

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

**MODELOVÉ SYSTÉMY JAKO NÁSTROJ PRO STUDIUM
KOŽNÍ BARIÉRY A TRANSDERMÁLNÍHO PODÁNÍ LÉČIV**

Habilitační práce

Soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem

PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

2021

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména svým kolegům z pracovní skupiny *Skin Barrier Research Group* a také z Katedry organické a bioorganické chemie a v neposlední řadě zaměstnancům Katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (19-09135J) a Univerzitě Karlově (PROGRES Q42, SVV 260 547). Další zdroje finanční podpory jsou uvedeny u jednotlivých prací, které jsou přílohami této práce. Za osobní podporu a zázemí děkuji své rodině a přátelům. Za jazykovou úpravu této práce děkuji PharmDr. Janu Babicovi, Ph.D.

Květen 2021

PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1 ÚVOD	7
1.1 Stavba a význam kůže.....	7
1.1.1 Hypodermis.....	7
1.1.2 Dermis	7
1.1.3 Epidermis	8
1.1.4 Lipidová matrix.....	10
1.2 Modelové systémy jako nástroj pro studium kožní bariéry	14
1.3 (Trans)dermální podání léčivých látek	15
1.3.1 Výhody a druhy (trans)dermálního přenosu léčiv.....	15
1.3.2 Cesty průchodu léčiva přes kůži.....	15
1.3.3 Akceleranty transdermální permeace léčiv	16
2 KOMENTÁŘ K VYBRANÝM ODBORNÝM PRACÍM.....	18
2.1 Vliv délky řetězců ceramidů na vlastnosti modelů kožní bariéry	18
2.2 Vliv polární hlavy ceramidů na vlastnosti modelů kožní bariéry.....	23
2.3 Studium akceleračních permeací a jejich význam v (trans)dermálním podání léčiv	30
3 ZÁVĚR A SMĚR DALŠÍHO VÝZKUMU.....	33
4 PODÍL PŘEDKLADATELE NA VYBRANÝCH ODBORNÝCH PRACÍCH	36
5 LITERATURA	40
6 SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	48
1. Školová B, Hudská K, Pullmannová P, Kováčik A, Palát K, Roh J, Fleddermann J, Estrela-Lopis I, Vávrová K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy using Deuterated Lipids. <i>J. Phys. Chem. B.</i> 2014 , 18(35): 10460–70.....	Chyba! Záložka není definována.
2. Pullmannová P, Pavlíková L, Kováčik A, Sochorová M, Školová B, Slepíčka P, Maixner J, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides With Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. <i>Biophys. Chem.</i> 2017 , 224: 20–31.	Chyba! Záložka není definována.
3. Engberg O, Kováčik A, Pullmannová P, Juhaščík M, Opálka L, Huster D, Vávrová K. The Sphingosine and Acyl Chains of Ceramide [NS] Show Very Different Structure and Dynamics That Challenge Our Understanding of the Skin Barrier. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2020 , 59(40): 17383–87.....	Chyba! Záložka není definována.
4. Opálka L, Kováčik A, Maixner J, Vávrová K. Omega-O-acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base and Model Complexity on Microstructure and Permeability. <i>Langmuir.</i> 2016 , 32(48): 12894–904.	Chyba! Záložka není definována.

5. Opálka L, Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Omega-O-Acylceramide Structures and Concentrations in Healthy and Diseased Skin Barrier Lipid Membrane Models. *J. Lipid Res.* **2020**, 61(2): 219–28..... **Chyba! Záložka není definována.**
6. Pullmannová P, Ermakova E, Kováčik A, Opálka L, Maixner J, Zbytovská J, Kučerka N, Vávrová K. Long and Very Long Lamellar Phases in Model Stratum Corneum Lipid Membranes. *2019, J. Lipid Res.* 60(5): 963–71..... **Chyba! Záložka není definována.**
7. Sochorová M, Staňková K, Pullmannová P, Kováčik A, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1): 6470. **Chyba! Záložka není definována.**
8. Školová B, Kováčik A, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* **2017**, 1859(5): 824–34. **Chyba! Záložka není definována.**
9. Stahlberg S, Eichner A, Sonnenberger S, Kováčik A, Lange S, Schmitt T, Demé B, Hauss T, Dobner B, Neubert RHH, Huster D. The Influence of a Novel Dimeric Ceramide Molecule on the Nanostructure and the Thermotropic Phase Behavior of a Stratum Corneum Model Mixture. *Langmuir.* **2017**, 33(36): 9211–21. **Chyba! Záložka není definována.**
10. Kováčik A, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **2017**, 33(11): 2890–99. **Chyba! Záložka není definována.**
11. Kováčik A, Vogel A, Adler J, Pullmannová P, Vávrová K, Huster D. Probing The Role of Ceramide Hydroxylation in Skin Barrier Lipid Models by ²H Solid-State NMR Spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* **2018**, 1860(5): 1162–70. **Chyba! Záložka není definována.**
12. Kováčik A, Pullmannová P, Pavlíková L, Maixner J, Vávrová K. Behavior of 1-Deoxy-, 3-Deoxy- and N-Methyl-Ceramides in Skin Barrier Lipid Models. *Sci. Rep.* **2020**, 10: 3832..... **Chyba! Záložka není definována.**
13. Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **2018**, 34(1): 521–29. **Chyba! Záložka není definována.**
14. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, 7(2): 145–55. **Chyba! Záložka není definována.**
15. Kováčik A, Vraníková B. Transdermální léčivé přípravky dostupné v České republice a základní principy jejich aplikace. *Prakt. Lékař.* **2020**, 16(2): 97–99. **Chyba! Záložka není definována.**
16. Čuříková BA, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, Kováčik A, Vávrová K, Zbytovská J. Simplified Stratum Corneum Model Membranes for Studying the Effects of Permeation Enhancers. *Int. J. Pharm.* **2017**, 534(1-2): 287–96. **Chyba! Záložka není definována.**
17. Kopečná M, Kováčik A, Kučera O, Macháček M, Sochorová M, Audrlická P, Vávrová K. Fluorescent Penetration Enhancers Reveal Complex Interactions among the Enhancer, Drug, Solvent, and Skin. *Mol. Pharm.* **2019**, 16(2): 886–97. **Chyba! Záložka není definována.**

SEZNAM ZKRATEK

Cer	ceramid(y)
DDAK	6-(dimethylamino)-hexanová kyselina
dihydroCer	dihydroceramid(y)
dS	dihydrosfingosin
FLU	fluidní, kapalně-krystalické uskupení
fytoCer	fytoceramid(y)
glukosylCer	glukosylceramid(y)
HEX	hexagonální mřížka
6-hydroxyCer	6-hydroxyceramid(y)
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LIG	kyselina lignocerová (C24:0)
LPP	lamelární fáze s dlouhou periodicitou (angl. long periodicity phase)
NMR	nukleární magnetická rezonance
ORT	ortorombická mřížka
P	fytosfingosin
pseudoCer	pseudoceramid(y)
S	sfingosin
SC	rohová vrstva (lat. stratum corneum)
SPP	lamelární fáze s krátkou periodicitou (angl. short periodicity phase)
VMK	volné mastné kyseliny

1 ÚVOD

1.1 Stavba a význam kůže

Lidskou kůži lze bezpochyby označit za největší orgán lidského těla. Tato vícevrstvá selektivně propustná tkáň tvoří *obal* lidského těla, chrání vnitřní orgány a další tkáně před poškozením a je v bezprostředním styku s okolním světem. Nepřetržitý kontakt tohoto orgánu s vnějším prostředím se projevuje i na funkcích kůže. To jsou zejména funkce vylučovací/respirační (kůže jako *vylučovací orgán* přebytečných látek), funkce smyslová (kůže jako *komunikační kanál* s vnějším světem), dále zásobní (kůže jako *rezervoár* energie), funkce imunitní (kůže jako *součást imunitní odpovědi*) a konečně funkce ochranná (kůže jako *selektivně propustná bariéra*).^{1,2}

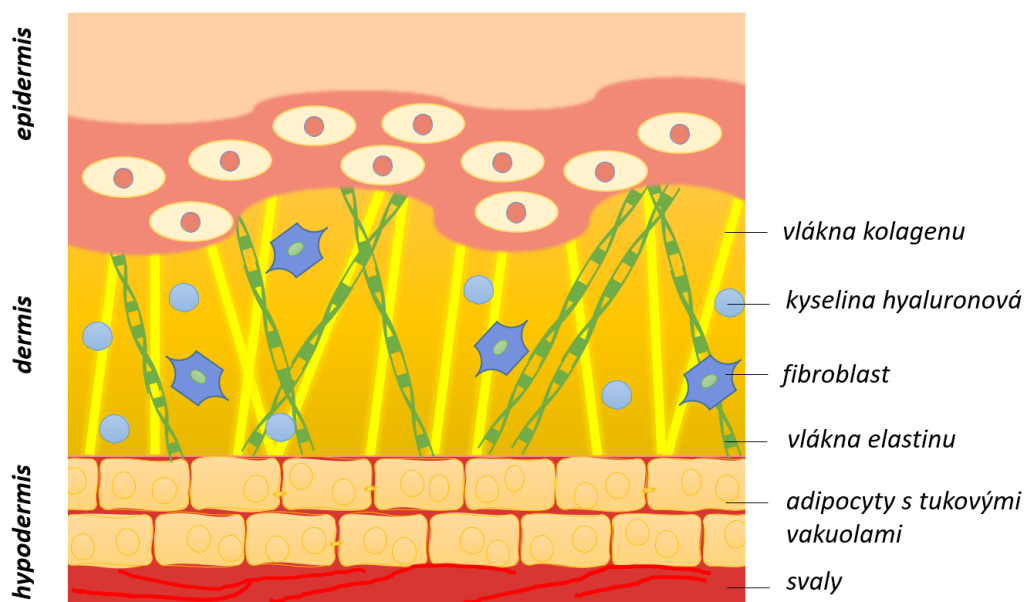
1.1.1 Hypodermis

Kůže se morfologicky člení na tři základní vrstvy, z nichž nejspodnější je vrstva podkožního vaziva, tzv. **podkoží** (hypodermis; **Obrázek 1**). Tato vrstva je kromě vláken kolagenu tvořena laloky tukových buněk, jejichž vakuoly jsou vyplněny zejména triacylglyceroly. V této oblasti je přítomno bohaté cévní zásobení. Podkoží může na některých partiích lidského těla absentovat (např. na očních víčkách); na jiných místech je podkoží zcela zřetelné (např. na ploskách nohou). Význam této vrstvy spočívá v **mechanické ochraně** a **tepelné izolaci** organismu. Kromě hormonálně indukované metabolické aktivity, tj. produkce/štěpení triacylglycerolů, má podkoží také endokrinní funkci. Tato činnost spočívá v sekreci nebo chemické úpravě hormonů, např. sekrece leptinu ovlivňujícího stravovací návyky jedince nebo přeměna androstendionu na estron.^{3,4}

1.1.2 Dermis

Na hypodermis směrem k povrchu kůže nasedá škára (dermis), tvořená **fibroblasty**, vazivovými **vlákný kolagenu** (vláknitými strukturními útvary bohatými zejména na L-prolin) a **elastinu** (zesíťovanými útvary bohatými na L-glycin, L-valin, L-prolin; **Obrázek 1**). Tato tkáň je bohatá na cévy a je rovněž dobře inervována. V této vrstvě je zakotvena většina **kožních derivátů**. Kromě vlasů, chlupů, nehtů, obočí a očních řas patří ke kožním derivátům i žlázy s vnější sekrecí. První skupinou žláz jsou potní

žlázy, které lze dále členit na žlázy ekrinní (vylučující pot přímo na kožní povrch) a žlázy apokrinní, vylučující zápachající pot do ústí vlasového/chlupového folikulu na specifických regionech těla, např. v podpažní jamce. Druhou skupinu žláz tvoří žlázy mazové, které jsou odpovědné za promaštění povrchu kůže a dalších derivátů.^{4,5}



Obrázek 1. Schematické znázornění vrstev savčí kůže.

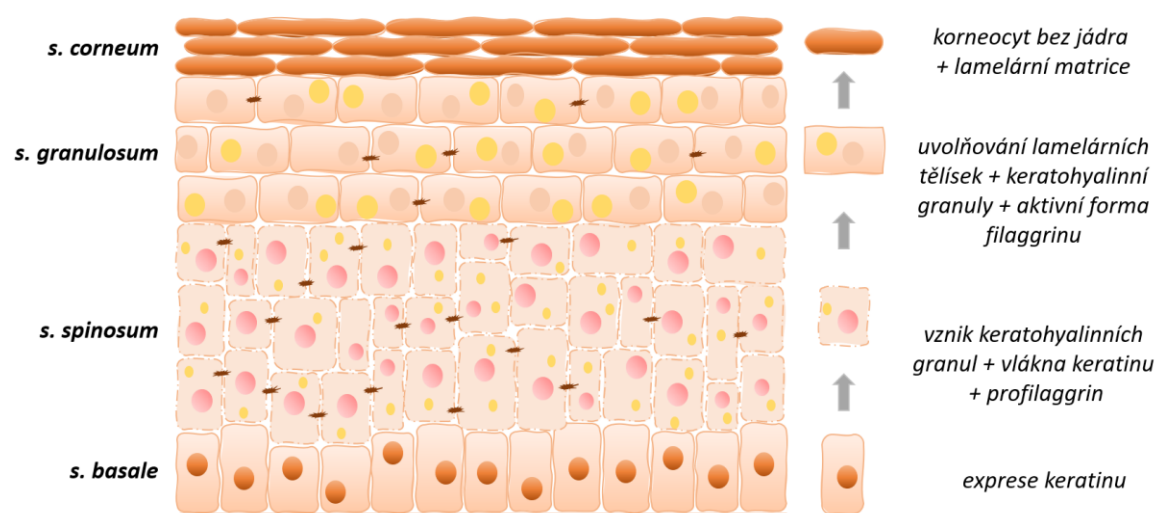
Díky přítomným látkám bílkovinného charakteru je kožní škára odpovědná za pevnost a také pružnost kůže. Vedle statické, tzv. dermální, složky nacházíme ve středních oblastech kůže i složku dynamickou, která se často označuje jako **tekuté pojivo**. Je to směs látek zejména bílkovinného, a dále cukerného původu (např. glukosaminoglykany – kyselina hyaluronová, chondroitin-sulfát apod.; **Obrázek 1**), které vyplňují prostory mezi fibroblasty a sítěmi kolagenu a elastinu. Všechny zmíněné složky se podílí na mechanických vlastnostech kůže.^{1,3}

1.1.3 Epidermis

Pokožka (epidermis) je nejsvrchnější vrstva kůže. V zásadě je tvořena dvěma typy buněk, a to buňkami vyplněnými keratinem (**keratinocyty**) a buňkami **dendritickými**. Buňky dendritické, které tvoří přibližně 20 % celkového množství pokožky, jí dodávají typické vlastnosti (např. vzhled) a funkce (např. ochranu před vnějšími vlivy). K nejvýznamnějším typům dendritických buněk patří **mechanoreceptory** (Merkelovy buňky), dále **T-buňky imunitního systému**

(Langerhansovy buňky) či **melanocyty**, které jsou odpovědné za produkci kožního barviva (melaninu).^{1,4,6}

Nejpočetnějšími buňkami pokožky jsou keratinocyty. Ty jsou propojeny proteinovými můstky (**desmozomy**), které pomáhají buňkám odolávat mechanickému stresu a tvoří tak s nimi kompaktní celek. Histologicky lze vrstvy pokožky rozdělit na vrstvu bazální, špičatou a zrnitou, které se souhrnně označují jako *živá epidermis*. Poslední a zároveň nejsvrchnější vrstva je vrstva rohová.⁷



Obrázek 2. Schematické znázornění vrstev pokožky a migrace keratinocytů.

Vrstva stratum basale, někdy označována jako stratum germinativum, je tvořena řadou kvádrovitých keratinocytů s velkým oválným jádrem. Buňky z této oblasti *postupují* ke kožnímu povrchu (**Obrázek 2**). Ve stratum basale začíná přibližně čtrnáct dní trvající proces migrace keratinocytů k povrchu, označovaný jako **proliferace** a **diferenciace**. Keratinocyty se mitoticky dělí, až dosáhnou fáze zplošťování, tzv. skvamace. Ve vrstvě špičaté (stratum spinosum) mají poté buňky charakteristicky zploštělý tvar a špičaté zakončení. Buňky mění svou metabolickou aktivitu, množí v sobě **lamelární (Odlandovy) granuly/tělíska**, tedy membránou ohraničené organely obsahující hydrolytické enzymy, a také glykolipidy, glykoproteiny, fosfolipidy, a volné steroly, tedy prekurzory lipidů **kožní bariéry** (viz dále, **Obrázek 2**).^{8,9}

Postupem keratinocytů do úseku stratum granulosum se v cytoplazmě kožních buněk objevují **keratohyalinní granuly** vyplněné látkami bílkovinné povahy. Vedle proteinové (hydrofilní) složky roste v buňkách i obsah složky hydrofobní. Polární

prekurzory hydrofobních lipidů (zejména sfingomyeliny a glukosylceramidy) jsou uvnitř buněk uskladněny v lamelárních tělískách. Tělíska v další fázi splývají s buněčnou membránou keratinocytů a jejich obsah se *vylévá* do mezibuněčných prostor. Prekurzory jsou převedeny do aktivní hydrofobní formy enzymatickou hydrolýzou, což vede k tvorbě **lipidové matrice** (matrix). Fosfolipidy jsou zároveň fosfolipázou hydrolyzovány na mastné kyseliny a glycerol, který se společně s dalšími látkami uplatní v udržování hydratace nejsvrchnějších úseků kůže. Lipidová směs obklopuje již odumřelé (bezjaderné), výrazně zploštělé a keratinem vyplněné keratinocyty (**korneocyty**). Formuje se nejsvrchnější vrstva pokožky, stratum corneum (SC; **Obrázek 2**).^{6,10}

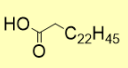
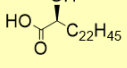
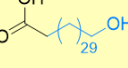
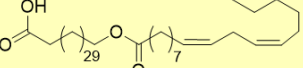
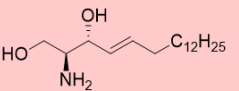
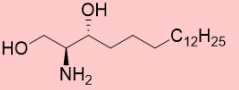
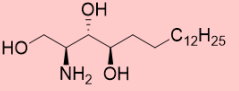
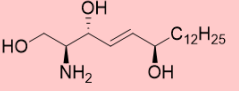
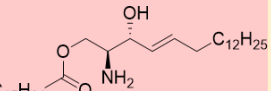
1.1.4 Lipidová matrix

1.1.4.1 Rozdělení a struktura bariérových lipidů

Stratum corneum (SC) je 10 až 20 µm tlustá vrstva, tvořena 15 až 20 řadami *cihly* připomínajících oploštěných šesterečných korneocytů a lipidové matrice, která jako *malta* vyplňuje mezibuněčné prostory. Výraznou oporou spojení korneocytů a matrice jsou již diferencované korneodesmozomy a dále bílkoviny (např. involukrin, lorikrin), které spolu tvoří tzv. **korneocytární obálku**. Soudržnost hydrofilních a hydrofobních součástí SC je umocněna esterovým spojením mezi bílkovinou lorikrinem (involukrinem) a ω-hydroxylovanými lipidy matrice (ceramidy (Cer) a mastnými kyselinami), které tvoří tzv. **korneocytární lipidovou obálku**.¹¹⁻¹³ Tato vrstva pravděpodobně slouží jako podklad uspořádání dalších bariérových lipidů, jak znázorňuje **Obrázek 3**.

Pro správnou funkci kůže jako bariéry je důležité kvalitativní a kvantitativní složení lipidů v mezibuněčné matici SC. Vedle kovalentně vázaných lipidů korneocytární lipidové obálky se v lipidové matici nacházejí také **volné lipidy**. Tyto lze popsat jako ekvimolární směs **cholesterolu** (Chol), dále **volných mastných kyselin** (VMK) se sudým počtem uhlíků (nejčastěji kyselina behenová (C₂₂) a lignocerová (C₂₄); LIG) a konečně **Cer**, tvořících přibližně polovinu hmotnosti lipidové matrice (**Obrázek 3**). Ve SC se dále nacházejí i estery Chol nebo také cholesterol-sulfát (CholS).¹³

Tabulka 1. Nomenklatura ceramidů podle Motty.¹⁴

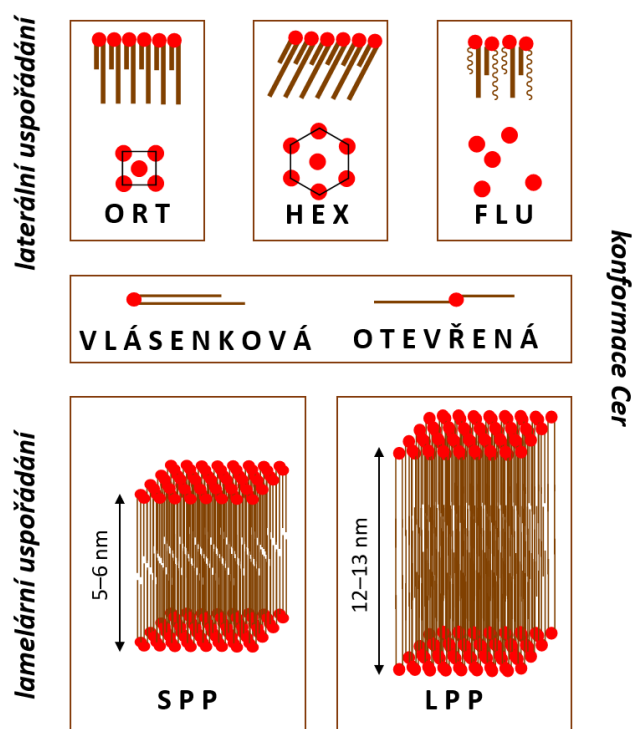
NÁZVOSLOVÍ CERAMIDŮ DLE MOTTY	 nehydroxylovaný (N)	 α-hydroxylovaný (A)	 ω-hydroxylovaný (O)	 ω-hydroxylovaný s vázanou kyselinou linolovou (EO)
 sfiningosin (S)	Cer NS	Cer AS	Cer OS	Cer EOS
 dihydrosfiningosin (dS)	Cer NdS	Cer AdS	Cer OdS	Cer EOdS
 fytosfiningosin (P)	Cer NP	Cer AP	Cer OP	Cer EOP
 6-hydroxysfiningosin (H)	Cer NH	Cer AH	Cer OH	Cer EOH
 1-O-acylsfiningosin (1-O-E_S)	1-O-ENS	1-O-EAS	Cer N S	
			acyl mastné kyseliny sfinogidní báze	

1.1.4.2 Uspořádání bariérových lipidů

Díky korneocytární lipidové obálce, která slouží jako podklad pro uspořádání dalších látek v mezibuněčných prostorech SC, jsou bariérové lipidy (Cer, VMK, Chol) uspořádány v **lamelárních útvarech** (vrstvách/lamelách).¹⁸ Pomocí elektronové mikroskopie a rentgenové difrakce bylo zjištěno, že mezibuněčné prostory SC jsou tvořeny pravidelně se opakujícími lamelami o délce přibližně 13 nm.^{19,20} Toto opakující se uspořádání bylo pojmenováno jako **dlouhá lamelární fáze**. Tvorba lamelárního uskupení (a tím zachování kompetentní bariérové funkce) je podmíněna přítomností ultradlouhých Cer s esterově vázanou kyselinou linolovou.²¹ Vedle dlouhé lamelární fáze byly v mezibuněčné lipidové matici charakterizovány i **krátká lamelární fáze** (s délkou lamel přibližně 6 nm)²² a fáze separovaného Chol²³ (**Obrázek 4**).

Vzhledem ke skutečnosti, že molekuly Cer mají dva řetězce, mohou tyto řetězce zaujmout uzavřenou nebo otevřenou konformaci. Podstatou **uzavřené**

(tzv. **vláseňkové**) **konformace** je uspořádání řetězců Cer vedle sebe. U **otevřené konformace** jsou methylenové řetězce roztažené s konci směřujícími do opačných směrů. Konformace řetězců Cer nebyla, navzdory mnoha studiím zabývajícím se uspořádáním kožních lipidů, doposud objasněna.²⁴



Obrázek 4. Schematické znázornění prostorového uspořádání lipidů rohové vrstvy kůže; ORT – ortorombická mřížka, HEX – hexagonální mřížka, FLU – fluidní uskupení, SPP – krátká lamelární fáze (angl. short periodicity phase), LPP – dlouhá lamelární fáze (angl. long periodicity phase).

Lipidy v lamelách SC mají charakteristické laterální uspořádání. Řetězce VMK a Cer jsou uspořádány těsně vedle sebe, což je označováno jako **ortorombická mřížka (Obrázek 4)**. Toto uskupení je nezbytné pro správnou funkci kožní bariéry. Pomocí spektrálních metod bylo také popsáno uspořádání řetězců do **mřížky hexagonální**, jež se vyznačuje volnějším uspořádáním a možností pohybu jednotlivých řetězců v mřížce. Velmi malá část lipidů není v lamelách organizována vůbec a je v kapalném stavu. Fluidní uskupení se pravděpodobně podílí na udržení pružnosti kůže.²⁵⁻²⁸

1.2 Modelové systémy jako nástroj pro studium kožní bariéry

K výzkumu kožní bariéry se nejčastěji využívají biofyzikální metody, jako jsou infračervená spektroskopie,²⁸⁻³¹ neutronová^{32,33} nebo rentgenová difrakce,^{34,35} elektronová mikroskopie,^{36,37} atomová silová mikroskopie³⁸⁻⁴⁰ či diferenciální skenovací kalorimetrie.⁴¹⁻⁴³ K tomu, aby bylo možné posoudit uspořádání (konformaci molekul) a laterální a lamelární organizaci bariérových lipidů, se používají **modelové systémy**.^{33,44-46} Tyto modely mohou věrohodně **simulovat jak složení, tak i vlastnosti kožní bariéry**.

Podle stupně složitosti a počtu složek lze modelové systémy (modelové membrány) klasifikovat na **dvojsložkové** (nejčastěji směsi Cer s VMK, nebo Chol),^{29,47-54} **třísložkové** (směs Cer, VMK a Chol) a konečně **vícisložkové**, tzv. komplexní. **Komplexní modely**, v jednovrstvém^{51,55} nebo častěji vícevrstevném provedení,⁵⁶ mohou kromě bariérových (syntetických/izolovaných) lipidů dále obsahovat látky bílkovinné povahy (např. keratin) či izolované korneocyty.⁵⁷ Obecně platí, že čím více složek daný model obsahuje, tím více se blíží k reálnému složení SC. Ke studiu zejména biochemických dějů lze také použít ***in vitro* tkáňové modely**, zhotovené na živných půdách z izolovaných keratinocytů, popřípadě dalších izolovaných buněk, např. fibroblastů.^{58,59} Nejvěrohodnějším modelem kožní bariéry však nadále zůstává **izolovaná kožní tkáň**, a to získaná nejčastěji z prasete domácího nebo člověka. Pro studium lze použít kůži v její plné tloušťce nebo její izolovanou část, jako je epidermis nebo SC.⁶⁰⁻⁶²

Výzkum v oblasti kožní bariéry pomocí modelových systémů se zaměřuje nejen na složení (uspořádání lipidů) či vlastnosti a vznik kožní bariéry, ale také na možné cesty vedoucí k její obnově v případě jejího poškození nebo porušení, např. v důsledku kožních nemocí. Dalším, velmi důležitým směrem ve studiu kožní bariéry je také hledání a zkoumání cest umožňujících kožní bariéru efektivně překonat. Toho se v medicíně a farmacii cíleně využívá např. v (trans)dermálním podání léčivých látek.

1.3 (Trans)dermální podání léčivých látek

1.3.1 Výhody a druhy (trans)dermálního přenosu léčiv

Léčivá látka podaná na kůži může působit na jejím povrchu, a to ve SC nebo v nižších vrstvách epidermis. Takové podání léčiva lze označit jako **topické (lokální)**. Příkladem by mohla být keratoplasticky, resp. keratolyticky působící kyselina salicylová v polotuhých lékových formách. V případě, že léčivá látka má působit ve škáře, ev. přilehlých oblastech kůže, lze takové podání léčiva označit jako **(intra)dermální**, např. lokálně působící hydrokortison v krémovém základu. V případě, že je léčivá látka podána na kůži a přes kůži také prochází a dosahuje systémového účinku, lze takové podání označit za **transdermální**. Toto podání mnohdy umožňuje snadné zahájení a přerušování léčby nemocného. Pacient může navíc měnit místa aplikace a v neposlední řadě je podporována i pacientova compliance (zejména u transdermálních náplastí). Absorpce léčivé látky není ovlivněna denním režimem nemocného, a navíc se obchází metabolismus léčiva při prvním průchodu játry. Podání léčiv přes kůži umožňuje dosažení konstantních hladin léčiva v krvi, což snižuje riziko předávkování a lékových interakcí s jinými léčivy.^{1,63,64}

K metodám usnadňujícím (trans)dermální přenos léčiv lze zařadit třeba elektroporaci, iontoforézu či aplikaci léčiv pomocí ultrazvuku. (Trans)dermální podání lze také podpořit mechanickým překonáním (poškozením) SC, a to intradermálními injekcemi, pistolemi, genovou elektroinjektáží či mikrojehlami.^{64,65} Nejčastější cestou v (trans)dermálním přenosu látek je však tzv. pasivní přenos, který je zprostředkován vhodnou **lékovou formou**.

1.3.2 Cesty průchodu léčiva přes kůži

Cesty, jejichž pomocí léčivá látka vstupuje do krevního oběhu, lze rozdělit na **transglandulární** (pomocí mazových a potních žláz), **transfolikulární** (pomocí vlasových/chlupových folikulů) a **transepidermální**. Transepidermální přenos může být realizován **intracelulárně (transcelulárně)**, kdy léčivo musí procházet střídavě mezi hydrofilním prostředím korneocytů (keratinem) a mezibuněčnými bariérovými lipidy. Většina (trans)dermálně podaných léčiv však prochází **intercelulární (paracelulární)** cestou, tj. difúzí mezibuněčnými prostory lipidové matrix. Zatímco

překonání kožní bariéry, tj. rohové vrstvy léčivou látkou (**permeantem**) lze označit jako **penetraci**, **permeaci** je myšlen transport léčivé látky přes vrstvy epidermis až do dermis. V nižších úsecích dermis a hypodermis může nastat proces **absorpce**, tedy přestup léčivé látky z kožní tkáně do systémového oběhu. Je nutno podotknout, že terminologie jednotlivých procesů kolísá a není vždy jednoznačná.

K tomu, aby léčivá látka mohla dosáhnout systémového účinku, by měla splňovat vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti. Léčivo by mělo mít ideální velikost ($M_w < 500 \text{ g/mol}$) a také stejnou ochotu rozpouštět se jak v hydrofilním, tak hydrofobním prostředí ($\log P \sim 1-5$). (Trans)dermálně podané léčivo by mělo dále vykazovat nízkou schopnost tvorby vodíkových můstků (teplota tání $< 250 \text{ }^\circ\text{C}$), měla by to být látka v neionizované formě a s maximální denní dávkou nepřesahující 10 mg.^{1,66}

1.3.3 Akceleranty transdermální permeace léčiv

V případech, kdy léčivá látka nemá ideální fyzikálně-chemické vlastnosti k *samovolnému* prostupu přes kožní bariéru a dosažení systémového účinku, musí být součástí transdermálního přípravku pomocná látka umožňující penetraci a permeaci, tj. látka zrychlující vstup léčiva přes kůži až k místu absorpce (cévnímu zásobení). **Urychlovače permeace** (enhancers, penetrační akceleranty, akceleranty transdermální permeace) by měly být netoxické, nedráždivé a chemicky inertní, a hlavně by měly umožňovat pouze jednosměrný vstup léčiva. Po odstranění lékové formy se musí obnovovat bariérové vlastnosti kůže.⁶⁷⁻⁶⁹

Mechanismus účinku akceleračních transdermálních permeací může být založen na **rozrušování pravidelně uspořádaných lipidů** SC nebo také jejich **interakci s intracelulárními proteiny** kůže (α -keratiny), což vede ke ztenčení buněk. V neposlední řadě mohou urychlovače permeace **optimalizovat hodnotu rozdělovacího koeficientu** mezi lékovou formou a lipidovými membránami SC. Účinnost těchto pomocných látek je charakterizována tzv. **akceleračním poměrem** vyjadřujícím urychlení modelového permeantu (léčivé látky) ze studovaného vzorku s akceleračním a ze vzorku bez urychlovače permeace.^{68,70-72}

Jako urychlovače permeace mohou působit jak malé molekuly (rozpuštědla), tak větší látky amfifilní povahy a konečně peptidy. K nejvýznamnějším typům

akcelerantů patří **alkoholy** (např. ethanol, glycerol, propylenglykol), dále **karboxylové kyseliny** (např. kyselina olejová či levulová) a jejich **estery** (např. isopropyl-myristát, oleyl-oleát) nebo také deriváty **sacharidů** (např. sorbitan-monooleát) či **vitamínů** (např. D-alfa-tokoferol).^{68,73}

2 KOMENTÁŘ K VYBRANÝM ODBORNÝM PRACÍM

Tato kapitola kompiluje sedmnáct prací (15 původních a 2 přehledové), které se zabývají studiem **kožní bariéry** a jejího hodnocení pomocí **modelových membránových systémů** a také **(trans)dermální aplikací léčiv**. Kapitola je rozdělena na tři tematické bloky. První pojednává o významu **délky řetězců** bariérových lipidů na vlastnosti modelů SC, zatímco blok druhý se zaměřuje na význam **polárních funkčních skupin** v molekulách bariérových Cer a jejich vliv na propustnost a mikrostrukturu modelových membrán. Kapitulu uzavírá blok o využití modelových membrán SC v **(trans)dermální aplikaci léčiv** a také studiu akceleraantů (trans)dermální permeace léčiv.

2.1 Vliv délky řetězců ceramidů na vlastnosti modelů kožní bariéry

Původní práce

Příloha 1: Školová B, Hudská K, Pullmannová P, Kováčik A, Palát K, Roh J, Fleddermann J, Estrela-Lopis I, Vávrová K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy using Deuterated Lipids. *J. Phys. Chem. B*. **2014**, 18(35): 10460–70.

Příloha 2: Pullmannová P, Pavlíková L, Kováčik A, Sochorová M, Školová B, Slepíčka P, Maixner J, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides With Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys. Chem.* **2017**, 224: 20–31.

Příloha 3: Engberg O, Kováčik A, Pullmannová P, Juhaščík M, Opálka L, Huster D, Vávrová K. The Sphingosine and Acyl Chains of Ceramide [NS] Show Very Different Structure and Dynamics That Challenge Our Understanding of the Skin Barrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59(40): 17383–87.

Komentář k pracím

Délka řetězců Cer (sfingoidních bází se 14 až 28 a acylových řetězců se 16 až 36 uhlíky) hraje klíčovou roli v bariérové funkci SC.¹⁶ Finální řetězec o jistém počtu

uhlíkových atomů je výsledkem řady biochemických dějů kožních buněk. Připojení acylu mastné kyseliny ke sfingoidní bázi je zprostředkováno rodinou **ceramidsyntáz**, lišících se od sebe preferencí k délce řetězce mastné kyseliny.^{74,75} Prodlužování délky řetězců, tj. připojování dvouuhlíkatých zbytků ke stávajícímu acylu, probíhá za pomoci **elongáz** přítomných v cytoplazmě keratinocytů.⁷⁶ Výsledkem činnosti těchto enzymů se tak z dlouhých (C₁₆) acylů stávají velmi dlouhé (20–26), přičemž nejčastěji zastoupená délka jejich řetězců je 22 a 24 uhlíků.^{77,78}

Pokles aktivity enzymů prodlužujících Cer byl pozorován u kožních nemocí, jako je např. atopická dermatitida, která se projevuje např. zvýšenou ztrátou vody v důsledku zhoršení bariérové funkce SC.⁷⁹ U této choroby bylo detekováno vyšší množství Cer s dlouhým řetězcem (C₁₆) na úkor Cer s řetězcem velmi dlouhým (C₂₄).⁸⁰ Pro objasnění významu vztahu délky řetězců a zhoršení bariérové funkce SC byly proto v práci Školová *et al.* (**Příloha 1**) připraveny modelové membrány SC, které obsahovaly Cer NS buď s velmi dlouhým, nebo dlouhým řetězcem. Vliv délky řetězců (rozdíl osmi uhlíků) na chování modelů kožní bariéry byl studován pomocí **infračervené spektroskopie**.²⁹ Pomocí této nedestruktivní a nenáročné spektrální metody bylo zjištěno následující:

- bariérové lipidy obou typů modelů jsou uspořádány v **ortorombické mřížce**, což je klíčové pro správnou funkci kůže jako bariéry,³⁰
- LIG (C₂₄) obsažená v modelu s Cer s dlouhým řetězcem se částečně separuje od ostatních kožních lipidů, na rozdíl od modelu s velmi dlouhým Cer, ve kterém se **LIG společně s Cer a Chol dobře mísí**,
- Cer NS s acylem odvozeným od LIG zaujímá přednostně **otevřenou konformaci** svých řetězců.

K výše uvedeným závěrům se dospělo studiem lipidů s neznačenými (protonovanými) a deuteriem značenými řetězci. Pomocí izotopové substituce lze infračervenou spektroskopií ve vzorku obsahujícím protonované a deuterované řetězce nezávisle sledovat chování CH₂ a CD₂ skupin (velmi) dlouhých řetězců. Z pozorování methylenových (a)symetrických vibrací nebo vibrací nůžkových/kývavých tak lze vyvodit **fázový přechod** směsi a také vzájemnou **mísitelnost** (homogenitu) či naopak **separaci** lipidových řetězců (tvorbu domén).^{50,81}

Podobně jako práce Školová *et al.* (**Příloha 1**), také studie Pullmannová *et al.* (**Příloha 2**) se zaměřuje na srovnání modelových systémů obsahujících buď dlouhé, nebo velmi dlouhé řetězce Cer NS. Membrány SC obsahující (kromě Chol a LIG nebo směsi VMK)⁸² Cer NS s acylem kyseliny palmitové byly významně propustnější pro vodu,⁸³⁻⁸⁵ permeanty s malou molekulovou hmotností, a také pro větší lipofilní molekuly⁸⁶ než membrány obsahující velmi dlouhý Cer NS s acylem LIG.

Pomocí **atomové silové mikroskopie** a **rentgenové difrakce** bylo dále prokázáno, že membrány s C₁₆ acylem vytváří oddělené domény. Tyto výsledky, stejně jako předchozí studie, naznačují, že nahrazení velmi dlouhého acylu za acyl dlouhý má přímý negativní dopad na strukturu a propustnost membrán. Toto potvrzuje skutečnost, že zkrácení řetězců Cer je průvodním jevem mnoha kožních onemocnění, např. atopické dermatitidy či ekzému.^{15,87-89}

Bariérové lipidy jsou podle dosavadních výsledků považovány za velmi těsně uspořádané komponenty, neboť rigidní SC chrání organismus před vlivy vnějšího prostředí.⁹⁰ V předchozích výzkumech však nebyla věnována dostatečná pozornost chování sfingosinového řetězce. Až v práci Engberg *et al.* (**Příloha 3**) byl připraven velmi dlouhý Cer (Cer NS) s deuterovaným sfingosinem^{91,92} a pomocí **nukleární magnetické rezonance v pevné fázi**,⁹³ infračervené spektroskopie^{52,94} a rentgenové difrakce bylo zjištěno, že sfingosinový řetězec velmi dlouhého Cer NS je značně **pohyblivý**.⁹⁵ Byl proto také navržen nový model uspořádání kožních lipidů, v němž

- je velmi dlouhý **Cer NS v otevřené konformaci**,
- se LIG organizuje přednostně k rigidním acylům, zatímco Chol se přednostně vyskytuje u sfingosinových řetězců,
- některé z deuterovaných **řetězců sfingosinu vytvářejí kapalně domény**.

Právě přítomnost kapalných domén by mohla být důležitá pro přenos signálních či obranných molekul v epidermální homeostáze.

Původní práce

Příloha 4: Opálka L, Kováčik A, Maixner J, Vávrová K. Omega-O-acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir*. **2016**, 32(48): 12894-904.

Příloha 5: Opálka L, Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Omega-O-Acylceramide Structures and Concentrations in Healthy and Diseased Skin Barrier Lipid Membrane Models. *J. Lipid Res.* **2020**, 61(2): 219–28.

Příloha 6: Pullmannová P, Ermakova E, Kováčik A, Opálka L, Maixner J, Zbytovská J, Kučerka N, Vávrová K. Long and Very Long Lamellar Phases in Model Stratum Corneum Lipid Membranes. **2019**, *J. Lipid Res.* 60(5): 963–71.

Komentář k pracím

Zajímavé postavení mezi kožními sfingolipidy mají Cer s ultradlouhým řetězcem vytvořeným pomocí speciálního druhu elongázy.^{76,96} Po prodloužení řetězce (>28 uhlíků) budoucího Cer typu EO následuje jeho úprava, spočívající v zavedení hydroxylové skupiny na poslední uhlík hydroxylázou⁹⁷ a jeho esterifikace kyselinou linolovou ω -acyltransferázou.⁹⁸ Proto se tyto sfingolipidy také označují jako tzv. **acylceramidy** (acylCer).⁹⁹

Byť je množství acylCer v lipidové matrici velmi malé,⁷⁸ je přítomnost těchto lipidů pro zachování správné funkce kůže jako bariéry **nevyhnutelná**. U pacientů s atopickou dermatidou byly pozorovány snížené hladiny zejména těchto Cer, které společně s poklesem délky VMK ubíraly na intenzitě pro kůži esenciální dlouhé lamelární fáze. Změny v zastoupení acylCer souvisí i se změnou laterální organizace dalších bariérových lipidů. V nemocné kůži byl také detekován nárůst počtu řetězců v hexagonálním uspořádání na úkor těsné ortorombické mřížky.^{14,100-102} Vlastnosti a význam jednotlivých podtříd acylCer však nebyly podrobně objasněny, jelikož acylCer nejsou komerčně dostupné a jejich syntéza je značně náročná.¹⁰³ Cílem práce Opálka *et al.* (**Příloha 4**) bylo studovat vztahy mezi koncentrací acylCer, strukturou jejich **polární hlavy** (Cer EOS vs. Cer EOdS vs. Cer EOP), tvorbou **lamelárních fází** a **permeabilitou** modelových lipidových membrán různých úrovní složitosti.

Studiem jednoduchého modelu (Cer EOS + Cer NS + LIG + Chol + CholS) bylo zjištěno, že koncentrace acylCer nutná k tvorbě dlouhé lamelární fáze je 10 %, což odpovídá literatuře.⁴⁶ Takto jednoduchý model nicméně vykazoval poměrně vysokou permeabilitu v porovnání s kontrolními membránami bez obsahu acylCer. Proto byly zhotoveny komplexní modely obsahující acylCer (nebo jejich směs), směs bariérových Cer, směs VMK,⁸² Chol a CholS. Složité modely kožní bariéry již byly méně propustné než kontrolní vzorky. Z toho lze soudit, že **heterogenita lipidového spektra je v komplexních modelech nezbytná**; pouze modely s devíti podtřídami Cer v této studii napodobovaly kožní bariéru jak v uspořádání lipidových řetězců, tak permeabilitě.

Obdobně jako předchozí práce i studie Opálka *et al.* (**Příloha 5**) se zaměřuje na bariérové vlastnosti a mikrostrukturu modelových membrán s obsahem acylCer v různé koncentraci. Práce simuluje poškozování kožní bariéry, čehož je dosaženo přípravou modelů SC s postupně klesající koncentrací ultradlouhých Cer. Snížené hladiny acylCer vedly ke zhoršení propustnosti modelů, což je typické pro mnoho kožních onemocnění.¹⁰⁰⁻¹⁰² Stejně jako koncentrace ultradlouhých Cer, tak i strukturní změny v jejich polární hlavě se podepisují na změnách vlastností modelových systémů. Výsledky prací by mohly sloužit jako podklad pro racionální navrhování strategií **k obnovení kožní bariéry** v léčbě kožních onemocnění.

Zajímavé je zjištění, že u modelových membrán SC lze pozorovat jejich polymorfismus na lamelární úrovni. Toto bylo hodnoceno v práci Pullmannová *et al.* (**Příloha 6**), zaměřené na vliv změny poměru Chol a CholS, která je typická pro X chromozomálně recesivně vázanou ichtyózu.^{104,105} Modelové membrány tedy simulují kožní onemocnění, v němž je množství CholS v SC přibližně pět- až desetkrát zvýšené, zatímco hladiny Chol jsou o 50 % nižší ve srovnání se zdravou pokožkou.^{106,107} V nepřítomnosti ultradlouhého Cer EOS se v modelových membránách objevuje krátká ($d \sim 5$ nm), ale také střední ($d \sim 11$ nm) a konečně dlouhá ($d \sim 16$ nm) či velmi dlouhá lamelární fáze ($d \sim 21$ nm). Příklad ultradlouhých Cer vede ke stabilizaci dlouhé lamelární fáze ($d \sim 12$ nm) a zároveň brání tvorbě fáze velmi dlouhé. Poznatky získané z této práce tak potvrzují esenciální úlohu ultradlouhých Cer v tvorbě, resp. **stabilizaci** finální podoby **lamel bariérových lipidů SC**.

2.2 Vliv polární hlavy ceramidů na vlastnosti modelů kožní bariéry

Původní práce

Příloha 7: Sochorová M, Staňková K, Pullmannová P, Kováčik A, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1): 6470.

Komentář k práci

Prekurzory Cer, polární **sfinomyeliny** a **glukosylceramidy** (glukosylCer), jsou metabolizovány na Cer za účasti enzymů sfinomyelinázy a β -glukocerebrosidázy,¹⁰⁸ uvolněných z lamelárních tělísek. Toto uvolnění hraje významnou roli v tvorbě bariéry, neboť lamely lipidové matrice jsou tvořeny molekulami Cer, nikoliv jejich prekurzory. Změny aktivity β -glukocerebrosidázy vedou ke hromadění glukosylCer, nemožnosti zabudování volných Cer do lamel a konečně ke tvorbě strukturálních defektů ve SC. Nefunkčnost tohoto hydrolytického enzymu byla pozorována u Gaucherovy choroby, jež se projevuje suchou šupinatou kůží a jejíž molekulární podstata není jasná.¹⁰⁹⁻¹¹³ Práce Sochorová *et al.* (**Příloha 7**) se pokouší tento děj objasnit a zaměřuje se na studium chování glukosylCer pomocí modelových membrán SC. Modelové poškození kožní bariéry, jehož bylo dosaženo přítomností 5–25 % glukosylCer v lipidových membránách, zhoršuje bariérové vlastnosti studovaných modelů. Vyšší koncentrace (50–100 %) prekurzorů Cer však propustnost membrán paradoxně snižuje. Z biofyzikálních experimentů bylo dále zjištěno, že nahrazování molekul Cer jejich prekurzory (glukosylCer) pozměnilo mikrostrukturu modelových membrán vytvořením nové lamelární fáze. Nežádoucí účinek glukosylCer byl nakonec potvrzen i po jejich **topickém podání na izolovanou lidskou kůži**, což se projevilo zvýšenou ztrátou vody a poklesem elektrické impedance. Výsledky této práce naznačují, že nejen prekurzory Cer (glukóza vázaná na Cer), ale pravděpodobně i další faktory (např. retence glukosylCer vázaných v lipidovém obalu korneocytů) mohou být zodpovědné za snížení bariérové funkce kůže.¹¹³⁻¹¹⁵

Původní práce

Příloha 8: Školová B, Kováčik A, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. **2017**, 1859(5): 824–34.

Příloha 9: Stahlberg S, Eichner A, Sonnenberger S, Kováčik A, Lange S, Schmitt T, Demé B, Hauss T, Dobner B, Neubert RHH, Huster D. The Influence of a Novel Dimeric Ceramide Molecule on the Nanostructure and the Thermotropic Phase Behavior of a Stratum Corneum Model Mixture. *Langmuir*. **2017**, 33(36): 9211–21.

Komentář k práci

Polární hlava bariérových Cer je tvořena poměrně jednoduchými funkčními skupinami. Všechny Cer mají hydroxylovou skupinu v poloze 1 a 3 ve sfingoidní bázi, což je dáno přirozeným prekurzorem sfingolipidů L-serinem.^{16,74,75,78} Další chemické úpravy spočívají v hydroxylačných/desaturačních reakcích.¹¹⁶ Pokud na substrát žádný z těchto enzymů nepůsobí, konečným produktem jsou Cer odvozené od dS. Dihydroceramidy (dihydroCer; Cer NdS, Cer AdS, Cer OdS a Cer EOdS) jsou mj. substrátem pro tvorbu dalších typů Cer. Enzym desaturáza 1 zavádí do molekuly dihydroCer *trans*-dvojnou vazbu, což vede k tvorbě Cer na bázi S. Zajímavé postavení mají však polární Cer (**fyto**ceramidy (fytoCer)¹¹⁷ a **6-hydroxy**ceramidy (6-hydroxyCer)¹¹⁸), u nichž je v polární hlavě přítomna další hydroxylová skupina v nasyceném řetězci (fytoCer) nebo řetězci s *trans*-dvojnou vazbou (6-hydroxyCer).

FytoCer (Cer NP, Cer AP, Cer OP a Cer EOP) patří mezi sfingolipidy, které tvoří přibližně třetinu bariérových Cer ve zdravém SC.⁷⁸ Je zajímavé, že tyto sfingolipidy jsou přítomny v takovéto míře ve vysoce hydrofobním SC. Proto bylo cílem práce Školová *et al.* (**Příloha 8**) prozkoumat účinky fytoCer na permeabilitu, organizaci lipidů a termotropní chování modelových lipidových membrán SC a srovnat je s účinky (dihydro)Cer. Z této práce vyplynulo několik závěrů:

- fytoCer s velmi dlouhými acylovými řetězci **zvýšily permeabilitu** modelových lipidových **membrán** pro ionty i permeanty s vysokou či vyváženou lipofilitou,

- nasycení (dihydroCer) nebo hydroxylace v poloze 4 (fytoCer) se podílí na snížení relativního zastoupení ortorombické mřížky v membránách,
- zavedení hydroxylové skupiny do polohy 4 ve sfingoidní bázi snižuje mísitelnost fytoCer s LIG, což bylo také potvrzeno rentgenovou difrakcí.

FytoCer mají tendenci tvořit silné **vodíkové můstky**, vedoucí k tvorbě termostabilních lipidových domén, což má za následek fázovou separaci. Tato práce potvrzuje hypotézu, že **heterogenita Cer v lipofilní vrstvě SC může zvyšovat jeho odolnost vůči různorodým vlivům** a stresorům z vnějšího prostředí, čímž se zachovává kompetentní funkce kožní bariéry. Polární fytoCer by dále mohly hrát roli v jiných než bariérových funkcích. Je totiž možné, že Cer na bázi P se podílejí na signalizačních procesech nebo také diferenciaci keratinocytů či jiných podobných dějích.^{119,120}

Zatímco předchozí studie popisovala chování fyziologických fytoCer, práce Stahlberg *et al.* (**Příloha 9**) se zaměřila na potenciální využití **dimeru Cer AP**,¹²¹ jehož dlouhý spojovací řetězec je rigidní a zachovává si svou konformaci v ortorombické mřížce. Z termotropního chování modelových membrán SC, které byly podrobeny neutronové difrakci a NMR spektroskopii v pevné fázi, vyplynuly tyto závěry:

- **spojovací řetězec dimeru Cer AP** (osm methylenových skupin připojených přes atomy síry), na rozdíl od ostatních lipidů v modelových systémech, zůstává v **all-trans konformaci** i při působení zvýšené teploty,
- byla prokázána poměrně vyšší propustnost modelových membrán SC a také lidské kůže po topické aplikaci dimeru Cer AP.

Práce Stahlberg *et al.* naznačuje, že dimer Cer AP je nadějnou molekulou, která by mohla najít využití v **topické aplikaci Cer na nemocnou/poškozenou kůži**. Finální podoba dimeru však vyžaduje další výzkum v optimalizaci jeho chemické struktury, např. délce spojovacího řetězce či použití jiného typu Cer.

Příloha 10: Kováčik A, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir*. **2017**, 33(11): 2890–99.

Příloha 11: Kováčik A, Vogel A, Adler J, Pullmannová P, Vávrová K, Huster D. Probing The Role of Ceramide Hydroxylation in Skin Barrier Lipid Models by ²H Solid-State NMR Spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. **2018**, 1860(5): 1162–70.

Komentář k pracím

U některých kožních onemocnění, jako je např. atopická dermatitida, byly zjištěny snížené koncentrace nejen acylCer, ale také **6-hydroxyCer**.¹²²⁻¹²⁵ Jejich biosyntéza navíc není, na rozdíl od ostatních podtypů Cer, doposud objasněna a není také známo, jakou roli sehrávají tyto prakticky nejpolárnější Cer v lidské kůži. Význam 6-hydroxyCer v bariérové funkci SC byl zkoumán v práci Kováčik *et al.* (**Příloha 10**). V této studii bylo hodnoceno biofyzikální chování *N*-lignoceroyl-6-hydroxysfingosinu (Cer NH) v lipidových komplexních modelových membránách, o jejichž složitost se zasloužila přítomnost VMK ve složení odpovídajícímu zdravému SC.⁸² Vztah struktury Cer a jejich bariérových účinků v modelových membránách byl studován srovnáváním modelových membrán s Cer na bázi S (Cer NS),³⁸ dihydroCer (Cer NdS)¹²⁶ a také polárních fytoCer (Cer NP), všech se stejnou délkou acylového řetězce (C₂₄). Tato rozsáhlá práce osvětlila vliv hydroxylace Cer na vlastnosti modelových membrán SC:

- **6-hydroxylace Cer zvyšuje ztrátu vody** v membránách a propustnost pro lipofilní permeanty,
- zavedení hydroxyly do polohy 6 sfingoidní báze signifikantně **zvyšuje odpor studovaných modelů vůči elektrickému proudu**, který je úměrný toku iontů,
- infračervená spektroskopie odhalila, že hydroxylace Cer (Cer NH/Cer NP) zvyšuje hlavní teplotu přechodu membrány a brání také dobré mísitelnosti Cer NH/Cer NP s VMK,

- pomocí rentgenové difrakce byla u modelů s Cer NH/Cer NP potvrzena přítomnost lamelární fáze s kratší periodicitou (potvrzující fázovou separaci), avšak u modelových membrán s Cer NH byla pozorována lamelární fáze **s neobvykle dlouhou délkou lamel** ($d = 10,6$ nm).

Podobně jako **Příloha 10** i práce Kováčik *et al.* (**Příloha 11**), jež je výsledkem dlouhodobé zahraniční spolupráce, studovala teplotní chování 6-hydroxyCer v modelových membránách pomocí NMR spektroskopie v pevné fázi,⁹⁵ rentgenové difrakce,¹²⁷ diferenciální skenovací kalorimetrie.¹²⁸ Z výsledků lze usoudit, že tvorba dlouhé lamelární fáze je zaručena i v přítomnosti 50 molárních procent Cer NH v modelových membránách. S pomocí deuterovaných lipidů (buď acylů Cer, nebo LIG nebo Chol) bylo studováno fázové chování jednotlivých řetězců v modelových systémech při teplotách od 25 °C do 80 °C. Nejdůležitější závěry práce Kováčik *et al.* (**Příloha 11**) jsou tyto:

- při fyziologické teplotě kůže (32 °C) tvoří lipidy v modelech **krystalickou (ortorombickou) fázi**,
- se zvyšující se teplotou (dodáním tepelné energie) se většina lipidů stává kapalnými, a tvoří tak kapalně-krystalickou fázi,
- kapalná fáze při vyšších teplotách (65–80 °C) přechází v izotropní fázi, jelikož pohyby molekul jsou tak rychlé, že je detektor přístroje nedokáže zachytit,
- LIG má v hodnocených modelových membránách s Cer NH tendenci při vyšších teplotách tvořit dva typy kapalných fází, a to tzv. **organizovanou a neorganizovanou**.

Z výše uvedených závěrů lze konstatovat, že pro kůži zcela unikátní Cer NH se v modelových membránách SC chová odlišně než Cer na bázi S, ale také polární fytoCer (Cer NP). Tvorba lamelární fáze s takto neobvyklou periodicitou (blízkou dlouhé lamelární fázi esenciální pro správnou funkci kůže)³⁶ by mohla vysvětlovat **jedinečnost této rodiny sfingolipidů v kůži**, a sehrávat tak důležitou roli ve formování kožní bariéry.

Příloha 12: Kováčik A, Pullmannová P, Pavlíková L, Maixner J, Vávrová K. Behavior of 1-Deoxy-, 3-Deoxy- and N-Methyl-Ceramides in Skin Barrier Lipid Models. *Sci. Rep.* **2020**, 10: 3832.

Příloha 13: Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *Langmuir*. **2018**, 34(1): 521–29.

Komentář k pracím

Důležitost funkčních skupin společných pro všechny typy sfingoidních bází byla předmětem práce Kováčik *et al.* (**Příloha 12**). To, zda hydroxylové skupiny v poloze 1¹²⁹ či 3¹³⁰ a primární amidová skupina¹³¹ hrají esenciální roli v bariérové funkci Cer, bylo zkoumáno pomocí modelových systémů SC. V těchto modelových membránách byly místo Cer zastoupeny tzv. **pseudoceramidy** (pseudoCer), tedy lipidy s absencí jedné z výše uvedených strukturních charakteristik.

Mnohvrstvé lipidové modely, které jsou ekvimolárními směsmi nefyziologických Cer (1-deoxy-, 3-deoxy-, nebo N-methyl-Cer, LIG a Chol (s přídatkem CholS)), vykazovaly odlišné fázové chování. Zatímco odstranění hydroxyly v poloze 3 nemá vliv na uspořádání lipidových řetězců v modelech a podporuje tvorbu dlouhé lamelární fáze (s periodicitou 10,8 nm), odstranění C-1 hydroxyly vede k **formování lipidových domén**, naprosté **fázové separaci** a ke **zvýšení propustnosti** takových membrán pro vodu a modelové permeanty. Zavedení methylové skupiny do molekuly Cer NS vede rovněž k fázové separaci (oddělování pseudoCer od LIG) a horšímu uspořádání lipidů (nárůstu *gauche* konformerů) a také ke zvýšené permeabilitě studovaných modelů kožní bariéry. Tato chemická obměna na druhou stranu zlepšuje mísitelnost Chol s dalšími složkami v lipidových membránách, což v případě jiných modelů není tak častý jev.

Doposud není objasněno, zda je stereochemie funkčních skupin Cer (např. Cer NS) důležitá pro správnou funkci kožní bariéry. Práce Kováčik *et al.* (**Příloha 13**) se proto zaměřuje na význam **konfigurace hydroxylové skupiny v poloze 3** u Cer na bázi S a dihydroCer.¹³² Účinky (dihydro)Cer s nepřirozenou stereochemií (*L-threo*-Cer NS a *L-threo*-Cer NdS) na bariérové vlastnosti modelových membrán byly srovnány s membránami obsahujícími Cer NS/Cer NdS ve fyziologické *D-erythro*-konfiguraci. Změna přirozené pozice hydroxylové skupiny se podepisuje na **zvýšení teplot fázového přechodu** modelových membrán, avšak nemá téměř žádný dopad na lamelární uspořádání studovaných lipidů. Nefyziologická ***L-threo* konfigurace** dále **snižuje zastoupení řetězců lipidů v ortorombické mřížce** a také mísení Cer s ostatními lipidy v modelových membránách. Pomocí permeačních experimentů bylo zjištěno, že změna fyziologické konfigurace zvyšuje propustnost modelových membrán pro vodu, ionty či větší lipofilní permeanty.

Závěrem lze říct, že hydroxylová skupina v poloze 1 a monosubstituovaná amidová vazba v Cer by měla být v Cer zachována, zatímco **allylová hydroxylová skupina v poloze 3 není pro zachování bariérových vlastností nezbytně nutná**. Proto je možné tuto skupinu při racionálním navrhování lipidových analogů (pseudoCer) v léčbě kožních onemocnění odstranit či nahradit jinou funkční skupinou. Pokud však hydroxylová skupina zůstane ponechána, musí být zachována i její stereochemie, neboť ***D-erythro* konfigurace se zdá být nezbytnou pro správný účinek kožních Cer**.

2.3 Studium akceleraantů permeace a jejich význam v (trans)dermálním podání léčiv

Přehledové práce

Příloha 14: Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, 7(2): 145–55.

Příloha 15: Kováčik A, Vraníková B. Transdermální léčivé přípravky dostupné v České republice a základní principy jejich aplikace. *Prakt. lékáren.* **2020**, 16(2): 97-99.

Komentář k pracím

Transdermální podávání léčiv má celou řadu klinických výhod, a to zejména v aplikaci makromolekulárních léčiv. Nejen pro ně, ale i pro další skupiny léčiv byly vyvinuty různé techniky k překonání kožní bariéry, včetně cílené syntézy nových urychlovačů permeace.⁷¹ Cílem přehledového článku Kováčik *et al.* (**Příloha 14**) bylo zaměřit se právě na tyto pomocné látky. Práce diskutuje kategorie a vlastnosti urychlovačů, dále **vztah mezi jejich strukturou a aktivitou**, mechanismy působení, reverzibilitu, biologickou odbouratelnost urychlovačů a kombinace synergických urychlovačů. V publikaci se také diskutuje vysoká účinnost akceleraantů zvyšujících propustnost léčiv přes kůži v souvislosti s toxicitou a dráždivostí urychlovačů permeace. Výsledný efekt (např. vstřebání dostatečného množství léčivé látky s dosažením systémového účinku) je **kombinací působení léčiva a akceleraantů, ale také interakce akceleraantů s kůží či lékovou formou** (roztok vs. gel/krém vs. náplast).

Praktické využití transdermálních forem je popsáno v práci Kováčik *et al.* (**Příloha 15**). Publikace popisuje rozdělení **klinicky používaných léčivých přípravků** obchodovaných v České republice. V práci je také zmíněna příprava individuálně připravovaných transdermálních přípravků. Práce rozděluje lékové formy z pohledu farmaceutické technologie, shrnuje jejich společné/odlišné vlastnosti a poukazuje na způsob jejich správné aplikace.

Původní práce

Příloha 16: Čuříková BA, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, Kováčik A, Vávrová K, Zbytovská J. Simplified Stratum Corneum Model Membranes for Studying the Effects of Permeation Enhancers. *Int. J. Pharm.* **2017**, 534(1-2): 287–96.

Příloha 17: Kopečná M, Kováčik A, Kučera O, Macháček M, Sochorová M, Audrlická P, Vávrová K. Fluorescent Penetration Enhancers Reveal Complex Interactions among the Enhancer, Drug, Solvent, and Skin. *Mol. Pharm.* **2019**, 16(2): 886–97.

Komentář k pracím

Účinek akceleraantů transdermální permeace se obvykle hodnotí *in vitro* na lidské nebo zvířecí kůži,¹³³ nicméně pro hodnocení aktivity těchto látek mohou být použity i modelové lipidové membrány.¹³⁴⁻¹³⁶ Výhodou lipidových filmů je jejich **nižší variabilita oproti izolované kožní tkáni**.¹³⁷ V práci Čuříková *et al.* (**Příloha 16**) byly hodnoceny účinky vybraných akceleraantů transdermální permeace. Pro návržení ideálního modelu kožní bariéry byly použity Cer odvozené od P, a to s nesubstituovaným nebo hydroxylovaným acylem v poloze alfa. Modelové membrány na bázi Cer NP nebo Cer AP nebo jejich kombinace s dalšími bariérovými lipidy byly v permeačních experimentech porovnány s prasečí kůží. U vybraných modelů byla propustnost hodnocena u modelových permeantů za použití vybraných akceleraantů transdermální permeace, a to konvenčně používaného laurokapramu (Azone®)¹³⁸ a také dodecylesteru (*S*)-*N*-acetylprolinu.¹³⁹ Modelové membrány, které obsahovaly stejný podíl Cer NP a Cer AP, dosahovaly **podobných parametrů jako izolovaná prasečí kůže**. Výsledky této práce dokazují, že jednoduché lipidové membrány, nenáročné na přípravu, věrohodně **napodobují lipidovou matici SC**, což by v budoucnu mohlo posloužit jako jedna z možných alternativ v hodnocení akceleraantů transdermální permeace.

Výše zmiňované interakce mezi urychlovačem permeace a léčivou látkou, resp. léčivých přípravkem nejsou doposud podrobně popsány. K lepšímu pochopení mechanismu účinku akceleraantů se využívá zejména **fluorescenčně značených molekul**,¹⁴⁰ což bylo cílem práce Kopečná *et al.* (**Příloha 17**). Ve studii byly připraveny akceleraanty transdermální permeace odvozené od účinného urychlovače

dodecylesteru 6-(dimethylamino)-hexanové kyseliny (DDAK).¹⁴¹⁻¹⁴³ Na DDAK byla zavedena fluorescenční značka (7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl),¹⁴⁴ která není prostorově velká a vykazuje vyšší rozpustnost ve vodě než jiné fluorescenční značky. Připravené fluorescenční akceleranty ve formě esterů

- výrazně **zvyšují prostupnost léčiv** (theofylinu a hydrokortisonu) přes lidskou kůži, avšak méně než DDAK,
- jsou **biologicky odbouratelné** (hydrolýza esterové vazby), což dokazuje fakt, že v akceptorové části Franzových difuzních cel nebyl akcelerant detekován ve formě esteru, nýbrž jako neaktivní uvolněná kyselina.

Koncentrace fluorescenčního akcelerantu v kůži závisí nejen na délce řetězce a použitém rozpouštědle, ale také na použitém léčivu. Léčivo při současném použití s akcelerantem moduluje penetraci akcelerantu do kůže, a v důsledku toho jeho účinek. Bylo také zjištěno, že hydrolýza urychlovače permeace nastala v dolní části SC a epidermis; uvolněná karboxylová kyselina, již jako neaktivní fragment akcelerantu, proniká do hlubších vrstev kůže. Příčinou nižší účinnosti značených akcelerantů by mohla být snížená tvorba vodíkových můstků s proteinovými složkami kůže.

Lokalizace značených urychlovačů byla potvrzena **pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie**¹⁴⁵ a infračervené spektroskopie;¹⁴⁶ pouze akceleranty ve formě esterů mají schopnost interakce s bariérovými lipidy SC, tj. rozrušují těsné uspořádání dlouhých řetězců lipidů kožní bariéry.^{73,147} Látky značené pomocí fluorescenční značky jsou často objemově velké, což může pozitivně, ale také negativně ovlivnit a tím zkreslit sledovaný jev. Navzdory této skutečnosti práce Kopečná *et al.* (**Příloha 17**) přibližuje **mechanismus účinku urychlovačů**, a tedy sledování penetrace léčivé látky přes SC a její následnou permeaci kožní tkání až do systémového oběhu.

3 ZÁVĚR A SMĚR DALŠÍHO VÝZKUMU

Ceramidy, které jsou pro savčí buňky ubikvitární látky, se kromě biochemických dějů (buněčné signalizace) podílejí na tvorbě a udržení správné funkce kožní bariéry. Ta spočívá zejména v zamezení ztrát vody, neboť právě přítomnost této zábrany umožňuje přežití jedinců na suché zemi. Navzdory rozsáhlému celosvětovému výzkumu v oblasti bariérových ceramidů není pořád zodpovězena řada otázek týkajících se jejich biochemie, významu ani jejich chování a vztahu k dalším lipidům v nejsvrchnější vrstvě savčí epidermis.

Pracovní skupina *Skin Barrier Research Group* se ve svém výzkumu zaměřuje nejen na studium fungování kožní bariéry, ale také na (trans)dermální aplikaci léčiv. Závěry studií prezentovaných v této habilitační práci jsou výsledkem týmové práce za využití přístrojového a materiálového vybavení Katedry organické a bioorganické chemie a Katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Pracovní skupina již dlouhodobě spolupracuje s Centrálními laboratořemi Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, které se podílí na měření a hodnocení vzorků pomocí rentgenové difrakce. Mezinárodním grantovým projektem byla podpořena dlouholetá spolupráce s pracovní skupinou profesora Daniela Hustera z Institutu lékařské fyziky a biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Lipsko, která se zabývá hodnocením fázového chování makromolekul a také lipidů pomocí nukleární magnetické rezonance v pevné fázi. Tři publikace představené v této habilitační práci jsou výsledkem spolupráce právě s lipskou výzkumnou skupinou, která zahrnovala také mou půlroční stáž na jejím pracovišti.

Výsledky publikované v odborných člancích se zaměřují na zkoumání kožní bariéry, neboť znalost významu vztahu struktury sfingolipidů a bariérových vlastností epidermis je základním předpokladem pro další/aplikovaný výzkum (např. transdermální aplikaci léčiv). Pomocí modelových membrán kožní bariéry bylo hodnoceno zejména fázové chování ceramidů a dalších bariérových lipidů, což přineslo zajímavé poznatky v oblasti uspořádání a mikrostruktury lipidové matrice rohové vrstvy. V platnosti však zůstává tvrzení, že každá podtřída ceramidů, a tedy každá strukturní charakteristika těchto látek (např. hydroxylová skupina

v definované konfiguraci či délka acylového řetězce), má v kožní bariéře svou mnohdy nezaměnitelnou funkci. Vztah struktury kožních ceramidů a jejich vlastností v kožní bariéře byl rovněž studován v práci, která popisuje hodnocení ceramidů s acylem hydroxylovaným v poloze alfa. Tato studie, popisující význam hydroxylace v acylovém řetězci ceramidů, je připravena k odeslání do redakce časopisu.

Pomocí modelových membrán simulujících rohovou vrstvu kůže lze kromě významu jednotlivých podtypů ceramidů studovat i chování dalších bariérových lipidů. Pracovní skupina *Skin Barrier Research Group* se také podílela na studii popisující význam cholesterolu a také metabolitů ceramidových prekurzorů – lysolipidů. Dalším probíhajícím výzkumem této pracovní skupiny je např. studium volných sfingoidních bází a jejich role v modelech zdravé a nemocné kůže.

Navzdory skutečnosti, že k výzkumu kožní bariéry je nejvhodnější izolovaná kožní tkáň, modelové systémy lze rovněž považovat za praktický a spolehlivý nástroj k jejímu hodnocení. Na základě získaných výsledků se také dají objasnit některé (pato)fyziologické děje a získat podklady pro racionální design podání látek na/přes kůži či do kůže.

V rámci dalšího probíhajícího projektu zabývajícího se významem korneocytární lipidové obálky bylo rovněž získáno několik zajímavých výsledků, které by mohly posloužit jako podklad v procesech obnovování kožní bariéry, a to zejména u kožních nemocí. Podstatou této obnovy by bylo podávání bariérových lipidů (ceramidů nebo pseudoceramidů) na poškozená ložiska ve vhodné formě, např. kapalné emulzi, krému, s využitím liposomů apod. Přípravou formulací obsahujících značený ceramid (např. izotopem ^{13}C) a jejich aplikací na modelově poškozenou pokožku nebo rohovou vrstvu lze pomocí vhodných chromatografických (LC-MS přístroj využívaný na Katedře bioorganické a organické chemie od roku 2019) nebo spektroskopických metod (NMR v pevné fázi) sledovat začlenění a lokalizaci aplikovaného lipidu v kůži.

Pro úplnost je třeba dodat, že kromě modelových lipidových membrán naše pracovní skupina pro výzkum využívá rovněž lidskou kožní tkáň získanou ze vzorků z oddělení plastické chirurgie sanatoria Sanus (První privátní chirurgické centrum,

spol. s r. o.) v Hradci Králové, se kterým má pracovní skupina již dlouholetou spolupráci a k experimentům má vypracovanou potřebnou dokumentaci. Zde plánujeme výzkum pomocí izolace kožních buněk a tvorby tkáňových modelů poškozené kožní bariéry. V rámci zahraniční spolupráce se skupinou profesorky Sarah Hedtrich z Univerzity Britské Kolumbie a profesorky Moniky Schaefer-Korting ze Svobodné univerzity Berlín máme s touto problematikou již zkušenosti.

Poškozenou kožní bariéru by bylo možné obnovit také cíleným podáváním ceramidů ve spojení s polymerními látkami, jako je např. kyselina hyaluronová. V rámci spolupráce se společností Contipro a.s. v Dolní Dobrouči jsou vyvíjeny deriváty kyseliny hyaluronové hydrofobizované ceramidy, které by měly mít takové vlastnosti, aby poškozené (suché) kůži dodaly chybějící humektant (kyselinu hyaluronovou) a rohové vrstvě chybějící hydrofobní složku (bariérový ceramid). Takový derivát by mohl najít uplatnění i v terapii kožních ran, např. popálenin. V případě chorob, jako jsou atopický ekzém či jiné dermatitidy, je topické podávání ceramidů nebo jiných tělu vlastních látek vhodnou alternativou topicky či systémově podávaných antiflogistik, čímž se snižuje riziko možných nežádoucích účinků.

4 PODÍL PŘEDKLADATELE NA VYBRANÝCH ODBORNÝCH PRACÍCH

1. Školová B, Hudská K, Pullmannová P, Kováčik A, Palát K, Roh J, Fleddermann J, Estrela-Lopis I, Vávrová K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy using Deuterated Lipids. *J. Phys. Chem. B*. **2014**, 18(35): 10460–70.

Podíl předkladatele: spolupráce s prvním autorem při interpretaci dat (infračervená spektroskopie), spoluúčast na sepsání rukopisu.

2. Pullmannová P, Pavlíková L, Kováčik A, Sochorová M, Školová B, Slepíčka P, Maixner J, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides With Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys. Chem.* **2017**, 224: 20–31.

Podíl předkladatele: interpretace dat (permeační experimenty), spolupráce s prvním autorem na sepsání a revizi rukopisu.

3. Engberg O, Kováčik A, Pullmannová P, Juhaščík M, Opálka L, Huster D, Vávrová K. The Sphingosine and Acyl Chains of Ceramide [NS] Show Very Different Structure and Dynamics That Challenge Our Understanding of the Skin Barrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59(40): 17383–87.

Podíl předkladatele: syntéza a charakterizace studovaných látek, příprava modelových membrán, interpretace dat (infračervená spektroskopie), sepsání rukopisu.

4. Opálka L, Kováčik A, Maixner J, Vávrová K. Omega-O-acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir*. **2016**, 32(48): 12894–904.

Podíl předkladatele: interpretace dat (permeační experimenty), spolupráce s prvním autorem na sepsání rukopisu.

5. Opálka L, Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Omega-O-Acylceramide Structures and Concentrations in Healthy and Diseased Skin Barrier Lipid Membrane Models. *J. Lipid Res.* **2020**, 61(2): 219–28.

Podíl předkladatele: interpretace dat a spoluúčast na permeačních experimentech, spolupráce s prvním autorem na sepsání a revizi rukopisu.

6. Pullmannová P, Ermakova E, Kováčik A, Opálka L, Maixner J, Zbytovská J, Kučerka N, Vávrová K. Long and Very Long Lamellar Phases in Model Stratum Corneum Lipid Membranes. **2019**, *J. Lipid Res.* 60(5): 963–71.

Podíl předkladatele: spoluúčast na interpretaci dat (rentgenová difrakce), spolupráce na sepsání a revizi rukopisu.

7. Sochorová M, Staňková K, Pullmannová P, Kováčik A, Zbytovská J, Vávrová K. Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1): 6470.

Podíl předkladatele: příprava modelových membrán, spoluúčast na interpretaci dat (permeační experiment), spolupráce na sepsání a revizi rukopisu.

8. Školová B, Kováčik A, Tesař O, Opálka L, Vávrová K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. **2017**, 1859(5): 824–34.

Podíl předkladatele: syntéza studovaných látek, příprava modelových membrán, interpretace dat a spoluúčast na experimentu (rentgenová difrakce), spolupráce s prvním autorem na sepsání a revizi rukopisu.

9. Stahlberg S, Eichner A, Sonnenberger S, Kováčik A, Lange S, Schmitt T, Demé B, Hauss T, Dobner B, Neubert RHH, Huster D. The Influence of a Novel Dimeric Ceramide Molecule on the Nanostructure and the Thermotropic Phase Behavior of a Stratum Corneum Model Mixture. *Langmuir*. **2017**, 33(36): 9211–21.

Podíl předkladatele: spoluúčast na experimentu a interpretaci dat (permeační experiment), spolupráce na sepsání rukopisu.

10. Kováčik A, Šilarová M, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir*. **2017**, 33(11): 2890–99.

Podíl předkladatele: *příprava modelových membrán, provedení a interpretace experimentu (permeační experiment, infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce), sepsání rukopisu.*

11. Kováčik A, Vogel A, Adler J, Pullmannová P, Vávrová K, Huster D. Probing The Role of Ceramide Hydroxylation in Skin Barrier Lipid Models by ²H Solid-State NMR Spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* **2018**, 1860(5): 1162–70.

Podíl předkladatele: *syntéza studovaných látek, příprava modelových membrán, provedení a interpretace experimentu (NMR spektroskopie v pevné fázi), sepsání rukopisu.*

12. Kováčik A, Pullmannová P, Pavlíková L, Maixner J, Vávrová K. Behavior of 1-Deoxy-, 3-Deoxy- and N-Methyl-Ceramides in Skin Barrier Lipid Models. *Sci. Rep.* **2020**, 10: 3832.

Podíl předkladatele: *syntéza studovaných látek, příprava modelových membrán, provedení a interpretace experimentu (permeační experiment, infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce), sepsání rukopisu.*

13. Kováčik A, Pullmannová P, Maixner J, Vávrová K. Effects of Ceramide and Dihydroceramide Stereochemistry at C-3 on the Microstructure, Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Membranes. *Langmuir.* **2018**, 34(1): 521–29.

Podíl předkladatele: *syntéza studovaných látek, příprava modelových membrán, provedení a interpretace experimentu (permeační experiment, infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce), sepsání rukopisu.*

14. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, 7(2): 145–55.

Podíl předkladatele: *literární rešerše, sepsání rukopisu.*

15. Kováčik A, Vraníková B. Transdermální léčivé přípravky dostupné v České republice a základní principy jejich aplikace. *Prakt. Lékáren.* **2020**, 16(2): 97–99.

Podíl předkladatele: *literární rešerše, sepsání rukopisu.*

16. Čuříková BA, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, Kováčik A, Vávrová K, Zbytovská J. Simplified Stratum Corneum Model Membranes for Studying the Effects of Permeation Enhancers. *Int. J. Pharm.* **2017**, 534(1-2): 287–96.

Podíl předkladatele: *spoluúčast při přípravě modelových membrán, spolupráce na sepsání rukopisu.*

17. Kopečná M, Kováčik A, Kučera O, Macháček M, Sochorová M, Audrlická P, Vávrová K. Fluorescent Penetration Enhancers Reveal Complex Interactions among the Enhancer, Drug, Solvent, and Skin. *Mol. Pharm.* **2019**, 16(2): 886–97.

Podíl předkladatele: *spoluúčast na experimentu a interpretaci dat (permeační experiment), spolupráce na sepsání a revizi rukopisu.*

5 LITERATURA

- (1) WILLIAMS, Adrian C. Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice, první, ilustrované vydání, London: Pharmaceutical Press, **2003**.
- (2) Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, S3.
- (3) Kabashima, K.; Honda, T.; Ginhoux, F.; Egawa, G. The immunological anatomy of the skin. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, 19 (1), 19.
- (4) Kolarsick, P. A.; Kolarsick, M. A.; Goodwin, C. Anatomy and physiology of the skin. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* **2011**, 3 (4), 203.
- (5) ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3, třetí, upravené a doplněné vydání, Praha: Grada Publishing, **2016**.
- (6) CHU, David H. Overview of biology, development, and structure of skin. In K. Wolff, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell (Eds.), Fitzpatrick's dermatology in general medicine, sedmé vydání, New York: McGraw-Hill, **2008**.
- (7) Bouwstra, J. A.; Ponc, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1758 (12), 2080.
- (8) BENSON, Heather A. E. Skin structure, function, and permeation. In H. A. E. Benson, A. C. Watkinson (Eds.), Topical and Transdermal Drug Delivery, první vydání, Hoboken: John Wiley & Sons Inc., **2012**.
- (9) WALTERS, Kenneth A.; ROBERTS, Michael S. The structure and function of skin. In K. A. Walters (Ed.), Drugs and the pharmaceutical Sciences, první vydání, New York: Marcel Dekker, **2002**.
- (10) MURPHY, George. Histology of the skin. In R. Elenitsas, C. Jaworsky, B. Johnson (Eds.), Lever's Histopathology of the Skin, první vydání, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, **1997**.
- (11) Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T. Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, 92 (1), 109.
- (12) Wertz, P. W.; Downing, D. T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* **1983**, 24 (6), 759.
- (13) Wertz, P. W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, 208, 7.
- (14) Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1182 (2), 147.
- (15) Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T. et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* **2008**, 49 (7), 1466.
- (16) Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1841 (3), 422.
- (17) Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J. Lipid Res.* **2013**, 54 (12), 3312.
- (18) Breathnach, A.; Goodman, T.; Stolinski, C.; Gross, M. Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. *J. Anat.* **1973**, 114 (1), 65.
- (19) Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, 88 (6), 714.
- (20) Hou, S. Y.; Mitra, A. K.; White, S. H.; Menon, G. K.; Ghadially, R.; Elias, P. M. Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, 96 (2), 215.

- (21) Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Weerheim, A. M.; Ijzerman, A. P.; Ponec, M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* **1998**, *39* (1), 186.
- (22) Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *97* (6), 1005.
- (23) Shieh, H.-S.; Hoard, L. G.; Nordman, C. E. The structure of cholesterol. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1981**, *37* (8), 1538.
- (24) Corkery, R. W. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Coll. Surf. B Biointerfaces* **2002**, *26* (1-2), 3.
- (25) Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2011**, *1808* (6), 1529.
- (26) White, S. H.; Mirejovsky, D.; King, G. I. Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. *Biochemistry* **1988**, *27* (10), 3725.
- (27) Damien, F.; Boncheva, M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (2), 611.
- (28) Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2006**, *1758* (7), 923.
- (29) Moore, D. J.; Rerek, M. E. Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)* **2000**, *208*, 16.
- (30) Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R. Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from Fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231* (3), 797.
- (31) Lafleur, M. Phase behaviour of model stratum corneum lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Can. J. Chem.* **1998**, *76* (11), 1501.
- (32) Schröter, A.; Kessner, D.; Kiselev, M. A.; Hauß, T.; Dante, S.; Neubert, R. H. Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study. *Biophys. J.* **2009**, *97* (4), 1104.
- (33) Kiselev, M.; Ryabova, N. Y.; Balagurov, A.; Dante, S.; Hauss, T.; Zbytovska, J.; Wartewig, S.; Neubert, R. New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34* (8), 1030.
- (34) Bouwstra, J.; Gooris, G.; Salomons-de Vries, M.; Van der Spek, J.; Bras, W. Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wide-angle X-ray diffraction study. *Int. J. Pharm.* **1992**, *84* (3), 205.
- (35) McIntosh, T. J.; Stewart, M. E.; Downing, D. T. X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* **1996**, *35* (12), 3649.
- (36) Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloëuf, A.; Nosek, D. et al. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (9), 2215.
- (37) Landmann, L. Epidermal Permeability Barrier: Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J. Invest. Dermatol.* **1986**, *87* (2), 202.
- (38) Skolova, B.; Janusova, B.; Zbytovska, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepicka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A. et al. Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624.
- (39) Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepicka, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Permeability and microstructure of model

- stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophys. Chem.* **2017**, *224*, 20.
- (40) Glombitza, B.; Müller-Goymann, C. C. Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *117* (1-2), 29.
- (41) Raith, K.; Farwanah, H.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. Progress in the analysis of stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106* (8), 561.
- (42) Wartewig, S.; Neubert, R. H. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: a review. Part 1: ceramides. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2007**, *20* (5), 220.
- (43) Gay, C. L.; Guy, R. H.; Golden, G. M.; Mak, V. H.; Francoeur, M. L. Characterization of low-temperature (i.e., < 65 degrees C) lipid transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, *103* (2), 233.
- (44) de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J. Lipid Res.* **2004**, *45* (5), 923.
- (45) de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2004**, *1664* (2), 132.
- (46) de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (12), 2649.
- (47) Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S.; Wegener, M.; Wienhold, A. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. II. Mixtures of ceramides and saturated fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *89* (1), 3.
- (48) Wegener, M.; Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *88* (1), 73.
- (49) Chen, H.-C.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. Effect of cholesterol on miscibility and phase behavior in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2001**, *1512* (2), 345.
- (50) Mendelsohn, R.; Moore, D. J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141.
- (51) Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection- absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (9), 2159.
- (52) Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. Infrared spectroscopy and microscopic imaging of stratum corneum models and skin. Invited Lecture. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (20), 4651.
- (53) Velkova, V.; Lafleur, M. Influence of the lipid composition on the organization of skin lipid model mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *117* (1-2), 63.
- (54) Rerek, M. E.; Van Wyck, D.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J. FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *134* (1), 51.
- (55) Eeman, M.; Deleu, M.; Paquot, M.; Thonart, P.; Dufrêne, Y. Nanoscale properties of mixed fengycin/ceramide monolayers explored using atomic force microscopy. *Langmuir* **2005**, *21* (6), 2505.
- (56) Kai, T.; Isami, T.; KUROSAKI, Y.; Nakayama, T.; Kimura, T. Keratinized epithelial transport of β -blocking agents. II. Evaluation of barrier property of stratum corneum by using model lipid systems. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16* (3), 284.

- (57) Friberg, S. E.; Kayali, I.; Beckerman, W.; Rhein, L. D.; Simion, A. Water Permeation of Reaggregated Stratum Corneum with Model Lipids. *J. Invest. Dermatol.* **1990**, *94* (3), 377.
- (58) Mathes, S. H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U. The use of skin models in drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69-70*, 81.
- (59) Welss, T.; Basketter, D. A.; Schroder, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18* (3), 231.
- (60) Schmook, F. P.; Meingassner, J. G.; Billich, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215* (1-2), 51.
- (61) Simon, G. A.; Maibach, H. I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2000**, *13* (5), 229.
- (62) Jung, E. C.; Maibach, H. I. Animal models for percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (1), 1.
- (63) Guy, R. H. Transdermal science and technology-an update. *Drug Deliv. System* **2007**, *22* (4), 442.
- (64) Prausnitz, M. R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1261.
- (65) Pastore, M. N.; Kalia, Y. N.; Horstmann, M.; Roberts, M. S. Transdermal patches: history, development and pharmacology. *Brit.J. Pharmacol.* **2015**, *172* (9), 2179.
- (66) Wiedersberg, S.; Guy, R. H. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *J. Control. Release* **2014**, *190*, 150.
- (67) Suhonen, T. M.; Bouwstra, J. A.; Urtti, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release* **1999**, *59* (2), 149.
- (68) Lane, M. E. Skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447* (1-2), 12.
- (69) DRAGICEVIC, Nina; MAIBACH, Howard. I. Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement, první vydání, New York: Springer, **2016**.
- (70) Potts, R. O.; Guy, R. H. Predicting skin permeability. *Pharm. Res.* **1992**, *9* (5), 663.
- (71) Barry, B. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Control. Release* **1991**, *15* (3), 237.
- (72) Zsikó, S.; Csányi, E.; Kovács, A.; Budai-Szűcs, M.; Gácsi, A.; Berkó, S. Methods to evaluate skin penetration In Vitro. *Sci. Pharm.* **2019**, *87* (3), 19.
- (73) Vavrova, K.; Zbytovska, J.; Hrabalek, A. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (19), 2273.
- (74) Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784.
- (75) Levy, M.; Futerman, A. H. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **2010**, *62* (5), 347.
- (76) Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237.
- (77) van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.* **2011**, *52* (6), 1211.
- (78) Breiden, B.; Sandhoff, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeabilitybarrier formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 441.
- (79) Huang, H.-w.; Goldberg, E. M.; Zidovetzki, R. Ceramides perturb the structure of phosphatidylcholine bilayers and modulate the activity of phospholipase A 2. *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27* (4), 361.

- (80) Sot, J.; Goñi, F. M.; Alonso, A. Molecular associations and surface-active properties of short-and long-N-acyl chain ceramides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2005**, *1711* (1), 12.
- (81) Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R. FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behavior of ceramides. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (44), 8933.
- (82) Groen, D.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a unique lamellar phase. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4168.
- (83) Netzlaff, F.; Kostka, K.-H.; Lehr, C.-M.; Schaefer, U. F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63* (1), 44.
- (84) Fokuhl, J.; Müller-Goymann, C. C. Modified TEWL in vitro measurements on transdermal patches with different additives with regard to water vapour permeability kinetics. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444* (1–2), 89.
- (85) De Paepe, K.; Houben, E.; Adam, R.; Wiesemann, F.; Rogiers, V. Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res. Technol.* **2005**, *11* (1), 61.
- (86) Mitragotri, S. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Release* **2003**, *86* (1), 69.
- (87) Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R. et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* **2012**, *53* (12), 2755.
- (88) Sassa, T.; Ohno, Y.; Suzuki, S.; Nomura, T.; Nishioka, C.; Kashiwagi, T.; Hirayama, T.; Akiyama, M.; Taguchi, R.; Shimizu, H. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elov11, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33* (14), 2787.
- (89) Park, Y.-H.; Jang, W.-H.; Seo, J. A.; Park, M.; Lee, T. R.; Park, Y.-H.; Kim, D. K.; Lim, K.-M. Decrease of ceramides with very long-chain fatty acids and downregulation of elongases in a murine atopic dermatitis model. *J. Invest. Dermatol.* **2012**, *132* (2), 476.
- (90) Elias, P. M. Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Dermatol.* **1981**, *20* (1), 1.
- (91) Grieco, P. A.; Gilman, S.; Nishizawa, M. J. T. J. o. O. C. Organoselenium chemistry. A facile one-step synthesis of alkyl aryl selenides from alcohols. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (8), 1485.
- (92) Mlynarski, S. N.; Schuster, C. H.; Morken, J. P. Asymmetric synthesis from terminal alkenes by cascades of diboration and cross-coupling. *Nature* **2014**, *505* (7483), 386.
- (93) Pham, Q. D.; Topgaard, D.; Sparr, E. Tracking solvents in the skin through atomically resolved measurements of molecular mobility in intact stratum corneum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2017**, *114* (2), E112.
- (94) Chen, X.; Kwak, S.; Lafleur, M.; Bloom, M.; Kitson, N.; Thewalt, J. Fatty acids influence “solid” phase formation in models of stratum corneum intercellular membranes. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5548.
- (95) Stahlberg, S. r.; Lange, S.; Dobner, B.; Huster, D. Probing the Role of Ceramide Headgroup Polarity in Short-Chain Model Skin Barrier Lipid Mixtures by 2H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2016**, *32* (8), 2023.
- (96) Li, W.; Sandhoff, R.; Kono, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Ding, B. C.-H.; Proia, R. L.; Deng, C.-X. Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3* (2), 120.
- (97) Ohno, Y.; Nakamichi, S.; Ohkuni, A.; Kamiyama, N.; Naoe, A.; Tsujimura, H.; Yokose, U.; Sugiura, K.; Ishikawa, J.; Akiyama, M. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22

- in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2015**, *112* (25), 7707.
- (98) Takagi, Y.; Nakagawa, H.; Matsuo, N.; Nomura, T.; Takizawa, M.; Imokawa, G. Biosynthesis of acylceramide in murine epidermis: characterization by inhibition of glucosylation and deglycosylation, and by substrate specificity. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122* (3), 722.
- (99) Jennemann, R.; Rabionet, M.; Gorgas, K.; Epstein, S.; Dalpke, A.; Rothermel, U.; Bayerle, A.; van der Hoeven, F.; Imgrund, S.; Kirsch, J. et al. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21* (3), 586.
- (100) Di Nardo, A.; Wertz, P.; Giannetti, A.; Seidenari, S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **1998**, *78* (1), 27.
- (101) Paige, D.; Morse-Fisher, N.; Harper, J. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *Brit. J. Dermatol.* **1994**, *131* (1), 23.
- (102) Van Smeden, J.; Janssens, M.; Boiten, W. A.; Van Drongelen, V.; Furio, L.; Vreeken, R. J.; Hovnanian, A.; Bouwstra, J. A. Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (5), 1238.
- (103) Opalka, L.; Kovacik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kunes, J.; Lenco, J.; Vávrová, K. i. Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5456.
- (104) Williams, M.; Elias, P. Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* **1981**, *68* (6), 1404.
- (105) Rehfeld, S. J.; Plachy, W. Z.; Williams, M. L.; Elias, P. M. Calorimetric and Electron Spin Resonance Examination of Lipid Phase Transitions in Human Stratum Corneum: Molecular Basis for Normal Cohesion and Abnormal Desquamation in Recessive X-Linked Ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **1988**, *91* (5).
- (106) Elias, P.; Williams, M.; Maloney, M.; Bonifas, J.; Brown, B.; Grayson, S.; Epstein, E. Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* **1984**, *74* (4), 1414.
- (107) Ranasinghe, A. W.; Wertz, P. W.; Downing, D. T.; Mackenzie, I. C. Lipid composition of cohesive and desquamated corneocytes from mouse ear skin. *J. Invest. Dermatol.* **1986**, *86* (2).
- (108) Hamanaka, S.; Hara, M.; Nishio, H.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Uchida, Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119*, 416.
- (109) Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Menon, G. K.; Legler, G.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91* (4), 1656.
- (110) Sidransky, E.; Sherer, D. M.; Ginns, E. I. Gaucher disease in the neonate: a distinct Gaucher phenotype is analogous to a mouse model created by targeted disruption of the glucocerebrosidase gene. *Pediatr. Res.* **1992**, *32* (4), 494.
- (111) Sidransky, E.; Fartasch, M.; Lee, R. E.; Metlay, L. A.; Abella, S.; Zimran, A.; Gao, W.; Elias, P. M.; Ginns, E. I.; Holleran, W. M. Epidermal abnormalities may distinguish type 2 from type 1 and type 3 of Gaucher disease. *Pediatr. Res.* **1996**, *39* (1), 134.
- (112) Holleran, W. M.; Ginns, E. I.; Menon, G. K.; Grundmann, J. U.; Fartasch, M.; McKinney, C. E.; Elias, P. M.; Sidransky, E. Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93* (4), 1756.
- (113) Doering, T.; Proia, R. L.; Sandhoff, K. Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in β -glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett.* **1999**, *447* (2-3), 167.

- (114) Uchida, Y.; Holleran, W. M. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J. Dermatol. Sci.* **2008**, *51* (2), 77.
- (115) Elias, P. M.; Gruber, R.; Crumrine, D.; Menon, G.; Williams, M. L.; Wakefield, J. S.; Holleran, W. M.; Uchida, Y. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 314.
- (116) Ternes, P.; Franke, S.; Zahringer, U.; Sperling, P.; Heinz, E. Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (28), 25512.
- (117) Howell, A. R.; Ndakala, A. J. The preparation and biological significance of phytosphingosines. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6* (4), 365.
- (118) Kovacik, A.; Roh, J.; Vavrova, K. The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family. *ChemBioChem.* **2014**, *15* (11), 1555.
- (119) Murakami, I.; Wakasa, Y.; Yamashita, S.; Kurihara, T.; Zama, K.; Kobayashi, N.; Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Shigyo, T.; Igarashi, Y. Phytoceramide and sphingoid bases derived from brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* activate peroxisome proliferator-activated receptors. *Lipids Health Dis.* **2011**, *10* (1), 150.
- (120) Kim, B.-H.; Lee, J. M.; Jung, Y.-G.; Kim, S.; Kim, T.-Y. Phytosphingosine Derivatives Ameliorate Skin Inflammation by Inhibiting NF- κ B and JAK/STAT Signaling in Keratinocytes and Mice. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (4), 1023.
- (121) Neubert, R. H.; Bayrak, O.; Steinbach, S.; Sonnenberger, S.; Dobner, B. Development and validation of analytical methods for the detection and quantification of a novel dimeric ceramide in stratum corneum and other layers of the skin. *Chromatographia* **2016**, *79* (23-24), 1615.
- (122) Hamanaka, S.; Asagami, C.; Suzuki, M.; Inagaki, F.; Suzuki, A. Structure determination of glucosyl beta 1-N-(omega-O-linoleoyl)-acylsphingosines of human epidermis. *J. Biochem.* **1989**, *105* (5), 684.
- (123) Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* **1994**, *35* (11), 2060.
- (124) Masuda, Y.; Mori, K. Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005* (22), 4789.
- (125) t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 403.
- (126) Skolova, B.; Jandovska, K.; Pullmannova, P.; Tesar, O.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes. *Langmuir* **2014**, *30* (19), 5527.
- (127) Ohta, N.; Hatta, I. Interaction among molecules in mixtures of ceramide/stearic acid, ceramide/cholesterol and ceramide/stearic acid/cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *115* (1-2), 93.
- (128) Stahlberg, S. r.; Školová, B.; Madhu, P. K.; Vogel, A.; Vávrová, K. i.; Huster, D. Probing the role of the ceramide acyl chain length and sphingosine unsaturation in model skin barrier lipid mixtures by 2H solid-state NMR spectroscopy. *Langmuir* **2015**, *31* (17), 4906.
- (129) Jiménez-Rojo, N.; Sot, J.; Busto, J. V.; Shaw, W. A.; Duan, J.; Merrill, A. H.; Alonso, A.; Goni, F. M. Biophysical properties of novel 1-deoxy-(dihydro) ceramides occurring in mammalian cells. *Biophys. J.* **2014**, *107* (12), 2850.
- (130) Li, L.; Tang, X.; Taylor, K. G.; DuPré, D. B.; Yappert, M. C. Conformational Characterization of Ceramides by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biophys. J.* **2002**, *82* (4), 2067.

- (131) Maula, T.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Yamamoto, T.; Katsumura, S.; Slotte, J. P. Effects of Sphingosine 2N- and 3O-Methylation on Palmitoyl Ceramide Properties in Bilayer Membranes. *Biophys. J.* **2011**, *101* (12), 2948.
- (132) Ishida, K.; Obata, Y.; Akagi, C.; Onuki, Y.; Takayama, K. Practical syntheses of D-erythro and L-threo-ceramide [NDS] and difference in contribution of each isomer in microstructure of stratum corneum intercellular lipids. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2014**, *24* (6), 689.
- (133) Barbero, A. M.; Frascch, H. F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23* (1), 1.
- (134) J Waters, L. Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21* (20), 2725.
- (135) Sloan, K. B.; Synovec, J.; Ketha, H. A surrogate for topical delivery in human skin: silicone membranes. *Ther. Deliv.* **2013**, *4* (2), 203.
- (136) Uchida, T.; Kadhum, W. R.; Kanai, S.; Todo, H.; Oshizaka, T.; Sugibayashi, K. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *67*, 113.
- (137) Godin, B.; Touitou, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (11), 1152.
- (138) Hadgraft, J.; Williams, D. G.; Allan, G. Azone. Mechanisms of action and clinical effect. *Drugs Pharm. Sci.* **1993**, *59*, 175.
- (139) Janůšová, B.; Školová, B.; Tükörová, K.; Wojnarová, L.; Šimůnek, T.; Mladěnka, P.; Filipický, T.; Říha, M.; Roh, J.; Palát, K. et al. Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. *J. Control. Release* **2013**, *165* (2), 91.
- (140) Seto, J. E.; Polat, B. E.; VanVeller, B.; Lopez, R. F.; Langer, R.; Blankschtein, D. Fluorescent penetration enhancers for transdermal applications. *J. Control. Release* **2012**, *158* (1), 85.
- (141) Novotný, J.; Kovaříková, P.; Novotný, M.; Janůšová, B.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (4), 811.
- (142) Vávrová, K.; Lorencová, K.; Novotný, J.; Holý, A.; Hrabálek, A. Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino) hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: influence of pH, ion-pairing and skin species. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70* (3), 901.
- (143) Diblíková, D.; Kopecna, M.; Školová, B.; Krecmerová, M.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Transdermal Delivery and Cutaneous Targeting of Antivirals using a Penetration Enhancer and Lysolipid Prodrugs. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (4), 1071.
- (144) Chattopadhyay, A. Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53* (1), 1.
- (145) Novotný, J.; Pospěchová, K.; Hrabálek, A.; Cap, R.; Vávrová, K. Synthesis of fluorescent C24-ceramide: evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (24), 6975.
- (146) Bernard, G.; Auger, M.; Soucy, J.; Pouliot, R. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2007**, *1770* (9), 1317.
- (147) Pham, Q. D.; Bjorklund, S.; Engblom, J.; Topgaard, D.; Sparr, E. Chemical penetration enhancers in stratum corneum - Relation between molecular effects and barrier function. *J Control. Release* **2016**, *232*, 175.

SOUBOR PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

