-7krát) došlo i v případě ostatních donorů. U donorů můžeme sledovat pomalejší návrat, ne úplně k původním hodnotám, ale vzhledem k variabilitě mezi vzorky není rozdíl statisticky významný. Hodnoty vzorků, na které byly nanесeny donory s BCDV se vracely nejpomaleji.

	Původní hodnota	1 h po odstranění	24 h od odstranění
Kontrola (60% PG)	29,99 kΩ×cm ² (± 1,86)	6,59 kΩ×cm ² (± 1,41)	32,09 kΩ×cm ² (± 3,64)
1% DDAK	27,65 kΩ×cm ² (± 1,23)	3,91 kΩ×cm ² (± 0,48)	35,75 kΩ×cm ² (± 2,92)
CDV	29,90 kΩ×cm ² (± 1,48)	6,50 kΩ×cm ² (± 0,75)	34,14 kΩ×cm ² (± 2,85)
CDV s 1% DDAK	31,33 kΩ×cm ² (± 1,87)	5,17 kΩ×cm ² (± 1,90)	24,92 kΩ×cm ² (± 5,19)
BCDV	28,63 kΩ×cm ² (± 0,73)	3,67 kΩ×cm ² (± 0,44)	24,13 kΩ×cm ² (± 0,47)
BCDV s 1% DDAK	28,66 kΩ×cm ² (± 0,93)	4,01 kΩ×cm ² (± 0,44)	27,84 kΩ×cm ² (± 2,33)

Tab. 3. Hodnoty měření EI

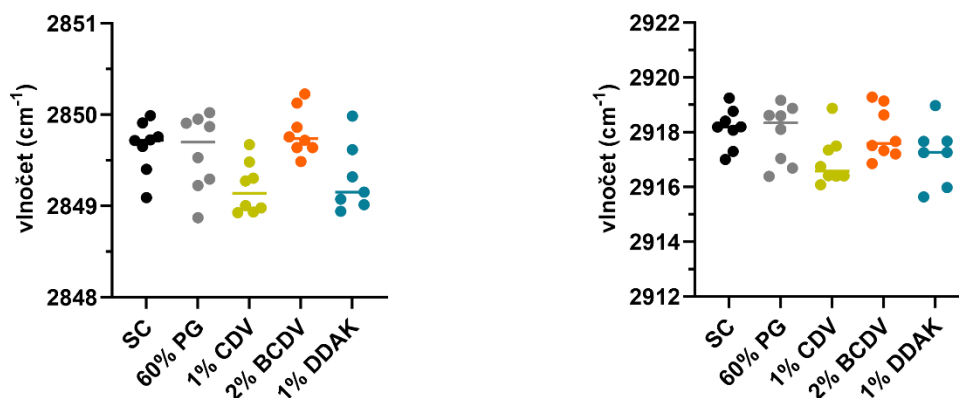
4.3 Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie

Pro zjištění vlivu samotného 60% PG, 1% DDAK a donorů na uspořádání lipidů a proteinů kožní bariéry izolovaného SC byla použita metoda IČ spektroskopie.



Graf 8. Spektrum IČ s výňatkem zobrazujícím pás symetrické valenční vibrace methylenové skupiny (vpravo) a pás vibrací amidu I (vlevo)

Aplikace 60% PG i donorů s léčivy či DDAK na SC vyvolala částečnou reorganizaci α -helixů do konformace β -skládaného listu. V IČ spektru (graf 8., detail vlevo) je to naznačeno rozdělením pásu při 1645 cm^{-1} na dva pásy s podobnou intenzitou při 1620 cm^{-1} (konformace β -skládaného listu) a 1648 cm^{-1} (konformace α -helixu).⁴⁷



Graf 9. Hodnota vlnočtu v oblasti symetrické valenční vibrace methylenové skupiny s vlnočtem 2848 cm^{-1} (vlevo) a v oblasti nesymetrické valenční vibrace methylenové skupiny s vlnočtem 2920 cm^{-1} (vpravo)

V porovnání kontrolního SC a vzorků nejsou vidět signifikantní změny v konformaci a laterálním uspořádání lipidových řetězců. Samotné SC, 60% PG i donorové vzorky měly dobře uspořádané lipidové řetězce, jak ukazují methylenové symetrické vibrace s vlnočtem 2849,65 ($\pm 0,10$) cm^{-1} . Vlnočť kontrolního SC se nijak výrazně nelišil od vlnočtů stejné vibrace u zkoumaných vzorků (graf 8., detail vpravo a tab. 4.).

vzorek	vlnočť
SC	2849,65 ($\pm 0,10$) cm^{-1}
60% PG	2849,58 ($\pm 0,15$) cm^{-1}
1% CDV	2849,20 ($\pm 0,10$) cm^{-1}
2% BCDV	2849,81 ($\pm 0,09$) cm^{-1}
1% DDAK	2849,30 ($\pm 0,14$) cm^{-1}

Tab. 4. Hodnoty vlnočtu jednotlivých látek

5 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak prostupuje BCDV do jednotlivých vrstev kůže, jaký vliv na prostup má akcelerator DDAK a jestli aplikované léčivo poškozuje kožní bariéru. Pro stanovení BCDV v kůži byly použity modifikované Franzovy difúzní cely. Tato studie vychází z mé předchozí práce,³ kde byly použity koncentrace 0,6% BCDV a 2% BCDV a jako výhodnější se jevila koncentrace 0,6% BCDV s přítomností DDAK. Cílem bylo zjistit, je-li možné dosáhnout podobných koncentrací léčiva i při 10krát nižších aplikovaných koncentracích (0,06% a 0,2% BCDV) a to i z důvodu, že po aplikaci nedochází ke 100% vstřebání BCDV a nadbytečná část léčiva může být umyta do odpadních vod. Po aplikaci nižších koncentrací BCDV by nedocházelo k jeho plýtvání. Měření TEWL a EI jsme zjišťovali, zda je poškození kožní bariéry reverzibilní. Účinky PG, DDAK a donorů na uspořádání lipidů a proteinů kožní bariéry byly studovány na izolovaném SC pomocí IČ spektroskopie.

5.1 Studium permeace 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akceleratoru DDAK na tento proces

Celkem byly pro studium permeace zkoumány 4 typy vzorků ve dvou různých koncentracích (0,06% a 0,2% BCDV) s přítomností 1% DDAK.

Zjistila jsem, že samotný BCDV má tendenci se hromadit hlavně ve vrstvě SC, kde jeho účinek není nijak významný. V případě koncentrace 0,06% BCDV byl jeho obsah i v této svrchní vrstvě kůže velmi nízký. Zvýšení koncentrace léčiva z 0,06% BCDV na 0,2% BCDV mělo vliv na zvýšení množství BCDV ve SC.

Abychom léčivo mohli považovat za vstřebané do organismu, je nutný jeho průnik do hlubších vrstev kůže, hlavně do epidermis, která je cílem při léčbě kožních onemocnění způsobených viry.⁴¹ Přidání DDAK ke studovaným koncentracím sice nezvýšilo prostup léčiva přes kůži, ale vedlo ke zdvojnásobení množství BCDV prošlého do vrstvy epidermis. V akceptoru nebyl v žádném z aplikovaných vzorků BCDV detekován. Nevstřebává se do krevního oběhu, což je výhodné pro lokální působení bez systémových nežádoucích účinků BCDV.

Ve srovnání použitých koncentrací BCDV v této práci se jako výhodnější jeví 0,06% BCDV s 1% DDAK. Při podání této koncentrace se do kůže dostával největší podíl z aplikované dávky BCDV. I v případě vstřebaného léčiva se BCDV vlivem DDAK kumuloval hlavně v epidermis. V porovnání s ostatními vrstvami se nijak výrazně statisticky tato koncentrace nelišila od koncentrace 0,2% BCDV s 1% DDAK.

Z pokusu vyplývá, že je výhodnější přidání akceleratoru, než navýšení koncentrace BCDV, což vede k úsporám ohledně množství léčiva při výrobě přípravku. Dále nižší koncentrace léčiva snižuje riziko negativních účinků na kožní bariéru a riziko vzniku nežádoucích účinků.

5.2 Studium reverzibility bariérové funkce kůže po topické aplikaci CDV, BCDV a DDAK

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda přítomnost CDV a BCDV ve vrstvách kůže nepůsobí trvalé nebo dočasné poškození kožní bariéry, protože jakýkoliv nanesený přípravek ji může poškodit.⁹ Jako ukazatel bariérové funkce kůže jsem použila měření TEWL a EI. Z pokusu je patrný výsledek, že do 24 h od odstranění vzorků se naměřené hodnoty donorů vracely blízko k původním hodnotám jako před nanesením. Přítomnost DDAK v donorech neměla žádný vliv na poškození kožní bariéry oproti donorům se samotnými látkami.

Protože oba tyto markery jsou v dermatologii používané pro hodnocení kožní dráždivosti a reverzibility účinku různých látek, poukazují výsledky práce na dobrý bezpečnostní profil jak zkoumaných léčiv samotných, tak v kombinaci s akcelerantem DDAK. Vlivem působení zmíněných látek ve zkoumaných koncentracích nedochází k trvalému poškození kožní bariéry, což by mohlo být výhodné pro jejich potenciální použití *in vivo*, protože poškození kožní bariéry je reverzibilní a kůže by se po podání léčiva opět rychle obnovila.

5.3 Interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC studovaná pomocí IČ spektroskopie

Hodnota vlnočtu pod 2850 cm^{-1} symetrické valenční vibrace methylenové skupiny odpovídá fyziologickým hodnotám lipidových řetězců a značí vysokou organizovanost uspořádání těchto řetězců v all-trans konformaci. All-trans uspořádání a vysoká organizovanost znamenají správné uspořádání a dobré bariérové vlastnosti kůže.^{48,49} Pokud by hodnoty vlnočtu přesahovaly hodnotu 2850 cm^{-1} znamenalo by to méně uspořádané nebo neuspořádané lipidové řetězce, díky navýšení počtu gauche konformerů.^{50,51} Nižší uspořádanost lipidů zvyšuje propustnost kožní bariéry což v tomto případě nenastalo.⁴⁹

U všech donorů byla zaznamenána změna konformace keratinu z α -helix do β - skládaného listu. Vzhledem k tomu, že zkoumaná léčiva ani DDAK neměly na tuto změnu větší vliv než samotný 60% PG, který sloužil jako vehikulum, je tento efekt přisuzován právě jemu. Zkoumané látky tedy samy o sobě nemají negativní vliv na konformaci proteinů SC.⁵²

Studované vzorky neměly vliv na snížení uspořádanosti lipidových řetězců ani proteinů SC. Na kožní bariéru působí reverzibilním mechanismem a jejich aplikace vede k lokálnímu účinku bez systémové absorpce léčiva. BCDV v kombinaci s akcelerantem DDAK se jeví jako výhodné spojení pro lokální podání tohoto proléčiva antivirotika cidofoviru bez systémových nežádoucích účinků.

6 ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce jsem podrobně sledovala permeaci 0,06% a 0,2% BCDV do jednotlivých vrstev kůže a vliv permeačního akceleraantu DDAK na tento proces, dále reverzibilitu bariérové funkce kůže po topické aplikaci BCDV, CDV a DDAK. Pomocí IČ spektroskopie jsem studovala interakce BCDV, CDV, DDAK a PG se strukturami lidského SC.

Při použití samotného BCDV se prokázalo, že se hromadí pouze ve vrstvě SC, kde není významný. Výrazná účinnost na prostup BCDV do hlubších vrstev kůže se prokázala po přidání akceleraantu transdermální permeace DDAK. Nejefektivnější se zdá koncentrace 0,06% BCDV s přídavkem DDAK, protože prostupuje do epidermis výrazně více léčiva, než při vyšší koncentraci. Vysoké množství BCDV je v epidermis žádoucí, protože epidermis je místem, kde jsou virové kožní infekce lokalizovány.

Na závěr lze říct, že malé množství 0,06% BCDV v kombinaci s 1% DDAK by mohlo být efektivní terapií v léčbě virových infekcí kůže citlivých na BCDV. Nejen, že díky malému množství lze předcházet systémovým nežádoucím účinkům, ale zdá se být i ekonomicky výhodné. Po aplikaci léčiva se bariérové funkce kůže vrací k původním hodnotám, z čehož vyplývá, že takovéto použití BCDV je bezpečné.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BCDV- Brincidofovir
CDV- Cidofovir
DDAK- dodecylester kyseliny 6-dimethylaminohexanové
EI- elektrická impedance
HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČ- infračervená (spektroskopie)
PBS- fosfátový pufr
PG- propylenglykol
SC- *stratum corneum*
TEWL- ztráta vody přes kůži

8 CITOVANÁ LITERATURA

1. Florescu, D. F., Keck, M. A. (2014). Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), 1171–1178. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.948847>
2. Toro, J. R., Sanchez, S., Turiansky, G., Blauvelt, A. (2003). Topical cidofovir for the treatment of dermatologic conditions: verruca, condyloma, intraepithelial neoplasia, herpes simplex and its potential use in smallpox. *Dermatologic clinics*, 21(2), 301–309. [https://doi.org/10.1016/s0733-8635\(02\)00116-x](https://doi.org/10.1016/s0733-8635(02)00116-x)
3. Vencovská, L. (2016). Studium prostupu protivirového léčiva brincidofoviru do kůže. *Středoškolská odborná činnost, Biskupské gymnázium Bohuslava Balbína, Hradec Králové*, 25s.
4. Sun, L., Wang, X., Wang, J. (2021). Žadatel Beijing Apex Medical Technology Development Co., Ltd. Číslo přihlášky 202011464864.0
5. Gerard, J. T., Derrickson, B. H. (2011). *Principles of Anatomy and Physiology*, 13th Edition. John Wiley & Sons. ISBN: 0470929189.
6. Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences*, 34(9), 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.08.001>
7. Eucerin[®]: Jak kůže funguje – Struktura a funkce kůže, dostupné online: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
8. Vávrová, K., Hrabálek, A. (2006). Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství*, 2(2), 55–58.
9. Vávrová, K., Hrabálek, A. (2005). Lze překonat kožní bariéru?, *Praktické lékařství*, 1(1), 8–11.
10. Meyer, J. M., Vávrová, K., Radner, F. P. W., Schneider, H., Dick, A., Mauro, T. M., Elias, P. M. (2023). ALOX12B and PNPLA1 have distinct roles in epidermal lipid lamellar organization. *The Journal of investigative dermatology*, 143(2), 332–335.E4. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.07.029>
11. Pathan, I. B., Setty, C. M. (2009). Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2), 173–17
12. Dwivedi, A., Mazumder, A., Pullmannová, P., Paraskevopoulou, A., Opálka, L., Kováčik, A., Macháček, M., Jančálková, P., Svačinová, P., Peterlík, H., Maixner, J., Vávrová, K. (2024). Lipid monolayer on cell surface protein templates functional extracellular lipid assembly. *Small*, 2307793, 1–11. <https://doi.org/10.1002/sml.202307793>

-
13. Marks R. (2004). The stratum corneum barrier: the final frontier. *The Journal of nutrition*, 134(8 Suppl), 2017S–2021S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.8.2017S>
14. Dmitrieva, N. I., Burg, M. B. (2011). Increased insensible water loss contributes to aging related dehydration. *PLoS ONE*, 6(5), e20691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020691>
15. Williams, A. C. (2004). Transdermal and topical drug delivery. From theory to clinical practice. Pharmaceutical Press, London, s 169-194, ISBN: 0853694893.
16. Elias, P. M., Feingold, K. R. (2006). Skin barrier. 1.vydání, CRC Press, s 1-3, 65-89, ISBN: 9780429163470.
17. Hergesell, K., Paraskevopoulou, A., Opálka, L., Velebný, V., Vávrová, K., Dolečková, I. (2023). The effect of long-term cigarette smoking on selected skin barrier proteins and lipids. *Scientific reports*, 13(1), 11572. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38178-7>
18. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., van der Spek, J. A., Bras, W. (1991). Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *The Journal of investigative dermatology*, 97(6), 1005–1012. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12492217>
19. Opálka, L., Meyer, J. M., Ondrejčková, V., Svatošová, L., Radner, F. P. W., Vávrová, K. (2022). ω -O-Acylceramides but not ω -hydroxy ceramides are required for healthy lamellar phase architecture of skin barrier lipids. *Journal of lipid research*, 63(6), 100226. <https://doi.org/10.1016/j.jlcr.2022.100226>
20. Elias, P. M., Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in lipid research*, 24, 1–26. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-024924-4.50005-5>
21. Engberg, O., Kováčik, A., Pullmannová, P., Juhaščík, M., Opálka, L., Huster, D., Vávrová, K. (2020). The Sphingosine and Acyl Chains of Ceramide [NS] Show Very Different Structure and Dynamics That Challenge Our Understanding of the Skin Barrier. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 59(40), 17383–17387. <https://doi.org/10.1002/anie.202003375>
22. Sochorová, M., Audrlická, P., Červená, M., Kováčik, A., Kopečná, M., Opálka, L., Pullmannová, P., Vávrová, K. (2019). Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *Journal of colloid and interface science*, 535, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.09.104>
23. Fandrei, F., Engberg, O., Opálka, L., Jančálková, P., Pullmannová, P., Steinhart, M., Kováčik, A., Vávrová, K., Huster, D. (2022). Cholesterol sulfate fluidizes the sterol fraction of the stratum corneum lipid phase and increases its permeability. *Journal of lipid research*, 63(3), 100177. <https://doi.org/10.1016/j.jlcr.2022.100177>
24. Güngör, S., Erdal, M., Ozsoy, Y. (2012). Plasticizers in transdermal delivery systems. In: Recent advances in plasticizers, Intech, s 91-112, ISBN: 9789535103639.

-
25. Kováčik, A., Kopečná, M., Hrdinová, I., Opálka, L., Boncheva Bettex, M., Vávrová, K. (2023). Time-dependent differences in the effects of oleic acid and oleyl alcohol on the human skin barrier. *Molecular pharmaceutics*, 20(12), 6237-6245. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00648>
26. Janůšová, B., Školová, B., Tükörová, K., Wojnarová, L., Šimůnek, T., Mladěnka, P., Filipický, T., Říha, M., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, A., Vávrová, K. (2013). Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 165(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.003>
27. Marwah, H., Garg, T., Goyal, A. K., Rath, G. (2016). Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug delivery*, 23(2), 564–578. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.935532>
28. Thomas, B. J., Finnin, B. C. (2004). The transdermal revolution. *Drug discovery today*, 9(16), 697–703. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03180-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03180-0)
29. Bos, J. D., Meinardi, M. M. H. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology*, 9(3), 165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
30. Wiedersberg, S., Guy, R. H. (2014). Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting!. *Journal of controlled release*, 190, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.022>
31. Hrabálek, A., Doležal, P., Šklubalová, Z., Farsa, O., Krebs, A. (1999). Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy*, 93(2), 107-119.
32. Williams, A. C., Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews*, 56(5), 603–618. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.025>
33. Vávrová, K., Lorencová, K., Novotný, J., Holý, A., Hrabálek, A. (2008). Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: influence of pH, ion-pairing and skin species. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 70(3), 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.07.002>
34. Hrabálek, A., Doležal, P., Farsa, O., Šklubalová, Z., Kuneš, J. (2000). Esters of 6-dimethylaminohexanoic acid as skin penetration enhancers. *Die Pharmazie*, 55(10), 759–761.
35. Novotný, J., Kovaříková, P., Novotný, M., Janůšová, B., Hrabálek, A., Vávrová, K. (2009). Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharmaceutical research*, 26(4), 811–821. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9780-3>
36. Kralund, H. H., Broesby-Olsen, S., Bistrup, C., Lorentzen, H. F. (2011). Substantial effect of topical cidofovir 1% on recalcitrant warts in a renal-transplanted adolescent: a case report. *Transplantation*, 91(7), e52–e54. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31820f08d0>

37. Naesens L, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J, Neyts J, De Clercq E. HPMPC (cidofovir), PME A (adefovir) and Related Acyclic Nucleoside Phosphonate Analogues: A Review of their Pharmacology and Clinical Potential in the Treatment of Viral Infections. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 1997;8(1):1-23. <https://doi.org/10.1177/095632029700800101>
38. Zabawski, E. J., Jr, Cockerell, C. J. (1998). Topical and intralesional cidofovir: a review of pharmacology and therapeutic effects. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 39(5 Pt 1), 741–745. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(98\)70046-5](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(98)70046-5)
39. Sobral-Costas, T. G., Escudero-Tornero, R., Servera-Negre, G., Bernardino, J. I., Gutiérrez Arroyo, A., Díaz-Menéndez, M., Busto-Leis, J. M., Roces Álvarez, P., Herranz Pinto, P., Sendagorta Cudos, E. (2023). Human monkeypox outbreak: Epidemiological data and therapeutic potential of topical cidofovir in a prospective cohort study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 88(5), 1074–1082. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.10.043>
40. Cena CDV. Dostupné online: <https://www.abmole.com/products/cidofovir.html>
41. Alvarez-Cardona, J. J., Whited, L. K., Chemaly, R. F. (2020). Brincidofovir: understanding its unique profile and potential role against adenovirus and other viral infections. *Future microbiology*, 15, 389–400. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0288>
42. Tylden, G. D., Hirsch, H. H., Rinaldo, C. H. (2015). Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3306–3316. <https://doi.org/10.1128/AAC.00238-15>
43. Guo, S., Zhang, Y., Liu, Z., Wang, D., Liu, H., Li, L., Chen, Q., Yang, D., Liu, Q., Guo, H., Mou, S., Chen, H., Wang, X. (2023). Brincidofovir is a robust replication inhibitor against African swine fever virus *in vivo* and *in vitro*. *Emerging microbes & infections*, 12(2), 2220572. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2220572>
44. Dunning, J., Kennedy, S. B., Antierens, A., Whitehead, J., Ciglenecki, I., Carson, G., Kanapathipillai, R., Castle, L., Howell-Jones, R., Pardinaz-Solis, R., Grove, J., Scott, J., Lang, T., Olliaro, P., Horby, P. W., RAPIDE-BCV trial team (2016). Experimental Treatment of Ebola Virus Disease with Brincidofovir. *PloS ONE*, 11(9), e0162199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162199>
45. Green, M., Kashetsky, N., Feschuk, A., Maibach, H. I. (2022). Transepidermal water loss (TEWL): Environment and pollution-A systematic review. *Skin health and disease*, 2(2), e104. <https://doi.org/10.1002/ski2.104>
46. Karande, P., Jain, A., Mitragotri, S. (2006). Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 110(2), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.012>
47. Kopečná, M., Macháček, M., Roh, J., Vávrová, K. (2022). Proline, hydroxyproline, and pyrrolidone carboxylic acid derivatives as highly efficient but reversible transdermal permeation enhancers. *Scientific reports*, 12(1), 19495. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24108-6>

-
48. 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. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of lipid research*, 53(12), 2755–2766. <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>
49. Mendelsohn, R., Flach, C. R., Moore, D. J. (2006). Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(7), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.009>
50. Mendelsohn, R., Moore, D. J. (1998). Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chemistry and physics of lipids*, 96(1-2), 141–157. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(98\)00085-1](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(98)00085-1)
51. Wohlrab, J., Vollmann, A., Wartewig, S., Marsch, W. C., Neubert, R. (2001). Noninvasive characterization of human stratum corneum of undiseased skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis as studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 62(3), 141–146. <https://doi.org/10.1002/bip.1006>
52. Kopečná, M., Macháček, M., Nováčková, A., Paraskevopoulos, G., Roh, J., Vávrová, K. (2019). Esters of terpene alcohols as highly potent, reversible, and low toxic skin penetration enhancers. *Scientific reports*, 9(1), 14617. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51226-5>