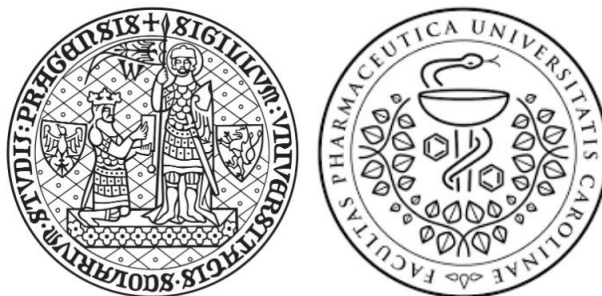


**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta Hradec Králové**  
**Katedra farmaceutické technologie**

**Studijní program: Farmacie**

**Studijní obor: Farmacie**



**In vitro modely kožní bariéry**

**In vitro models of skin barrier**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce: doc. Dr. rer. nat. Jarmila Zbytovská**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

**Matěj Šimek**

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

V Hradci Králové 2021

Matěj Šimek

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval paní doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmile Zbytové za velkou trpělivost a mnoho rad a instrukcí při psaní mé diplomové práce.

# Obsah

1	ÚVOD .....	11
2	CÍL PRÁCE .....	12
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE .....	13
3.1	Kůže .....	13
3.1.1	Stratum corneum .....	14
3.1.2	Průnik léčiv a dalších látek kůže .....	16
3.1.3	Faktory ovlivňující permeaci léčiv .....	18
3.2	Ceramidy v epidermis .....	18
3.2.1	Charakteristika ceramidů a jejich funkce .....	18
3.2.2	Struktura ceramidů .....	19
3.2.3	Ceramidy a jejich důležitost pro tělo a obranu proti infekcím .....	21
3.3	Urychlovače permeace .....	21
3.3.1	Charakteristika urychlovačů permeace .....	21
3.3.2	Interakce mezi kůží a chemickými urychlovači .....	21
3.4	Vybrané kožní choroby .....	22
3.4.1	Zánětlivé choroby .....	22
3.4.2	Puchýřnatá onemocnění kůže .....	24
4	MODELY KŮŽE PRO STUDIUM PERMEABILITY LÉČIV .....	24
4.1	Syntetické membrány .....	25
4.1.1	Charakteristika syntetických membrán .....	25
4.1.2	Celulózové membrány .....	25
4.1.3	Syntetické polymery .....	26
4.1.4	Přednosti silikonových membrán .....	27
4.2	Zvířecí modely kožních membrán .....	27
4.2.1	Odlišnosti kůže člověka a kůže zvířat .....	27
4.2.2	Myš .....	29
4.2.3	Krysa .....	30

4.2.4 Morče.....	30
4.2.5 Králík .....	30
4.2.6 Opice .....	31
4.2.7 Prase.....	31
4.2.8 Had .....	31
4.2.9 Membrána vaječné skořápky .....	32
4.3 Skin-PAMPA: nová metoda pro rychlou predikci kožní permeability .....	32
4.3.1 Charakteristika metody.....	32
4.3.2 Složení modelu skin - PAMPA .....	33
4.3.3 Egg-PAMPA .....	34
4.3.4 DOPC-PAMPA a DS-PAMPA .....	34
4.3.5 BM-PAMPA .....	35
4.3.6 Nastavitelné podmínky experimentů při PAMPA metodách.....	35
4.4 Lipidové membrány stratum corneum.....	36
4.4.1 Charakteristika lipidových membrán .....	36
4.4.2 Příprava lipidových membrán .....	37
4.4.3 Využití lipidových membrán .....	37
4.4.4 Průběh testování permeability na lipidových membránách.....	38
4.5 Modely kůže získané bioinženýrstvím.....	38
4.5.1 Charakteristika bioinženýrstvím získané kůže .....	38
4.5.2 Využití kůže z bioinženýrství .....	40
4.5.3 Modely kožních chorob.....	41
4.5.4 Typy modelů kůže získané bioinženýrstvím.....	43
4.6 3D modely kůže .....	45
4.6.1 Charakteristika 3D modelů kůže .....	45
4.6.2 3D kožní modely tvořené lidskými buňkami .....	47
4.6.3 Integrace imunitních buněk.....	47
4.6.4 Využití bakterií na 3D kožních modelech pro medicínské účely.....	48
4.6.5 Syntetická stratum corneum.....	49

4.7 Komerčně dostupné modely lidské epidermis.....	49
4.7.1 Charakteristika modelů lidské epidermis.....	49
4.7.2 Příprava a využití vybraných modelů lidské epidermis.....	49
4.7.3 Model SkinEthic® .....	51
4.7.4 Model EpiSkin® .....	53
4.7.5 Model EpiDerm® .....	55
4.7.6 Porovnání modelů lidské epidermis .....	56
5 VÝSLEDKY HLEDANÍ Z DATABÁZÍ PUBMED, WEB OF SCIENCE A SCOPUS.....	58
6 ZÁVĚR.....	61
7 SEZNAM CITACÍ:.....	64

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Student: Matěj Šimek

Školitel: doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmila Zbytovská

Název: In vitro modely kožní bariéry

Cílem této diplomové práce je prostřednictvím odborné, ověřené a recenzované literatury podat informace o různých typech modelů kůže, na kterých se zkouší permeabilita léčiv, jejich toxicita, dráždivost a další charakteristiky, které je nezbytné znát pro zajištění optimální bezpečnosti, účinnosti a kvality transdermálně podávaných léčiv.

Podání léčiv přes kůži skýtá mnoho benefitů oproti klasickému perorálnímu podání. Aplikace léčiv tímto způsobem je poměrně snadná a lze ji rychle přerušit, lze také obměnit místo aplikace, ve kterém se má léčivo uvolňovat a je sníženo riziko předávkování. Transdermální podání dále umožňuje udržovat konstantní plazmatickou hladinu léčiva v krvi, prodloužit trvání účinku léčiv s krátkým poločasem díky konstantnímu uvolňování a především se takto podané léčivo vyhne „*first-pass*“ efektu jater, tudíž můžeme snížit celkovou podanou dávku. Dále je omezeno riziko interakcí léčiv a jejich nežádoucích účinků, pacient má obvykle dobrou compliance (snadno zjistí, zda si léčivý přípravek nezapomněl vzít) a v neposlední řadě se jedná o vhodnou lékovou formu pro pacienty v bezvědomí, s polykacími potížemi a starší pacienty.

Tento způsob podání léčiv je testován na různých kožních modelech, jejichž výrobci se snaží o co nejautentičtější složení modelů vzhledem k lidské kůži, tak aby ohledně dat získaných z experimentů a testování léčiv cestou kožního podání byla možná dobrá extrapolace přímo na lidskou kůži. K usnadnění permeace léčiv se pak využívá celá řada látek urychlujících nebo usnadňujících permeaci. Sortiment těchto modelů je velmi široký, zahrnuje mnoho různých typů od těch nejjednodušších (syntetické modely, modely zvířecí kůže...) až po ty komplexní, které se v mnohém podobají právě lidské kůži (modely získané bioinženýrstvím, modely lidské epidermis).

Tato práce shrnuje problematiku kožních modelů. Na konci literární rešerše jsou pomocí tabulek porovnány výsledky z bibliografické databáze PubMed, citační databáze Web of Science a z citační databáze Scopus v rámci množství článků, které tyto databáze našly podle klíčových slov rovněž uvedených v tabulce.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: Matěj Šimek

Consultant: doc. Dr. rer. nat. Mgr. Jarmila Zbytovská

Title of thesis: In vitro models of skin barrier

The aim of this work is to summarize information about various types of skin models which are used for testing of permeability, toxicity, irritability and other aspects of drugs, through professional, verified and reviewed literature. These characteristics are necessary to know in order to grant optimal safety, effectiveness and quality of transdermally administered drugs.

Transdermal administration of drugs has got lots of benefits in contrast with classic peroral administration. An administration of drugs through this way is quite simple and it can be interrupted quite easily. We can also easily change a place of administration in which a drug is released and the risk of overdosing is very low. Furthermore, transdermal administration makes possible to maintain constant plasmatic concentration of drug in a blood stream and also to prolong the duration of effect of drugs with small halftime thanks to constant releasing of drug. And primarily, transdermally administered drug normally avoids the „*first-pass*“ effect of liver, so the dose of drug can be lowered. The risk of drug interactions and their adverse effects is also lowered and a patient usually has a good compliance (he/she can simply figure if he/she did not forget to use his/her drug). Last but not least, transdermal administration is a suitable way of drug administration for unconscious patients, patients with swallowing problems and older patients.



This type of drug administration is tested on various skin models, whose manufacturers tend to make the most authentic composition like the human skin has, in order to have a good extrapolation of data gained from experiments and tests of drugs, to human skin. To facilitate the permeation of drugs, various substances accelerating and facilitating the drug permeation are used. The assortment of these models is very wide and it features various skin models from the most simple ones (synthetic skin models, animal skin models...) to the complex ones which should mimic the human skin as much as possible (bioengineered skin models, human epidermis models).

This work summarizes the problematics of skin models. At the end of this work there are tables which compare the results of searching in a bibliographic database PubMed, citation database Web of Science and citation database Scopus. There are numbers of articles found in these databases by using of keywords which can be also seen in tables.

## **Seznam použitých zkratek**

SC – stratum corneum

AD – atopická dermatitida

IgE – imunoglobulin E

EB – epidermolysis bullosa

PAMPA - parallel artificial membrane permeability assay (paralelní test permeability umělé membrány)

DOPC-PAMPA – dioleoylphosphatidylcholine parallel artificial membrane permeability assay (paralelní test permeability umělé membrány s využitím dioleoylphosphatidylcholinu)

DS-PAMPA – double sink parallel artificial membrane permeability assay (paralelní test permeability umělé membrány s využitím dvojitého sinku podmínek)

BM-PAMPA - biological membrane parallel artificial membrane permeability assay (paralelní test permeability umělé membrány s využitím biologických membrán)

PEG - polyethylenglykol

RHE – reconstructed human epidermis

# 1 ÚVOD

Modely kůže pro testování léčiv, především in vitro modely *stratum corneum*, jsou veledůležitým nástrojem pro získávání poznatků o léčivech stran jejich kožní permeability, toxicity, dráždivosti a dalších charakteristik. Problematika těchto modelů, jejichž spektrum je opravdu široké, je předmětem lékařských výzkumů zhruba od 60. let minulého století, jak je patrné z tabulky shrnující počty vyhledaných článků o různých modelech na konci této rešerše.

Lokální / transdermální podání léčiv skýtá oproti tradiční perorální cestě podání mnoho výhod (viz. výše). Množství nezměněného léčiva, které projde kůží a dosáhne zamýšleného místa svého působení, popř. se dostane do systémové cirkulace, je důležitým parametrem toho, zda je léčivo vhodné k transdermálnímu podání. Vliv na kožní absorpci léčiva má mnoho faktorů, zejména místo a fyziologický stav kůže v místě podání, fyzikálně – chemické vlastnosti léčiva a fyzikálně chemické vlastnosti vehikula, ve kterém je léčivo podáno. [1] Pro vyhodnocení vhodnosti léčiva pro transdermální podání je nezbytný screening jeho permeability. Pro tento účel se používají důvěryhodné a specifické kožní modely, které by během testování měly svým složením a vlastnostmi co nejpřesněji simulovat situaci v přirozené lidské kůži. Tyto modely se používají jak ve farmaceutických, tak v toxikologických i kosmetických výzkumech. [2]

Mezi jednodušší modely patří syntetické modely, namátkou silikonové membrány nebo membrány z polydimethylsiloxanu. [3]. Dále se k výzkumným účelům používají kůže mnohých zvířat, která jsou též významným zdrojem materiálu pro testování léčiv. Mezi častěji využívané patří kůže myši, krysa a prasete. Speciálně prasečí kůže má pro výzkumné účely mnoho výhod, jelikož její anatomické, fyziologické a histologické charakteristiky se lidské kůži v mnohém podobají. [2]. Nakládání s kůžemi zvířat však provází řada etických norem a pravidel, která se musí striktně dodržovat.

V posledních dvaceti letech se do praxe dostávají i 3D modely lidské kůže, které jsou připravovány způsobem, který umožní použitým komponentám samovolně prospívat

(např. diferenciaci keratinocytů), a v těchto modelech se používají i buňky jiných lidských orgánů, čímž lze dobře simulovat situaci v podmínkách *in vivo* při transdermálním podání léčiva. Perspektivním nástrojem do budoucna je pak metoda Skin – PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay = paralelní test permeability s uměle vytvořenou membránou) a její různé modifikace, kterou se vědci zabývají teprve nějakých 10 – 15 let. [4]. Podobně dlouho jako 3D modely kůže, se pro testování permeability léčiv a také ztráty vody z epidermis používají lipidové membrány *stratum corneum*. Tyto se připravují ze širokého spektra ceramidů, cholesterolu a mastných kyselin, které jsou běžnou součástí přirozené lidské kůže. Vhodné pro *in vitro* testování permeace a penetrace léčiv ve formě vodných roztoků, zejména v raných stádiích vývoje léčiv (včetně jejich lékových forem) jsou komerčně dostupné modely lidské epidermis EpiSkin<sup>®</sup>, EpiDerm<sup>®</sup> a SkinEthic<sup>®</sup>. [5]

Výzkum v rámci kožního podání léčiv se však upíná především k lidské kůži, která je logicky nejvhodnějším modelem pro testování léčiv. [2] Mezi její složky, se kterými se v praxi pracuje, patří např. keratinocyty (kožní buňky), fibroblasty, ceramidy, cholesterol a další komponenty lidské kůže. Zdrojem je materiál z plastických operací, amputací, popř. mrtvých těl, procesy jejich získávání a nakládání s nimi jsou však provázeny mnohými etickými normami, jejichž požadavky musí být pro nakládání s tímto materiálem vždy splněny. [2]

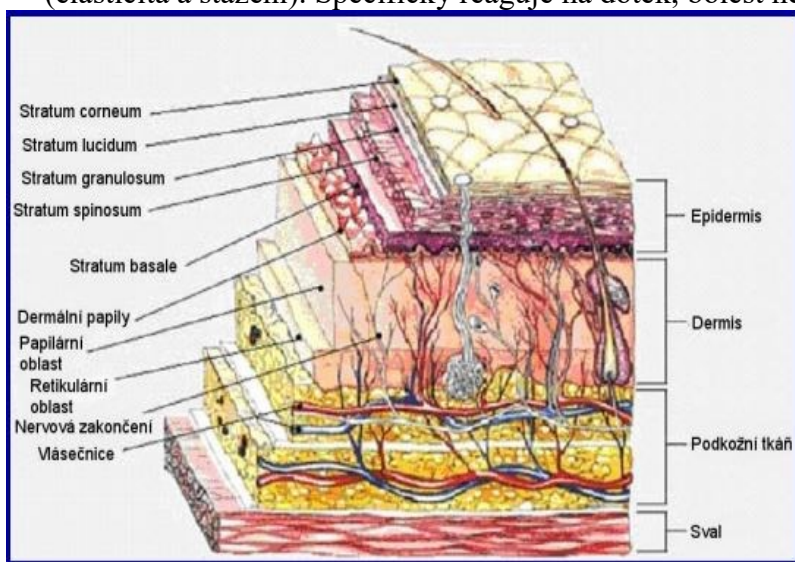
## 2 CÍL PRÁCE

Modely kůže jsou velmi širokou problematikou a dosud jich bylo vytvořeno opravdu široké spektrum, přičemž stále dochází jak ke zdokonalování již těch stávajících, tak i k vývoji nových modelů kůže. Z toho pramení i nespočet publikovaných studií a prací na toto téma. Za účelem vytvoření aspoň základního přehledu byla vypracována tato práce, která pojednává o jednotlivých skupinách modelů kůže stran jejich možností využití, výhod, nedostatků, dostupnosti, přípravy atd. K tomuto účelu bylo použito odborných a ověřených informačních zdrojů z výše zmíněných databází. Co se časového horizontu týče, ukazují tabulky počet výsledků hledání pro jednotlivé časové intervaly od roku 1960 až po současnost, přičemž počty výsledků mohou poukazovat i na obsáhlou databázi.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla a také primární bariérou pro systémovou absorpci a lokálně aplikované látky. Dále je kůže vstupní branou pro transdermální léčiva. Díky svému velkému povrchu (1,5 – 2 m<sup>2</sup>) a cévní protkanosti, která tvoří 5 – 10 % srdečního oběhu, může být kůže cestou vstupu některých látek do organismu. Kůže poskytuje bariéru pro nechtěné toxické substance a patologické mikroorganismy, chrání před ztrátou vody a živin a reaguje na mechanické podněty (elasticita a stažení). Specificky reaguje na dotek, bolest nebo a změnu teploty (např.



pocení při letních teplotách), chrání před ultrafialovým zářením, má svůj specifický metabolismus, imunologickou aktivitu a je schopna vykazovat i zánětlivou reakci.

Kůže je heterogenní orgán, skládající se z velkého množství buněčných vrstev, viz. Obrázek 1. Sama tvoří až pětinu tělesné hmotnosti.

**Obrázek 1:** Stavba kůže, viditelná na jejím řezu. Zdroj: [1]

Epidermis je vnější část, je

embryonálního i ektodermálního původu, zatímco hypodermis je původu mesodermálního. Tloušťka epidermis závisí na konkrétní části lidského těla, např. na víčkách dosahuje 0,03 mm, na dlaních pak i 2 mm. Epidermis se skládá z několika vrstev v následujícím pořadí od nejsvrchnější po nejspodnější: *stratum corneum* (SC, zrohovatělá vrstva z bezjaderných, plochých a zrohovatělých korneocytů), *stratum lucidum* (světlá vrstva), *stratum granulosum* (zrnitá vrstva s keratohyalinovými granuly), *stratum spinosum* (vřetenovitá vrstva a místo produkce keratinu) a *stratum basale* (bazální vrstva, s oválnými a cylindrickými buňkami, které mají velká jádra, ovšem málo cytoplasmy a obsahuje melanocyty produkující melanin). [6]

Uspořádání vrstev na sobě je patrné z obrázku 1. Kromě *stratum corneum* se všechny skládají z živých buněk. Naprostá většina buněk v epidermis jsou keratinocyty, které se tvoří diferenciací a migrací směrem vzhůru z metabolicky aktivní bazální vrstvy. Buňky *stratum spinosum* jsou spojeny pomocí desmozomů, což jsou mezibuněčné spoje zajišťující pružnost, pevnost a odolnost vůči tahu a tlaku. V epidermis pak dále najdeme Langersansovy buňky a melanocyty produkující kožní barvivo melanin. Pod epidermis se nachází dermis neboli škára obsahující kožní komponenty jako jsou např. mazové a potní žlázy. Mazové žlázy se vážou na vlasové folikuly, najdeme je hlavně na obličeji a horní části hrudníku, jejich aktivita je pak řízena hormonálně. Dospělý jedinec disponuje zhruba 300 000 mazovými žlázami. Dále jsou zde potní žlázy, které rozlišujeme na velké potní žlázy (apokrinní) a malé potní žlázy (ekrinní). Apokrinní se též vážou na vlasový folikul a jejich aktivita začíná v pubertě, taktéž je ovlivněna hormony. Důvodem značného zápachu jejich sekretu je to, že sekret je relativně bohatý na lipidy, které podléhají bakteriálnímu rozkladu za vzniku nepříjemně zapáchajících rozkladných produktů. Vyskytují se hlavně v oblasti podpaží, na dlaních a ploskách nohou. Malé potní žlázy jsou pak rozmístěny po celém povrchu těla, krom nehtových lůžek, rtů, malých stydkých pysků a klitorisu. Je jich zde zhruba 6 milionů a jejich sekret obsahuje také vodu nebo sodné ionty. Jsou zde také krevní cévy a nervová zakončení. [6] Podkožní tkáň pak obsahuje převážně tuky, ale stejně jako v dermis, i zde jsou krevní cévy a nervová zakončení.

### 3.1.1 Stratum corneum

Vrstva *stratum corneum* je hlavní bariérou regulující kožní permeabilitu. Je zhruba 10-50 um silná, metabolicky neaktivní, s nízkým obsahem vody. Skládá se ze zrohovatělých korneocytů, které jsou bezjaderné a nemají ani cytoplasmatické organely. Korneocyty spolu tvoří tzv. strukturu cihel a malty, viz. Obrázek 2. Korneocyty jsou zde jako cihly, obklopené lipidovou matrix v mezibuněčných prostorech, které představují maltu. [7] Jak korneocyty, tak lipidová matrix se vyznačují strukturální a funkční komplexností, metabolickou adaptabilitou a schopností autopoéze (udržování funkce sebe sama svým konstantním obnovováním). [8]

*Stratum corneum* je tvořena především lipidy a to ze 70 – 80 %. Nejvíce obsaženým proteinem je pak keratin. Zbytek tvoří různorodé organické sloučeniny a voda. Lipidy zde tvoří dvojvrstvy a to tak, že hydrofobní část směřuje dovnitř, hydrofilní část pak směrem vně. Lamely ve *stratum corneum* jsou tvořeny z 50 % ceramidy, což je hlavní lipidová složka

vrstvy, z 25 % cholesterolem, z 10 % volnými mastnými kyselinami, zbytek připadá na některé deriváty cholesterolu (např. cholesterol-sulfát) a další lipidy. [6]

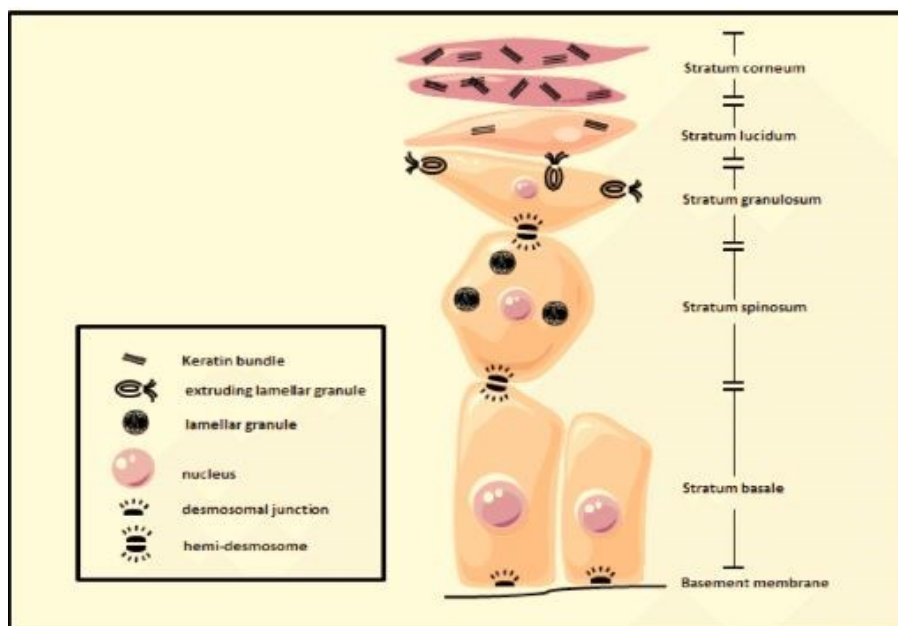
Mezi hlavní strukturální komponenty vrstvy *stratum corneum* patří:

- 1) Korneocyty v 18 – 20 vrstvách (v závislosti na oblasti lidského těla), poskytující fyzikální bariéru.
- 2) Korneodesmosomy držící korneocyty pohromadě. Desmosomy podléhají procesu postupného rozkladu, což umožňuje deskvamaci vnějších, extrémně zrohovatělých korneocytů
- 3) Lipidová matrix vyplňující klikatou cestou mezi naskládanými korneocyty. Jedná se o vysoce komplexní směs asi 13 druhů ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin v ekvimolárních poměrech. Tyto ovlivňují permeabilitu bariéry.
- 4) Lipolytické a proteolytické enzymy, účastníci se zpracovávání bariérových lipidů a rozkladu desmozomů. Napomáhají biochemickým procesům ve *stratum corneum*.
- 5) Sekretovaný obsah lamelárních tělísek na rozhraní *stratum corneum* a *stratum granulosum*. Jde o směs bariérových lipidů, které dávají vzniknout dalším lipidovým lamelám ve *stratum corneum* a spolupracují zde s výše zmíněnými enzymy.

Všechny tyto komponenty jsou nezbytné pro správnou funkci kožní bariéry a významně ovlivňují transdermální přenos léčiv. Jakékoliv narušení těchto komponent nebo změny jejich vlastností mohou oslabit bariéru. Obrázek 3 srovnává sílu všech dílčích vrstev.



**Obrázek 2:** Korneocyt s lipidovou matrix jako struktura "cihel a malty". Zdroj: [9]



**Obrázek 3:** Řez epidermis zobrazující návaznost jejich vrstev. Zdroj: [12]

### 3.1.2 Průnik léčiv a dalších látek kůží

Proces průchodu léčiva během jeho transdermálního přenosu do systémového oběhu vlastně představuje průchod navazujícími vrstvami kůže. Začíná tedy uvolněním permeantu z lékové formy, následuje penetrace do *stratum corneum*. Léčivo difunduje skrz tuto lipofilní vrstvu ve množství, které umožňuje jeho difuzivita touto vrstvou, poté se rozděluje ve vodném prostředí životaschopné oblasti epidermis. Nakonec je léčivo absorbováno kapilárním systémem do dermis, jejíž prostředí je také spíše vodné.

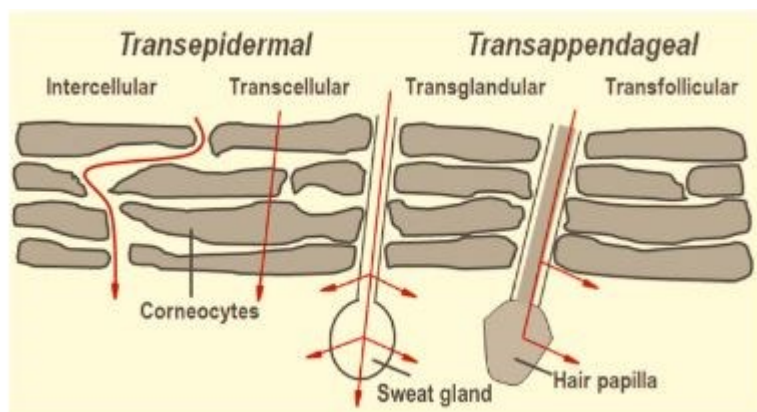
Limitujícím krokem je zde rozdělování léčiva ve *stratum corneum*, na což má určitý vliv jeho uvolňování z vehikula. Na druhou stranu, tento a výše zmíněné kroky jsou vysoce závislé na rozpustnosti a difuzivitě permeantu v různých prostředích. Uvolňování permeantu z vehikula a jeho proudění do lipofilní *stratum corneum* je závislé na relativní rozpustnosti v každé části vrstvy a tedy na rozdělovacím koeficientu vehikulum – *stratum corneum*. Difúzní koeficient a rychlost, kterou se permeant v různých prostředích pohybuje, jsou závislé jak na vlastnostech permeantu, tak na faktorech prostředí jako jsou viskozita a délka průchodu difundující látky. [10,11]



Transport léčiv přes kůži může potenciálně probíhat třemi cestami. Tou první je tzv. „transappendageální“ cesta, zahrnující potní žlázy, vlasové folikuly a mazové žlázy, viz. Obrázek 4. Další dvě cesty vedou přímo přes *stratum corneum* - jedná se o cestu intercelulární (mezi korneocyty) a cestu transcelulární, vedoucí přes korneocyty. [13]

Léčivo samozřejmě ve většině případů využije pro transport tu cestu, která je vhodná z hlediska jeho fyzikálně-chemických vlastností. Např. transcelulární cesta je vhodná pro průchod polárních látek přes *stratum corneum*, jelikož korneocyty obsahují intracelulární keratinovou matrix, které je významně hydratovaná a tedy polární povahy. Permeace látky zde vyžaduje stálé rozdělování mezi tímto polárním prostředím a lipofilními doménami, též obsaženými v korneocytech. [10,11] Toto je tedy preferenční cesta pro hydrofilní látky, i když zde permeant musí projít přes mezibuněčné lipidy, aby se mohl dostávat z jednoho korneocytu na druhý, což je princip transcelulární cesty transportu léčiv. [14]

I když je výše zmíněný typ transportu v podstatě jednoduchou a přímou cestou, více se uplatňuje intercelulární cesta, která spočívá v plynulém pohybu léčiva přes *stratum corneum*. [13] V jejím případě je difúzní cesta podstatně delší, než je tloušťka *stratum corneum* (10 – 15  $\mu\text{m}$ ), jelikož mezibuněčné domény mezi korneocyty jsou velmi klikaté. V mezibuněčných prostorách pak musí difundující molekula projít přes četné lipofilní (přes lipidové jádro) a hydrofilní (přes polární skupiny) domény dalších zde přítomných lipidů. [10]



**Obrázek 4:** Schématické znázornění možných cest penetrace léčiv přes *stratum corneum*.

Zdroj: [8]

### 3.1.3 Faktory ovlivňující permeaci léčiv

Permeabilita kůže je ovlivněna řadou fyziologických faktorů, mezi které řadíme např. věk, oblast aplikace léčiva na lidském těle, etnickou příslušnost, pohlaví, některé kožní choroby apod. Přirozené stárnutí kůže vede k tomu, že epidermis se stává tenčí a spojení mezi korneocyty postupně slábne. [15] Složení lipidů vlivem stárnutí též podléhá změnám, navíc klesá zastoupení některých důležitých lipidových podtříd, zejména ceramidů. Změnám neuteče ani dermis, ta se může dostat až do stádia atrofie a chátrá i její vaskularizace. Snížení hydratace a obsahu lipidů dále způsobují snížení permeability kůže pro hydrofilní sloučeniny. [11]

Vedle věku má vliv na permeabilitu kůže také oblast aplikace léčiva na kůži. Kůže na různých částech těla se liší jak morfologicky, tak po stránce funkčních charakteristik. Tyto lokální rozdíly vedou k rozdílům ve funkci kožní bariéry, permeabilita pak klesá např. v pořadí: genitálie (nejvíce permeabilní kůže) > hlava a krk > trup > paže a nohy (nejméně permeabilní kůže). Na rozdílech v permeabilitě se také může podílet konkrétní etnická příslušnost, tyto rozdíly však nejsou tak výrazné ve srovnání s interindividuální variabilitou napříč každou etnickou skupinou. [16] Ani co se pohlaví týče, tak zde nejsou významné rozdíly v kožní permeabilitě mezi pohlavími, pokud se mezi mužskou a ženskou kůží porovnají rozdíly ve transepidermálních ztrátách vody. [10, 17].

Všechny tyto faktory by měly být brány v potaz při výrobě transdermálních systémů s léčivem. Intenzita proudění léčiva pak záleží ještě na uvolňování ze systému v místě aplikace a na oblasti lidského těla, na které léčivo do kůže proudí, jelikož mezi různými tělesnými regiony jsou rozdíly v tloušťce a teplotě kůže. To ovlivňuje množství proudícího léčiva, jeho cirkulaci krví a jeho clearance. [18]

## 3.2 Ceramidy v epidermis

### 3.2.1 Charakteristika ceramidů a jejich funkce

Epidermis a zejména vnější vrstva *stratum corneum* poskytují obrannou bariéru proti ztrátám vody, xenobiotikům a škodlivým patogenům. Podmínkou života pro tuto epidermální bariéru je lamelární matrix bohatá na lipidy, jenž obklopuje odkryté korneocyty. Ceramidy jsou hlavními komponentami těchto vysoce organizovaně

uspořádaných lamelárních struktur, ve kterých zejména kyselina linoleová a ceramidy s esterifikovanými proteiny jsou nezbytné pro správnou strukturu a udržování integrity kožní bariéry. [19]

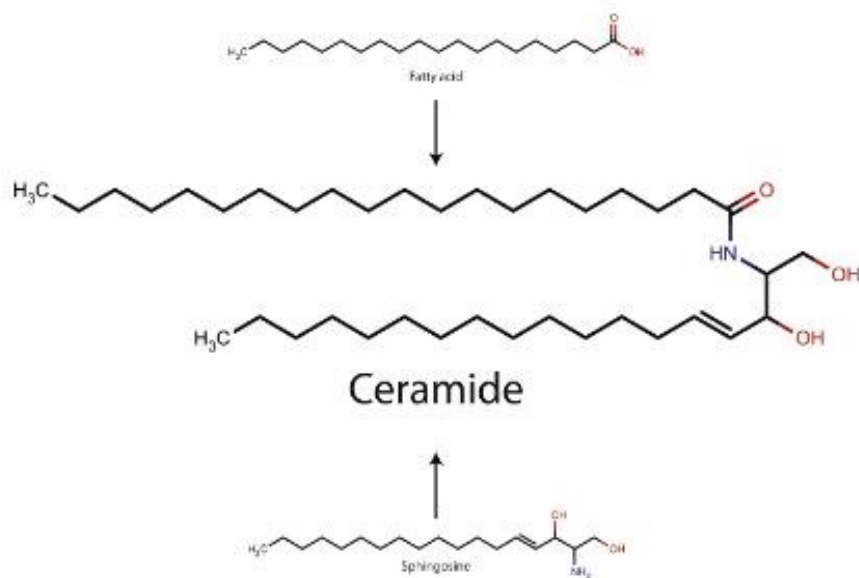
Ceramidy jsou centrální metabolity v metabolismu sfingolipidů a klíčové prostředníky pro syntézu glykosfingolipidů a sfingomyelinů. Jsou esenciálními komponenty pro eukaryotickou plasmatickou membránu a jsou všudypřítomně distribuovány ve všech tkáních savců. Role ceramidů jakožto strukturálních komponent je důležitá, stejně jako jejich vliv na bioaktivní metabolity, které rozhodují o osudu některých buněk lidského těla v procesech jako je například „programovaná“ buněčná smrt. [20] Široká paleta jejich funkcí dále zahrnuje jejich rozpoznávání mezi buňkami navzájem, mezibuněčnou adhezi, pohyblivost a diferenciaci buněk. [21]

I když jsou ceramidy menšinovou komponentou v mnohých tkáních, tak ve vnější epidermální vrstvě, tedy ve *stratum corneum* zastupují ceramidy z hlediska hmotnosti až polovinu celkové lipidové frakce. [22] Důležitost epidermálních ceramidů souvisí s jejich klíčovou rolí v udržování homeostázy epidermální bariéry. Epidermální ceramidy jsou důležité nejen pro ochranu proti transepidermálním ztrátám vody, ale taky pro ochranu proti mikrobiálním infekcím. To vysvětluje větší náchylnost k infekcím při různých kožních chorobách, jako je např. atopická dermatitida, pro které jsou typické snížené hladiny ceramidů. [23]

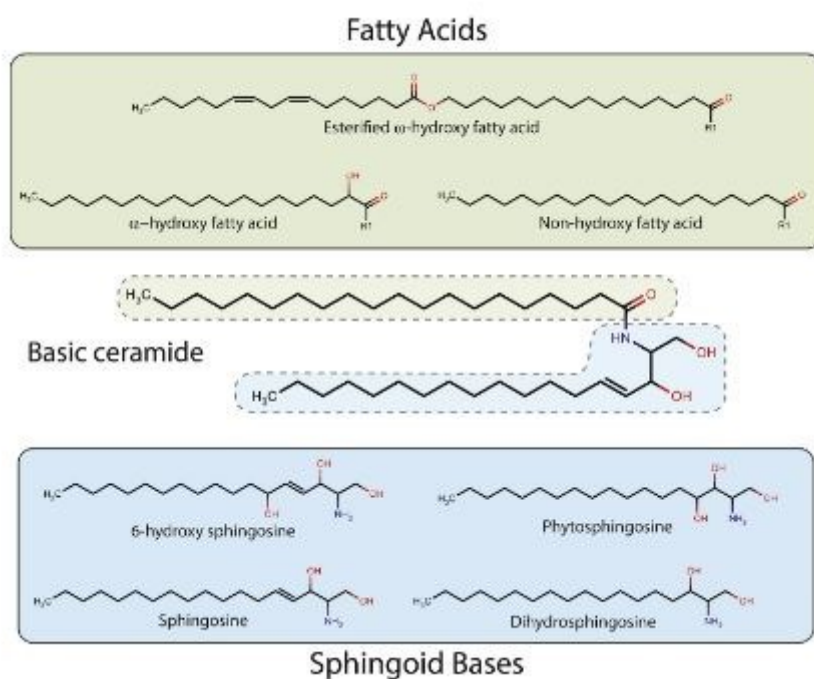
### 3.2.2 Struktura ceramidů

Základ ceramidu je tvořen tzv. sfingoidní bazí připojenou k mastné kyselině přes amidovou vazbu, viz. Obrázek 5. Složení ceramidů v lidské *stratum corneum* je však široce variabilní. Počet dosud známých tříd ceramidů v lidské kůži činí nejméně 12, ty se mezi sebou liší na základě složení hlavní skupiny nebo esterifikací mastné kyseliny, viz. Obrázek 6. Dosud známe 4 typy sfingoidních bazí a 3 různé typy mastných kyselin pro tyto ceramidy. Jedním z důležitých parametrů, kterým se třídy ceramidů mezi sebou liší, je délka uhlíkového řetězce, která napomáhá diferenciaci specifických ceramidů. Jen ve *stratum corneum* jich bylo doposud zjištěno až 340 specifických zástupců. [24] Délka ceramidů v lidské kůži je taktéž velmi variabilní. Například ceramidy s nehydroxylovanými mastnými kyselinami a sfingosinovou bazí v kůži čela obsahují 33 až 52 uhlíkových atomů. Sklony k větším délkám uhlíkových řetězců mají též volné mastné kyseliny obsažené ve *stratum*

*corneum*, jejichž délka se pohybuje mezi 14 a 32 uhlíky, přičemž převažují ty se 20 uhlíky a více. [25]



**Obrázek 5:** Základní struktura ceramidu. 1 mastná kyselina je připojena ke sfingoidní bázi přes amidovou vazbu. Zdroj: [26]



**Obrázek 6:** Různé třídy ceramidů. 3 třídy mastných kyselin a 4 třídy sfingoidních bazí dávají vzniknout 12 různým třídám ceramidů. Rozdíly v délce řetězců mastných kyselin a sfingoidních bazích pak určují konkrétní druh ceramidu. Zdroj: [26]

### 3.2.3 Ceramidy a jejich důležitost pro tělo a obranu proti infekcím

Vedle své důležité role ve tvorbě a udržování integrity kožní bariéry jsou ceramidy a jejich důležité metabolity klíčové v procesech buněčné signalizace a buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy v lidské epidermis. [27] Hladiny ceramidů se zvyšují s diferenciací keratinocytů. Ceramidy se také přeměňují na glukosylceramidy a sfingomyeliny, čímž přispívají k ochraně keratinocytů před toxickými účinky ceramidů a svojí kumulací, jejich množství je tedy za fyziologických podmínek pod kontrolou. [19]

## 3.3 Urychlovače permeace

### 3.3.1 Charakteristika urychlovačů permeace

Urychlovače permeace jsou farmakologicky inaktivní látky, které difundují do kůže a interagují s komponenty *stratum corneum*. Jsou obecně považovány za bezpečné. Urychlovače zvyšují permeaci léčiv tím, že interagují s intracelulární cestou transportu látek kůží a v ní obecně a ovlivňují rozpustnost nebo rozdělení léčiva ve *stratum corneum*. Mechanismy usnadnění permeace zahrnují interakce s mezibuněčnými lipidy *stratum corneum*, interakce s vnitrobuněčnými proteiny korneocytů nebo zvýšení distribuce pronikající látky do *stratum corneum* díky působení urychlovače. [28]

### 3.3.2 Interakce mezi kůží a chemickými urychlovači

Po lokální aplikaci léčivého přípravku na povrch kůže se mohou objevit již zmíněné interakce léčivo – urychlovač, urychlovač – kůže nebo léčivo – kůže. [29] První zmíněné účinkují na množství a rychlost uvolnění léčiva z přípravku. Interakce urychlovač - kůže buďto zvyšují nebo snižují permeaci léčiva kůží. [30] Interakce léčivo – urychlovač lze vysvětlit pomocí parametru rozpustnosti. Větší rozpustnost léčiva v rozpouštědle bude zřejmá, pokud rozdíl mezi rozpustností léčiva a rozpustností urychlovače bude nízký. [29] Ovšem, pokud má molekula léčiva vysokou afinitu k urychlovači, bude se ho silně držet a výsledkem bude nízká permeace léčiva. Interakce mezi léčivem a kůží jsou ovlivněny hlavně fyzikálně - chemickými vlastnostmi léčiva (molekulová hmotnost a rozpustnost). Mezi standardně používané urychlovače permeace patří např. voda, alkoholy, mastné kyseliny, surfaktanty, fosfolipidy nebo terpeny. [28]

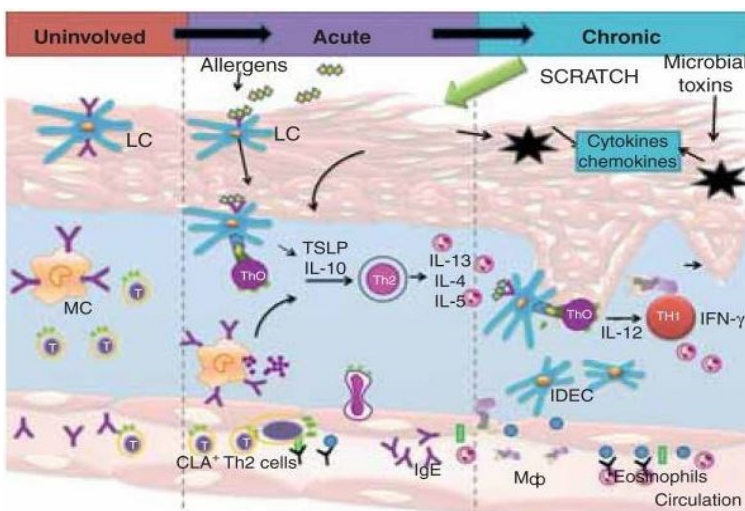
## 3.4 Vybrané kožní choroby

### 3.4.1 Zánětlivé choroby

#### 3.4.1.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida (AD) je chronická, recidivující zánětlivá kožní choroba, která může mít buď akutní, nebo chronické stádium, viz. Obrázek 7. Existují dva hlavní modely popisující patogenezi této nemoci. První model ji popisuje jako výsledek narušení funkce epidermální bariéry vzhledem k vnitřním strukturálním a funkčním abnormalitám v kůži, kde se choroba vyvíjí zevně, a to s abnormalitou epidermální bariéry jakožto s primárním defektem. [31] Druhý model ukazuje AD jako defekt funkce imunitního systému, ve které Langerhansovy buňky, T-buňky a buňky imunitního systému vyvolávají zánětlivou odpověď vůči faktorům vnějšího prostředí. [32]

Imunitní reakce na alergeny, dráždivé látky a mikroby, jež procházejí do kůže skrz narušenou kožní bariéru, pravděpodobně přispívají k vývoji lokálních zánětlivých odpovědí a kožních příznaků AD. Antigen-prezentující buňky, částečně i imunoglobulin E (IgE) – nesoucí Langerhansovy buňky pak interagují s těmito alergeny z vnějšího prostředí, což následně vede k lokálním zánětlivým reakcím modulovaným Th2 buňkami, tyto reakce jsou běžné u pacientů s AD. [33] Pacienti s lehčím až středním průběhem AD mají typicky výrazně snížené hodnoty IgE v séru ve srovnání s pacienty s vážnějším



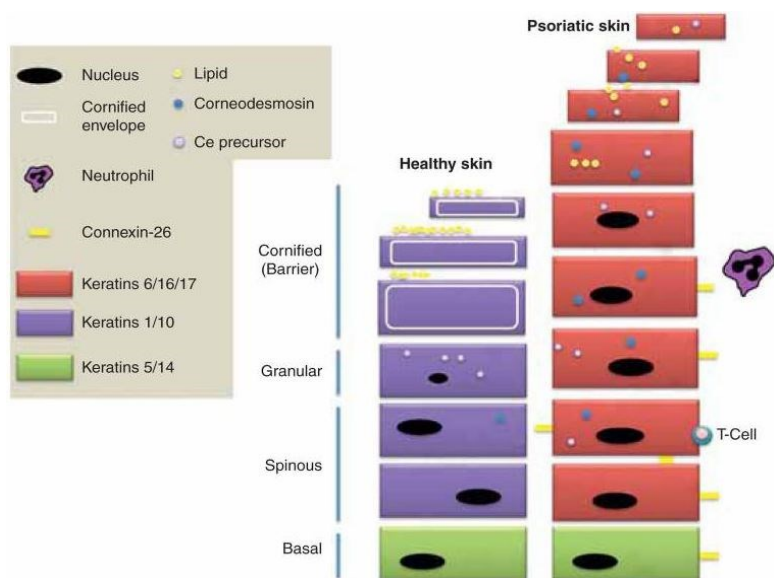
průběhem. To souvisí s tím, že imunitní buňky Th2 u pacientů s AD pravděpodobně přispívají k dysfunkci epidermální bariéry a náchylnosti k antigenům z vnějšího prostředí. [34]

**Obrázek 7:** Mechanismus AD z pohledu imunitního systému při akutní i chronické fázi AD.

Zdroj: [35]

### 3.4.1.2 Psoriáza

Psoriáza je zánětlivá kožní choroba, kterou nelze úplně vyléčit, je však možné brzdit její progres projevy. Psoriatická kůže obsahuje zvýšené množství imunitních buněk, které produkují mnoho cytokinů, chemokinů a zánětlivých molekul, viz. Obrázek 8. Epidermis se diferencuje mnohem rychleji, než v případě zdravé kůže a má narušenou vnější vrstvu, která za běžných podmínek chrání před infekcí a dehydratací. Pro studování psoriázy se s oblibou využívá zvířecích modelů kůže. Často se testují např. protilátky proti IL-15, který zabraňuje produkci T-lymfocytů a uvolňování TNF- $\alpha$  v podmínkách *in vitro*. Aplikace této protilátky u imunodeficitního potkana vedla k výraznému vymizení příznaků psoriázy. [35]



**Obrázek 8:** Schématické porovnání zdravé a psoriatické epidermis. Zdravá epidermis sestává zhruba z 10 buněčných vrstev, tento soubor se skládá ze stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum. Poslední zmíněná se stále sloupává a obnovuje skrz proliferaci v bazální vrstvě. V psoriatických lézích často chybí vrstva stratum granulosum. Stratum corneum je silnější a neuspořádaná a je pozměněna sekrece kožních lipidů, což vede k narušení procesu odpařování vody a stratum corneum se odlupuje ve shlucích šupin, což je pro psoriázu typické. Zde zmíněný Connexin 26 je protein buněčných spojů mezi korneocyty, jehož sekrece je při psoriáze zvýšená a jeho zvýšená exprese udržuje narušenou epidermis v hyperproliferativním stavu. To dále vede k infiltraci kůže buňkami imunitního systému. Zdroj: [35]

### 3.4.2 Puchýřnatá onemocnění kůže

#### 3.4.2.1 *Pemphigus vulgaris*

*Pemphigus vulgaris* je akutní nebo chronická autoimunní choroba kůže, popř. mukózních membrán. [36] Ztráta spojů mezi buňkami, která je pro ni charakteristická, je výsledkem cirkulujících IgG protilátek, které se vážou na desmoglein, což je transmembránový glykoprotein v desmozomech, které jsou důležitým elementem mezibuněčných spojů. Vedle tohoto druhu existuje i *Pemphigus foliaceus*. V raných stádiích PV jsou přítomné především protilátky proti desmogleinu typu 3 a typické puchýře se tvoří pouze na mukózních membránách. Ovšem v případě mukokutánního pemphigu jsou zde přítomny i protilátky proti desmogleinu typu 1 a puchýře se pak vedle mukózních membrán vyskytují i přímo na kůži. [36]

#### 3.4.2.2 *Epidermolysis bullosa*

Tato choroba zahrnuje spektrum dědičných dermatóz, při kterých je narušená spojitost epidermis anebo i dermis, což následně vede ke vzniku puchýřů až kožních traumat. Podle lokace výskytu puchýřů rozlišujeme tři druhy této nemoci, mezi které patří *Epidermolysis bullosa (EB) simplex*, tedy běžná, poté *dermolytická* nebo *dystrofická EB*. [36] Jako modely pro studování této choroby se používá kůže tzv. transgenních myší. Mezi příklady těchto modelů patří kůže s myofibroblasty zprostředkovanou kontraktilní fibrózou [37] nebo kůže s Langerhansovými buňkami zprostředkovaným zánětlivým procesem popisovaným u potkanů s deficitem keratinu typu 5. [38] Modely myší kůže s touto chorobou lze využít pro preklinické testování terapií založených na genech, jelikož se jedná o dědičnou chorobu. Například myši s deficitem kolagenu 7 byly používány pro pilotní studie některých buněčných a proteinových terapií, ale krátká životnost těchto myší byla důvodem k upuštění od těchto pokusů. [35]

## 4 MODELÝ KŮŽE PRO STUDIUM PERMEABILITY LÉČIV

Modely kůže jsou v této práci rozděleny od těch nejjednodušších po komplexnější modely. Mezi ty jednodušší patří syntetické membrány. O něco autentičtější z hlediska extrapolace výsledků na lidskou kůži jsou zvířecí modely kůže, mezi novějšími kožními modely se pak uplatňují modely založené na metodě Skin-PAMPA a lipidové membrány *stratum corneum*. Ovšem až 3D modely kůže umožňují relevantnější studie permeability a



účinků léčiv díky svému komplexnímu složení. Komerčně dostupné modely lidské epidermis jsou svým složením a vlastnostmi velmi blízké komerčně dostupné modely EpiSkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> a EpiDerm<sup>®</sup>. Tyto mají ze všech modelů zmíněných v této práci nejširší využití.

## **4.1 Syntetické membrány**

### **4.1.1 Charakteristika syntetických membrán**

Syntetické membrány jsou vyvíjeny za účelem vytvoření umělých ekvivalentů lidské kůže a nabízí jednoduchou a reprodukovatelnou alternativu lidských a zvířecích kůží. Ve výzkumu kožní bariéry a tvorbě jejích modelů se s nimi setkáváme zhruba posledních 40 let. Výhodami oproti přirozené kůži je to, že je lze ve většině případů poměrně snadno vyrobit a běžně nevyžadují žádné speciální podmínky uchovávání. V syntetických membránách se dále setkáme s nižší variabilitou v permeabilitě léčiv, která je v přirozených kůžích výraznější díky neustálým metabolickým, buněčným, fyziologickým, patologickým a mnohým dalším jevům. [39]

Komerční dostupnost, stabilita a jednotné složení dělají z použití syntetických membrán v problematice kožních modelů velmi žádoucí nástroj. [40] Bariérové vlastnosti těchto porézních membrán ovlivňují průchod difundujících molekul a jejich vstup do membrány difúzí skrz póry. Faktory ovlivňující selektivitu difúze jsou pak velikost molekuly, její tvar a její elektrostatické interakce s membránou. Bariérové vlastnosti syntetických membrán dále závisí na rozpustnosti difundující látky v polymerní matrix (s vlivem rozdělovacího koeficientu mezi donorovým vehikulem a membránou) a na okolnostech průchodu difundující látky skrz polymer. [41]

### **4.1.2 Celulózové membrány**

Celulóza tvoří relativně rigidní struktury skládající se z glukopyranózových kruhů, spojených  $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami. Tato konformace umožňuje pouze dva typy pohybu řetězců: inverze pyranózového kruhu (ze židličkové konformace do konformace vaničkové) nebo otočení kolem glykosidické vazby. Navíc celulóza existuje i v částečně krystalické formě díky meziřetězcovým vodíkovým vazbám. [40]

Komerční celulózy membrány jsou propustné pro molekuly o maximální velikosti 8 000 – 15 000 Da a běžně jsou jejich součástí nějaké další látky, např. plastifikátory, které mohou ovlivňovat permeaci léčiv v závislosti na úpravě membrány před prováděním různých experimentů. Tato aditiva jsou obvykle látky absorbující ultrafialové záření, které by v případě experimentů ve Franzových difúzních celách, se kterými se v oblasti modelů kůže často pracuje, mohlo proudit do akceptorové fáze a zkreslovat tak výsledky experimentů. Odstranění těchto látek je poté nutné, a protože jde především o látky rozpustné ve vodě, mohou být odstraněny ponecháním membrány ve vodě nebo přivedením membrány k mírnému varu. Pokud jsou tato aditiva odstraněna pouze částečně, mohou interagovat s difundující látkou například tak, že jí naadsorbují. V permeačních experimentech se často používají již zmíněné membrány z acetátu celulózy [42], zatímco např. membrány z nitrátu celulózy se používají jako model žaludeční bariéry. [43]

Příprava membrány z acetátu celulózy zahrnuje promytí destilovanou vodou a ponechání ve vodě, aby celulóza začala bobtnat. Promytí v teplé vodě a ponechání ve studené vodě po dobu 1 týdne více, než zdvojnásobí tloušťku celulózy membrány a skrz toto prostředí molekuly látek pravděpodobně difundují. [41]

### 4.1.3 Syntetické polymery

Difúze molekuly přes spojitý syntetický polymer je analogická k difúzi skrz „nesmíšené roztoky“. Transport hmoty skrz polymerní matrix záleží na frekvenci tvorby dostatečného prostoru pro průchod difundující látky. Tyto prostory jsou tvořeny náhodným přemísťováním se řetězců polymeru, a čím jsou molekuly difundující látky větší, tím víc se zvyšuje počet sousedících polymerních jednotek, které se musí specificky pohybovat za účelem vytvoření dostatečného prostoru pro průchod látky. Schopnost tvorby vazeb mezi řetězci polymeru rozhoduje o rigiditě polymerní matrix a tím i o ochotě tvořit prostor pro průchod látky a o výsledné permeabilitě. [44] Problémem může být krystalinita polymerní matrix, díky které se mohou tvořit oblasti s nízkou difuzivitou, tam mohou pomoci některá rozpouštědla usnadňující pohyb segmentů polymeru. Jak krystalinita, tak přítomnost rozpouštědel mají vliv na celkovou permeabilitu membrány. [41]

#### 4.1.4 Přednosti silikonových membrán

Silikonové membrány jsou nejvhodnějšími syntetickými membránami pro použití v systémech s Franzovými difúzními celami. Jsou relativně inertní a lipofilní, což zajišťuje vhodné prostředí pro rozdělování a permeaci lipofilních léčiv, ovšem jejich nízká porozita může permeaci látek lehce limitovat. Silikonové membrány jsou obvykle dodávány potažené filmem nebo jemným práškem, které je před použitím chrání před poškozením a znečištěním. Tyto musí být před použitím odstraněny. V případě ve vodě rozpustného ochranného prášku lze tento snadno odstranit opláchnutím ve vodě. Za nejdůležitější parametry pro permeaci jsou považovány pohyblivost polymerových řetězců (popř. jejich rigidita) a rozpustnost difundující látky v polymerní matrix (což ovlivňuje i koeficient rozdělování látky). [41]

## 4.2 Zvířecí modely kožních membrán

### 4.2.1 Odlišnosti kůže člověka a kůže zvířat

Vzhledem k omezené dostupnosti lidských tkání a k tomu, že perkutánní experimenty jsou nevhodné k provádění na živých subjektech výzkumu, bylo prozkoumáno několik zvířecích modelů kůže za účelem predikce kinetiky perkutánní absorpce léčiv. Kůže zvířat se samozřejmě liší od té lidské svojí tloušťkou a biochemickým složením *stratum corneum*, dále o hustotou vlasových folikulů a žláz. Dalším důležitým rozdílem je složení lipidů, které se výrazně liší mezi jednotlivými druhy a částmi jejich těl. Předmětem výzkumu jsou zhruba posledních 50 let. [45]

Permeabilita kůže zde uvedených zvířat se zvyšuje postupně v tomto pořadí: šimpanz, člověk, prase, opice, pes, kočka, kuň, králík, morče, myš. [46] *In vitro* data u těchto kůží společně s pozorováním v podmínkách *in vivo* se shodují v tom, že zvířecí kůže má ve většině případů větší permeabilitu, než lidská. Nejvíce podobná permeabilita kůže je pak mezi prasetem a opicí. [49] Vzorkování a separační metody používané pro lidskou kůži mohou být aplikovány i na kůži zvířecí, je však možno je i upravit tam, kde je to potřeba.

Ve všech případech, kde je vzorkování biologické tkáně nutné, je také zapotřebí metoda pro ověření integrity tkáně po preparaci. [47] Tuto proceduru lze nejpřesněji

provést prvotním zkoumáním permeability pomocí látky, která je schopná modelem snadno difundovat, například pomocí tzv. tritiované vody a následně srovnáním získaných výsledků s normální hodnotou permeability příslušné membrány. Tabulka 1 ukazuje koeficienty permeability pro vodu měřené v podmínkách *in vitro* na zvířecích membránách. Tabulka 2 pak srovnává tloušťku různých vrstev kůže člověka a laboratorních zvířat. Při interpretaci rozdílů mezi kůží jednotlivých zvířat je však nutno vzít v potaz i další data jako jsou složení lipidů nebo hustota ochlupení. [41]

**Tabulka 1:** *In vitro* koeficienty permeability pro vodu pro lidskou a zvířecí kůži. Zdroj: [41]

<b>Druh</b>	<b>Koeficient permeability pro vodu (cm . h<sup>-1</sup> x 10)</b>
Člověk (oblast břicha)	93-250
Člověk (tvář)	950
Člověk (dermis)	21996
Krysa	103
Chlupatá krysa	110
Málo ochlupená krysa	130
Holá krysa	152
Myš	144
Prase	180
Králík	253
Myš bez chlupů	351
Morče	442
Psí bukální mukóza	18396

**Tabulka 2:** Srovnání tloušťky kůže člověka a některých zvířat. Zdroj: [41]

Druh	Stratum corneum (μm)	Epidermis (μm)	Celá kůže (mm)
Člověk	16,8	46,9	2,97
Prase	26,4	65,8	3,43
Krysa – hřbet (samice)	18,4	32,1	2,09
Krysa – oblast břicha (samice)	13,7	34,8	0,92
Krysa – hřbet (samec)	34,7	61,1	2,80
Krysa – oblast břicha (samec)	13,8	30,4	1,66
Myš bez chlupů	8,9	28,6	0,70
Myš	5,8	12,6	0,84

#### 4.2.2 Myš

Laboratorní hlodavci jsou běžným zdrojem zvířecí kůže pro výzkumné účely, jelikož jsou nenároční na chovné podmínky a relativně levní oproti větším zvířatům. Myší kůže má však větší permeabilitu, než ta lidská, pravděpodobně díky slabší vrstvě *stratum corneum*. [48]. Kůže holých myší se používá často pro výzkum transdermální absorpce díky podobnosti struktury s lidskou kůží. [49] Zatímco počet a průměr vlasových folikulů u holých myší jsou více blízké lidské kůži, než v případě většiny ostatních laboratorních zvířat [48], je vrstva *stratum corneum* těchto zvířat o více, než polovinu tenčí v porovnání s lidskou kůží a má tedy i výrazně odlišné bariérové vlastnosti.

Permeabilita kůže holých myší je závislá na charakteristikách permeantu a pro řadu látek je zde velmi podobná lidské kůži [41], u jiných látek se zase výrazně liší. [48]. I tak se však tato kůže používá pro prvotní screening léčiv pro zjišťování vztahů mezi jejich strukturou a difuzivitou. Proces difúze léčiv je pak ovlivněn řadou dalších faktorů. Permeabilita kůže se liší s jejím postupným vývojem a ztrátou srsti, zejména během prvních 35 dnů života myší. Pro difúzní experimenty je tedy nutné mít k dispozici myší starší 35 dní, aby se minimalizovala variabilita permeability způsobená postupným vývojem kůže. Dále se pak permeabilita kůže o plné tloušťce z oblasti zad a břicha nějak významně neliší, ovšem kůže z oblasti břicha je o něco více permeabilní, než kůže ze zad. [41]

Kůže holých myší má i další dobrou vlastnost, a sice že nepřiléhá příliš k dalším orgánům pod ní. Je tedy možné snadné odebrání velkých kusů kůže o jednotné tloušťce. Ve většině případů se používá kůže o plné tloušťce, protože separace relativně tenké *stratum corneum* od epidermis je poměrně náročná. [41]

#### 4.2.3 Krysa

Krysa je běžným laboratorním zvířetem, které se taktéž používá pro studování transdermální absorpce léčiv. Vypreparovaná kůže krysy je více permeabilní, než kůže lidská nebo prasečí. [50] Ovšem difúze určitých látek je v kůži krysy podobná jako v kůži prasete. Stejně jako v případě myší, i zde se v difúzních experimentech používá kůže o plné tloušťce. Řezy kůže obsahují jenom malou část epidermis a oproti kůži o plné tloušťce vykazují zvýšenou absorpci hydrofobních sloučenin. I když existuje dostatečné souvislosti mezi *in vitro* a *in vivo* daty, jsou u kůže krysy patrné rozdíly mezi kůží z různých částí těla a také rozdíly mezi oběma pohlavími. Navzdory těmto poznatkům platí, že dostupnost a podobnost některých vlastností s lidskou kůží jsou dobré důvody k tomu používat krysí kůži pro studie transdermální absorpce. [41]

#### 4.2.4 Morče

O využití kůže morčete jako modelu pro zkoumání transdermální absorpce se dosud mnoho neví. Histologické studie však ukazují, že kůže morčete je svým vzhledem podobná té lidské což naznačuje, že jejich *in vitro* testované permeability léčiv by mohly být podobné. [51] Opět se zde používá kůže o plné tloušťce. Ve většině případů však studie neprokazují přílišnou podobnost vlastností kůže morčete s kůží lidskou (např. kůže morčete jeví větší permeabilitu pro steroidy, než lidská kůže) to však nebrání jejímu používání jakožto screeningového nástroje pro studie permeace a penetrace léčiv. [41]

#### 4.2.5 Králík

Kůže králíka patří nejvíce permeabilní zvířecí kůže ze všech běžně používaných zvířecích kůží v oblasti výzkumu transdermálního podávání léčiv. [52] Tyto poznatky potvrzují fakt, že králičí kůže je špatným modelem pro studie transdermální absorpce, jelikož hodnoty permeability by zde ve většině případů byly velmi vysoké a extrapolace na lidskou kůži by byla velmi složitá. Ovšem, kůže tohoto zvířete je dobrým indikátorem

toxicity působící na kůži díky své rychlé schopnosti absorpce a pro tento účel má mezi modely kůže své pevné místo. [46]

#### 4.2.6 Opice

Mnozí by si mohli myslet, že charakteristika kůže primátů bude díky společnému původu velmi podobná té lidské, což by z nich dělalo důležité modely pro studování transdermální absorpce. Existuje dokonce mnoho podobností mezi daty o permeabilitě o lidské kůži a kůži primátů. [53] Co je však problémem, je extrapolace výsledků na kůži člověka. Proto použití kůže primátů není zrovna žádoucí. Dále jsou pak tato zvířata náročná na podmínky chovu, stravu, zázemí a také péči, což s ohledem na možnosti využití jejich kůže pro experimentální a výzkumné účely přináší další komplikace. [41]

#### 4.2.7 Prase

V mnohých *in vitro* studiích se kůže prasete prokázala jako dobrý model kůže pro testování permeability léčiv a následnou extrapolaci získaných dat na lidskou kůži. [53] Kůže prasete se mnohými charakteristikami podobá kůži lidské – v obou případech je zde podobná tloušťka epidermis a dermis, podobná hustota chlupových folikulů, hustota krevních cév a obsah ceramidů a kolagenu. [54]. Mnoho léčiv též vykazuje statisticky podobnou percutánní penetraci prasečí kůži pro mnoho látek v podmínkách *in vitro* jako přes lidskou kůži v podmínkách *in vivo*. Tloušťka prasečí dermis je však větší, než v případě člověka a díky tomu je použití kůže o plné tloušťce nepraktické. Díky velkým vlasovým folikulům je také velmi těžké oddělit epidermis od vzorků plné kůže. Nejlepší metodou preparace prasečí kůže je tedy nařezání na vzorky, které nemají plnou tloušťku kůže tohoto zvířete. [41]

#### 4.2.8 Had

I když had není savec, tak mnoho látek penetruje jeho kůži v podobných množstvích jako přes lidskou *stratum corneum*. [54] Protože se hadi svlékají z kůže postupně, lze z jednoho exempláře získat více stejných vzorků, čímž se eliminuje inter-individuální variabilita. Hadí kůži lze tedy získat bez nutnosti poranění zvířete a ta následně nemusí být vystavena chemickému nebo tepelnému opracování před použitím. Epidermis hadí kůže je zde tvořena silnou jednotnou vrstvou, z kůže jednoho hada lze tedy

získat více vzorků. V případě svlečené kůže se nejedná o živou tkáň a může být tedy uchovávána při pokojové teplotě po dlouhou dobu a není náročná na podmínky při transportu a uchovávání. Kůže, které jsou už nějakou dobu uložené, pak ani nevykazují rozdíly v permeabilitě oproti kůži čerstvě získané. Protože hadí kůže postrádá vlasové folikuly, můžeme se vyhnout problémům spojenými s transfolikulárními cestami penetrace. [55]

#### **4.2.9 Membrána vaječné skořápky**

Může se to zdát podivné, ale v některých studiích se zkoušelo použití membrány vaječné skořápky, která se stejně jako lidská *stratum corneum* skládá především z keratinu. [56] Membrána je připravena ponořením celého vejce do 0,5 M kyseliny chlorovodíkové, která rozpustí vnější skořápku. Potom se obsah vejce odstraní a membrána se vymyje a ochladí ponořená v isopropyl-myristátu ve vakuu, tak aby se naimpregnovala keratinová matrix. Náhrada vody v membráně tímto lipidem je prováděna za účelem zvýšení podobnosti k biochemickému složení lidské *stratum corneum*, díky přítomnosti lipidové frakce. [41] Bylo zjištěno, že membrána vaječné skořápky je více permeabilní, než membrány z celulózy, a že vykazuje přibližně stejnou permeabilitu jako syntetická membrána z polyamidu. I když její relativně nízká odolnost je důvodem k tomu, že její použití je limitováno pro *in vitro* studie, jedná se o membránu, kterou je snadné získat. [56]

Další zvířecí kůže, které byly použity v některých studiích, ale nepatří mezi běžné modely pro studování permeability a penetrace látek, jsou například kůže žáby, křečka, kozy, kočky, psa, koně a šimpanze. [41]

### **4.3 *Skin-PAMPA: nová metoda pro rychlou predikci kožní permeability***

#### **4.3.1 Charakteristika metody**

Paralelní test permeability umělé membrány (PAMPA = Parallel artificial membrane permeability assay) je relativně nízkonákladová metoda pro screening permeability léčiv a v posledních letech výrazně roste četnost jejího používání pro tyto účely. Princip metody v případě standardního provedení spočívá ve vytvoření umělé membrány (ovšem vyrobené z komponent běžně se vyskytujících v biologických membránách), do které je zakomponován vysoce porézní mikrofiltr s obsahem 10 %



olejového roztoku vaječného lecitinového prášku rozpuštěného v n-dodekanu. Tato filtrační membrána odděluje vodný roztok obsahující molekuly testované látky (donorový kompartment) od obsaženého vodného pufu (akceptorový kompartment), který tyto molekuly neobsahuje, jsou zde tedy dva kompartmenty. [57] V mikrotitračních destičkách s 96 komůrkami, které se v kombinaci s metodou PAMPA často používají, pak mohou být až desítky takovýchto komponent vedle sebe, z nichž tedy každá obsahuje pomyslnou lipofilní bariéru a tenký mikrofilm, který odděluje dva vodné kompartmenty. Na mikrotitrační destičce pak můžeme testovat permeabilitu mnoha látek naráz. [58] Vždy je však třeba na začátku metody počkat na odpaření použitého rozpouštědla. [59]

Metoda PAMPA umožňuje sledovat kinetiku transportu léčiva mechanismem pasivní difúze, v případě aktivního transportu léčiv tuto metodu však nelze použít. Ovšem, zhruba 95 % léčiv se vstřebává pasivní difúzí, tudíž je tato metoda opravdu na místě. Navíc díky své jednoduchosti, rychlosti a nízké ceně je v současné době hojně využívána v laboratořích. S výhodou se používá k získávání poznatků o pasivní permeabilitě biologických membrán pro léčiva. [60]

#### **4.3.2 Složení modelu skin - PAMPA**

Model skin - PAMPA se obecně skládá ze směsi syntetických ceramidů (tzv. certramidů, což jsou analogy ceramidů přirozeně se vyskytujících ve stratum corneum), cholesterolu a volných mastných kyselin (např. kyselina stearová). Experimenty zaměřené na testování permeability léčiv s modelem skin - PAMPA se provádějí v mikrotitrační destičce, která má obvykle 96 jamek, tudíž lze testovat více substancí zároveň. Složení modelu lze však široce upravovat a tak již bylo vyvinuto mnoho jeho modifikací. V modelových membránách lze tedy použít různé složení lipofilních látek, a jak se metoda PAMPA stává populárnější, byla vyzkoušena již celá řada různých lipidových směsí, podle kterých jsou metody také pojmenovány. [60]

#### **4.3.3 Egg-PAMPA**

Základní metodou je metoda egg-PAMPA, tedy metoda s použitím již výše zmíněného vaječného lecitinu, který obsahuje fosfatidylcholin. Tento fosfolipid je ve velké míře přítomen v savčích biologických membránách a často se zde přidává ještě cholesterol,

který biologické membrány taktéž ve velké míře obsahují. [60]

#### 4.3.4 DOPC-PAMPA a DS-PAMPA

První komerčně dostupnou lipidovou směsí pro použití v metodě PAMPA byl 2% roztok čistého syntetického fosfolipidu dioleoylfosfatidylcholinu (zkráceně DOPC, z toho název metody DOPC-PAMPA) rozpuštěného v n-dodekanu. [60, 61]

Vylepšenou verzí DOPC-PAMPA metody je pak Double-Sink metoda, tedy DS-PAMPA. Lipidovou směs zde opět tvoří vaječný lecitin. Principem metody je systém obsahující dvoje různé „sink“ podmínky (podmínky zohledňující koncentraci léčivé látky v disolučním médiu během experimentu tak, aby nedocházelo ke změně koncentračního gradientu a ovlivnění procesu disoluce). Tato metoda umožňuje napodobit podmínky pro absorpci léčiv v lidském gastrointestinálním traktu. [60, 62] Většina ostatních PAMPA metod vykazuje stejnou hodnotu pH v donorovém i akceptorovém kompartmentu, zde je však důležitá přítomnost dvou gradientových systémů. V lidském těle je léčivo vystaveno různým hodnotám pH při průchodu trávicím traktem, přičemž pH krve (za fyziologických podmínek) zůstává na hodnotě 7,4. A podobně při metodě DS-PAMPA lze nastavit pH donorového kompartmentu na hodnotu 3 – 10, přičemž v případě akceptorového kompartmentu zůstává na hodnotě 7,4. Takže například léčiva povahy slabých kyselin přejdou v neionizované formě z donorového kompartmentu do akceptorového, kde se ionizují – to jsou první „sink“ podmínky. [60]

Druhé „sink“ podmínky spočívají v přítomnosti tzv. chemických scavengerů („pročišťovačů“) v akceptorovém kompartmentu, které mohou zajistit jednosměrný transport lipofilních sloučenin přes membránu a jejich chování je podobné jako v případě sérových proteinů. Jedná se o surfaktanty ve formě micel. Principem tohoto děje je fakt, že mezi donorovým i akceptorovým kompartmentem v případě lidského těla neexistuje statická rovnováha, jelikož sérové proteiny, na které se mnoho léčiv váže, tuto rovnováhu neustále vychylují. Lipofilní scavengery zvyšují objem léčiva v akceptorovém kompartmentu (můžeme si na jeho místě představit např. orgán, do kterého se podané léčivo má dostat) tím, že na sebe vážou léčiva, podobně jako sérové proteiny a mohou vychýlit rovnováhu mezi kompartmenty až do té míry, že se celé množství podaného, popř. testovaného léčiva dostane do akceptorového kompartmentu. Scavengery také v případě experimentů díky

tomuto snižují čas potřebný pro provedení. Jsou to taktéž látky velmi stabilní, relativně nespecifické, co se vazby látek týče, a nepodporují bakteriální kontaminaci ve vodném pufru, což snižuje nároky na podmínky skladování a přípravy. [59,62]

Pomocí metody DS-PAMPA tedy můžeme simulovat podmínky absorpce léčiv především z tenkého a tlustého střeva, přičemž z tenkého střeva se vstřebává naprostá většina léčiv. Hodnotu pH můžeme nastavit v rozmezí 3-10 a do toho intervalu spadají hodnoty pH dvanáctníku, lačnicku a kyčelníku, kde hodnota kolísá kolem 6,5, i pH tlustého střeva, kde se tato hodnota drží kolem hodnoty 8. [60]

#### **4.3.5 BM-PAMPA**

Další, zdaleka však ne poslední lipidovou směsí používanou v PAMPA metodách, je směs tvořená několika fosfolipidy běžně se vyskytující v biologických membránách lidského těla. Mezi ně patří např. fosfatidylcholin, fosfatidylinositol, fosfatidylethanolamin nebo cholesterol. Tato směs je velmi blízká zastoupení fosfolipidů v těchto membránách, což významně zlepšuje extrapolaci získaných dat na člověka a používá se například k predikci absorpce léčiv v tenkém střevě. Na rozdíl od mnohých dalších PAMPA metod se zde jako rozpouštědlo používá 1,7-oktadien namísto n-dodekanu. [63].

#### **4.3.6 Nastavitelné podmínky experimentů při PAMPA metodách**

Potenciálním problémem při permeačních experimentech může být odpařování roztoků testovaných látek, proto musí být mikrotitrační destičky uloženy v prostředí s vhodnou vlhkostí vzduchu. Obsah léčiv v akceptorovém kompartmentu na konci experimentu se vyhodnocuje zpravidla UV-spektrofotometrií, což je velmi citlivá metoda. Obsah komor mikrotitrační destičky může být též během experimentu automaticky promícháván, což nám zkrátí dobu trvání experimentu na 10-30 minut. [64] Promíchávání se často používá při testování vysoce permeujících molekul (které jsou často špatně rozpustné), pozbývá však smysl u málo permeujících molekul léčiv (např. atenolol, cimetidin). V jejich případě se nedoporučuje zapnout promíchávání, experimenty však potom mají delšího trvání, jelikož trvá déle přejít zkoušené látce do akceptorového kompartmentu. [60]

V případně špatně permeujících (atenolol, cimetidin) nebo špatně rozpustných (itraconazol, terfenadin) léčiv si můžeme pomoci např. použitím dalšího rozpouštědla neboli kosolventu (např. 20 % acetonitril), použitím vyšších koncentrací vzorku [62] nebo nastavením promíchávání komůrek mikrotitrační destičky (pouze v případě málo rozpustných nebo vysoce permeujících látek). [64]

Permeabilita modelů používaných v metodě Skin-PAMPA je tedy závislá především na složení lipidové směsi membrány a samozřejmě na experimentálních. V novějších PAMPA metodách je snaha co nejvíce její složení připodobnit té biologické membráně, jejíž permeabilitu pro daná léčiva chceme studovat. To nám pak usnadní extrapolaci získaných dat přímo na člověka, a tedy porovnat výsledky experimentů s touto metodou se skutečnými *in vivo* podmínkami. [60]

## **4.4 Lipidové membrány stratum corneum**

### **4.4.1 Charakteristika lipidových membrán**

Tyto membrány, používané především v posledním čtvrt století, jsou dalším velmi autentickým nástrojem pro testování permeability léčiv, jelikož jejich složení důvěryhodně reprezentuje složení lipidů v lidské kůži, z čehož pramení jejich velká výhoda. Nevýhodou je poměrně složitější příprava membrán a především složitost obstarávání jednotlivých membránových komponent. Primárními složkami těchto membrán jsou ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny, které se mísí v různých v poměrech za účelem studování vlivu různého zastoupení těchto komponent na permeabilitu membrány pro testovaná a další její vlastnosti.

### **4.4.2 Příprava lipidových membrán**

Pro vytvoření těchto modelových membrán je nejprve nutné izolovat potřebné komponenty, jejich zdrojem může být např. kůže z plastických operací, pokud tomu pacienti dodají informovaný souhlas. Při zahřátí lidské kůže lze oddělit epidermis od dermis a také lze izolovat vrstvu *stratum corneum* a poté extrahovat i lipidy z lipidové matrix. Pomocí chromatografie potom lze analyzovat složení těchto ceramidů. [65]

Lipidové membrány se připravují zpravidla smícháním ceramidů získaných z lidské kůže s volnými mastnými kyselinami a cholesterolem v molárním poměru 1:1:1 a s přídavkem cholesterol sulfátu. [66] Tato směs se rozpustí ve směsi hexanu a 96 % ethanolu v poměru 2:1. Nechá se odpařit rozpouštědlo a vysuší se ve vakuu [65]. K výsledné směsi se ještě přidá pufr, kterým se nastaví vhodná hodnota pH. Součástí těchto membrán jsou i membránové filtry, které představují většinou malé disky z acetátu celulózy o velikosti pórů v řádu mikrometrů [67], popř. lze použít i polykarbonátové filtry [68]. Filtry se nejprve nahřejí, poté zvlhčí destilovanou vodou či omyjí v organickém rozpouštědle a poté se na ně (obvykle přístrojově) v malých množstvích stříkačkou aplikuje v proudu dusíku připravená lipidová směs, která se nechá zaschnout. V tomto stavu je membrána připravena pro experimenty. [67]

#### **4.4.3 Využití lipidových membrán**

Na lipidových membránách se studuje především permeabilita léčiv a transepidermální ztráta vody. Studie permeability léčiv se provádí většinou za použití Franzových difúzních cel. Pro lipofilní látky se permeabilita membrán mění společně se změnou množství cholesterolu obsaženého v membráně. [65] Co se cholesterolu týče, tak obecně se snížením jeho množství v membráně se zvyšuje permeabilita pro většinu léčiv, přičemž membrána se zhruba 40 % zastoupením cholesterolu vykazuje nejodolnější kombinaci bariérových vlastností - zde se jedná o velmi nízkou transepidermální ztrátu vody a nízkou permeabilitu pro většinu léčiv. [65] Permeabilitu membrán významně ovlivňují také délky acylových řetězců ceramidů a heterogenita řetězců mastných kyselin obsažených v membránách. [66]

#### **4.4.4 Průběh testování permeability na lipidových membránách**

Při testování permeability membrán se do testovaných membrán uchycených v difúzních celách aplikují objemy roztoků léčiv v řádu mikrolitrů (např. teofylin nebo indometacin v roztoku propylenglykolu) a z difúzních cel jsou v zadaných intervalech odebrány zkoušené vzorky. Odebraný objem musí být vždy nahrazen stejným objemem nejlépe fyziologického roztoku (ten zde plní roli receptorové tekutiny). Po předem stanovené době délky experimentu se testované membrány nechají po několik hodin

v klidu a po určité době je můžeme opět uchytit v difúzních celách a můžeme do nich aplikovat další roztok testovaných látek. Z naměřených koncentrací testovaných léčiv v akceptorové fázi a objemu difúzních cel se poté spočítá množství léčiva, které proniklo přes lipidovou membránu. [68]

Lipidové membrány jsou tedy díky podobnosti svého složení s lipidovým zastoupením v lidské kůži dobrým screeningovým nástrojem pro testování permeability léčiv. Předmětem výzkumu v této oblasti jsou především posledních 25 let a studie těchto membrán se zaměřují zejména na variabilitu permeability a transepidermální ztráty vody ovlivněnou složením lipidů, jelikož strukturní variabilita ceramidů a mastných kyselin je poměrně značná. [68]

## **4.5 Modely kůže získané bioinženýrstvím**

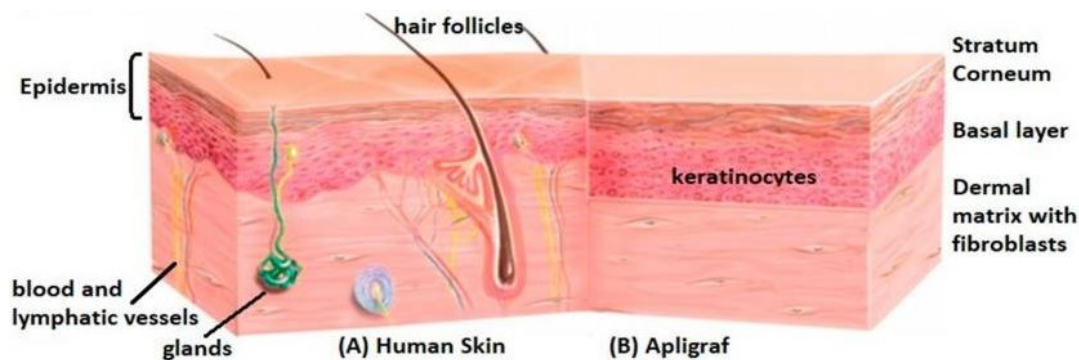
### **4.5.1 Charakteristika bioinženýrstvím získané kůže**

Klinické využití kůže získané bioinženýrstvím při operacích je známé už zhruba 25 let. Využití má i v modelování kožních chorob a screeningu léčiv, jelikož některé modely vykazují i komplexnější složení, speciálně pak modely „skin-on-chip“, které mnohdy obsahují i buňky jiných tělních orgánů, než je kůže. Tyto modely by měly ideálně kopírovat anatomické a fyziologické znaky přirozené kůže pro efektivní simulaci normálních a patologických podmínek kůže. Výhodou těchto modelů je to, že jejich komponenty pochází přímo ze vzorků odebraných od lidí, tudíž se dá očekávat podobnost výsledků experimentů s přirozenou lidskou kůží, nevýhodou je pak menší dostupnost takových komponent. Dobrým zdrojem je např. kůže získaná z kosmetických procedur a plastických operací. [69]

Kůže získaná bioinženýrstvím je v podstatě uměle vytvořená kožní náhrada. Tvoří se správným uspořádáním kožních buněk nebo trojrozměrné matrix, zdrojem buněk je především kůže získaná biopsií. Nejprve jsou izolované fibroblasty obaleny trojrozměrnou kožní matrix a po určité době jejich inkubace a kultivace je možné přeorganizovat tuto matrix až takovým způsobem, že lze připravit i kožní deriváty. Kultivace keratinocytů na rozhraní vzduch-kapalina vyústí v jejich diferenciaci a tvorbu různých epidermálních vrstev. [70] Syntetické polymery jako jsou například polyhydroxybutyrát nebo

polyethylenglykol (PEG), jsou někdy používány jako biomateriály poskytující jakési „lešení“ pro kožní buňky díky jejich dobrým mechanickým vlastnostem. [71] Kolagen typu I obvykle z velké části tvoří umělou matrix, jelikož je v kůži hojně obsazen, lze ho však nahradit i fibrinem, který se tvoří během srážení krve a při procesu hojení ran. [72]

Dermo – epidermální ekvivalenty o plné tloušťce jsou používané nejčastěji a prokazatelně se chovají mnohem podobněji jako lidská kůže ve srovnání s jednoduchými dermálními nebo epidermálními analogy. [71] Stále jsou však pouze zjednodušeným „modelem“ lidské kůže. Obrázek 9 ukazuje odlišnost lidské kůže od kůže získané bioinženýrstvím. Ohledně druhé jmenované je v posledních letech snaha zakomponovat do ní další typy buněk běžně se v kůži vyskytujících, aby zde bylo možné simulovat vaskularizaci, pigmentaci a inervaci tak, aby tento model plnohodnotně simuloval strukturu a funkci lidské kůže. Častou myšlenkou je též zakomponování kožních ekvivalentů, např. vlasových folikulů, potních a mazových žláz, atd. [69]



**Obrázek 9:** Anatomické porovnání lidské kůže (A) a příkladu dermo-epidermálního ekvivalentu (B), zde model Apligraf®. Ekvivalent obsahuje dermální matrix s fibroblasty a diferenciované vrstvy epidermis, postrádá však vlasové folikuly, mazové a potní žlázy a krevní a lymfatické cévy, které jsou obsaženy v lidské kůži. Zdroj: [69]

#### 4.5.2 Využití kůže z bioinženýrství

Základním účelem vývoje těchto modelů kůže je snaha o plnohodnotné vyléčení jak akutních tak chronických ran, většinou způsobených popálením, kdy kůže uhelnatí. [69] V takovýchto případech je zlatým standardem tzv. autografting, jehož principem je odebrání kůže popáleného pacienta ze zdravého místa na těle a její aplikace na těžce popálené místo, často se bere například z hýždí nebo zad. [72] Je to jedna z pomalejších možností léčby, která vyúsťuje v bolest a diskomfort pro pacienta. Navíc v případě, že jde o rozsáhlé poranění kůže, nemusí takto vypreparovaná kůže pokrýt celou poraněnou

plochu.[69, 72]. Další možností je pak allografting, při kterém se vypreparuje část kůže jednoho pacienta a aplikuje se na poraněnou plochu na těle druhého pacienta. Je zde ale riziko rejekce transplantované kůže, jelikož se ze strany příjemce jedná o tělu nevlastní objekt. [69]

I když tato náhrada kůže byla původně vyvinuta pro klinické využití, používá se dnes také jako potenciální model pro preklinické testování léčiv a kosmetických produktů. [69] Před klinickou aplikací nových léčiv by mělo být známo její *in vivo* chování a bezpečnost použití. Kosmetické produkty musí být také před testováním na tomto modelu předem ohodnoceny z hlediska možných alergických reakcí nebo toxických účinků. Bioinženýrstvím získaná kůže je tedy považována za vhodný prostředek pro testování farmaceutických a kosmetických produktů [73] a také pro modelaci fyziologických i patologických podmínek kůže. Například proces hojení zranění by mohl být reprodukován v podmínkách *in vitro* v kontextu regenerační medicíny a poté by se daly odhadovat vhodné *in vivo* podmínky pro tento děj nebo jako druhý příklad lze uvést reakci kůže na ultrafialové záření pro posuzování účinnosti tohoto záření na kožní nádory. Takové náhrady kůže jsou tedy vhodné prostředky pro modelování komplikovaných a vážných kožních chorob jako jsou psoriáza a rakovina kůže a také pro preklinické testování potenciální léčby. [69] Tabulka 3 ukazuje širokou škálu využití kůže získané bioinženýrstvím.

**Tabulka 3:** Možnosti využití kůže získané bioinženýrstvím. Zdroj: [69]

Využití kůže získané bioinženýrstvím			
Ošetřování kůže	Modelování fyziologických a patologických podmínek		Farmaceutický screening
Popáleniny	Uzdravení poranění	Podráždění světlem	Metabolismus léčiv
Poranění způsobená kožními onemocněními	Reakce na ultrafialové záření	Reakce na léčiva	Absorbance léčiv
	Proces stárnutí	Rakovina kůže	Bezpečnost a účinnost
	Permeabilita kožní bariéry	Dermatózy	Personalizovaná terapie (specifická pro konkrétního pacienta)
		Kožní záněty	



Lidská kůže by byla ideálním modelem pro studování kožních abnormalit, avšak toto nelze provádět na živých lidských bytostech. Používání kůže ze zvířat je limitováno nejen z etických důvodů, ale také kvůli odlišnostem oproti lidské kůži, zde by tedy výsledky studií byly nespolehlivé a nerelevantní. Mrtvoly nebo bioptické vzorky kůže pacientů jsou však někdy používány v preklinických studiích, bohužel vzorky kůže nemusí být vždy k dispozici v dostatečném množství a velikosti a vzhledem k odlišnostem vzorků kůže mezi jednotlivými zvířecími druhy a mezi jedinci stejného druhu nemusí být zajištěna reprodukovatelnost. *In vitro* rekonstrukce konzistentních a důvěryhodných modelů kůže může pomoci překonat tyto překážky. Dostatečné množství kožních buněk a lipidové matrix poskytující žádoucí 3D prostředí pro normální růst, proliferaci a funkčnost buněk umožňuje dostat vhodný model pro testování chorob a další procedury a nedochází přitom k porušování důležitých etických zásad. [74] Jediný bioptický vzorek může poskytnout bohaté buněčné kultury pro jejich *in vitro* expanzi, což umožní výrobu dostatečného množství modelů kůže stejného původu, což řeší problémy s dostupností a reprodukovatelností modelů kůže. [69]

#### **4.5.3 Modely kožních chorob**

*In vitro* kožní modely zahrnují rekonstruované kožní náhrady, které mají využití ve zkoumání dermatologických abnormalit a jejich potenciální léčby. Trnem v patě je však jejich strukturální jednoduchost, zejména v případě komplikovaných kožních chorob jako jsou psoriáza nebo kožní nádory, jejichž patogeneze spočívá ve složitých interakcích mezi různými skupinami buněk. [75] Spolehlivé a výhodné modelování kožních chorob vyžaduje robustní a standardizovaný trojrozměrný model kůže. Na výběr máme z jednovrstevných modelů, rekonstruované lidské epidermis, dermis zbavené epidermu, kolagenových hydrogelů, samo-vznikajících modelů a tzv. modelů „skin-on-chip“. [69] Dostupné modely a podrobnější informace o nich jsou shrnuty v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Různé typy kožních modelů z bioinženýrství vhodné pro modelování kožních chorob, jejich výhody a nevýhody. Zdroj: [69]

Kožní model	Buňky	Matrix	Výhody	Nevýhody
Jednovrstevné modely	Keratinocyty nebo fibroblasty	-	Diferenciovaná epidermis	Dvojměrné prostředí, žádné buněčné interakce
Rekonstruovaná lidská epidermis	Keratinocyty	Polykarbonátová	Diferenciovaná epidermis, trojrozměrné prostředí	Žádné buněčné interakce
Dermis zbavená epidermis	Fibroblasty nebo plně bez buněk	Přirozená extracelulární matrix	Trojrozměrné prostředí, dermo-epidermální ekvivalenty	Absence keratinocytů, omezená dostupnost
Kolagenové hydrogely	Fibroblasty (obalené v kolagenových hydrogelech), keratinocyty (zasazené do horní části hydrogelu)	Kolagen typu I (lze skombinovat s chitosanem nebo jinými typy kolagenu)	Trojrozměrné prostředí, dermo-epidermální ekvivalenty, dostupnost, snadná výroba	Nepřítomnost přirozené extracelulární matrix, možnost kontrakce hydrogelu
Samo – vznikající modely	Fibroblasty (obaleny kolagenovými hydrogely), keratinocyty (zasazené do hydrogelu)	Přirozená extracelulární matrix	Trojrozměrné prostředí, dermo-epidermální ekvivalent, plně autologní kožní model	Velmi pomalý proces jejich vzniku
Modely „skin-on-chip“	Fibroblasty, keratinocyty, buňky endotelu, buňky dalších orgánů	Porézní membrány, lipidová „lešení“ pro kožní buňky	Trojrozměrné prostředí, interakce mezi různými typy buněk nebo orgánů	Komplexní a složité systémy, nepřítomnost extracelulární matrix

## 4.5.4 Typy modelů kůže získané bioinženýrstvím

### 4.5.4.1 Jednovrstevné modely

Jednovrstevné modely jsou tvořeny jedním typem buněk: buďto fibroblasty nebo keratinocyty. Vrstva keratinocytů představuje epidermis, vrstva fibroblastů pak představuje dermis. Nabízejí možnost studovat fyziologii nebo patogenezí obou typů buněk odděleně, také částečně umožňují zkoumání buněčných interakcí a jejich chování bez přítomnosti jiných typů buněk. [76] Postrádají ovšem trojrozměrné prostředí, které je důležité pro normální růst a funkci buněk, navíc se zde nedá modelovat rozhraní mezi epidermis a dermis. [69]

### 4.5.4.2 Rekonstruovaná lidská epidermis

Rekonstruovaná lidská epidermis je model skládající se z polykarbonátové membrány, ve které jsou zasazeny keratinocyty a poté jsou kultivovány na rozhraní vzduch-kapalina za účelem jejich diferenciací a tvorby epidermálních vrstev. Jde o trojrozměrný ekvivalent modelující kožní bariéru, ale stejně jako v případě jednovrstevných modelů tady nelze studovat interakce mezi keratinocyty a jinými kožními buňkami, jelikož jiné zde nejsou obsazeny. [77]

### 4.5.4.3 Dermis zbavená epidermis

Modely na způsob dermis zbavené epidermis se tvoří oddělením epidermis od dermis ze tkání získaných biopsií. Případně takové nebuněčné modely mohou být získány tak, že se z dermis odstraní i fibroblasty. Keratinocyty jsou zasazeny na modelu a po kultivaci na rozhraní vzduch-kapalina se postupně diferencuje epidermis. Zasazení keratinocytů do modelu bez všech buněk nám poskytne epidermální kožní model, zatímco zasazení keratinocytů do modelu obsahujícího fibroblasty nám poskytne plný dermo-epidermální ekvivalent, který se svým složením více blíží přirozené lidské kůži. [78]

### 4.5.4.4 Kolagenové hydrogely

Kolagenové hydrogely jsou dobře prozkoumané modely kůže, které mají též klinické využití. [79] V jejich případě jde o lidské fibroblasty v kolagenovém hydrogelu, což dohromady poskytuje potřebné 3D prostředí a po inkubaci a kultivaci se přetvoří dermální matrix a vznikne jednoduchá zrekonstruovaná dermis. Na tuto se zasadí

keratinocyty, aby se docílilo plného dermo-epidermálního ekvivalentu, který je vhodný pro zkoumání kožních chorob. Případná nadměrná kontrakce a nestabilita jsou však běžné defekty těchto modelů. Ovšem samy o sobě mohou být lehce a rychle vyráběny. [69] Zapojení dalších typů kožních buněk do rekonstruované dermální matrix je pak vyžadováno pro možnost modelování většiny kožních chorob na těchto modelech.

#### 4.5.4.5 „Samo – vznikající“ modely

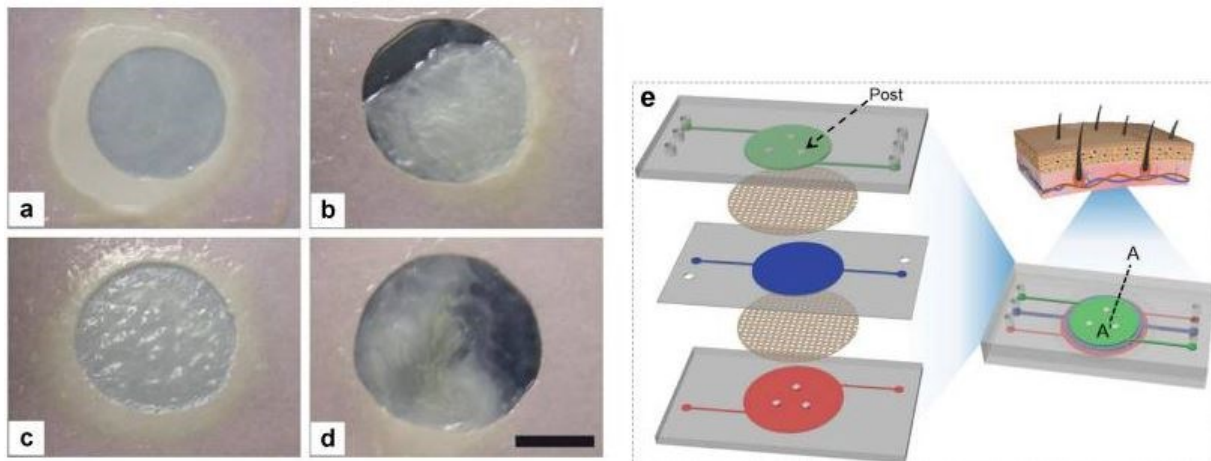
Tyto modely se tvoří tak, že se lidské fibroblasty ponechají v kultuře vhodného složení, aby sekretovaly svoji vlastní extracelulární matrix, a poté se keratinocyty získané od stejného jedince, od kterého byly získány fibroblasty, zasadí do vzniklé dermis. Touto metodou lze dobře tvořit např. kožní modely psoriázy. Jedna se o skvělou možnost pro *in vitro* studování chování jako zdravé, tak patologické kůže díky absenci syntetických biomateriálů a plně autologního zdroje buněk, avšak efektivita a spolehlivost těchto modelů závisí na schopnosti fibroblastů tvořit dostatečné množství jejich extracelulární matrix. [69]

#### 4.5.4.6 Modely „skin-on-chip“

Modely „skin-on-chip“ jsou modely komplexní struktury, vhodné pro *in vitro* studie komplexních kožních chorob. Liší se ve struktuře v závislosti na použitých a studovaných buněčných a molekulárních komponentách, ale obvykle jsou zde kultivovány různé typy buněk v několika vrstvách nebo komorách na jediné platformě, které mezi sebou „komunikují“ a interagují skrz porézní membrány. Jsou zde zapojeny i komponenty, které zajišťují vyživování buněk a molekul a tekutin mezi různými vrstvami modelu, tak aby se co nejdůvěryhodněji napodobila funkce kožní tkáně. [69, 80] Tento typ modelu kombinuje dermální, epidermální i endoteliální vrstvy, jak je patrné na obrázku 10, který zobrazuje i „samo-vznikající“ model psoriázy.

Modely „skin-on-chip“ představují příslib pro studie kožní mikrobioty. [81] Od kmenových buněk, které se zde využívají, jsou odvozeny například keratinocyty, fibroblasty a melanocyty, jejich použití je tedy jedním z důležitých nástrojů tvorby komplexních modelů kůže. V těchto modelech jsou různé buňky kultivovány za použití mikrofluidního zařízení a můžeme na nich pak studovat vliv látek i na další orgány lidského těla díky jejich komplexnímu složení. Práce s těmito modely zahrnuje dynamickou perfúzi a ventilaci, což umožňuje důvěryhodně napodobovat epidermální morfologii, diferenciaci a bariérovou funkci. [69] Mikrofluidní zařízení také umožňují

studovat pohyb imunitních buněk. S možností tvorby všech hlavních typů kožních buněk z buněk kmenových je takto tedy možné vytvořit komplexní model kůže téměř identický té přirozené. [82] Mikrofluidní zařízení jsou však finančně náročná, což použití této technologie poměrně limituje, je ale jisté, že modely „skin-on-chip“ představují důležitý nástroj dermatologického výzkumu a pomohou ke snížení potřeby využívání zvířat. [69]



**Obrázek 10:** Samo-vznikající model kůže s psoriázou: (a): zdravá náhrada kůže ; (b) náhrada kůže zasažená psoriázou s fibroblasy a keratinocyty ; (c) náhrada kůže s psoriatickými fibroblasty a zdravými keratinocyty ; (d) náhrada kůže se zdravými fibroblasty a psoriatickými keratinocyty; (e) schématický diagram modelu „skin-on-chip“ skládajícího se z epidermální vrstvy (zelená barva), dermální vrstvy (modrá barva) a endoteliální vrstvy (červená barva), vrstvy jsou oddělené porézními membránami. Obrázek napravo ukazuje samo-vznikající „skin-on-chip“ model, kdežto levý obrázek ukazuje oba typy modelu zvlášť. Zdroj: [69]

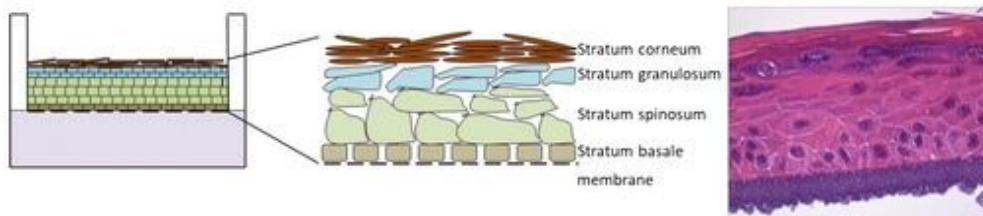
## 4.6 3D modely kůže

### 4.6.1 Charakteristika 3D modelů kůže

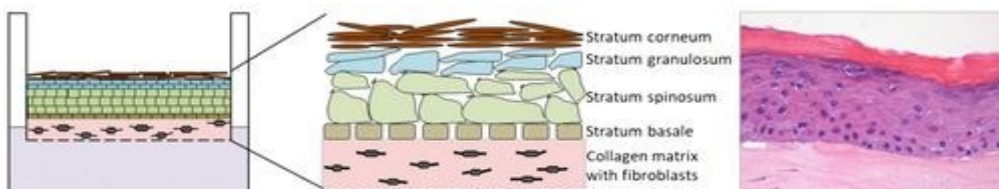
V posledních dvou dekadách byl učiněn významný pokrok ve vývoji 3D modelů epidermis a kůže obecně. Stále více studií je využívá v rámci dermatologického výzkumu. Tento trend by měl v budoucnu vést k redukcí počtu zvířat používaných pro takovýto výzkum. U těchto modelů je také důležité, aby jejich povrch reprezentoval typickou kožní mikrobiotu a jelikož o ní získáváme stále nové informace, je důležité, aby ruku v ruce s ní

rostla i důvěryhodnost takovýchto modelů. Oproti zvířecím modelům kůže skýtají mnoho výhod. Mezi ně patří například to, že důvěryhodně zpodobňuje vlastnosti lidské kůže (jejich součástí je plně diferenciovaná epidermis), k jejich výrobě není zapotřebí zvířat, jsou dobře dostupné, mohou být sterilní a mohou být kolonizovány specifickými mikroorganismy a lze na nich použít a studovat buňky získané přímo od pacientů (např. keratinocyty zasažené atopickou dermatitidou nebo psoriázou) a jejich chování. [83]

Těchto modelů je mnoho druhů. Ten nejjednodušší se skládá pouze z diferenciované epidermis, viz. Obrázek 11. U tohoto modelu jsou kultivované keratinocyty zasazeny do kultury s kožní tkání a zde dále rostou. Poté se odstraní kultivující médium a keratinocyty jsou tak vystaveny působení vzduchu. To zapříčiní tvorbu a diferenciaci několika epidermálních vrstev včetně *stratum corneum*. [84, 85] U jiných typů podobných modelů mohou být keratinocyty zasazeny do kolagenu nebo fibrinové matrix obsahující fibroblasty, viz. Obrázek 12. [86] V těchto modelech slouží kolagen nebo fibrinová matrix jako jakési lešení pro keratinocyty a napodobuje funkci mimobuněčné kožní matrix. 3D modely kůže lze využít ke studii kožní mikrobioty, ty složitější pak i ke sledování vlivu léčiv a dalších látek na jiné orgány lidského těla díky komplexnímu složení. S výhodou se pak tyto modely používají pro zkoumání interakcí mezi kožními a imunitními buňkami, či interakcí mezi kůží a některými standardními i patogenními bakteriemi. [83]



**Obrázek 11:** Model s plně diferenciovanou epidermis vytvořený na membráně s buněčnými kulturami keratinocytů. Zdroj: [83]



**Obrázek 12:** Model s plně diferenciovanou epidermis vytvořený na kolagenní matrix obsahující fibroblasty. Zdroj: [83]

#### 4.6.2 3D kožní modely tvořené lidskými buňkami

Možná je i výroba 3D modelů kůže, které se skládají pouze z lidských kožních komponent. V takovýchto jsou kolagen nebo fibrinová matrix nahrazeny kožním substituentem odvozeným z fibroblastů vzhledem k jejich kapacitě sekretovat jejich vlastní mimobuněčnou matrix. [87] Další možností tvorby modelů je zasadit keratinocyty do holé dermis získané z lidské kůže. [88] Je možné i použití keratinocytů odvozených z kořínků vlasových folikulů, což poskytuje neinvazivní způsob získání kožních modelů s keratinocyty získanými od pacientů. Keratinocyty lze však získat i za pomoci biopsií. Takhle se dají vytvořit kožní modely s fibroblasty a keratinocyty získanými např. od pacientů s atopickou dermatitidou. [83]

#### 4.6.3 Integrace imunitních buněk

3D modely kůže se též používají pro studium interakcí mezi epidermálními keratinocyty a imunitními buňkami. Příkladem je 3D model s keratinocyty rostoucími na holé dermis, inkubovaný s aktivovanými imunitními CD4+ T-buňkami. Tyto buňky procházejí dermis a vyvolávají zánětlivou reakci tím, že indukují expresi některých zánětlivých markerů v epidermis. To narušuje i konečný proces diferenciaci keratinocytů. [83] Tuto zánětlivou reakci lze zbrzdit některými léčivy jejich přidáním do kultury. [89] Je tedy možné na některých 3D modelech kůže studovat vliv imunitních buněk na keratinocyty v trojrozměrném prostředí. [83]

Vedle imunitních buněk stojí za zmínku i studium chování komenzálů v kůži, což je typ mikroorganismů, které mají z hostitele nějaký prospěch, přičemž ho nepoškozují. Jedním z příkladů je *Staphylococcus epidermidis*, jenž posiluje kožní bariéru aktivací imunitních buněk. Tady mohou 3D modely kůže pomoci k rozklíčování mechanismů, pomocí kterých takto komenzálové napomáhají imunitě. Jedním z těchto modelů je třeba 3D model s CD4+ T-buňkami, který se používá pro zjišťování reakce různých buněk kůže na infekci kvasinkami rodu *Candida albicans*. Proti těmto jsou účinné T-buňky imunitního systému, které indukují protimikrobní odpověď fibroblastů. Takovéto modely jsou tedy vhodné na získávání informací o interakcích mezi hostitelskými buňkami v kůži a jejich reakcích na různé mikroorganismy. [83]

#### 4.6.4 Využití bakterií na 3D kožních modelech pro medicínské účely

Dalším takovým mikrobem je *Staphylococcus aureus*, popř. *Staphylococcus epidermidis*. Interakce mezi ním a kůží jsou už nějakou dobu jedním z předmětů dermatologického výzkumu vzhledem k jeho vysokému patogennímu potenciálu. Na některých 3D modelech lze takto monitorovat růst a lokalizaci tohoto patogena [90], který je schopný jako jiné bakterie infikovat i kožní poranění. Na některých modelech byla prováděná cílená poranění teplem v rámci zjišťování účinnosti protimikrobních faktorů proti multirezistentnímu *S. aureus*. [91] Špatně se hojící nebo dokonce nehojící se zranění jsou pak často spojována s bakteriálním „filmem“, který se na ráně vytvoří. Za účelem studování vývoje takového biofilmu v poraněních infikovaných bakteriemi *S. aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa* bývá používán komerční 3D kožní ekvivalent Graftskin®. Ten má potenciál do budoucna v použití pro výzkum terapeutických možností s cílem zabránit vzniku bakteriálních filmů v ranách, tento model však řadíme do modelů lidské epidermis. [92] Celkově pak představují 3D kožní modely možnost studování protiinfekčních postupů s účelem snížit bakteriální hrozbu při poranění kůže. [83]

Dalšími bakteriemi, které obývají lidskou kůži, je například rod gram-negativních *Acinetobacter*, které mají mj. protizánětlivou roli v homeostázi kůže. [93] Ovšem některé druhy, například *Acinetobacter baumannii*, mohou způsobovat oportunní infekce. Tento patogen totiž na epidermis tvoří biofilm, sám od sebe však nevyvolává protizánětlivou odpověď ani neaktivuje keratinocyty. Navíc se dá snadno odstranit, např. lokálně chlorhexidinem. Zde tedy vidíme další využití 3D kožních modelů, kterým je možnost vyhodnotit kolonizaci kůže bakteriemi a zkoumat protimikrobní procedury s účelem odstranění těchto bakterií z povrchu kůže. [93]

Podobně na tom jsou bakterie rodu *Corynebacteria*, které běžně obývají povrch lidské kůže, ale některé z nich mohou opět způsobovat oportunní infekce. Takovým druhem je např. komenzální *Corynebacterium amycolatum*, jenž ovlivňuje keratinocyty. V epidermis indukuje v keratinocytech aktivitu protimikrobního proteinu RNázy 7. Inaktivace tohoto proteinu ve *stratum corneum* snižuje schopnost této vrstvy omezovat růst těchto škodlivých bakterií, což značí důležitou roli tohoto proteinu při regulaci růstu komenzálních *corynebakterií*. [94]



#### 4.6.5 Syntetická stratum corneum

Použití kultivovaných buněk *stratum corneum* jako permeačních bariér je další možností práce s modely *stratum corneum*. [95] Může jít například o myší keratinocyty, epiteliální nebo endoteliální buňky této vrstvy. Je však komerčně dostupný i model lidské kůže vytvořen *in vitro* kultivací dermálních a epidermálních buněk. I když je více permeabilní pro většinu látek, než lidská kůže, má podobnou kapacitu diferenciaci buněk jako tato. [41] Je také pravděpodobně možné vylepšit její bariérovou funkci úpravou podmínek kultivace. [96]

3D modely kůže tedy oproti mnohým dalším modelům lze používat na studování patogenických mechanismů způsobených celou řadou bakterií, což je v současných dermatologických výzkumech rozhodně radí do popředí. [85]

### 4.7 Komerčně dostupné modely lidské epidermis

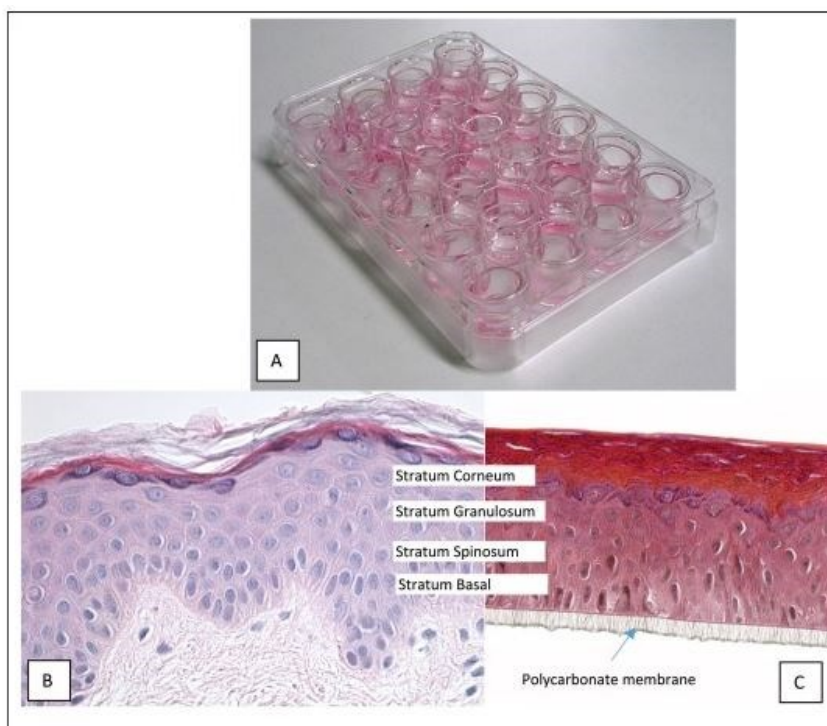
#### 4.7.1 Charakteristika modelů lidské epidermis

Komerčně dostupné modely rekonstruované lidské epidermis EpiSkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> a EpiDerm<sup>®</sup> vykazují mnohé podobnosti s přirozenou lidskou epidermis, co se morfologie a složení lipidů týče. Z toho pramení výhoda toho, že data získaná při experimentech s nimi se mohou v mnohém téměř shodovat s daty známými o lidské kůži. Tyto modely jsou užitečnými nástroji pro testování fototoxicity, korozivity a dráždivosti zkoušených léčiv a dalších látek. Na těchto modelech lze též testovat transport léčiv a dalších xenobiotik kůží. Trnem v patě a hlavní nevýhodou zde však může být nedostatečně vyvinutá bariérová funkce oproti přirozené lidské kůži. Je tedy žádoucí se u těchto modelů co nejvíce přiblížit složením lidské epidermis, zejména tedy v bariérové funkci. Modely lidské epidermis jsou záležitostí především posledních 25 let. [97]

#### 4.7.2 Příprava a využití vybraných modelů lidské epidermis

Model SkinEthic<sup>®</sup> typu RHE (Reconstructed Human Epidermis) tvoří normální keratinocyty odvozené od těch lidských, které jsou kultivovány za takových podmínek, aby vytvořily plně diferenciovanou trojrozměrnou epidermis na povrchu inertního

polykarbonátového filtru na rozhraní vzduch – tekutina v chemicky definovaném médiu. [98] Jeden ze způsobů jeho přípravy zahrnuje destičku se 24 komorami, z nichž každá obsahuje rekonstruovanou epidermis a všechny vrstvy lidské epidermis, viz. Obrázek 13.



**Obrázek 13:** A) Model SkinEthic® RHE model připravený na destičce se 24 komůrkami. B) Vrstvy lidské epidermis zakomponované v modelu. C) Rekonstruovaná epidermis. Zdroj: [99]

Model EpiSkin® se připravuje kultivací vyzrálých lidských keratinocytů na kolagenovém substrátu v podmínkách, které umožňují jejich konečnou diferenciaci a rekonstrukci epidermis s funkční horní vrstvou. Tento model se používá ke studiím predikce vedlejších účinků lokálně aplikovaných látek, směsí a přípravků. Dále ho lze použít k testům korozivity látek a testům dráždivosti látek a směsí. [100]

Model EpiDerm® je vysoce diferenciováním trojrozměrným modelem kůže, který se skládá z normálních epidermálních keratinocytů odvozených od těch lidských, které se kultivují na speciálně připravovaných insertech s tkáňovými kulturami na rozhraní vzduch-kapalina. Umožňuje vyhodnocování permeability a dalších vlastností lokálně aplikovaných látek, chemikálií, kosmetických přípravků a léčivých přípravků. Jde o jakýsi zlatý standard pro široké spektrum prediktivních *in vitro* aplikací. [99]

Tyto modely prošly širokospektrým testováním, aby se prokázala možnost jejich použití jako alternativa kůže zvířat. Pro tento účel musí co nejdůvěryhodněji napodobovat vlastnosti lidské kůže. Ohledně morfologie je důležité zastoupení lipidů v těchto modelech. Složení lipidů rozhoduje o kožní permeabilitě, flexibilitě, průchodu léčiv přes kůži a dalších aspektech kožní biologie. Je tedy nezbytné, aby co nejdůvěrněji napodobovalo v případě modelu vlastnosti lidské kůže. Metodami používanými k zjišťování lipidových profilů jsou především analytická tenkovrstvá chromatografie nebo vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie. [101] Na modelech se testuje několik níže zmíněných parametrů, a to mj. fototoxicita, reakce na dráždivé látky, permeabilita různorodých látek nebo reakce na korodující látky. [97]

Testování fototoxicity se provádí tak, že fototoxické látky jsou aplikovány na model a potom jsou ozařovány ultrafialovým zářením různých vlnových délek a různé intenzity a sleduje se, zda dojde k fototoxické reakci. Takto se dá rozpoznat fototoxický potenciál léčiv a dalších látek. Podobným způsobem se provádí testování působení dráždivých látek – dráždivé látky se aplikují na modely a sleduje se, zda model vykazuje biochemické nebo histologické známky podráždění. Samozřejmě se sleduje též permeabilita látek přes modely, v tomto případě se léčivé přípravky aplikují na povrch modelu a měří se množství látky, které projde modelem za jednotku času. Takto získaná data nám umožňují vyhodnotit bariérovou funkci modelu. Posledním z nejčastěji měřených parametrů je testování schopnosti koroze. Model je exponován korodujícími látkami a posuzuje se výsledná reakce. Vhodnost modelu pro testování všech těchto charakteristik byla potvrzena před jejich uvedením do praxe. Speciální pozornost se zde klade na testy permeability léčiv a porovnání jejich výsledků s testy na přirozené lidské kůži, ve většině případů se dochází k podobným výsledkům, díky čemuž jsou modely lidské epidermis výborným screeningovým nástrojem pro tyto účely. [97]

#### **4.7.3 Model SkinEthic®**

Tento model vyvinuly laboratoře společnosti SkinEthic® ve francouzském městě Nice v roce 1992. Technická data a bezpečnostní pravidla z laboratoří SkinEthic® popisují epidermální model SkinEthic® jako epidermis tvořený kulturou lidských keratinocytů ponechaných na dobu 17 dní v chemicky definovaném médiu na inertních polykarbonátových filtrech. [102]

#### 4.7.3.1 Morfologie modelu

Model sám o sobě je velmi podobný lidské epidermis. Obsahuje vrstvy *stratum corneum*, *stratum granulosum* a *stratum spinosum* [103]. Dále zde nalezneme desmosomy, keratohyalinová a lamelární granula. [99] Pomocí elektronové mikroskopie se zde dále dají odhalit hemidesmosomy, některé komponenty tzv. *lamina densa* (struktura mezi epidermis a dermis), přichycená kožní filamenta a struktura, která vypadá jako bazální membrána. Model SkinEthic® se však lehce liší od přirozené lidské tkáně, například tím, že napříč všemi vrstvami modelu se vyskytují kapičky lipidů, především ve vrstvě *stratum basale*. [97]

#### 4.7.3.2 Složení lipidů

Hlavní podtřídy ceramidů a jejich prekurzory, tedy glukosylceramidy, jsou v modelu SkinEthic® běžně přítomny [97, 104]. Obecně je však složení lipidů v tomto modelu podobné přirozené lidské tkáni. V tabulce 5 zde vidíme zastoupení jednotlivých skupin lipidů v modelu ve srovnání s ní. Podle této je složení lipidů v tomto modelu blízké přirozené lidské kůži. [101]

**Tabulka 5:** Složení lipidů v modelu SkinEthic® v porovnání s přirozenou lidskou kůží.

Zdroj: [101]

Lipid	Model SkinEthic® ± směrodatná odchylka [%]	Přirozená lidská kůže ± směrodatná odchylka [%]
Fosfolipidy	17,0±10,6	36,5±4,1
Sfingomyelin	2,8±1,3	8,9±1,6
Fosfatidylcholin	6,4±3,8	11,2±0,8
Fosfatidylserin	1,1±0,7	3,9±0,3
Fosfatidylinositol	1,8±1,2	2,2±0,8
Fosfatidylethanolamin	4,9±4,0	10,3±0,8
Cholesterolsulfát	3,8±2,0	5,0±1,6
Glukosfingolipidy	3,0±1,7	5,0±0,4
Ceramidy	26,5±12,2	12,1±1,8
Volné mastné kyseliny	6,9±3,9	7,8±1,2
Cholesterol	19,5±9,5	17,7±3,2
Lanosterol	4,3±3,1	-
Di-/triglyceridy	12,6±8,6	8,9±3,7
Cholesterolester	6,5±4,4	7,0±0,4

Důležitým rozdílem je také to, že v lidské kůži má vrstva *stratum corneum* konstantní tloušťku. V modelu jako takovém je vrstva *stratum corneum* silnější, než v lidské tkáni. Tohle by mohlo vysvětlovat, proč je zastoupení fosfolipidů v modelu menší, než v epidermis a zastoupení ceramidů je zase naopak vyšší, než v epidermis. Oproti modelu se v lidské tkáni navíc nachází diglyceridy a triglyceridy, jejichž původ zde je dosud nejistý. [105] Pravděpodobně může jít o rozkladné produkty mazových lipidů nebo podkožního tuku. [97]

#### 4.7.4 Model EpiSkin®

Autorem tohoto modelu je Eduardo Tinois, od kterého byl odkoupen v roce 1997 kosmetickým gigantem L'Oréal. Skládá se z hovězí kolagenové matrix (kolagen typu 1), která představuje dermis a na jejím povrchu je lidský kolagen typu 4. Na tento se po 13 dnech kultivace přidá rozvrstvená diferenciovaná epidermis odvozená z lidských keratinocytů. [106] Tento model se používá především pro studování dráždivosti různých látek. Aby byl vytvořen model vhodný pro testování penetrace léčiv skrz něj, jsou keratinocyty kultivovány déle, zhruba 20 dní předtím, než se přidají ke kolagenovému substrátu. [97]

##### 4.7.4.1 Morfologie modelu

Tento model obsahuje všechny vrstvy epidermis, které nalezneme i v lidské. *Stratum corneum* v případě modelu vykazuje významně zvýšený počet buněčných vrstev oproti lidské kůži a také je silnější. Životaschopné buňky jsou tu organizovány jinak, než v lidské kůži, jsou zde i určité změny jejich tvaru v bazální vrstvě kůže. Bazální buňky mají krychlovitý tvar, zatímco v hořejších vrstvách jsou buňky relativně ploché. Zrnité buňky s keratohyalinem jsou sice přítomné, ale v nepravidelném tvaru. Za použití elektronové mikroskopie můžeme v modelu vidět lamelární vrstvy lipidů bohaté na elektrony v mezibuněčných prostorách *stratum corneum*. [101, 107] Model EpiSkin® pro studování penetrace léčivých přípravků má silnější a těsněji uspořádanou vrstvu *stratum corneum*, než model EpiSkin® pro studování dráždivosti látek. [97]

##### 4.7.4.2 Složení lipidů

Složení lipidů pro modely k testování dráždivosti a penetrace je dobře a důvěrně známo, viz. Tabulka 6. Jak model pro studování dráždivosti látek, tak model pro studování

penetrace obsahují všechny hlavní třídy lipidů. Množství fosfolipidů v modelu pro dráždivost je velmi blízké množství fosfolipidů v lidské kůži, zatímco u modelu pro penetraci je fosfolipidů méně. Prekurzory ceramidů, konkrétně glykosfingolipidy, jsou v obou modelech zastoupeny v množstvích podobným lidské kůži. Množství ceramidů se od ní v obou modelech však značně liší. Množství volných mastných kyselin a esterů cholesterolu jsou v modelech v porovnání přirozenou lidskou kůží nižší. Lanosterol, který se nevyskytuje ve významném množství v lidské kůži, je též obsažen v obou modelech. Ve složení lipidů se však vyskytují určité rozdíly kus od kusu. [101, 107]

Tabulka 6 ukazuje velké rozdíly mezi přirozenou lidskou tkání a modelem EpiSkin®. Co se týče jejich množství diglyceridů a triglyceridů, jejich původ je dosud neznámý. Důvody těchto rozdílů nebyly doposud objasněny. V návaznosti na to vyvstává z těchto poznatků otázka, zda tento fakt ovlivňuje vlastnosti bariér těchto modelů. [97]

**Tabulka 6:** Složení lipidů v modelu EpiSkin® a jeho porovnání s přirozenou lidskou kůží.

Zdroj: [101]

Lipid	Model EpiSkin® pro testování dráždivosti ± směrodatná odchylka [%]	Model EpiSkin® pro testování penetrace ± směrodatná odchylka [%]	Přirozená lidská kůže ± směrodatná odchylka [%]
Fosfolipidy	33,0±12,5	13,7±6,9	36,5±4,1
Sfingomyelin	4,7±1,3	2,2±0,9	8,9±1,6
Fosfatidylcholin	10,8±2,7	5,2±2,5	11,2±0,8
Fosfatidylserin	2,6±1,6	0,9±0,7	3,9±0,3
Fosfatidylinositol	3,6±2,5	1,5±0,6	2,2±0,8
Fosfatidylethanolamin	11,2±5,4	4,0±2,5	10,3±0,8
Cholesterolsulfát	2,0±0,5	1,4±0,5	5,0±1,6
Glukosfingolipidy	3,4±1,4	1,2±0,4	5,0±0,4
Ceramidy	18,5±6,0	25,1±4,2	12,1±1,8
Volné mastné kyseliny	1,8±0,5	2,0±1,3	7,8±1,2
Cholesterol	17,6±4,2	17,5±2,3	17,7±3,2
Lanosterol	1,3±0,5	2,8±1,5	-
Di-/triglyceridy	20,9±2,9	34,0±6,4	8,9±3,7
Cholesterolester	1,5±0,5	2,3±0,8	7,0±0,4

Souvislosti mezi zastoupením určitých tříd lipidů s transportem léčiv přes model byly studovány již mnohokrát [108, 109], podle většiny pramenů souvisí transport léčiv

v kůži především se složením lipidů. Nemůžeme tedy dosud jasně stanovit vliv vyšších hladin triglyceridů na funkci kožní bariéry. Co se těchto týče, tak jejich zvýšená tvorba a retence lipidů uvnitř zrohovatělých buněk souvisí s hyperproliferací a narušenou funkcí kožní bariéry. Tento jev je pozorován při některých hyperproliferativních onemocněních kůže jako jsou atopická dermatitida, psoriáza, případně významný deficit mastných kyselin. [97]

#### 4.7.5 Model EpiDerm®

Tento model byl představen v roce 1993 americkou společností MatTek Corporation z města Ashland ve státu Massachusetts. Na trhu je několik typů tohoto modelu, například rekonstruovaná epidermis s melanocyty, rekonstruovaná zrohovatělá epidermis atd. Nedávno jsme se dočkali i modelu o tloušťce plné lidské kůže, o kterém zatím ale není mnoho dat ze studií. Pozornost je poslední dobou zaměřena zejména na model pro perkutánní absorpci léčiv. Obecně lze model popsat jako soubor normálních epidermálních keratinocytů odvozených od těch lidských, které jsou kultivovány do vícevrstvého, vysoce diferenciovaného modelu lidské epidermis. [110]

##### 4.7.5.1 Morfologie modelu

Morfologie modelu EpiDerm® je podobná jako u lidské epidermis. Rozdíl je však v tom, že jelikož se v případě modelu „pěstují“ keratinocyty na polykarbonátových filtrech, chybí zde tzv. Retovy brázdy, které spojují dermis a epidermis v lidské kůži. Všechny vrstvy epidermis najdeme v modelu EpiDerm® pro testování penetrace léčiv. Počet živých vrstev buněk v modelu pro testování penetrace látek je 6-8, v modelu pro testování dráždivosti pak 7-14. Tloušťka epidermis v případě prvního modelu je 28-43  $\mu\text{m}$ , zatímco u druhého modelu je to 83-100  $\mu\text{m}$ . *Stratum basale* je pro oba modely stejná. Tvar buněk je sloupovitý, až kulatý. [97]

Vnitrobuněčné lipidové kapénky, které se nevyskytují v lidské epidermis, zde můžeme také často najít. Ve vrstvě *stratum spinosum* jsou buňky placaté, stejně jako v lidské epidermis. Ve *stratum corneum* se nachází vnitrobuněčné lipidy, ale jejich uspořádání je velmi různorodé. Lamerální tělíska ve *stratum granulosum* se v modelu vyskytují běžně a keratohyalinová granula se nacházejí okolo nich, dohromady s nimi mohou tvarem připomínat hvězdu. *Stratum corneum* obsahuje 16-25 volně uspořádaných buněčných vrstev, které mají dohromady tloušťku 12-28  $\mu\text{m}$ . [101,107]

#### 4.7.5.2 Složení lipidů

Obsah lipidů v tomto modelu lidské epidermis zahrnuje všechny hlavní třídy lipidů v množstvích podobných jako v lidské epidermis, viz. Tabulka 7. Je tu však lehce zvýšené množství glukosylceramidů. Obsah ceramidů je celkově srovnatelný s lidskou epidermis ohledně všech svých tříd, malé rozdíly oproti lidské kůži zde však mohou být, obsahy esterů cholesterolu a volných mastných kyselin jsou zde nižší, než v lidské epidermis [101].

**Tabulka 7:** Složení lipidů v modelu EpiDerm® v porovnání s přirozenou lidskou kůží.

Zdroj: [101]

Lipid	Model EpiDerm® pro testování dráždivosti ± směrodatná odchylka	Model EpiDerm® pro testování penetrace ± směrodatná odchylka	Přirozená lidská kůže ± směrodatná odchylka
Fosfolipidy	36,5±2,7	30,4±1,1	36,5±4,1
Sfingomyelin	8,2±1,5	6,3±0,3	8,9±1,6
Fosfatidylcholin	13,6±2,4	10,7±0,2	11,2±0,8
Fosfatidylserin	3,2±0,7	2,3±0,1	3,9±0,3
Fosfatidylinositol	4,3±0,8	3,7±0,9	2,2±0,8
Fosfatidylethanolamin	7,1±1,6	7,4±0,3	10,3±0,8
Cholesterolsulfát	5,8±1,2	5,7±1,6	5,0±1,6
Glukosfingolipidy	9,5±1,3	5,8±0,1	5,0±0,4
Ceramidy	18,5±2,5	28,9±0,3	12,1±1,8
Volné mastné kyseliny	2,6±0,5	3,1±0,6	7,8±1,2
Cholesterol	14,8±1,3	17,9±0,9	17,7±3,2
Lanosterol	1,2±0,5	1,0±0,1	-
Di-/triglyceridy	10,5±2,2	6,9±0,8	8,9±3,7
Cholesterolester	2,7±1,1	2,1±0,4	7,0±0,4

#### 4.7.6 Porovnání modelů lidské epidermis

Modely SkinEthic®, EpiSkin® a EpiDerm® jsou pečlivě zdokumentovány v dostupné literatuře. Jsou to modely složením a vlastnostmi blízké lidské kůži, ale jen v určitých aspektech. Jejich obecná struktura, složení a biochemické aspekty v podstatě reprezentují lidskou kůži. Používají se při testování toxicity látek (např. fototoxicity) a pro



sledování transportu léčiv. I když mají většinou větší permeabilitu, než lidská kůže, je jejich permeabilita většinou stálejší, než v případě lidské kůže, ve které je velmi variabilní. [97]

Největším limitem všech těchto tří komerčně dostupných modelů je stále ještě relativně slabá bariérová funkce. Velké úsilí již bylo vynaloženo za účelem zjištění příčin tohoto jevu, v úvahu připadají např. defekty v procesu deskvamace [111]. V každém případě, zvýšená permeabilita ve srovnání s lidskou kůží může limitovat používání těchto modelů pro studie transportu látek a může též vést k falešně pozitivním výsledkům ve studiích toxicity látek.

Cílem všech výrobců modelů kůže je především to, aby bariéra a její funkce byly co nejvíc podobné a nejlépe naprosto stejné jako u lidské kůže v podmínkách *in vivo*, ale je jen těžko předvídatelné, kdy a zda vůbec se toto někdy povede. I když se soustředíme především na modely epidermis, nesmíme zapomenout také na roli dermis ve studiích permeability. [97] Pro simulaci *in vivo* podmínek jsou pak pravděpodobně nejvhodnější modely typu plné lidské kůže. [112] O tom, že zakomponování dermis do modelu je žádoucí, svědčí například fakt, že v případě studování transportu lipofilních látek skrz modely epidermis dochází k výraznějšímu transportu látek kůží, než v podmínkách *in vivo*, a to díky nepřítomnosti dermis, která je v podmínkách *in vivo* efektivní bariérou pro lipofilní látky. [97] Ale právě přidáním dermis k modelu kůže by tento problém mohl být částečně vyřešen.

Dermis je v případě lidské kůže vyživována podkožní vaskularizací, která prochází skrze ní. Tento systém může rychle odstraňovat permeanty, které dosáhnou spojení epidermis – dermis. V situaci *in vitro* se tento systém nenachází. Dalším problémem je, že v podmínkách *in vitro* vodní prostředí dermis zpomaluje penetraci lipofilních látek, zatím v podmínkách *in vivo* je tato bariéra „obklíčena“ kapilárami, což penetraci látek prospívá. Použití čistě epidermálních membrán nebo membrán *stratum corneum* je vhodnější pro sledování transportu lipofilních permeantů, vzhledem k vysokému obsahu lipidů. [113]

Současné komerčně dostupné modely lidské kůže jsou výrazným pokrokem ve studování nových možností podání léčiv a jejich celkového působení na kůži. Stále však není jasné, zda někdy tyto modely dosáhnou takové dokonalosti, aby testy na nich byly stoprocentně důvěryhodné a nemusela se pro tento účel používat zvířata. A protože řada

dalších metod je potřeba pro vývoj nových produktů ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, představuje další vývoj modelů lidské kůže velkou výzvu. [97]

## 5 VÝSLEDKY HLEDANÍ Z DATABÁZÍ PUBMED, WEB OF SCIENCE A SCOPUS

Pro zhodnocení výsledků vyhledávání byly použity databáze PubMed, Web of Science a Scopus. Pro každou z databází byla vytvořena jedna tabulka. Klíčovými slovy pro vyhledávání byly na prvním místě vždy názvy daných typů modelů kůže, na druhém místě pak časový interval v letech.

**Tabulka 8:** Počet výsledků vyhledávání z databáze PubMed, ke dni 8.4.2021.

Klíčová slova	1960 - 1973	1974 - 1987	1988 - 2001	2002 - 2008	2009 - 2015	2016 - 2021
Artificial skin	9	29	121	141	197	263
Animal skin	23	34	75	77	107	111
Skin-PAMPA	0	0	0	0	4	8
Stratum corneum lipid membranes	0	0	0	0	4	7
Bioengineered skin	0	0	32	53	76	57
3D skin model	0	0	0	6	17	44
Human epidermis model	0	0	3	6	14	51

**Tabulka 9:** Počet výsledků vyhledávání z databáze Web of Science, kde dni 8.4.2021.

Klíčová slova	1960 - 1973	1974 - 1987	1988 - 2001	2002 - 2008	2009 - 2015	2016 - 2021
Artificial skin	14	53	999	1284	2085	3138
Animal skin	99	157	7991	6906	9891	10201
Skin-PAMPA	0	0	0	0	4	11
Stratum corneum lipid membranes	0	6	349	214	246	224
Bioengineered skin	1	2	249	240	333	319
3D skin model	0	0	130	439	958	1807
Human epidermis models	0	0	826	754	1149	1022

**Tabulka 10:** Počet výsledků vyhledávání z databáze Scopus, ke dni 8.4.2021.

Klíčová slova	1960 – 1973	1974 – 1987	1988 – 2001	2002 – 2008	2009 – 2015	2016 - 2021
Artificial skin	177	406	1293	2446	3771	3332
Animal skin	16189	29596	34062	26554	35488	35315
Skin-PAMPA	0	0	0	0	2	7
Stratum corneum lipid membranes	0	10	174	124	163	119
Bioengineered skin	0	0	4	11	39	28
3D skin model	0	1	11	55	159	251
Human epidermis models	4	100	466	778	1263	1232

Z množství výsledků, které použité databáze našly, lze vydedukovat, že syntetické modely kůže a kůže zvířat jsou předmětem experimentů ohledně testování léčiv již déle, než půl století. Důvodem toho je jednak dobrá dostupnost potřebných materiálů v případě syntetických membrán, jednak v případě kůží zvířat pak jejich široká škála a možností získání z jatek, případně z laboratorních zvířat (zde hlavně z myši a krysy). O pár let kratší, ale stále již dlouhodobé využití je zde patrné u lipidových membrán, jelikož studium funkcí jednotlivých komponent lidské kůže je předmětem mnohaletých výzkumů a stále jsou prováděny další a další studie jejich možných kombinací. O komerčně dostupných modelech lidské epidermis, které jsou v podstatě těmi nejvhodnějšími modely pro testování léčiv, se pak dozvídáme zhruba od konce minulého tisíciletí. Záležitostmi především posledních dvou dekad jsou modely kůže získané bioinženýrstvím, 3D modely kůže a nejmladší ze zde uvedených jsou pak modely kůže používané v metodě Skin-PAMPA. Poslední zmíněná metoda má velký potenciál do budoucna, jelikož se o ní ví teprve málo, avšak mezi modely kůže již má své pevné uplatnění.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat mezi sebou několik skupin modelů kůže z hlediska možnosti využití, spolehlivosti, dostupnosti, výhod, nevýhod a dalších kritérií. Pokud to vezmeme od začátku, tedy od nejjednodušších modelů po ty komplexní, můžeme začít syntetickými membránami. Ty mají nespornou výhodu oproti ostatním modelům kůže díky snadné dostupnosti materiálu a nenáročnosti na uchovávání, navíc zde není taková variabilita v permeabilitách testovaných látek, jelikož zde neprobíhají žádné metabolické, fyziologické, patologické a další procesy. To ovšem odchyluje získané výsledky od dat získaných například na modelech přirozené kůže a pro data získaná ze syntetických membrán by tak byla velmi obtížná extrapolace na data získaná ze přirozených kůží. Výrazně lépe pak pochodíme u modelů zvířecí kůže, zejména pak v případě prasat díky mnohým charakteristikám podobným s kůží lidskou. Musíme ovšem při testování permeability pro léčiva a další látky brát v potaz rozdíly mezi kůží člověka a zvířat, jelikož kůže různých zvířat se liší svým složením (zejména kožních lipidů), hustotou vlasových a chlupových folikulů, permeabilitou, tloušťkou jednotlivých kožních vrstev, vzhledem, atd.

Jak u syntetických modelů kůže, tak u kůží zvířat figuruje dobrá dostupnost. Kůže některých zvířat jsou navíc mnohými svými vlastnostmi podobné té lidské, nedostatkem je zde však variabilita tloušťky *stratum corneum*, což může interferovat při extrapolaci získaných dat na lidskou *stratum corneum* a dále také variabilita ochlupení. Proto je zde důležitá validace integrity membrány, aby byla důvěryhodným materiálem pro testování permeability léčiv a dalších látek.

Kůže myší a krys se vyznačují podobnou permeabilitou pro mnoho látek jako kůže lidská, jde tedy o dva výborné prostředky pro výzkum transdermálního přenosu léčiv. Dalším velmi důležitým modelem z oblasti zvířecích kůží je kůže prasat, nejen díky poměrně snadné extrapolaci získaných dat na kůži lidskou. Penetrace mnohých léčiv jsou zde s lidskou kůží také srovnatelné, výhodou je také malá hustota ochlupení, která je srovnatelná s ochlupením lidské kůže. Ohledně permeace je dobré zmínit králičí kůži,

kteřá je díky výrazné permeabilitě vhodným indikátorem toxicity léčiv. Podobné vlastnosti s lidskou kůží co se kožní penetrace a permeace látek týče, má i kůže hadí. Jejich kůže má výhodu v tom, že had se z ní pravidelně svléká a lze tedy z jednoho jedince získat více vzorků, což eliminuje tzv. inter-individuální variabilitu.

Pro predikci transdermální penetrace látek se s výhodou používají i modely skin – PAMPA. Podobně jako 3D modely kůže, i u tohoto modelu je snaha o složení co nejvíce podobnému lidské kůži, využívají se zde však syntetické ceramidy. Ovšem finální složení lipidů membrány je zde optimalizováno tak, aby výsledkem byl co nejdůvěryhodnější model. Jak je zmíněno výše, model skin-PAMPA se používá především pro testování permeace látek kůží. Největší plus spočívá v tom, že práce s tímto modelem je relativně jednoduchá a výsledky mají dobrou reprodukovatelnost. Složení modelu lze také vhodným způsobem upravit, podle toho, jaký proces týkající se léčiv chceme sledovat. Tento model se však nehodí pro časově náročnější experimenty, např. uvolňování účinné látky z náplastí v řádu desítek hodiny, proto se model používá především pro testy látek trvající pouze pár hodin. Jedná se o nejmladší metodu ze zde zmíněných pro studování účinků léčiv na kůži a i proto má velký potenciál do budoucna, jelikož se jí začíná zabývat stále více a více studií a jistě se dočkáme ještě mnohých modifikací této metody.

Relativně novějšími modely jsou membrány skládající se z ceramidů a dalších kožních lipidů. Takovéto kožní modely se používají pro studování kožní permeability léčiv, jelikož jde o složky, které se v lidské kůži přirozeně vyskytují, a proto je zde snadná extrapolace získaných dat na lidskou kůži. Problém však spočívá v tom, že příprava takovýchto membrán a získání potřebných komponent membrán jsou poměrně složité a to, co se týče materiálu, tak používaných metod. Variabilita struktur jednotlivých ceramidů je také problémem, protože u některých podtříd ceramidů stačí jen malý rozdíl v délce řetězce a taková membrána se rázem chová jinak. Při používání těchto modelů je tedy vždy záhodno ověřit jejich složení.

To modely kůže získané z bioinženýrství se s oblibou používají pro modelování kožních chorob, a to díky komplexnímu složení, zejména pak modely „skin-on-chip“. Pro tyto účely pochází komponenty modelů přímo ze vzorků odebrané lidské tkáně, výsledky experimentů se tedy často velice podobají datům získaným ze přirozené lidské kůže. Tyto komponenty jsou však špatně dostupné, ovšem relativně dobrým zdrojem je kůže získaná

z plastických operací, které za posledních pár let nejsou ničím neobvyklým. Protože se v podstatě jedná „kožní náhrady“, lze takto připravené membrány využít např. při umělé obnově nevratně poškozené kůže, např. při rozsáhlých popáleninách. Pro výzkumné účely se používá především kůže o plné tloušťce s již zakomponovanými buňkami jiných tělních orgánů a ekvivalentů kůže, zejména modely „skin-on-chip“. Do modelů kůže z bioinženýrství je snaha stále přidávat další komponenty, ze kterých sestává přirozená lidská kůže a i díky tomu jsou tyto modely důležitou součástí výzkumu velké škály procesů probíhajících v lidské kůži.

3D modely kůže jsou i díky tomu, že jejich vývoj je záležitostí především posledních pár let, hojně využívány v současném dermatologickém výzkumu. Snahou je, aby jejich povrch byl co nejvíce autentický vzhledem k přirozenému mikrobiomu kůže a epidermis je zde plně diferenciována. Z hlediska etnického a morálního kodexu je též dobré, že k jejich výrobě není potřeba zvířat, navíc u těchto modelů lze použít buňky získané přímo od pacientů, což jim v jejich užitečnosti ještě více přidává. Díky tomu, že jsou jednotlivé vrstvy kůže na modelu diferenciovány, lze také 3D modely kůže použít pro výzkum interakcí mezi jeho buňkami a buňkami imunitního systému, či některými patogenními bakteriemi, což umožňuje lépe poznat děje probíhající v kůži při různých kožních onemocněních. Tato možnost je řadí mezi nejdokonalejší dosud používané kožní modely.

Autentické vzhledem k lidské kůži jsou i komerčně dostupné modely lidské epidermis. Jsou důležité zejména pro svoji vhodnost na testování fototoxicity, potenciální dráždivosti nebo schopnosti korozivní účinnosti léčiv, xenobiotik a dalších látek. Jelikož tyto okolnosti jsou nežádoucími účinky mnohých lokálně podávaných léčiv, možnosti jejich využití jsou tedy velmi široké. Nejen z těchto důvodů je snaha co nejvíce přiblížit bariérovou funkci modelů přirozené lidské kůži. I proto jsou keratinocyty v těchto modelech odvozené od těch lidských. Tyto komerčně dostupné modely kůže musí vykazovat optimální složení lipidů, jelikož to ovlivňuje veškeré procesy, které se na nich testují. Aby v nich probíhala správně diferenciaci jednotlivých vrstev kůže, je zde zapotřebí i určitých biochemických markerů, což jsou např. různé typy keratinu, proteiny nebo některé enzymy. Principy testů fototoxicity, potenciálu dráždivosti nebo korozivní jsou pak poměrně jednoduché a snadno pochopitelné. Modely lidské epidermis jsou tedy ze zde zmíněných modelů ty neoptimálnější pro testování mnohých aspektů transdermálně podávaných léčiv.

## 7 SEZNAM CITACÍ:

- [1]: BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *Structure* 99. 2010. 21-50
- [2]: SHAKEL, Z., C. NUNES, S.A. COSTA LIMA a S. REIS. Development of a novel human stratum corneum model, as a tool in the optimization of drug formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 569. 2019. 1-2
- [3]: OLIVEIRA, G., A.F. BEEZER, J. HADGRAFT a M.F. LANE. Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning. *International Journal of Pharmaceutics*. 420. 2011. 216-222.
- [4]: SINKÓ, B., T.M. GARRIGUES, G.T. BALOGH, Z.K. NAGY, O. TSINMAN, A. AVDEEF a K. TAKACS NOVAK. Skin PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45. 2012. 698-707
- [5]: NETZLAFF, F., C.M. LEHR, P.W. WERTZ a U.F. SCHAEFER. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60. 2005. 167-178
- [6]: BENDO VÁ, Hana RNDr. Anatomie a fyziologie kůže. 2010. 2-6. Dostupné také z: <https://www.sdrprokos.cz/DOCS/16-seminar/Kuze.pdf>
- [7]: MICHAELS, A.S., S.K. CHANDRASEKARAN a J.E. SHEW. Drug permeation through human skin: a holistic view. *AIChE Journal* 21. 1975. 985 – 996
- [8]: MENON, G.K. a P.M. ELIAS, U.R.HENGGE a B. VOLC-PLATZER ed. The epidermal barrier and strategies for surmounting it: an overview. *The Skin and Gene Therapy* 2001. 3-26
- [9]: GOPINATHAN, K. Menon, Gary W. CLEARLY a Majella E.Lane. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 435. 2012. 3-9
- [10]: BENSON, H.A.E. Skin Structure, Function and Permeation. Transdermal and Topical Drug Delivery. *John Wiley Sons Inc*. 2011. 1-22
- [11]: WALTERS, K.A. Dermatological and Transdermal Formulations. *Taylor Francis*. 2002
- [12]: VITORINO, C., J. SOUSA a A. PAIS. Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. *Current Pharmaceutical Design* 21. 2015. 2698-2712
- [13]: TROMMER, H. a R.H.H. NEUBERT. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology* 19. 2006. 106 – 121



- [14]: BOLZINGER, M.A., S. BRIANCON, J. PELLETIER a Y. CHEVALIER. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current. Opinion in Colloid & Interface Science* 17. 2012. 156 - 165
- [15]: BATISSE, D., R. BAZIN, T. BALDEWECK a R.H. GUY. Influence of age on the wrinkling capacities of skin. *Skin Research and. Technology* 8. 2002. 148 - 154
- [16]: DARLENSKI, R. a J.W. FLUHR. Influence of skin type, race, sex. and anatomic location on epidermal barrier function. *Clinics in Dermatology* 30. 2012. 269 – 273
- [17]: CUA, A.B., K.P. WILHELM a H.I. MAIBACH. Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *British Journal of Dermatology* 123. 1990. 473 - 479
- [18]: GUPTA, S.K., M. SOUTHAM, R. GALE a S.S. HWANG. System functionality and physicochemical model of fentanyl transdermal system. *Journal of Pain and Symptom Management* 7. 1992. 17-26
- [19]: RABIONNET, M., K. GORGAS a R. SANDHOFF. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et. Biophysica Acta* 1841. 2014. 422-434
- [20]: HOLLERAN, W.M., Y. TAKAGI a Y. UCHIDA. Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Letters* 580. 2006. 5456-5466
- [21]: ARIKAWA, J., M. ISHIBASHI, M. KAWASHIMA, Y. TAKAGI, Y. ICHIKAWA a G. IMOKAWA. Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Investigative Dermatology* 119. 2002. 433-439
- [22]: MASUKAWA, Y., H. NARITA., E. SHIMIZU, et. Al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research* 49. 2008. 1466-1476
- [23]: MASUKAWA, Y., H. NARITA., H. SATO, et al. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research* 50. 2009. 1708-1719
- [24]: GEILEN, C.C., T. WIEDER a C.E. ORFANOS. Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Archives of Dermatological Research* 289. 1997. 559-566
- [25]: ROBERTS, M.S., S.E. CROSS a M.A. PELLETT, WALTERS, K.A., ed. Skin transport. Dermatological and transdermal formulation. *Basel: Marcel Dekker*. 2002. 89-183
- [26]: MECKFESSEL, M.H. PhD a S. BRANDT PA-C,MSMR,MBA. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* 71. 2014. 177-184
- [27]: BENSON, H.A., V. SARVEIYA, S. RISK, M.S. ROBERTS. Influence of anatomical site and topical formulation on skin penetration of sunscreens. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 1. 2005. 209-218

- [28]: KAPOOR, M.S., S. GUHA SARKAR a R. BANERJEE. Stratum corneum modulation by chemical enhancers and lipid nanostructures: implications for transdermal drug delivery. *Therapeutic Delivery* 8. 2017. 701-718
- [29]: TROMMER, H. a R.H.H. NEUBE. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology* 19. 2006. 106-121
- [30]: ONGPIPATTANAKUL, B., R.R. BURNETTE, R.O. POTTS a M.L. FRANCOEUR. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharmaceutical Research* 8. 1991. 350-354
- [31]: ELIAS, P.M. a M. STEINHOFF. "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 128 (5). 2008. 1067-1070
- [32]: CHAN, L.S. Atopic dermatitis in 2008. *Current Directions in Autoimmunity* 10. 2008. 76-118
- [33]: LEUNG, D.Y. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105. 2000. 860-876
- [34]: CORK, M.J., D.A. ROBINSON a Y. VASILOPOULOS. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118. 2006. 3-21
- [35]: AVCI, P., M. SADASIVAM, A. GUPTA, et al. Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 8. 2013. 331-355
- [36]: KLAUS WOLFF, R.A.J. *Fitzpatrick's color atlas & synopsis of clinical dermatology* 6. 2009
- [37]: FRITSCH, A., S. LOECKERMANN a J.S. KERN, et al. A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 118. 2008. 1669-1679
- [38]: ROTH, W., U. REUTER, C. WOHLLENBERG. Cytokines as genetic modifiers in K5<sup>-/-</sup> mice and in human epidermolysis bullosa simplex. *Human Mutation* 30. 2009. 832-841
- [39]: AMERI, M., H. LEWIS a P. LEHMAN. Effect of Skin Model on In Vitro Performance of an Adhesive Dermal Applied Microarray Coated with Zolmitriptan. *Journal of Pharmaceutics* 5. 2018. 1-5
- [40]: SATO, S. a S. WAN KIM. Macromolecular diffusion through polymer membranes. *International Journal of Pharmaceutics* 22. 1984. 229-255
- [41]: HAIGH, J.M. a E.W. SMITH. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *European Journal of Pharmaceutical Science* 2. 1994. 311-330
- [42]: BABAR, A., R.D. BHANDARI a F.M. PLAKOGIANNIS. In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from topical bases using cellulose membrane and hairless mouse skin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 17. 1991. 1027-1040

- [43]: CESCHEL, G.C. a P. DE FILIPPIS. Diffusion through artificial lipid barriers of two forms of betamethasone and correlation with in vivo data. *Pharmaceutical Acta Helvetiae*. 56. 1981. 291-295
- [44]: LEE, C.-L., K.L. ULMAN a K.R. LARSON. Kinetics and thermodynamics of drug permeation through silicone elastomers: IV. Effect of polymer backbone structure. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 12. 1986. 369-383
- [45]: ELIAS, P.M., B.E. BROWN a V.A. ZIBOH. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *Journal of Investigative Dermatology* 74. 1980. 230-233
- [46]: MCGREESH, A.H. Percutaneous toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2. 1965. 20-26
- [47]: BRONAUGH, R.L. a R.F. STEWART. Methods for in vitro percutaneous absorption studies: V. Permeation through damaged skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74. 1985. 1062-1066
- [48]: BRONAUGH, R.L., R.F. STEWART a E.R. CONGDON. Methods for in vitro percutaneous absorption studies: Animal models for human skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 62. 1982. 481-488
- [49]: KESHARY, P.R. a Y.W. CHIEN. Mechanisms of transdermal controlled nitroglycerin administration: Development of a finite-dosing skin permeation system. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 10. 1984. 883-913
- [50]: MARZULLI, F. a H.I. MAIBACH, H.I. MAIBACH (ed.). Relevance of animal models: the hexachlorophene story. *Animal Models in Dermatology Churchill-Livingstone, New York*. 1975. 156-167
- [51]: PICTON, W., H. DEVITT a M.A. FORGIE. Practical applications of the Quantimet 720 image analysing computer in the field of investigative dermatology. *British Journal of Dermatology* 95. 1970. 341-345
- [52]: SCOTT, R.C., M. WALKER a P.H. DUGARD. A comparison of the in vitro permeability properties of human and some laboratory animal skins. *International Journal of Cosmetic Science* 8. 1986. 189-194
- [53]: MARZULLI, F.N., D.W.C. BROWN a H.I. MAIBACH. Techniques for studying skin penetration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 3. 1969. 76-83
- [54]: RIGG, P.C. a B.W. BARRY. Shed snake skin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies. *Journal of Investigative Dermatology*. 1990. 235-240
- [55]: ITOH, T., R. MAGAVI, R.I. CASADY, T. NISHIHATA a J.H. RYTTING. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds - shed snake skin as a model membrane. *Pharmaceutical Research* 7. 1990. 1302-1306
- [56]: WASHITAKE, M., Y. TAKASHIMA, Y. TANAKA, S. ANMO a I. TANAKA. Drug permeation through egg shell membranes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 28. 1980. 2855-2861

- [57]: KANSY, M., F. SENNER a K. GUBERNATOR. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry* 41. 1998. 1007-1010
- [58]: RUELL, J.A. a A. AVDEEF, YAN, Z. a G.W. CALDWELL, ed. Absorption using the PAMPA Approach. In: Optimization in drug discovery: In vitro method. *Humana Press*. 2004. 37-64
- [59]: AVDEEF, A., VAN DE WATERBEEMD, H., H. LENNERNAS a P. ARTUSSON, ed. High-throughput measurements of permeability profiles. In: Drug bioavailability. Estimation of solubility. Permeability. Absorption and bioavailability. *Wiley - VCH*. 2003. 46-70
- [60]: AVDEEF, A. a . The rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1. 2005. 325-342
- [61]: RUELL, J.A., K.I. TSINMAN a A. AVDEEF. A drug absorption in vitro model. 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and pKa flux - optimized design (pOD-PAMPA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20. 2003, 393-402
- [62]: AVDEEF, A. Absorption and Drug Development. *Wiley-Interscience*. 2003, 116-246
- [63]: SUGANO, K., H. HAMADA, M. MACHIDA, H. USHIO, K. SAITOH a K. TERADA. Optimised conditions of biomimetic artificial membrane permeability assay. *International Journal of Pharmaceutics* 228. 2001. 181-188
- [64]: AVDEEF, A., P.E. NIELSEN a O. TSINMAN. PAMPA - a drug absorption in vitro model. 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22. 2004. 365-374
- [65]: SOCHOROVÁ, M., P. AUDRLICKÁ, M. ČERVENÁ, A. KOVÁČIK, M. KOPEČNÁ, L. OPÁLKA, P. PULLMANOVÁ a K. VÁVROVÁ. Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *Journal of Colloid and Interface Science* 535. 2019. 227-238
- [66]: GROEN, D., G.S. GOORIS a J.A. BOUWSTRA. Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a unique lamellar phase. *Langmuir* 26. 2010. 4168-4175
- [67]: ABRAHAM, W. a D.T. DOWNING. Preparation of Model Membranes for Skin Permeability Studies Using Stratum Corneum Lipids. *Journal of Investigative Dermatology* 93. 1989. 809-813
- [68]: PULLMANOVÁ, P., L. PAVLÍKOVÁ, A. KOVÁČIK, et al. Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophysical Chemistry* 224. 2017. 20-31
- [69]: SARKIRI, M., S.C. FOX, L.E. FRATILA-APACHITEI a A.A. ZADPOOR. Bioengineered Skin Intended for Skin Disease Modeling. *International Journal of Molecular Sciences* 6. 2019. 3-4

- [70]: GEER, D.J., D.D. SWARTZ a S.T. ANDREADIS. Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration. *Tissue Engineering* 8. 200. 787-798
- [71]: BI, H. a Y. JIN. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies. *Burns Trauma* 1. 2013. 63-72
- [72]: METCALFE, A.D. a M.W. FERGUSON. Bioengineered skin substitutes: Key elements and novel design for biomedical applications. *International Wound Journal* 2009. 5100-5113
- [73]: GUTHRIE, K., A. BRUCE, N. SANGHA a J. BASU. Potency evaluation of tissue engineered and regenerative medicine products. *Trends in Biotechnology* 31. 2013. 505-514
- [74]: FRAUNHOFER GROUP, BEACON PROJECTS. Dostupné také z: [http://www.lifesciences.fraunhofer.de/en/leuchtturmprojekte/geschaeftsfeld\\_2/hautfabrik.html](http://www.lifesciences.fraunhofer.de/en/leuchtturmprojekte/geschaeftsfeld_2/hautfabrik.html)
- [75]: GARCIA, M., M.J. ESCAMEZ, M. CARRETERO, et al. Modeling normal and pathological processes through skin tissue engineering. *Molecular Carcinogenesis* 46. 2007. 741-745
- [76]: DANILENKO, D.M. Preclinical models of psoriasis. *Veterinary Pathology* 45. 2008. 563-575
- [77]: CHIRICOZZI, A., M. ROMANELLI, S. PANDURI, E. DONETTI a F. PRIGNANO. Relevance of in vitro 3-D skin models in dissecting cytokine contribution to psoriasis pathogenesis. *Histology and Histopathology* 32. 2017. 893-898
- [78]: CAPALLERE, C., C. PLAZA, C. MEYRIGNAC, et al. Property characterization of reconstructed human epidermis equivalents, and performance as a skin irritation model. *Toxicology in Vitro* 53. 2018. 45-56
- [79]: GUERRERO-ASPIZUA, S., C.J. CONTI, E. ZAPATERO-SOLANA, F. LARCHER a M.D. RÍO. Translating Regenerative Medicine to the Clinic. *International Wound Journal* 2016. 107-120
- [80]: WUFUER, M., G. LEE, W. HUR, B. JEON, B.J. KIM, T.H. CHOI a S. LEE. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. *Scientific Reports* 6. 2016. 1-3
- [81]: ABACI, H.E., Z. GUO, Y. DOUCET, J. JACKÓW a A. CHRISTIANO. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. *Experimental Biology and Medicine* 242. 2017. 1657-1668
- [82]: VAN DEN BROEK, L.J., L. BERGERS, C.M.A. REIJNDERS a S. GIBBS. Progress and Future Perspectives in Skin-on-Chip Development with Emphasis on the use of Different Cell Types and Technical Challenges. *Stem Cell Reviews and Reports* 13. 2017. 418-429
- [83]: RADEMACHER, F., M. SIMANSKI, R. GLÄSER MILDNER a J. HARDER. Skin microbiota and human 3D skin models. *Experimental Dermatology* 27. 2018. 489-494
- [84]: DE BREIJ, A., E.M. HAISMA, M. RIETVELD, A. EL GHALBZOURI, P.J. VAN DEN BROEK, L. DIJKSHOORN a P.H. NIBBERING. Three-dimensional human skin

equivalent as a tool to study *Acinetobacter baumannii* colonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56. 2012. 2459-2464

[85]: DE VUYST, E., M. SALMON, C. EVRARD, C. LAMBERT DE ROUVROIT a Y. POUMAY. Atopic Dermatitis Studies through In Vitro Models. *Frontiers in Medicine* 24. 2017. 119

[86]: ALI, N., M. HOSSEINI, S. VAINIO, A. TAIEB, M. CARIO-ANDRÉ a H.R. REZVANI. Skin equivalents: skin from reconstructions as models to study skin development and diseases. *British Journal of Dermatology* 173. 2015. 391-403

[87]: EL GHALBZOUTI, A., S. COMMANDEUR, M.H. RIETVELD, A.A. MULDER a R. WILLEMZE. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials* 30. 2009. 71-78

[88]: TJABRINGA, G., M. BERGERS, D. VAN RENS, R. DE BOER a J. SCHALKWIJK. Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *The American Journal of Pathology* 173. 2008. 815-823

[89]: ENGELHART, K., T. EL HINDI a H. K. BIESALSKI. In vitro reproduction of clinical hallmarks of eczematous dermatitis in organotypic skin models. *Archives of Dermatological Research* 297. 2005. 1-9

[90]: NAIK, S., N. BOULADOUX, J.L. LINEHAN, S.-J. HAN, O.J. HARRISON, Ch. WILHELM, A.L. BYRD a C. DEMING. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 520. 2015. 104-108

[91]: KÜHBACHER, A., H. HENKEL, P. STEVENS, et al. Central Role for Dermal Fibroblasts in Skin Model Protection against *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases* 215. 2017. 1742-1752

[92]: CHARLES, C.A., C.A. RICOTTI, S.C. DAVIS, P.M. MERTZ a R.S. KIRSNER. Use of tissue-engineered skin to study in vitro biofilm development. *Dermatologic Surgery* 35. 2009. 1334-1341

[93]: HAISMA, E.M., A. DE BREIJ, H. CHAN, J.T. VAN DISSEL, J.W. DRIJFHOUT, P.S. HIEMSTRA, A. EL GHALBZOURI a P.H. NIBBERING. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58. 2014. 4411-4419

[94]: WALTER, S., F. RADEMACHER, N. KOBINGER, M. SIMANSKI, R. GLÄSER a J. HARDER. RNase 7 participates in cutaneous innate control of *Corynebacterium amycolatum*. *Scientific Reports* 7. 2017

[95]: MOODY, R.P. a B. NADEAU. An automated in vitro dermal absorption procedure: In vivo and in vitro comparison with the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in mouse, rat, guinea pig, pig, human and tissue-cultured skin. *Toxicology In Vitro* 7. 1993. 167-176

[96]: REGNIER, M., D. CARON a U. REICHERT, H. SCHAEFER. Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. *Skin Pharmacology and Physiology* 5. 1992. 49-56

- [97]: NETZLAFF, F., C.-M. LÉHR, P.W. WERTZ a U.F. SCHAEFER. The human epidermis models EpiSkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> and EpiDerm<sup>®</sup>: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60. 2005. 167-178
- [98]: ALÉPÉE, N., M.-H. GRANDIDIER a J. COTOVIO. Usefulness of the EpiSkin reconstructed human epidermis model within Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. *Toxicology In Vitro* 54. 2018. 147-167
- [99]: ROSDY, M., A. PISANI a J.-P. ORTONNE. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Journal of Investigative Dermatology* 129. 1993. 227-234
- [100]: PELLEVOISIN, Ch., Ch. VIDEAU, D. BRIOTET, et al. SkinEthic TM RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology In Vitro* 50. 2018. 3
- [101]: PONEC, M., E. BOELSMA, S. GIBBS a M. MOMMAAS. Characterization of reconstructed skin models. *Skin. Pharmacology and Applied Skin Physiology* 1. 2002. 4-17
- [102]: ROSDY, M., L.C. CLAUSS. Terminal epidermal differentiation of humankeratinocytes grown in chemically defined medium on inert filtersubstrates at the air-liquid interface. *Journal of Investigative Dermatology* 95. 1990. 409-414
- [103]: PONEC, M., A. WEERHEIM, J. KEMPENAAR, A. MULDER, G.S. GOORIS, J.A. BOUWSTRA a A.M. MOMMAAS. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *Journal of Investigative Dermatology* 95. 1997. 348-355
- [104]: ROBSON, K.J., M.E. STEWART, S. MICHELSEN, N.D. LAZO a D.T. DOWNING. 6-Hydroxy-4-sphingene in human epidermal ceramides. *Journal of Lipid Research* 35. 1994. 2060-2068
- [105]: WERTZ, P.W., D.C. SWARTZENDRUBER, K.C. MADISON a D.T. DOWNING. Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *Journal of Investigative Dermatology* 89. 1987. 419-425.
- [106]: TINOIS, E., J. TIOLLIER, M. GAUCHERAND, H. DUMAS, M. TARDY a J. THIVOLET. In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research* 193. 1991. 310-319
- [107]: PONEC, M., E. BOELSMA, A. WEERHEIM, A. MULDER, J. BOUWSTRA a M. MOMMAAS. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics* 203. 2000. 211-225
- [108]: ELIAS, P.M., E.R. COOPER, A. KORC a B.E. BROWN. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *Journal of Investigative Dermatology* 76 (4). 1981. 297-301

- [109]: LAMPE, M.A., A.L. BURLINGAME, J. WHITNEY, M.L. WILLIAM, B.E. BROWN, E. ROITMAN a P.M. ELIAS. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *Journal of Lipid Research* 24. 1983. 120-130
- [110]: CANNON, C.L., P.J. NEAL, J.A. SOUTHEE, J. KUBILUS a M. KLAUSNER. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology In Vitro* 8. 1994. 889-891
- [111]: VICANOVAA, J., A.M. MOMMAAS, A.A. MULDER, H.K. KOERTEN a M. PONEC. Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. *Cell and Tissue Research*. 286. 1996. 115-122
- [112]: NAKAMURA, M., T. RIKIMARU, T. YANO, K.G. MOORE, P.J. PULA a B.H. SCHOFIELD. Full-thickness human skin explants for testing the toxicity of topically applied chemicals. *Journal of Investigative Dermatology* 95. 1990. 325-332
- [113]: BRAIN, K.B., K.A. WALTERS a A.C. WATTKINSON, ROBERTS, M.S., K.A. WALTERS a J. SWARBRICK, ed. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 91. 1998