

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické technologie

*Skin Barrier Research Group*



**Roksolana Kulhánková**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

Hradec Králové 2022

## **Prohlášení**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, kterou jsem vypracovala sama. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové 2022

Roksolana Kulhánková

## **Poděkování**

Mé poděkování patří především doc. PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za odborné rady a velmi profesionální a přátelský přístup při vedení experimentální části a za vynikající podporu a trpělivost, kterou mi věnoval během zpracování mé absolventské práce. Děkuji také ostatním členům Skin Barrier Research Group za milý přístup a cenné rady poskytované v průběhu experimentální části práce.

*Tento výzkum proběhl za podpory Grantové agentury ČR (GAČR 120/60/960531) a Univerzity Karlovy (SVV 260 547).*

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: *Roksolana Kulhánková*

Školitel: *doc. PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.*

Název diplomové práce: ***Studium topicky podávaných ceramidů***

Lidská rohová vrstva kůže (*stratum corneum*; SC) je nejsvrchnější vrstva epidermis, která je tvořena z několika vrstev korneocytů. Prostor mezi korneocyty je vyplněn bariérovými lipidy, tj. ceramidy, cholesterolem a mastnými kyselinami, které jsou zastoupeny v ekvimolárním poměru. Uspořádání mezibuněčných lipidů má významný vliv na bariérové vlastnosti kůže. Poškozená kožní bariéra (např. u atopické dermatitidy) je spjata s nedostatkem lipidů v lipidové matrici SC, což se projevuje zvýšením trans-epidermální ztráty vody a zhoršením kvality kůže (např. výraznou suchostí, šupinatěním a prasklinkami). Jednou z potenciálních cest v obnovení kožní bariéry je topické podávání bariérových lipidů, zejména ceramidů (Cer).

Cílem této práce bylo studovat vliv topicky podávaných Cer (velmi dlouhý Cer AP samostatně nebo v kombinaci s ultradlouhým Cer EOS) na modelově poškozené SC a jejich účinku v procesu obnovy bariérové funkce. Bylo připraveno několik topicky podávaných formulací (krémů), u kterých byly hodnoceny vlivy hydrofilních kapalin, viskozitní přísady a zejména charakter emulgátorů, tj. sorbitan-monostearátu, glycerol-monostearátu a polysorbátu 80. Připravené formulace s bariérovými lipidy byly hodnoceny pomocí rentgenové difrakce a optické mikroskopie. Vliv bariérových lipidů na obnovení poškozené kožní bariéry bylo hodnoceno pomocí permeačních experimentů na modelově poškozeném SC. Bariérové vlastnosti a uspořádání bariérových lipidů ve SC byly popsány pomocí trans-epidermální ztráty vody (TEWL), elektrické impedance a infračervené spektroskopie. Z výsledků této práce lze říct, že aplikace topické formulace na bázi hydrofilního a hydrofobního emulgátoru s obsahem směsi Cer AP + Cer EOS statisticky snižuje propustnost SC pro vodu. Získané výsledky jsou tak vhodným podkladem pro další studium možností obnovování poškozené/nemocné kožní bariéry, což by mohlo najít uplatnění v terapii kožních nemocí (např. atopické dermatitidy) či jiných patofyziologických procesů v kůži.

## Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: *Roksolana Kulhánková*

Supervisor: *doc. PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.*

Title of diploma thesis: ***Study of topically administered ceramides***

The human *stratum corneum* (SC) is the uppermost layer of the epidermis, which is made up of several layers of corneocytes. The space between the corneocytes is filled with barrier lipids, *i.e.*, ceramides, cholesterol, and fatty acids, which are represented in an equimolar ratio. The arrangement of intercellular lipids has a significant effect on the barrier properties of the skin. Damaged skin barrier (*e.g.*, in atopic dermatitis) is associated with a lack of lipids in the SC lipid matrix, which is reflected in increased trans-epidermal water loss and deterioration of skin quality (*e.g.*, severe dryness, flaking, and cracks). One of the potential ways to restore the skin barrier is the topical administration of barrier lipids, especially ceramides (Cer).

The goal of this work was to study the effect of topically administered Cer (very long-chain Cer AP alone or in combination with ultra-long-chain Cer EOS) on model-damaged SC and their effect in the process of restoring barrier function. Several topically administered formulations (creams) were prepared, which were evaluated for the effects of hydrophilic liquids, viscosity additives, and especially the nature of emulsifiers, *i.e.*, sorbitan monostearate, glycerol monostearate, and polysorbate 80. Prepared formulations with barrier lipids were evaluated by X-ray diffraction and optical microscopy. The effect of barrier lipids on the restoration of the damaged skin barrier was evaluated using permeation experiments on a model-damaged SC. Barrier properties and arrangement of barrier lipids in SC have been described by trans-epidermal water loss (TEWL), electrical impedance, and infrared spectroscopy. From the results of this work we found out that the application of a topical formulation based on a hydrophilic and hydrophobic emulsifier containing a mixture of Cer AP + Cer EOS statistically decreases the permeability of SC to water. The obtained results are a suitable basis for further study of the possibilities of restoring the damaged/diseased skin barrier, which could find application in the treatment of skin diseases (*e.g.*, atopic dermatitis) or other pathophysiological processes in the skin.

# Obsah

1. Úvod a cíl práce.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Lidská kůže .....	9
2.1.1. Funkce .....	9
2.1.2. Stavba .....	9
2.1.2.1. Hypodermis .....	10
2.1.2.2. Dermis .....	10
2.1.2.3. Epidermis .....	11
2.1.2.4. Další buňky epidermální tkáně.....	12
2.1.3. Stratum corneum .....	12
2.2. Poškození kožní bariéry .....	16
2.2.1. Fyzikální faktory poškození kožní bariéry.....	16
2.2.2. Chemické faktory poškození kožní bariéry.....	18
2.2.3. Mechanické faktory poškození kožní bariéry .....	19
2.2.4. Atopická dermatitida .....	19
2.2.5. Psoriáza .....	20
2.3. Topicky podávané bariérové lipidy.....	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1. Použité chemikálie a materiály .....	23
3.2. Příprava topických formulací .....	23
3.3. Optická mikroskopie .....	24
3.4. Rentgenová difrakce.....	24
3.5. Izolace a zpracování lidské kůže pro permeační experimenty .....	25
3.6. Permeační experimenty .....	26
3.6.1. Trans-epidermální ztráta vody (TEWL).....	27
3.6.2. Elektrická impedance .....	28
3.6.3. Infračervená spektroskopie .....	29
3.6.4. Zpracování výsledků .....	31

4.	Výsledky a diskuze.....	32
4.1.	První permeační experiment.....	32
4.1.1.	Příprava a následná volba formulací použitých do experimentu .....	32
4.1.2.	Aplikace topických formulací na modelově poškozenou kožní bariéru .....	41
4.2.	Druhý permeační experiment .....	47
4.2.1.	Příprava a následná volba formulací použitých do experimentu .....	47
4.2.2.	Aplikace topických formulací na modelově poškozenou kožní bariéru .....	48
5.	Závěr.....	50
6.	Použité zkratky .....	51
7.	Literatura .....	52

## 1. Úvod a cíl práce

Hlavním úkolem savčí (lidské) kůže je chránit organismus před okolním prostředím a tvořit bariéru mezi organismem a okolím, ve kterém se organismus pohybuje/žije (1). Tato bariéra propustnosti sídlí v nejsvrchnější vrstvě a je nezbytná pro existenci života savců na suché zemi. Nejsvrchnější vrstva kůže je zrohovatělý kožní epitel selektivně propustný pro vodu. Funkce kožní bariéry je dána jak složením, tak uspořádáním jednotlivých složek. V některých případech, kdy je kožní bariéra poškozena (např. u kožních nemocí) je kůže ochuzena o klíčové látky s bariérovými vlastnostmi. Jednou z možných cest obnovení kožní bariéry je topické podávání chybějících bariérových lipidů. Tyto látky, mezi které patří hlavně ceramidy (Cer), lze cíleně aplikovat na poškozenou kožní bariéru pomocí topicky podávaných aplikačních forem.

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a připravit topicky podávanou formulaci, která by obsahovala bariérové lipidy (včetně pro kožní bariéru nevyhnutelného Cer s ultradlouhým řetězcem), byla vhodně a pohodlně aplikovatelná na kožní tkáň a aby její působení snížilo projevy poškození kožní bariéry. Cílem této práce bylo také připravené formulace charakterizovat a hodnotit jejich vliv na modelově poškozenou kožní bariéru. Součástí této práce byla optimalizace podmínek a metodiky přípravy modelově poškozené kožní bariéry. Pro sledování obnovy kožní bariéry bylo cílem charakterizovat permeační parametry, jako je např. ztráta vody. Vliv topicky podávaných formulací s bariérovými lipidy na uspořádání bariérových lipidů v lipidové matici bylo charakterizováno pomocí infračervené spektroskopie.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Lidská kůže

Kůže (*cutis, derma*) patří mezi tkáně povrchu těla, která chrání celý organismus před vnějšími vlivy. V oblasti tělních otvorů plynule přechází ve sliznice jednotlivých ústrojí, a proto lze kůži společně se sliznicemi označit jako intergumenty (*intergumentum commune*). Ty jsou zodpovědné za ochranu těla a jeho orgánů a tvoří tak první linii v obraně organismu (2). Role kůže je zásadní pro zajištění řady vitálních funkcí včetně udržení stálosti vnitřního prostředí (homeostázy).

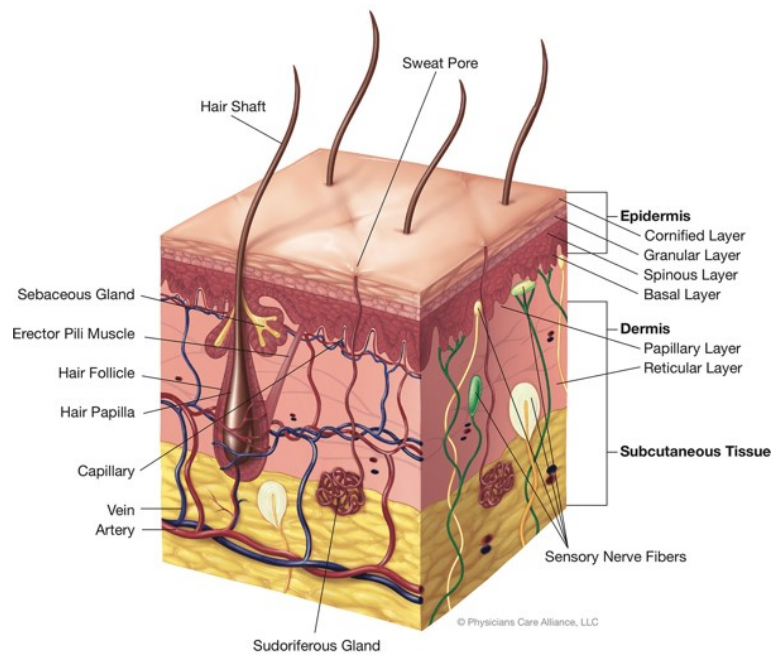
Kůže je bezesporu největším orgánem lidského těla a tvoří zhruba 16 % celkové hmotnosti těla člověka (3). Kůže u dospělého člověka zaujímá plochu přibližně 1,6 – 2 m<sup>2</sup> a její tloušťka je několik milimetrů. Oblast s velmi tenkou kůží se nachází např. na očních víčkách (přibližně 0,5 mm), naopak v oblasti zad je kůže silnější a dosahuje až 4 mm. Hmotnost kůže u průměrného dospělého jedince je přibližně 3 kg (4).

#### 2.1.1. Funkce

Kůže tvoří bariéru mezi lidským tělem a vnějším prostředím. Poskytuje ochrannou funkci a vytváří fyzickou bariéru proti pronikání dráždivých látek. Kůže minimalizuje mechanické, chemické, tepelné a dalších vlivy vnějšího prostředí. Kůže je také smyslovým orgánem, reaguje na různé poruchy vznikající na rozhraní vnitřního (organismu) a vnějšího prostředí, jako jsou tepelné poruchy. Kůže je důležitým tepelným izolátorem, což je zajištěno vrstvou podkožního tuku (viz níže). Kůže také slouží jako receptorový orgán; je zde lokalizován obrovský počet receptorů umožňujících komunikaci s vnějším prostředím, tj. dotykové a tlakové receptory, termoreceptory a v neposlední řadě také receptory pro detekci bolesti. Kůže je zodpovědná za resorpci a exkreci. Exkreční funkce je zajištěna činností potních a mazových žláz. Kožní maz, tvořen triglyceridy, vosky, skvalenem a dalšími lipidy, chrání kůži před vysycháním a jeho složky mají baktericidní účinky (5).

#### 2.1.2. Stavba

Lidská kůže se skládá ze tří hlavních vrstev, a to z vrchní epidermis, střední dermis a hypodermis. Součástí kožní tkáně jsou také kožní deriváty, kam se řadí vlasové folikuly, mazové, mléčné a potní žlázy, dále vlasy, chlupy a nehty (6). Stavba a jednotlivé součásti lidské kůže jsou zobrazeny v *Obrázku 1*.



Obrázek 1. Schématické znázornění vrstev kůže (*epidermis*, *dermis* a *hypodermis*) a jejich součástí včetně derivátů kůže (7).

### 2.1.2.1. Hypodermis

Podkožní tkáň (*hypodermis*, *tela subcutanea*) je tvořena vrstvami tukových buněk (adipocytů) uspořádaných do lalůček, které jsou propojeny kolagenovými a elastinovými vlákny. Hypodermis odděluje výše umístěné vrstvy kůže od povrchové fascie a periostu. Hlavní funkcí podkožní tkáně je tepelná izolace a ochrana před fyzickými nárazy, mimo jiné také tvoří zásobárnu energie (6,4).

### 2.1.2.2. Dermis

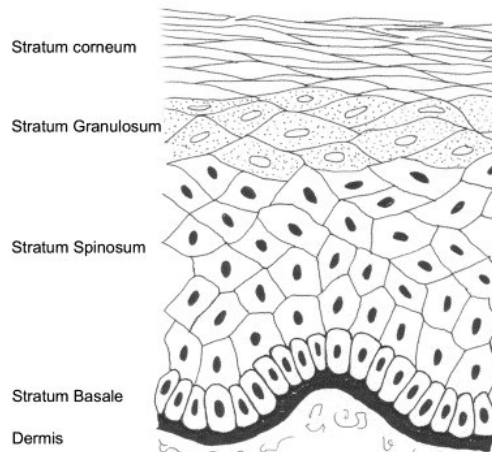
Škára (*dermis*, *corium*) je 2 až 5 mm široká vrstva tvořena kolagenními vlákny a elastickou pojivovou tkání zajišťující elasticitu a flexibilitu celého orgánu. Dermis je tvořena dvěma vrstvami, a to vnější (*stratum papillare*) a vnitřní (*stratum reticulare*). Papilární oblast je umístěna bezprostředně pod pokožkou a je tvořena papilami. Ty sestávají z řídkého vaziva, tenkých kolagenních (typ III a I) a elastických vláken. V neposlední řadě je v dermální oblasti kůže velké množství různých typů buněk imunitního systému; vyskytují se zde např. žírné buňky vyplavující histamin, spoluzodpovědné za vznik projevů typických pro zánět (svědění zarudnutí a otok). Papily jsou vybaveny volnými nervovými zakončeními vedoucími bolest a pocit svědění. Nacházejí se zde tzv. Meissnerova hmatová tělíska vnímající pocit lehkých a povrchových vibrací. V dermis se kromě vlasových folikulů a různých žlázek také nacházejí tzv. Ruffiniho tělíska, které se uplatňují jako receptory tahu (8).

### 2.1.2.3. Epidermis

Pokožka (*epidermis*) je vícevrstevná oblast s tloušťkou od 0,6 mm (oční víčka) do 0,8 mm (dlaně a plosky nohou). Epidermis lze rozdělit na čtyři základní vrstvy, a to na vrstvu bazální (*stratum basale*), vrstvu ostnitou (*stratum spinosum*), dále vrstvu granulozní (*stratum granulosum*) a konečně vrstvu rohovou (*stratum corneum*; SC; Obrázek 2) (6,9).

Základním typem kožních buněk pokožky jsou keratinocyty. Ty vytvářejí keratinové monofilamenty, tedy prekurzory vlastního keratinu. Keratinocyty jsou upnuty do desmosomů (spojů) buněčné membrány, které jsou průběžně odbourávány a nově vytvářeny, aby se mohly buňky posunovat a postupovat směrem k povrchu (4).

Jednotlivé vrstvy pokožky představují různá stadia diferenciaci kožních buněk (keratinocytů), které jsou vytvářeny z kmenových buněk v bazální vrstvě na hranici epidermis a dermis a migrují směrem ke kožnímu povrchu. Ve směru od dermis k epidermis/kožnímu povrchu ubývá kyslíku i živin, dochází ke změnám buněčných struktur, zplošťování keratinocytů a akumulaci keratinu (vznik keratohyalinních granul) a prekurzorů bariérových lipidů (vznik lamelárních, tzv. Odlandových tělísek) v buňkách. Tyto změny začínají již v ostnitě vrstvě, kde jsou buňky uspořádány ve 2–5 vrstvách. Při keratinizaci keratinocytů jsou buněčné orgány degradovány a keratinová vlákna se spojují do svazků, ty zcela vyplní vnitřek keratinocytů. V pozdní fázi diferenciaci keratinocytů Odlandova tělíska migrují k okrajovým částem keratinocytů, kde se jejich membrána spojí s plazmatickou membránou a lipidové prekurzory jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru. Následně dojde k hydrolýze prekurzorů lipidů pomocí současně uvolněných enzymů. Dochází k vytvoření souboru lipidových lamel, které zcela vyplní mezibuněčné prostory již nejsvrchnější vrstvy epidermis, tedy SC. Proces od vzniku keratinocytů ve *stratum basale* a jeho odloučení jako zrohovatělé buňky z oblasti SC trvá přibližně 4 týdny (3,4,6,8,9).



Obrázek 2. Schématické znázornění lidské pokožky (epidermis) a jednotlivých vrstev, tj. *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale* (3).

#### 2.1.2.4. Další buňky epidermální tkáně

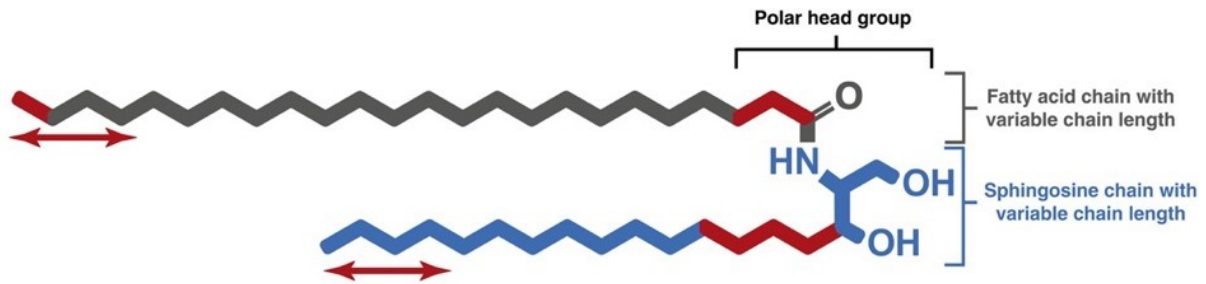
Epidermální tkáň tvoří kromě keratinocytů (korneocytů) také např. melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. Melanocyty jsou zodpovědné za barvu kůže díky syntéze tmavě hnědého pigmentu melaninu. Funkce melaninu spočívá v absorpci UV záření a tím ochraně kůže před škodlivým účinkem slunečního záření. Výběžky melanocytů se větví mezi keratinocyty, které z nich přebírají prostřednictvím endocytózy pigment melanin (4,10). Langerhansovy buňky pocházejí z monocytů kostní dřeně a představují mononukleární fagocytární systém v kůži. Tyto buňky jsou morfologicky a funkčně podobné makrofágům. Jsou umístěny v rozsahu *stratum basale* až *stratum granulosum*. Merkelovy buňky se nacházejí ve *stratum basale* a zevní epitelové pochvě vlasového folikulu, a to buď jednotlivě nebo ve vrstvách. Podílejí se na mechanoreceptci, a proto jsou v synaptických kontaktech aferentní nervová vlákna, jinými slovy jakýkoliv pohyb vlasového stvolu vede ke stimulaci těchto buněk (4,8,10).

#### 2.1.3. Stratum corneum

Rohová vrstva (SC) je tvořena z deseti až pětadvaceti vrstev korneocytů, které jsou orientovány přibližně rovnoběžně s povrchem kůže. Korneocyty jsou oploštěné buňky postrádající buněčné organely včetně buněčného jádra, obsahují malé množství vody a jsou prakticky vyplněny mikrofibrilárním keratinem, který je obklopen zrohovatěným obalem skládajícího se z hustě zesíťované vrstvy proteinů, jako je filaggrin, lorikrin a involukrin. Korneocyty mají tvar polygonálních destiček, které jsou mezi sebou spojeny korneodesmozomy. Po proteolytickém rozvolnění korneodesmozomů se zrohovatělé buňky jednotlivě odlupují. Tento proces se nazývá deskvamace.

Mezibuněčné prostory SC, tedy prostor mezi naskládanými korneocyty je vyplněn vysoce komplexní směsí látek lipidové povahy, které se označují jako lipidová matrice (matrix) a která je tvořena zejména cholesterolem, dále volnými mastnými kyselinami a sfingolipidy (tedy Cer) přibližně v ekvimolárním poměru (11). Přibližně polovinu hmotnosti lipidové matrice, která na rozdíl od buněčných membrán neobsahuje žádné fosfolipidy, tvoří Cer. Výzkum bariérových lipidů sahá až do roku 1970, kdy Ansari *et al.* popsali složení lidské epidermis pomocí plynové/kapalinové chromatografie. Podrobnější studium Cer se objevuje v roce 1978, kdy Gray a White popsali několik podtříd Cer pomocí vysoce účinné chromatografie na tenké vrstvě (12).

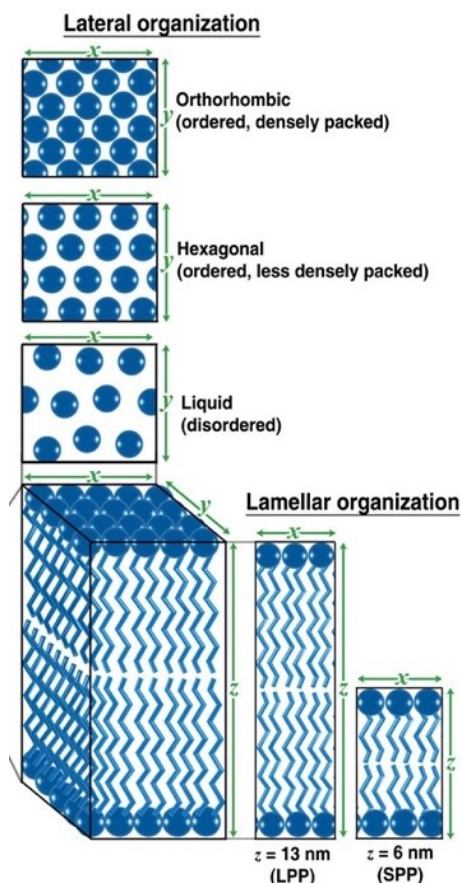
Cer jsou lipidy amfifilní povahy; mají malou polární hlavičku a dva lipofilní řetězce. Základem molekuly Cer je bazický amino-alkohol (sfingoidní báze s délkou nejčastěji 18 C), kterým může být např. dihydrosfingosin (dS), sfingosin (s dvojnou vazbou na čtvrtém uhlíku; S), fytosfingosin (s hydroxylovou skupinou v poloze 4; P) nebo 6-hydroxysfingosin (H), jež je typický dvojnou vazbou v poloze 4 a hydroxylovou skupinou v poloze 6 na svém řetězci. Na primární aminoskupinu sfingoidních bází je v poloze 2 amidicky vázána mastná kyselina. Acyl dlouhé nebo velmi dlouhé mastné kyseliny může být nesubstituovaný (N) nebo substitovaný hydroxylovou skupinou na začátku (v poloze  $\alpha$ ; A) anebo na konci řetězce (v poloze  $\omega$ ; O). Délka acylového řetězce se pohybuje od 16 až do 34 uhlíků, přičemž nejčastěji se vyskytují kyseliny obsahující 24 atomů uhlíků. Hydroxylová skupina v poloze omega, která je typická pro acyly s velkým počtem uhlíků (nejčastěji 30), může být esterově spojena s kyselinou linolovou. Takové poddruhy Cer se označují jako acylceramidy, resp. Cer typu EO a pro správnou funkci kůže jako bariéry jsou nepostradatelné. Kombinací různých typů sfingoidních bází (S, dS, P, H) a acylů mastných kyselin (N, A, O, EO) vzniká celá řada strukturních podtypů. Jako příklad lze uvést Cer AP, tedy molekulu fytosfingosinu acylovanou alfa-hydroxy-kyselinou. Jiným příkladem je ultradlouhý Cer EOS, tj. sfingosin acylovaný omega-hydroxy-kyselinou, která je dále esterifikována kyselinou linolovou. Struktura a nomenklatura bariérových Cer jsou zobrazeny na *Obrázku 3* (9,13,14).



	Non-hydroxy fatty acid [N]	$\alpha$ -hydroxy fatty acid [A]	Esterified $\omega$ -hydroxy fatty acid [EO]
Dihydrosphingosine [dS]			
Sphingosine [S]			
Phytosphingosine [P]			
6-hydroxy sphingosine [H]			

Obrázek 3. Struktura a nomenklatura bariérových ceramidů (Cer). Všechny Cer jsou tvořeny polární hlavní skupinou a dvěma dlouhými uhlíkovými řetězci. Cer jsou tvořeny polární charakteristickou skupinou (značena červeně), sfingoidní bází (modré značení) a řetězcem mastné kyseliny (šedé značení) (13).

SC vytvářejí v mezibuněčných prostorech pravidelně se opakující uskupení, tzv. lamelární fáze. Vedle uskupení, které se označuje jako fáze s krátkou periodicitou (angl. *short periodicity phase*; SPP) s délkou lamel asi 6 nm, je ve zdravé lipidové matrici SC přítomna fáze s dlouhou periodicitou (angl. *long periodicity phase*; LPP). Dlouhá lamelární periodická fáze, jejíž velikost je přibližně 13 nm, je pro správnou funkci SC jako bariéry nezbytná a klíčová. Uvnitř lipidových lamel jsou lipidy laterálně uspořádány do tzv. mřížek. První a velmi důležité uspořádání je tzv. čtvercová (ortorombická) mřížka, která je pro správnou funkci kůže jako bariéry esenciální. Vedle ortorombického uspořádání mohou být bariérové lipidy uspořádány do šestiúhelníku (hexagonálně) nebo nemusí být uspořádány vůbec a jsou v kapalném stavu (kapalně-krystalické mřížce). Ve zdravém SC jsou ve všech třech typech uskupení. Architektura bariérových lipidů (zejména řetězců mastných kyselin a Cer) jsou uvedeny na Obrázku 4 (13).



Obrázek 4. Schématické zobrazení organizace lipidů v lidském SC: laterální uspořádání (ortorombická, hexagonální nebo kapalná mřížka) a lamelární uspořádání (dlouhá a krátká lamelární periodická fáze) (13).

Pro kožní bariéru a její ochrannou funkci je nezbytná správná organizace lipidů v mezibuněčných lamelách, což mimo jiné závisí i na pH. V nejnižší vrstvě SC je pH 7, což způsobí 90% ionizaci mastných kyselin a odpuzování hlavních skupin, naopak na povrchu SC způsobí pH 5 tvorbu neiontových mastných kyselin a minimální odpuzování hlavních skupin a vznik dvouvrstvé struktury. Mimo jiné pH reguluje tvorbu SC aktivací  $\beta$ -glukocerebrosidázy a kyselá sfingomyelinázy. Tyto enzymy jsou aktivní pouze při nízkém pH a jejich snížená aktivita je zodpovědná za snížení bariérových funkcí.  $\beta$ -glukocerebrosidáza je zodpovědná za obnovu bariéry a kyselá sfingomyelináza je zapojena do epidermální diference.

U zdravé, patologicky nenarušené kůže je pH na povrchu kyselá a pohybuje se v rozmezí 4,1 – 5,8. Oblasti s nejkyselějším pH zahrnují čelo (pH 4,4) a horní oční víčko (pH 4,6), naopak hodnoty pH mezi 6,1 – 7,4 lze nalézt v oblasti třísel, mezi prsty dolních končetin, ale i v oblasti konečníku. Významné jsou i rasové rozdíly; tmavě pigmentovaní jedinci (vysoký stupeň fototypu) mohou vykazovat nižší pH ve srovnání s jedinci s nízkým fototypem (pH 4,6

oproti 5,0). K acidifikaci kůže přispívá několik faktorů, jako je např. kyselina urokánová, dále protonová pumpa, volné mastné kyseliny uvolněny hydrolyzou fosfolipidů apod. Důležitost kyselého pH spočívá ve schopnosti inhibovat kolonizaci kůže patogenními bakteriemi, jako je zejména *Staphylococcus aureus* (15).

## **2.2. Poškození kožní bariéry**

Jak bylo zmíněno výše, kůže chrání vnitřní orgány před fyzickým a chemickým traumatem, invazí mikroorganismů a ultrafialovým zářením. Integrita kůže může být ohrožena řadou faktorů, které lze rozdělit na vnitřní (např. kožní nemoci; viz níže) a vnější. Mezi nejvýznamnější vnější faktory patří např. infekce, alergie, změny obsahu vzdušné vlhkosti, ale také faktory fyzikálního, chemického či mechanického původu. Tyto faktory mohou vyvolat změny ve složení bariérových lipidů či hydro-lipidovém filmu a v neposlední řadě poruchy metabolismu vody či změny pH povrchu kůže (16,17).

### **2.2.1. Fyzikální faktory poškození kožní bariéry**

Radiace je jeden z nejčastějších fyzikálních faktorů, které mohou vést k poškození kůže. S ohledem na současný úbytek ozonové vrstvy ve stratosféře může sluneční záření, zejména UVA a UVB (viz dále), pronikat na Zemi ve vyšší míře a vyvolat tak nežádoucí a škodlivé účinky na lidskou pokožku (18). Plné optické spektrum slunečního světla zahrnuje ultrafialové, viditelné a infračervené, s vlnovou délkou v rozmezí od 200 nm do 1 mm. Bylo prokázáno, že sluneční spektrum ovlivňuje kůži různými způsoby v závislosti na vlnové délce. Záření s krátkou vlnovou délkou v ultrafialové oblasti má vyšší energii, a proto je potenciálně škodlivější.

Ultrafialové záření (angl. *ultraviolet*; UV) lze dělit na UVC, UVB a UVA. Vysokoenergetické UVC (200–280 nm) záření je normálně snadno filtrovatelné atmosférickou zónou a je tak silné, že je schopné při vystavení zabít jednobuněčné organismy. UVB (280–315 nm) paprsky pronikají do povrchových vrstev kůže až k bazální vrstvě epidermis, kde vytváří škodlivé reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS a RNS), a s tím související záněty a spáleniny a urychluje stárnutí pokožky. ROS vznikají v průběhu uvolňování energie poté, co je světlo absorbováno chromofory, jako je např. melanin v kůži. UVB záření může být absorbováno nukleovými bázemi DNA a vést k tvorbě mutagenních lézí. Tyto mutace jsou poté reparovány pomocí nukleotidové excesní opravy, v případě selhání nebo překročení kapacity



těchto oprav dochází ke kumulaci mutací v kožních buňkách a vývoji rakoviny kůže související s UV zářením.

Méně energetické, než UVB je UVA záření (315–400 nm), které proniká hlouběji do kůže, dosahuje dermis a je přítomno ve větším množství než UVB. Přestože je UVA pronikavější, způsobuje méně zjevné poškození, ale i přesto UVA generuje ROS a RNS, které mění proteiny, lipidy a DNA. Oxidační poškození významně přispívá k předčasnému stárnutí kůže a tvorbě vrásek a také nepřímo zvyšuje riziko rakoviny prostřednictvím tvorby oxidovaných bází DNA. Okamžitá pigmentace vyvolaná UVA se vyskytuje díky fotooxidaci existujícího melaninu spíše než syntézou nových pigmentů a poskytuje malou fotoprotektivní výhodu, což staví kůži do nevýhodné pozice pro budoucí vystavení slunci (19).

Viditelné světlo (angl. *visible*; VIS) (400–700 nm) představuje přibližně 50 % celkového slunečního spektra. Proniká hluboko do biologických tkání a v malém procentu dosahuje i hypodermis. Zdá se, že VIS ovlivňuje DNA prostřednictvím tvorby oxidovaných bází DNA, avšak studie provedená na buňkách čínské křečka naznačila, že přispívá k méně než 10 % celkového poškození DNA způsobeného sluneční expozicí (19,20).

Infračervené záření (angl. *infrared*; IR) má nejnižší energii a tvoří 45% podíl ve slunečním spektru. IR záření je tvořeno vlnovými délkami od 800 nm do 1 mm a je rozděleno do 3 oblastí s rostoucí vlnovou délkou, tj. IRA (700–1400 nm), IRB (1400–3000 nm) a IRC (3000 nm – 1 mm). Stejně jako UV a VIS i IR generuje tvorbu ROS v lidské kůži, ale na rozdíl od UV a VIS je však IR špatně absorbováno obvyklými kožními chromofory, jako je melanin, a je příliš slabé na to, aby přímo ovlivnilo DNA. Lidská kůže je stále víc vystavována IRA (tzv. blízké IR) záření ať už jde o přirozené sluneční záření či IRA používané pro terapeutické účely. Účinek IRA na lidskou kůži se liší dle míry její pigmentace. Lehce pigmentovaná kůže je nejzranitelnější, u lidí s tímto typem kůže dochází ke snížení syntézy kolagenu a zvýšení exprese matrixové metaloproteinázy 1 (MMP-1) a matrixové metaloproteinázy 3 (MMP-3), zatímco vliv na kolagen a MMP u vysoce pigmentované kůže je minimální, ale dochází ke stimulaci produkce melaninu. Buněčná infiltrace narušuje dermální extracelulární matici indukci MMP a mění dermální strukturní proteiny, čímž přispívá k předčasnému stárnutí kůže (19,21,22).

### 2.2.2. Chemické faktory poškození kožní bariéry

Alkohol a jeho intenzivní a nadměrný příjem lze považovat za chemický faktor poškozující kožní bariéru. Metabolismus alkoholu má za následek tvorbu acetaldehydu, který je zodpovědný za narušení střevní bariéry, a tvorbu ROS (23). Bylo zjištěno, že ethanol a aceton mohou podporovat proliferaci keratinocytů *in vitro* a mohou tak zvýšit propustnost kůže a narušit její bariérovou funkci. Ethanol má také vliv na metabolismus lipidů, jako jsou triglyceridy a cholesterol, a může tak ovlivnit i lipidové složení kožní bariéry. Studie autorů Farkase a Keményiho popisuje také zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, zvýšenou produkci tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) z monocytů a makrofágů periferní krve a zvýšenou proliferaci a aktivaci lymfocytů způsobenou dlouhodobým příjmem alkoholu. Alkohol může ovlivnit průběh kožních nemocí, např. psoriázy, a to několika mechanismy, jako jsou zvýšená náchylnost k infekcím, stimulace proliferace lymfocytů a keratinocytů a produkce prozánětlivých cytokinů. Konzumace alkoholu u pacientů s psoriázou není spojena pouze se závažnějším průběhem, ale také se závažnější formou zánětu, který je distribuován v obličeji, tříslech a flexurách nebo se projevuje hyperkeratotickými lézemi (24).

Topická aplikace ethanolu je v praxi velmi rozšířena; ethanol se uplatňuje jako rozpouštědlo v řadě léčivých/kosmetických přípravků. Lokálně aplikovaný ethanol působí jako urychlovač permeace (akcelerant), může tedy usnadnit průchod léčiv přes kožní bariéru (SC) a umožnit transdermální absorpci xenobiotik. Na druhou stranu ethanol může také vyvolat podráždění kůže nebo kontaktní dermatitidu zejména u lidí s deficitem aldehyddehydrogenázy. Obecně však lze říct, že pokud je ethanol aplikován lokálně na nepoškozenou lidskou kůži nevyvolá akutní nebo systémové toxické účinky (25).

Mezi další látky, které mohou ovlivnit funkci kožní bariéry patří povrchově aktivní látky (PAL, surfaktanty), nejčastěji mýdla a detergenty. PAL vyvolávají biochemické změny pokožky při místní aplikaci a způsobují dráždivé kožní reakce, zejména na úrovni bariérových lipidů. Tyto účinky závisí jak na absolutní koncentraci surfaktantů, tak na molárním poměru surfaktantu a lipidu. Aniontové surfaktanty jsou silně dráždivými látkami pro lidskou a zvířecí kůži. Kationtové PAL jsou přinejmenším stejně dráždivé, ale více cytotoxické než aniontové. Dráždivý potenciál neiontových PAL je nejnižší (26).

### 2.2.3. Mechanické faktory poškození kožní bariéry

Mezi mechanické síly, které mohou způsobit poškození kožní bariéry patří tlak, tření a smyk. Smykové síly jsou síly působící paralelně s kůží na rozhraní s opěrným povrchem, což má často za následek okluzi kapilár, následnou ischemii tkáně s přidruženou lokalizovanou hypoxií. Tento proces narušuje dodávku životně důležitých živin, jako je zejména kyslík. Navíc přidružená lymfatická okluze vede k akumulaci toxických metabolitů. Výsledná buněčná smrt brání jakémukoli procesu remodelace a má za následek místní rozpad měkkých tkání. Přítomnost smykových sil ve spojení s tlakem může vést ke zvýšené míře odumírání buněk způsobené zvýšeným narušením tkáně a zvýšenou okluzí krevní cévy (16,27).

Tlak představuje normálovou sílu na jednotku plochy působící na kůži. V případě, že vnější tlak bude vyšší než 33 mm Hg (což je horní hranice kapilárního tlaku v kůži), dochází k uzavírání krevních cév a pokud tlak pokračuje po kritickou dobu, dojde k buněčné smrti či nekróze měkkých tkání. Jak smykové síly, tak působení vnějšího tlaku hrají velkou roli v procesu vzniku vředu (27,28).

### 2.2.4. Atopická dermatitida

Atopická dermatitida (*exzema atopicum*; AD) je chronické, multifaktoriální zánětlivé onemocnění, často spojené s potravinovou alergií, alergickou rhinitidou, astmatem a vysokou hladinou celkových protilátek IgE i specifických IgE v séru (tzv. extrinsic forma AD). Zhruba 20 % pacientů má normální hladiny IgE v séru a netrpí alergiemi ze zevního prostředí (tzv. intrinsic forma AD). AD je komplexní onemocnění, podmíněné složitou interakcí genetické predispozice (geneticky komplexní choroba), vlivů zevního prostředí, neuro-imunologické nerovnováhy a porušené epidermální bariéry. Klinicky se AD projevuje svěděním, suchostí a zánětem kůže. Vývoj onemocnění probíhá od dětství do dospělosti a označuje se jako atopický pochod (angl. *atopic march*) (29).

U pacientů s AD jsou sníženy hladiny Cer ve SC v porovnání se zdravými jedinci. Celkové množství Cer je téměř poloviční u AD kůže ve srovnání se zdravými pacienty. Byly pozorovány snížené hladiny Cer NS s velmi dlouhým acylovým řetězcem (C24), zatímco Cer NS s kratšími řetězci (<40 celkového počtu uhlíků), byl zastoupen ve vyšší míře. Zároveň je u atopických pacientů pozorována snížená produkce ultradlouhých Cer, zejména Cer EOS. Snížené hladiny bariérových Cer korelují s charakteristickými parametry kožní bariérové funkce, jako je téměř čtyřnásobné zvýšení TEWL (30).

### 2.2.5. Psoriáza

Psoriáza patří mezi nejčastější kožní choroby a je charakterizována jako genetická, imunologická a systémová choroba. Jedinec dědí predispozici k této chorobě, ne chorobu samotnou. Nejčastěji se dává vazbě souvislost choroby na tzv. lokus PSORS 1, který se nalézá na krátkém raménku 6. chromozomu v oblasti kódující HLA I. a III. třídy. Vznik je možný v každém věku, nejčastěji však v období puberty a klimakteria. Dle vazby na HLA se klasifikují dva typy psoriázy, s vazbou na HLA postihující mladší jedince do 40. roku a bez vazby na HLA postihující jedince mezi 57. až 60. rokem života (31).

U psoriatických pacientů, stejně jako u nemocných s AD, byly pozorovány snížené hladiny bariérových lipidů. Ve studii zabývající se vztahem mezi klinickou závažností psoriázy a syntézou Cer bylo pozorováno, že u těchto pacientů dochází ke snížení syntézy Cer. Příčinou je pokles aktivity serin-palmitoyl transferázy v lézích vyskytujících se na povrchu epidermis pacientů s psoriázou. Změny v aktivitě sfingomyelinázy a glukocerebrosidázy nebyly pozorovány. Není však jasné, zda změny v aktivitě enzymů jsou příčinou vzniku onemocnění nebo zda jde o sekundární příhodu vznikající až v průběhu již existujícího onemocnění. Nemocná kožní bariéra obsahuje nižší množství Cer NP a Cer AP, naopak u těchto pacientů bylo pozorováno významné zvýšení hladin Cer NS a Cer AS. Množství Cer EOS je asi o 40 % nižší než u zdravé pokožky. Nedostatek bariérových Cer (zejména Cer EOS) se zrcadlí ve vlastnostech kožní bariéry; kůže je více propustná pro vodu a je náchylnější k poškození (14). Pomocí analýzy MALDI-TOF-MS (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of light mass spectrometry*) bylo stanoveno, že podíl Cer NH s počtem uhlíků 40 a 43 byl vyšší, avšak podíl C<sub>47</sub>-C<sub>50</sub> u Cer NH byl nižší u pacientů s psoriázou ve srovnání se zdravými jedinci. Množství Cer NH s C<sub>44</sub>-C<sub>46</sub> se také snížil. Podobné změny v hladinách Cer byly u těchto pacientů pozorováno také v případě Cer ADS/NP a Cer AP, podíl Cer ADS/NP s C<sub>38</sub>-C<sub>43</sub> a Cer AP s C<sub>38</sub>-C<sub>42</sub> se zvýšil, zatímco hladiny Cer ADS/NP s C<sub>49</sub>-C<sub>52</sub> a Cer AP s C<sub>45</sub>-C<sub>48</sub> se snížil (14,32,33).

### 2.3. Topicky podávané bariérové lipidy

Za topicky aplikované přípravky lze považovat takové přípravky, u nichž se neprojeví systémové, nýbrž lokální účinky. Takovéto přípravky (např. krémy, lotiony, masti) mohou být využívány v podávání na poškozenou kožní bariéru. Často jsou to přípravky obsahující minimálně dvě fáze (vodnou a olejovou), s nastaveným pH v kyselé oblasti a konečně s obsahem takových látek, které ovlivňují/léčí poškozenou kožní bariéru. Základním cílem všech těchto přípravků je obnovení bariérových vlastností, a to různými mechanismy. Mezi nejvýznamnější patří zvyšování obsahu vody v kůži např. pomocí tzv. humektantů, tedy hygroskopických látek poutajících vodu. Tyto hygroskopické látky se nacházejí především uvnitř korneocytů a označují se jako přirozený hydratační faktor (angl. *natural moisturizing factor*; NMF). Jsou to zejména organické sloučeniny ze skupiny polyolů schopné zadržovat vlhkost při změně vnější vlhkosti po delší dobu (např. glycerol, propylenglykol a sorbitol). Řadíme sem i látky jako jsou močovina nebo kyselina mléčná, v případě polysacharidů je to kyselina hyaluronová a její sodná sůl a chitosan. Optimálně hydratovaná kůže vykazuje ohebnost a koherentnost vrstvy SC. Ideální obsah vody se pohybuje mezi 7–10 %. Dále lze v topických přípravcích na nemocnou/poškozenou kožní bariéru aplikovat tzv. emolienty. Jedná se o hydrofobní látky, nejčastěji rostlinné (mandlový, olivový) nebo minerální oleje, zejména parafíny a vazelíny, které po rozetření na kůži vytvářejí neprodyšný film zamezující evaporaci vodní páry z těla. Dalšími látkami, které vykazují účinky připisované emolientům jsou tuk z ovčí vlny, isopropyl-palmitát, glycerol-stearát, acetylovaný/hydrogenovaný ricinový olej, cholesterol a další (34,35).

Nezastupitelnou složkou přípravků k obnově kožní bariéry se zdají být také Cer, které nahrazují chybějící lipidy u kožních onemocněních s narušenou vrstvou SC. Někdy se lze setkat i s tzv. pseudoceramidy. Jedná se o látky podobné struktury jako Cer, nicméně jejich výroba a zpracování do topických přípravků je méně ekonomicky náročné. Topicky podávané Cer jako registrované léčivé přípravky se v České republice prozatím nevyskytují. V zahraničí biofarmaceutická společnost Ceragenix Pharmaceuticals se sídlem v Coloradu vyvíjí léčivé přípravky na platformě patentovaných povrchově aktivních technologií (tzv. Skin Barrier Repair Technology a Cerageninis). Tato společnost získala roku 2006 registraci k přípravku EpiCream®. Jedná se o Cer kožní emulze bez parfemace. Bariérové lipidy jsou obsaženy v poměru Cer, konjugovaná kyselina linolová a cholesterol (3:1:1), dispergovány ve změkčujícím základu. Roli Cer zde hraje hydroxypropyl bispalmitamid monoethanolamid (MEA); jde o molekulu vytvořenou v laboratoři napodobující vlastnosti přírodních Cer, jeho

účinky by měly být srovnatelné s Cer NP. Fyziologické lipidy jsou kontinuálně dodávány pomocí řízeného uvolňování, což je dáno unikátním patentovaným systémem sestávajícím z vícesložkových mikrokuliček, které obsahují submikronové kuličky. Přípravek je indikován k léčbě suchých kožních onemocnění a ke zvládnutí a zmírnění pálení a svědění spojených s různými typy dermatóz, včetně AD, dráždivé kontaktní dermatitidy a radiační dermatitidy (36). Z výsledků studie, porovnávající účinnost ceramidového přípravku EpiCream® a krému na bázi topického kortikoidu (fluticasonu) bylo zjištěno, že v obou případech dochází ke snížení klinické závažnosti onemocnění, avšak v případě fluticasonu, můžeme toto zlepšení pozorovat dříve. Přípravek na bázi fyziologických lipidů však představují do budoucna účinnou terapii (samostatnou/doplňkovou) dětských pacientů s AD (37).

Aplikace lipidové směsi, tj. směsi Cer, cholesterolu a FFA v poměru 3:1:1 vedou k obnově kožní bariéry a ve srovnání s aplikací samotného Cer tyto směsi vykazují rychlejší proces obnovy kožní vrstvy, lipidové lamelární struktury a složení Cer ve SC (38). Existuje řada volně prodejných přípravků s obsahem Cer. Jako příklad lze uvést přípravek CeraVe®. Jedná se o krém s obsahem Cer EOP, Cer NP a Cer AP. Přípravek dále obsahuje cholesterol, volné mastné kyseliny a volnou sfingoidní bázi fytosfingosin. Ceramedx® je další přípravek obsahující esenciální Cer získané z rýžových otrub, rostlinný cholesterol a extrakt mastných kyselin s názvem Riceramide®-3. Přípravek Aveeno® vyrobený z komplexu Triple Oat Complex, Cer a bohatých změkčovadel je také bez parfemace. Dalšími přípravky jsou také SkinCeuticals Triple Lipid Restore 2:4:2, Elizabeth Arden Ceramide Capsules a Eucerin®. Dostupné jsou i kosmetické přípravky s obsahem Cer, některé jsou registrované jako zdravotnické prostředky např. Bepanthen® sensiderm krém a KAdermin® krém obsahující Cer NP.

Pseudoceramidy snižují užívání steroidů a mohou sloužit jako prevence vzplanutí onemocnění. Curel® Moisture cream obsahuje 8 % syntetického pseudoceramidu, sfingolipidu E (cetyl- propylenglykolhydroxy-ethylpalmitamid), který svými účinku odpovídá Cer 2 (39).

Neocera™ je krém se složením obsahující syntetický Cer PC-104, kyselinu glycerrhetinovou, palmitoylethanolamid MEA, protizánětlivá aktivita těchto složek pravděpodobně způsobuje inhibici proliferativní aktivity T-buněk prostřednictvím mitogenem aktivované proteinkinázy a signálních drah nukleárního faktoru kappa B (40).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Použité chemikálie a materiály

Farmaceutické suroviny *Adeps solidus*, *Alcoholum cetylicus*, *Acidum stearicum*, *Cholesterolum*, *Helianthi oleum raffinatum*, *1,3-propandiolum*, *Glycerolum 85%*, *Sorbitani monostearas*, *Polysorbatum 80*, *Glyceroli monostearas*, *Carbomerum*, *Trolaminum* byly zakoupeny od společnosti Fagron a.s. (Olomouc, Česká republika). Cer AP byl zakoupen od firmy Evonik Industries (Essen, Německo) a Cer EOS byl syntetizován a charakterizován na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové dle validovaných postupů (41). Další chemikálie jako jsou trypsin, anorganické soli pro zhotovení octanového a fosfátového pufru, polykarbonátové filtry (s průměrem pórů 0,015  $\mu\text{m}$ ) a další pomůcky byly nakoupeny u společnosti Merck – Sigma Aldrich (Schelldorf, Německo). Pro přípravu topicky podávaných formulací se použila melaminová třenka s těrkou, dále lékárenská infralampa, analytické váhy a další drobné lékárenské laboratorní pomůcky.

#### 3.2. Příprava topických formulací

Základní složení přípravku vycházelo z nutnosti připravit formulaci obsahující přirozeně se vyskytující kožní lipidy, které omezují ztrátu vody přes SC. Suroviny, které formulaci tvoří jsou částečně převzaté z literatury (42). Dalším požadavkem pro formulace byla optimální hodnota pH (cca 5,5) a také dostatečné množství vodné fáze, která by vytvořila s fází olejovou emulzní systém, ale také aby byl přípravek jednoduše aplikovatelný, tj. aby měl vhodnou konzistenci (viskozitu).

K přípravě topicky podávaných formulací (krémů) byla využita anglická metoda přípravy emulzních systémů. Do vytárované melaminové třenky s těrkou byly naváženy hydrofobní složky, včetně emulgátorů. Směs látek se opatrně roztaví pod infralampou. Vodná fáze se zahřeje na teplotu stejnou nebo mírně vyšší ( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a poté se po částech a za pomalého míchání přidává do roztavené hydrofobní fáze. Nakonec se nahradila odpařená voda a krém byl míchán do vychladnutí (43). Připravené krémy byly hodnoceny pomocí fyzikálních metod, konkrétně optické mikroskopie a rentgenové difrakce.

### 3.3. Optická mikroskopie

Optická mikroskopie je neinvazivní metoda umožňující zobrazování vzorků, tedy i topických formulací s bariérovými lipidy. Připravené topické formulace byly charakterizovány pomocí optického mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Německo). Malé množství z každé připravené formulace (přibližně 0,5 ml) bylo naneseno na podložné sklíčko a přikryto sklíčkem krycím tak, aby formulace vytvořila souvislou tenkou vrstvu. Všechny takto připravené vzorky byly hodnoceny při 100 a 200násobném zvětšení za laboratorní teploty.

Optické mikroskopy jsou tvořené objektivem, který vytváří převrácený obraz objektu. Dále obsahují okulár, který umožňuje pozorovat objekt, podobně jako pomocí lupy. Další nezbytnou součástí je zdroj světla s kondenzorem. Rozlišovací schopnost objektivu je dána vzdáleností tzv. Airyho kroužků (difrakčních obrazců vznikajících ohybem světla na výstupní pupile objektivu). Bodový objekt se zobrazuje jako jeden bod v případě, že dojde k překrývání Airyho kroužků při jejich minimální vzájemné vzdálenosti. Tuto vzdálenost definují Rayleighova kritéria a uplatňují se pouze v případě vizuálního hodnocení obrazů. Spojením těchto kritérií s teorií difrakce na kruhovém otvoru lze stanovit takovou minimální vzdálenost, která vede k rozlišení dvou bodů. Ke kvantitativní analýze obrazců lze využít mikrofotografování či videomikroskopie s následným počítačovým zpracováním (44).

### 3.4. Rentgenová difrakce

K hodnocení mikrostruktury topicky podávaných formulací byla využita rentgenová difrakce, jejíž princip je založený na ozáření vzorku monochromatickým rentgenovým (RTG) zářením. Připravené formulace byly hodnoceny za použití práškového difraktometru X'Pert PRO  $\theta$ - $\theta$  (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemí). Malé množství z připravené formulace (přibližně 2 ml) bylo převedeno do speciálního držáku (vaničky) a držák byl umístěn do pracovní části difraktometru. Samotné měření, provedené v Centrálních laboratořích VŠCHT (RNDr. Jaroslav Maixner, CSc.), bylo provedeno za laboratorní teploty.

Dopadající RTG svazek se rozptyluje na elektronech měřeného materiálu (tj. krému), elektrony v obalech atomů se rozkmitají s frekvencí odpovídající vlnové délce záření. Důsledkem interference těchto parciálních vlnění je za jistých okolností zesílení rozptýleného rentgenového záření v určitých směrech a v jiných zrušeních. Tento jev se nazývá difrakce a paprsky zesíleného záření se označují jako reflexe. Aby došlo k difrakci RTG záření, tak musí být splněné jisté podmínky, které popisuje Braggova rovnice. Ta popisuje difrakci jako odraz



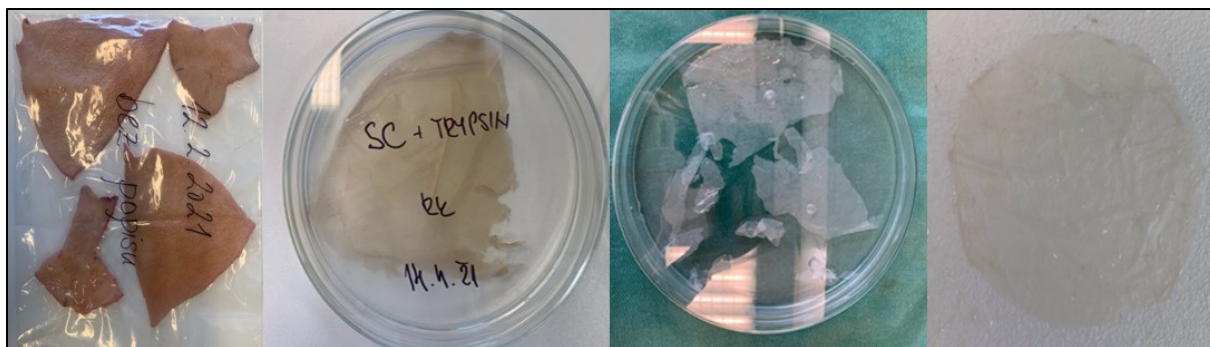
RTG záření na strukturních rovinách krystalu. Svazek rovnoběžných paprsků RTG záření o vlnové délce  $l$ , který dopadá pod úhlem  $\Theta$  (*théta*) na roviny vzdáleny od sebe o hodnotu  $d$ . K difrakci dojde v případě, že se paprsek odražený od jedné roviny zpozdí vůči paprsku odraženému od vedlejší roviny o celý násobek jeho vlnové délky. Výsledkem měření je tzv. difrakční obrazec (difraktogram) (45,46). Získané obrazce byly vyhodnoceny pomocí programu X'Pert Data Viewer (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemí).

### **3.5. Izolace a zpracování lidské kůže pro permeační experimenty**

Lidská kůže využita k izolaci SC byla získána díky spolupráci Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové se Sanatoriem Sanus a.s. v Hradci Králové (Oddělení plastické chirurgie). Použití lidské kůže bylo v souladu s Etickou komisí centra Sanus (4/5/2018) a zároveň s ní bylo nakládáno v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Všichni dárči před zákrokem poskytlí ústní a písemný informovaný souhlas (47).

Použitá kůže v tomto experimentu byla z pacientky, která podstoupila chirurgický zákrok v abdominální krajině. Kůže byla očištěna, zbavena podkožního tuku, omyta v ultračisté (Millipore) vodě a zmrazena, aby nedošlo k jejímu znehodnocení. Izolace SC se provádí dle validovaného postupu uvedeného v publikaci autorů Kligman and Christophel (48).

Kůže byla těsně před začátkem experimentu rozmrazena, a to vložením do kádinky s ultračistou vodou o teplotě 60 °C na několik vteřin. Následně byla stažena epidermis pomocí pinzet s tupým koncem, aby nedošlo k narušení její celistvosti. Oddělená epidermis od dermální části byla následně vložena do Petriho misky s fosfátovým pufrům (pH = 7,4; složení viz dále) a trypsinem a inkubována 12 hodin při teplotě  $32 \pm 0,5$  °C (*Obrázek 5*). Použití trypsinu umožňuje rozložení spodních („živých“) vrstev epidermis od její „neživé“ části, tj. SC. Poté bylo SC několikrát opláchnuto v ultračisté vodě, a nakonec několik vteřin v acetonu za účelem odstranění povrchových lipidů a dalších nečistot.



Obrázek 5. Zleva lidská kůže očištěná od podkožního tuku, epidermis v trypsinu, SC zbaveno zbylých vrstev epidermis, SC na kruhovém polykarbonátovém filtru.

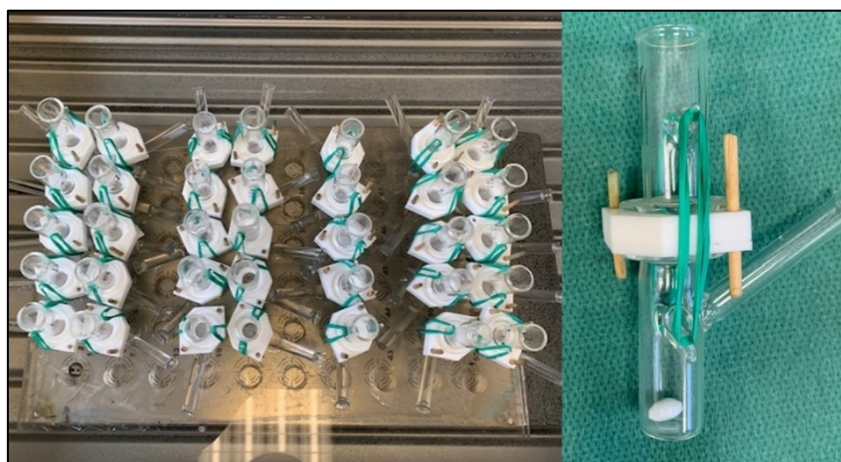
V případě modelově poškozené kožní bariéry bylo SC po očištění vloženo do Petriho misky se směsí hexan/ethanol 96% (HEX/EtOH 96%) a extrahováno nejdříve v poměru 2:1 (v/v) 30 min (resp. 2 h) a poté v poměru 1:1 (v/v) 30 min (resp. 2 h). Po definované době extrakce byly vzorky opatrně převedeny do Petriho misky s ultračistou vodou. SC bylo převedeno z vodného prostředí na podpůrný filtr s definovanými rozměry pórů, který umožnil lepší manipulaci se vzorky (Obrázek 5). Kontrolní (neextrahované SC) a poškozené modely kožní bariéry (extrahované SC) byly společně s filtry vloženy do teflonových držáků s kruhovou difuzní plochou přibližně 1 cm<sup>2</sup>.

### 3.6. Permeační experimenty

Pro hodnocení účinnosti topicky podávaných formulací na poškozenou kožní bariéru byly použity Franzovy difuzní cely (Obrázek 6). Ty jsou tvořeny dvěma svisle uspořádanými skleněnými částmi, a to horní donorovou a dolní receptorovou (akceptorovou) částí o přibližném objemu 6,5 ml (49). Obě části jsou oddělené bariérou (= SC + podpůrný filtr), která je umístěna v teflonovém držáku. Vrchní (tlustší) širší teflonová destička, která přiléhá k donorové části Franzovy cely a spodní deska přiléhá k akceptorové části Franzovy cely.

Všechny kontaktní plochy v provedeném permeačním experimentu byly promazány silikonovou pastou, která zvyšovala přilnavost jednotlivých komponent k sobě, ale zároveň zamezovala prostupu kapalin. Receptorová část Franzovy cely byla pomocí odběrového raménka naplněna fosfátovým pufrům (pH = 7,4) ve složení NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (2 mmol/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (8 mmol/l), NaCl (137 mmol/l) a KCl (2,7 mmol/l), s přidavkem gentamicin-sulfátu (50 mg/l). V akceptorové části bylo umístěno magnetické míchadlo pro zajištění homogenity akceptorové fáze cely. Takto připravené Franzovy cely byly vloženy do vodní lázně temperované na teplotu 32 °C. Propustnost modelů kožní bariéry

((ne)extrahované SC) byly před a po aplikaci topických formulací s bariérovými lipidy charakterizovány měřením TEWL a elektrické impedance.



Obrázek 6. Schématické znázornění permeačního experimentu (vlevo) a ukázka Franzovy difúzní cely, použité v permeačním experimentu s topicky podávanými formulacemi na model poškozené kožní bariéry (vpravo).

### 3.6.1. Trans-epidermální ztráta vody (TEWL)

Trans-epidermální ztráta vody (angl. *trans-epidermal water loss*; TEWL) hodnocených modelů kožní bariéry byla měřena přístrojem AquaFlux™ AF200 (Biox Systems Ltd, Londýn, Anglie) zobrazeným na *Obrázku 7*. Princip tohoto měření spočívá v měření toku vodní páry uvolňující se z určité plochy povrchu membrány či jiné bariéry. Ta je pomocí výkonného kondenzátoru přeměněna na led a následně kvantifikována v čase [ $\text{g/h/m}^2$ ] (50).

Po kalibraci přístroje se sejmula donorová část Franzovy cely a měřicí sonda se přiložila kolmo na otvor držáku tak, aby nevznikaly žádné otvory pro prostup vzduchu. Signál pro oznámení výsledku se dostavil přibližně do 2 minut od zahájení měření vzorků. V případě, že došlo k akumulaci velkého množství ledu, bylo potřeba jej odstranit. K tomu byly použity speciální tyčinky dodávané výrobcem, které jsou tvořeny měkkou špičkou. Podmínky, za kterých byla TEWL měřena, se řídila doporučením výrobce a po celou dobu byly tyto podmínky konstantní. Okolní teplota místnosti v rozmezí  $20\text{--}22 \pm 1$  °C s relativní vlhkostí nižší než 60 % (51).



Obrázek 7. Schematické znázornění měření trans-epidermální ztráty vody (TEWL) pomocí přístroje AquaFlux™.

Stanovení TEWL se provádělo u všech vzorků kožní bariéry před a po aplikaci formulace a v rámci jednoho měření byla provedena alespoň tři opakování. Při prvním permeačním experimentu se provedlo měření před aplikací formulací, tj. po 12h temperaci při 32 °C ( $t_0$ ). Poté byly na extrahované vzorky SC aplikovány formulace, které na nich byly ponechány 12 h při teplotě 32°C. Po této době byly formulace opatrně odstraněny vatovou tyčinkou, následně opláchnuty ultračistou vodou a ponechány 12h temperaci při teplotě 32 °C. Potom byla u neextrahovaných i extrahovaných vzorků SC změřena TEWL podruhé (= 12 h po odstranění formulace  $t_1$ ), potřetí (= 18 h po odstranění formulace;  $t_2$ ) a počtvrté (= 24 h po odstranění formulace;  $t_3$ ). Při druhém permeačním experimentu byly vzorky SC změřeny před aplikací ( $t_0$ ), a v časech 12 h ( $t_1$ ), 16 h ( $t_2$ ), 24 h ( $t_3$ ) a 36 h ( $t_4$ ) po odstranění topicky podaného krému.

### 3.6.2. Elektrická impedance

Elektrická impedance pokožky je přímým měřítkem propustnosti kůže a lze ji použít k hodnocení integrity pokožky a také kožní bariéry, jejího poškození a zotavení. V případě, že je kožní bariéra narušena, očekává se snížení hodnot elektrické impedance, protože transportní rychlost iontů proudících přes kůži je vyšší.

Elektrická impedance, stejně jako TEWL, byla provedena u všech studovaných vzorků kožní bariéry. K měření byl použit přístroj LCR 4080, užívající kmitočet 120 Hz. Byla provedena dvě měření, tedy před nanesením formulace a po jejím odstranění. Před samotným měřením se do horní části Franzovy cely nanoslo 500  $\mu$ l fosfátového pufru pomocí pipety po dobu 60 minut. Následně byla do plnicího raménka akceptorové části vložena první sonda LCR metru. Sonda druhá (se širším zakončením) byla vložena do donorové části Franzovy cely tak,

aby se dotýkala vzniklé vrstvy fosfátovém pufru na SC. U všech vzorků byla v rámci jednoho měření provedena dvě opakování. Výsledné hodnoty odporu membrán byly zapsány v podobě odporu membrány o definované ploše [ $k\Omega \times \text{cm}^2$ ] (52).

### 3.6.3. Infračervená spektroskopie

Infračervená (angl. *infrared*; IR) spektroskopie je nedestruktivní zobrazovací metoda, která má mimo jiné uplatnění v hodnocení organizace lipidů v kožní bariéře na molekulární úrovni (53). Principem této metody je absorpce fotonů IR záření, což vede ke změně vibračně-rotálních pohybů molekuly. IR záření je část elektromagnetického spektra v oblasti vlnových délek od 700 nm do 1000  $\mu\text{m}$  (vlnočty 12 821–10  $\text{cm}^{-1}$ ). Dle vlnočtů můžeme rozdělit IR spektrum na tři oblasti, a to na blízkou, střední a vzdálenou. Největší význam při řešení strukturálního uspořádání molekul v SC má střední IR oblast ( $2,5 \times 10^{-6}$  m do  $2,5 \times 10^{-5}$  m) (54).

Při studiu uspořádání lipidů v SC je často využívána IR spektroskopie zeslabeného úplného odrazu s Fourierovou transformací (angl. *attenuated total reflection-Fourier transform infrared*, ATR-FTIR). Principem ATR techniky je úplný odraz IR záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřicího krystalu s dostatečně vysokým indexem lomu. Svazek paprsku dopadá pod určitým úhlem na krystal, který má tvar hranolu a je tvořený např. germaniem nebo selenidem. Měřený vzorek je v těsném kontaktu s ATR krystalem a pokud vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, pak v totálně odraženém záření bude tato složka zeslabená.

Výsledkem měření je IR spektrum, což je závislost propustnosti (transmitance) T, příp. absorbance A (pozn. záporný dekadický logaritmus transmitance) na vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ). V rámci výsledného IR spektra sledujeme dva typy vibrací, tj. valenční a deformační (*Tabulka 1*). U valenčních vibrací dochází k natahování vazeb (mění se délka vazby), zatímco deformační vibrace jsou odpovědné za ohýbání vazeb. Deformační vibrace dále dělíme na rovinné (zejm. nůžkové a kývavé) a mimorovinné (zejm. vějířové a krouživé). Valenční vibrace vykazují vyšší frekvence než vibrace deformační, jelikož energie potřebná na natažení vazby je vyšší než na její ohnutí (54,55).

TYP VIBRACE	VLNOČET (CM <sup>-1</sup> )	FUNKCE/POZNÁMKA
<b>VALENČNÍ SYMETRICKÁ</b> 	2847–2855	<b>KONFORMACE ŘETĚZCŮ</b>  ALL-TRANS (<2850 CM <sup>-1</sup> ) = DOBRÉ USPOŘÁDÁNÍ  GAUCHE (>2850 CM <sup>-1</sup> ) = ZLÉ USPOŘÁDÁNÍ
<b>VALENČNÍ ASYMETRICKÁ</b> 	2915–2924	<b>KONFORMACE ŘETĚZCŮ</b>  MÉNĚ CITLIVÁ NA KONFORMAČNÍ ZMĚNY
<b>DEFORMAČNÍ NŮŽKOVÁ</b> 	DUBLET V ROZMEZÍ ~1462–1473  SINGLET V OBLASTI ~1468	<b>LATERÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ DO KRYSTALICKÉ MŘÍŽKY</b>  ORTOROMBICKÉ  HEXAGONÁLNÍ/KAPALNÉ
<b>DEFORMAČNÍ KÝVAVÁ</b> 	DUBLET V ROZMEZÍ ~720–730	<b>LATERÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ DO KRYSTALICKÉ MŘÍŽKY</b>  (ORTOROMBICKÉ/HEXAGONÁLNÍ/KAPALNÉ)

Tabulka 1. Charakteristické valenční a deformační vibrace methylenových řetězců bariérových lipidů, které lze studovat v IR spektru. V tabulce je uvedena oblast vlnočtů a informace, které lze z dané vibrace vyvodit (56,57).

Vliv topických formulací na uspořádání lipidových řetězců v modelech bylo hodnoceno pomocí IR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Vzorky SC byly po permečním experimentu vyjmuty z teflonových držáků, vysušeny v exsikátoru a po 12h temperaci (32 °C v termostatu) měřeny na ZnSe ATR krystalu za laboratorní teploty. Získaná spektra byla vyhodnocena pomocí programu OPUS.

#### **3.6.4. Zpracování výsledků**

Veškerá naměřená data určená k hodnocení integrity a stavu lidské kůže, konkrétně vrstvy SC byly zpracované pomocí programů Microsoft Excel a GraphPad. Tyto data byly následně podrobeny statistické analýze (ANOVA, t-test).

## 4. Výsledky a diskuze

Tato kapitola zahrnuje výsledky provedených experimentů, tj. přípravu topických formulací s bariérovými lipidy, jejich hodnocení a následnou aplikaci na SC, a konečně hodnocení vlastností SC před a po aplikaci topických krémů. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě grafů a tabulek, doplněny o slovní popis a diskuzi.

### 4.1. První permeační experiment

#### 4.1.1. Příprava a následná volba formulací použitých do experimentu

Tuhé lipofilní substance byly naváženy do vytárované melaminové třenky s těrku a nataveny pod infralampou. Po roztavení se postupně přidával čištěný slunečnicový olej pomocí pipety a obsah třenky se promísil. Do druhé třenky byl navážen karbomer a po částech byla k němu přidána čištěná voda (cca 2 g). Do kádinky byl navážen glycerol 85%, 1,3-propandiol a čištěná voda (5,4 g). Směs kapalin byla pomocí skleněné tyčinky přidána do třenky s karbomerovým gelem (již neutralizovaným trolaminem). Pomocí infralampy byly obě třenky zahřáty na stejnou teplotu (v případě vodné fáze i mírně vyšší). Nakonec se do lipofilní fáze po částech za pomalého míchání přidala fáze vodná (karbomerový gel s hydrofilními kapalinami). Přípravek byl důkladně míchán do vychladnutí. Vedle formulací s karbomerem byly rovněž připraveny formulace bez přísady viskozitní (Obrázek 8). Připravené formulace byly hodnoceny barevnými reakcemi (methylenová modř pro systémy o/v a Sudan III pro systémy v/o).



Obrázek 8. Ukázka jedné z připravených topických formulací, tj. polotuhých emulzí (krémů).

Celkem bylo připraveno 8 základních formulací (krémů/emulgelů/polotuhých emulzí), které se lišily přítomností viskozitní přísady, jednak typem použitého emulgátoru. Byla využita i záměna či kombinace jednotlivých emulgátorů. Složení jednotlivých formulací je uvedeno v *Tabulce 2*. Byly připraveny krémy obsahující sorbitan-monostearát + polysorbát 80 s karbomerem (A) nebo bez karbomeru (A1), dále formulace obsahující kombinaci glycerol-monostearát + polysorbát 80 s karbomerem (B), nebo bez karbomeru (B1), poté



formulace obsahující pouze polysorbát 80 s karbomerem (C), nebo bez karbomery (C1), a konečně formulace obsahující kombinaci hydrofobního sorbitan-monostearátu a glycerol-monostearátu s karbomerem (D), nebo bez karbomeru (D1).

Složení/Označení formulace	A	A1	B	B1	C	C1	D	D1
olejová fáze								
Adeps solidus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Alcoholum cetylicus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Acidum stearicum	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cholesterolum	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Helianthi oleum raffinatum	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
vodná fáze								
1,3-propandiolum	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glycerolum 85%	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Aq. purificata	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
emulgátory								
Sorbitani monostearas	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓
Polysorbatum 80	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗
Glyceroli monostearas	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✓
viskozitní přísada								
Carbomerum/Trolaminum	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗

Tabulka 2. Kvalitativní složení topických formulací se zřetelem na typ emulgátoru a použití viskozitní přísady.

Níže je uvedeno kvantitativní složení připravených formulací:

<b>Formulace A</b>	<b>10 g</b>
<i>Adeps solidus</i>	0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>	0,55
<i>Acidum stearicum</i>	0,09
<i>Cholesterolum</i>	0,08
<i>Sorbitani monostearas</i>	0,30
<i>Polysorbatum 80</i>	0,15
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>	0,20
<i>1,3-propandiolum</i>	0,50
<i>Glycerolum 85%</i>	0,50
<i>Carbomerum</i>	0,03
<i>Trolaminum</i>	0,035
<i>Aq. purificata</i>	ad 10,0

<b>Formulace A1</b>	<b>10 g</b>
<i>Adeps solidus</i>	0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>	0,55
<i>Acidum stearicum</i>	0,09
<i>Cholesterolum</i>	0,08
<i>Sorbitani monostearas</i>	0,30
<i>Polysorbatum 80</i>	0,15
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>	0,20
<i>1,3-propandiolum</i>	0,50
<i>Glycerolum 85%</i>	0,50
<i>Aq. purificata</i>	ad 10,0

<b>Formulace B</b>	<b>10 g</b>
<i>Adeps solidus</i>	0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>	0,55
<i>Acidum stearicum</i>	0,09
<i>Cholesterolum</i>	0,08
<i>Polysorbatum 80</i>	0,30
<i>Glyceroli monostearas</i>	0,15
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>	0,20
<i>1,3-propandiolum</i>	0,50
<i>Glycerolum 85%</i>	0,50
<i>Carbomerum</i>	0,03
<i>Trolaminum</i>	0,035
<i>Aq. purificata</i>	ad 10,0

<b>Formulace B1</b>	<b>10 g</b>
<i>Adeps solidus</i>	0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>	0,55
<i>Acidum stearicum</i>	0,09
<i>Cholesterolum</i>	0,08
<i>Polysorbatum 80</i>	0,30
<i>Glyceroli monostearas</i>	0,15

<i>Helianthi oleum raffinatum</i>		0,20
<i>1,3-propandiolum</i>		0,50
<i>Glycerolum 85%</i>		0,50
<i>Aq. purificata</i>	<i>ad</i>	10,0

**Formulace C** **10 g**

<i>Adeps solidus</i>		0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>		0,55
<i>Acidum stearicum</i>		0,09
<i>Cholesterolum</i>		0,08
<i>Polysorbatum 80</i>		0,45
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>		0,20
<i>1,3-propandiolum</i>		0,50
<i>Glycerolum 85%</i>		0,50
<i>Carbomerum</i>		0,03
<i>Trolaminum</i>		0,035
<i>Aq. purificata</i>	<i>ad</i>	10,0

**Formulace C1** **10 g**

<i>Adeps solidus</i>		0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>		0,55
<i>Acidum stearicum</i>		0,09
<i>Cholesterolum</i>		0,08
<i>Polysorbatum 80</i>		0,45
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>		0,20
<i>1,3-propandiolum</i>		0,50
<i>Glycerolum 85%</i>		0,50
<i>Aq. purificata</i>	<i>ad</i>	10,0

**Formulace D** **10 g**

<i>Adeps solidus</i>		0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>		0,55
<i>Acidum stearicum</i>		0,09
<i>Cholesterolum</i>		0,08

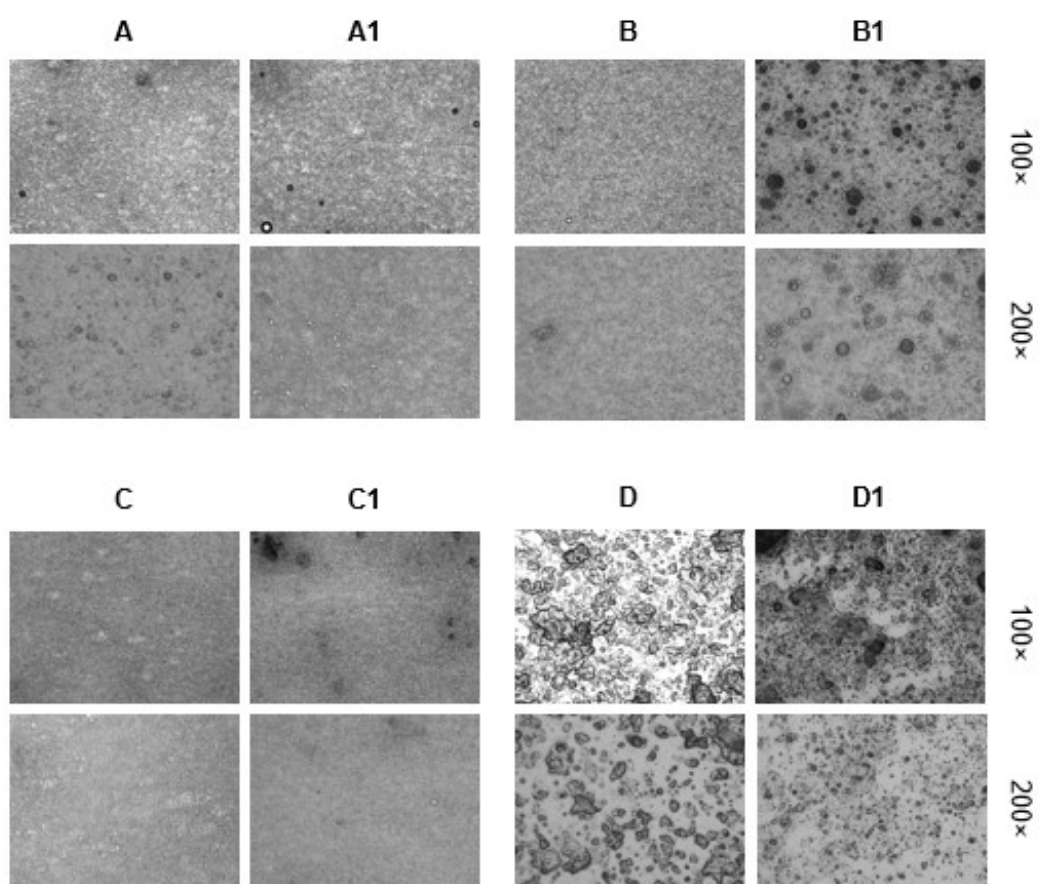
<i>Sorbitani monostearas</i>		0,30
<i>Glyceroli monostearas</i>		0,15
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>		0,20
<i>1,3-propandiolum</i>		0,50
<i>Glycerolum 85%</i>		0,50
<i>Carbomerum</i>		0,03
<i>Trolaminum</i>		0,035
<i>Aq. purificata</i>	<i>ad</i>	10,0

***Formulace D1*** **10 g**

<i>Adeps solidus</i>		0,15
<i>Alcoholum cetilicus</i>		0,55
<i>Acidum stearicum</i>		0,09
<i>Cholesterolum</i>		0,08
<i>Sorbitani monostearas</i>		0,30
<i>Glyceroli monostearas</i>		0,15
<i>Helianthi oleum raffinatum</i>		0,20
<i>1,3-propandiolum</i>		0,50
<i>Glycerolum 85%</i>		0,50
<i>Aq. purificata</i>	<i>ad</i>	10,0

Ze začátku přípravy krémů byl studován vliv hydrofilních kapalin na výsledný vzhled a konzistenci formulace. To zahrnovalo přítomnost/nepřítomnost 1,3-propandiolu, glycerolu 85% nebo obou složek. Bylo připraveno několik formulací, ve kterých bylo zastoupení těchto kapalin pozměněno či dokonce eliminováno. U těchto přípravků však nebyla pozorována výrazná vizuální změna v homogenitě. Na druhou stranu však byla pozorována nepatrně vyšší viskozita přípravků. Vzhledem k tomu, že tyto změny nebyly na kvalitu formulací značné, byly hydrofilní kapaliny pro další zpracování ve formulacích ponechány. Poté byl zkoumán vliv emulgátorů, tj. sorbitan-monostearátu, glycerol-monostearátu a polysorbátu 80, který nebyl součástí původní receptury. Polysorbát 80 (známý pod komerčním názvem Tween® 80) je ester kyseliny olejové konjugovaný s přibližně 20 jednotkami ethylenoxidu. Jde o neiontovou PAL bez zápachu a chuti s hydrofilně-lipofilní rovnováhou přibližně 15. Polysorbát 80 je schopen snižovat mezifázové napětí systému a používá se také jako solubilizátor či smáčedlo (58).

Po přípravě jednotlivých formulací byla provedena optická mikroskopie. Formulace se pozorovaly při 100× a 200× násobném zvětšení. U každé jednotlivé formulace se vytvořily alespoň dva snímky při uvedeném zvětšení. *Obrázek 9* zobrazuje mikrostrukturu formulací (A-A1, B-B1, C-C1, D-D1). V horní části (nad snímky) jsou uvedeny názvy formulací, postranní značení vlevo udává zvětšení. Je patrné, že velikost kapének u A-A1, B-B1 a C-C1 je výrazně menší než v případě formulace D-D1, nezávisle na přítomnosti/nepřítomnosti karbomeru. U těchto přípravků byla pozorována značná zrnitost, a proto formulace D a D1 nebyly použity do dalšího kroku.



*Obrázek 9. Zobrazení topických formulací (krémů) se zřetelem na typ emulgátoru a použití viskozitní přísady (karbomeru).*

Při pozorování formulací optickou mikroskopií nebyla u přípravků obsahujících viskozitní přísadu pozorována výrazná zrnitost, avšak přípravky obsahující karbomer měly pro další experimenty nežádoucí konzistenci, což by činilo přípravky obtížně aplikovatelné. Pro další část experimentu byly proto zvoleny ty formulace, které neobsahovaly viskozitní přísadu a byly založeny na kombinaci hydrofilního a hydrofobního emulgátoru, tj. formulace A1, B1

a C1. Do těchto formulací byly zapracovány Cer, tedy látky důležité pro strukturu a zachování bariérových vlastností SC, a tedy zlepšení schopnosti zadržovat vodu (59).

Nejdříve byly připraveny topické formulace obsahující Cer AP, jehož acyl mastné kyseliny (C18) je hydroxylován v poloze  $\alpha$  (A) a jehož sfingoidní báze je tvořena fytosfingosinem (P). Cer AP je schopen tvořit vysoce stabilní nanostrukturu díky svým čtyřem hydroxylovým skupinám, které vytváří silnou síť postranních vodíkových vazeb. Jeho výhodou je menší finanční náročnost v porovnání s Cer s velmi dlouhými nebo ultradlouhými řetězci, např. Cer EOS či Cer EOP. Vedle formulací s fytoceramidem byly také připraveny formulace obsahující kombinaci Cer AP a ultradlouhého Cer EOS. Cer EOS je nejčastější přirozeně se vyskytující ultradlouhý Cer ve SC. Jeho acylová část (C32) je  $\omega$ -hydroxylovaná a esterově vázaná s kyselinou linolovou (EO), sfingoidní část molekuly Cer tvoří sfingosin (S) (60).

Množství použitých Cer do formulací tvořila 0,6 % hmotnosti celého přípravku. U každého typu formulace byl připraven přípravek obsahující 0,6 % Cer AP nebo 0,6 % Cer AP + Cer EOS, jehož molární poměr byl 0,7:0,3. Pro 10g topický přípravek bylo zapotřebí 60 mg (0,6 %) bariérových Cer. Výpočet množství Cer AP a Cer EOS je uveden níže:

$$M_{(\text{prům})} = 0,7 \cdot 599,97 (\text{Cer AP}) + 0,3 \cdot 1013,0 (\text{Cer EOS}) = 723,873 \text{ g/mol}$$

a tedy množství jednotlivých Cer je

$$m_{\text{Cer AP}} = \frac{0,06}{723,873} \cdot 599,97 \cdot 0,7 = \mathbf{0,034 \text{ g na 10 g přípravku}}$$

$$m_{\text{Cer EOS}} = \frac{0,06}{723,873} \cdot 1013,0 \cdot 0,3 = \mathbf{0,026 \text{ g na 10 g přípravku}}$$

přičemž  $M_{(\text{prům})}$  odpovídá součtu součinů požadovaných molárních poměrů a molekulových hmotností Cer AP a Cer EOS; kde  $M_{\text{Cer AP}}$  odpovídá molekulové hmotnosti Cer AP a  $M_{\text{Cer EOS}}$  odpovídá molekulové hmotnosti Cer EOS.

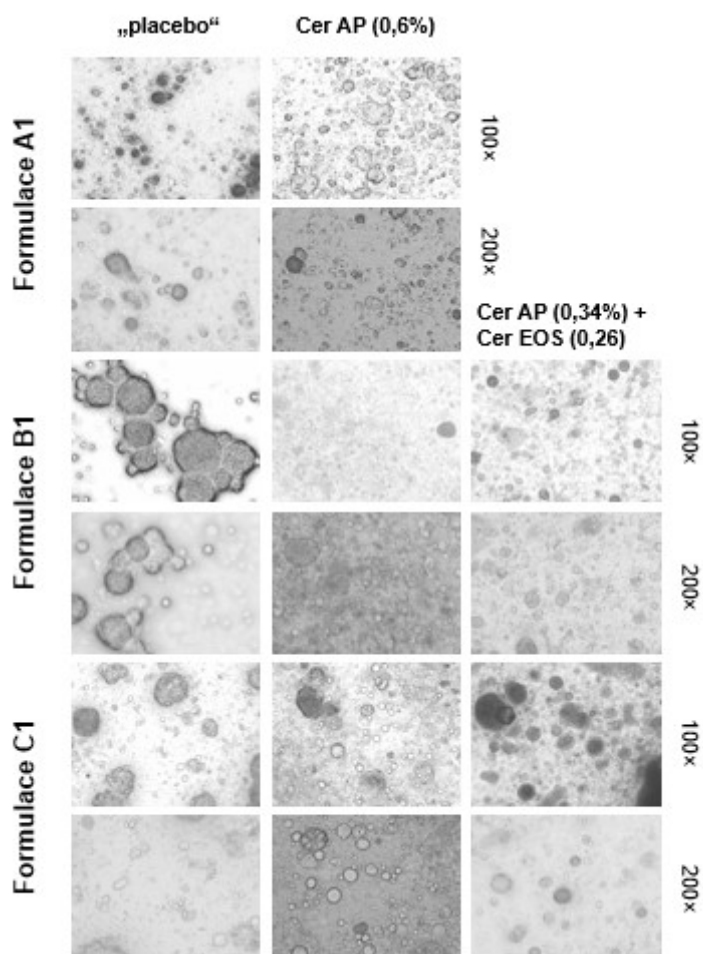
Příprava formulací s bariérovými Cer byla podobná jako u krémů bez Cer. Do natavené olejové fáze, jejíž součástí byl(y) použit(y) Cer, byla postupně emulgována fáze vodná. Zde byla čištěná voda nahrazena octanovým pufrem, který udržoval kyselé (~5,5) pH vodné fáze. Celkově byly připraveny formulace bez Cer („placebo“), dále přípravek s Cer AP a přípravek s kombinací Cer AP a Cer EOS. Kvalitativní a kvantitativní složení připravených formulací je uvedeno v *Tabulce 3*.

Složení	Formulace A1			Formulace B1			Formulace C1		
	„placebo“	Cer AP (0,6%)	Cer AP + Cer EOS (0,34%/0,26%)	„placebo“	Cer AP (0,6%)	Cer AP + Cer EOS (0,34%/0,26%)	„placebo“	Cer AP (0,6%)	Cer AP + Cer EOS (0,34%/0,26%)
Ceramidum AP	-	0,06	-	-	0,06	0,034	-	0,06	0,034
Ceramidum EOS	-	-	-	-	-	0,026	-	-	0,026
Adeps solidus	0,15	0,15	-	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55	-	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Acidum stearicum	0,09	0,09	-	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Cholesterolum	0,08	0,08	-	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Polysorbatum 80	0,15	0,15	-	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Sorbitani monostearas	0,30	0,30	-	-	-	-	-	-	-
Glyceroli monostearas	-	-	-	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Helianthi ol. raff.	0,20	0,20	-	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
1,3-propandiolum	0,50	0,50	-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Glycerolum 85%	0,50	0,50	-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sol. natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5 ad	10,0	10,0	-	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Tabulka 3. Kvantitativní a kvalitativní složení formulací bez bariérového Cer nebo s Cer AP nebo kombinací Cer AP a Cer EOS.

Po zapracování Cer AP do formulací lišících se použitými emulgátory (formulace A1, B1 a C1) byly vzniklé přípravky vizuálně hodnoceny. U formulace A1 obsahující Cer AP byla patrná větší zrnitost krému a menší homogenita ve srovnání s formulacemi B1 a C1. Proto formulace A1 s obsahem Cer AP + Cer EOS již nebyla dále připravena a formulace A1 („placebo“ a „Cer AP (0,6%)“) nebyly již dále studovány. Celkově tedy bylo připraveno 8 formulací (Obrázek 10), které byly hodnoceny pomocí optické mikroskopie. Popisky v horní části Obrázku 10 ukazují označení formulace, zatímco postranní popisek vpravo uvádí zvětšení.

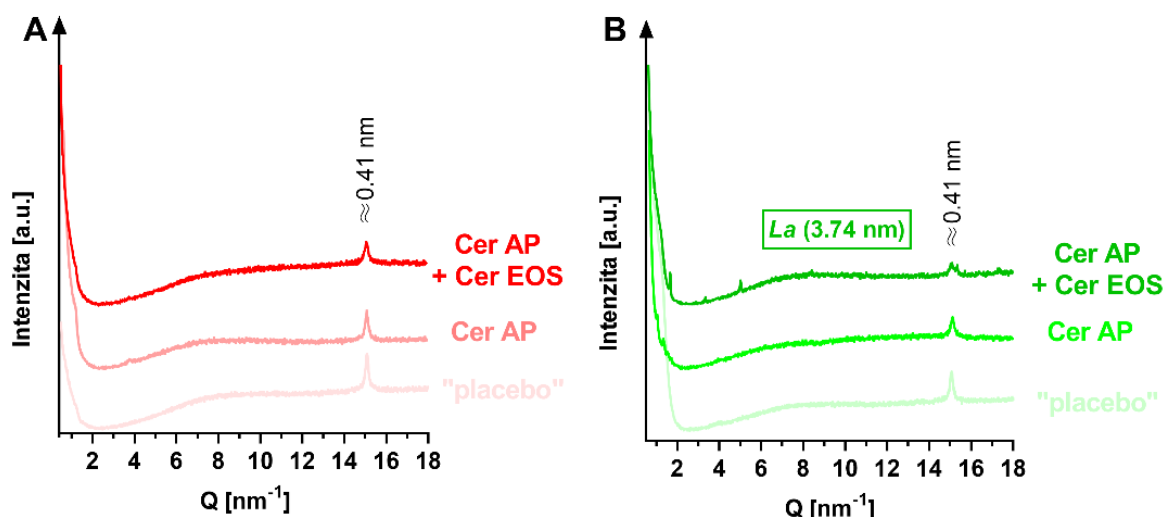
Formulace B1 „placebo“ obsahovala poměrně velké shlukující se částice, byť byl přípravek pouhým okem homogenní. Může jít o částice cholesterolu nebo oddělené olejové kapičky čištěného slunečnicového oleje či jiných komponent. Přídavek Cer AP nebo kombinace Cer AP + EOS nevedl k rozpadu emulzního systému ani vzniku zrn či nerozpuštěných částic v přípravku B1. Na obrázku jsou patrné velmi jemné a homogenní struktury obou krémů. Prakticky velmi podobnou mikrostrukturu při zvětšení 100×/200× měly formulace C1, a to jak v případě „placeba“, tak i formulací na bázi Cer AP či formulace s Cer AP a Cer EOS (Obrázek 10).



Obrázek 10. Zobrazení topických formulací bez bariérového Cer nebo s Cer AP nebo kombinací Cer AP a Cer EOS.

Připravené krémy B1 a C1 byly dále hodnoceny pomocí rentgenové difrakce, která byla provedena ve spolupráci s Centrálními laboratořemi Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Na *Obrázku 11* je zobrazen difraktogram, v jehož pravé části (oblast širokých úhlů) lze hodnotit laterální uspořádání lipidových řetězců v připravených formulacích. Ve všech difraktogramech byl nalezen difrakční pík (s přibližnou délkou 0,41 nm), který značí hexagonální uspořádání. Ve formulaci C1, která obsahuje kombinaci Cer AP a Cer EOS byla nalezená tzv. *La* fáze s periodicitou 3,74 nm. Velmi podobná mezirovinná vzdálenost byla pozorována i při studiu mikrostruktury modelových membrán SC a byla označena jako fáze separovaného fytoceramidu (61–63). Z výsledků hodnocení struktury formulací lze tedy naznačit, že u formulace C1 na bázi Cer AP a Cer EOS byla zjištěna částečná fázová separace fytoceramidu. U všech ostatních formulací nebyla tato skutečnost pozorována.





Obrázek 11. Difraktogramy topických formulací (formulace B1 na bázi glycerol-monostearátu a polysorbátu 80 v odstínech červené a formulace C1 na bázi polysorbátu 80 v odstínech zelené) bez bariérového Cer nebo s Cer AP nebo kombinací Cer AP a Cer EOS.

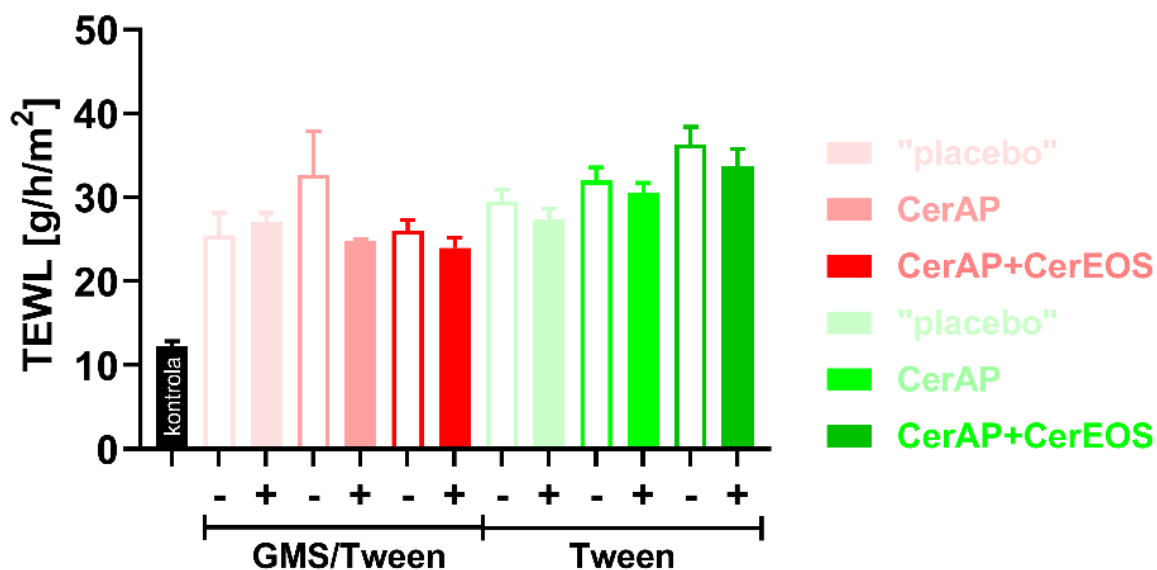
#### 4.1.2. Aplikace topických formulací na modelově poškozenou kožní bariéru

Aby se mohl studovat vliv Cer AP a Cer EOS na bariérové vlastnosti SC, bylo nutné část vzorků SC modelově poškodit. Před začátkem vlastního permeačního experimentu bylo SC extrahováno po dobu 30 min ve směsi HEX/EtOH 96%. Následně bylo SC vloženo na polykarbonátovou podpůrnou membránu (filtr), která sama o sobě nemá vliv na podporu bariérových vlastností SC, jak již bylo diskutováno ve studii zabývající se délkou Cer a jejich rolí v kožní lipidové membráně (64).

V permeačním experimentu bylo použito nativní SC jako kontrolní membrány (po pěti opakováních), tj. zdravá kožní bariéra. Na modelově poškozené (= extrahované) SC bylo pomocí speciálně upravených plastových stříkaček aplikováno 6 různých přípravků B1 („placebo“, „Cer AP (0,6%)“ a „Cer EOS (0,34%) + Cer AP (0,26%)“) a C1 („placebo“, „Cer AP (0,6%)“ a „Cer EOS (0,34%) + Cer AP (0,26%)“) po pěti opakováních. Na modelově poškozené SC bylo vždy nanášeno 0,166 g dané formulace, tedy takové množství, které odpovídalo 1 mg topicky podaného Cer AP nebo Cer AP + Cer EOS.

Výsledky TEWL v rámci prvního permeačního experimentu jsou zobrazeny na Obrázku 12. U kontroly (černé sloupce) byla změřena hodnota  $12,29 \pm 0,56$  g/h/m<sup>2</sup> (65). V případě „placebo“ formulací B1 (s obsahem glycerol-monostearátu a polysorbátu 80; světle růžové sloupky) byly naměřeny hodnoty TEWL následovně:  $25,47 \pm 0,56$  g/h/m<sup>2</sup> (před

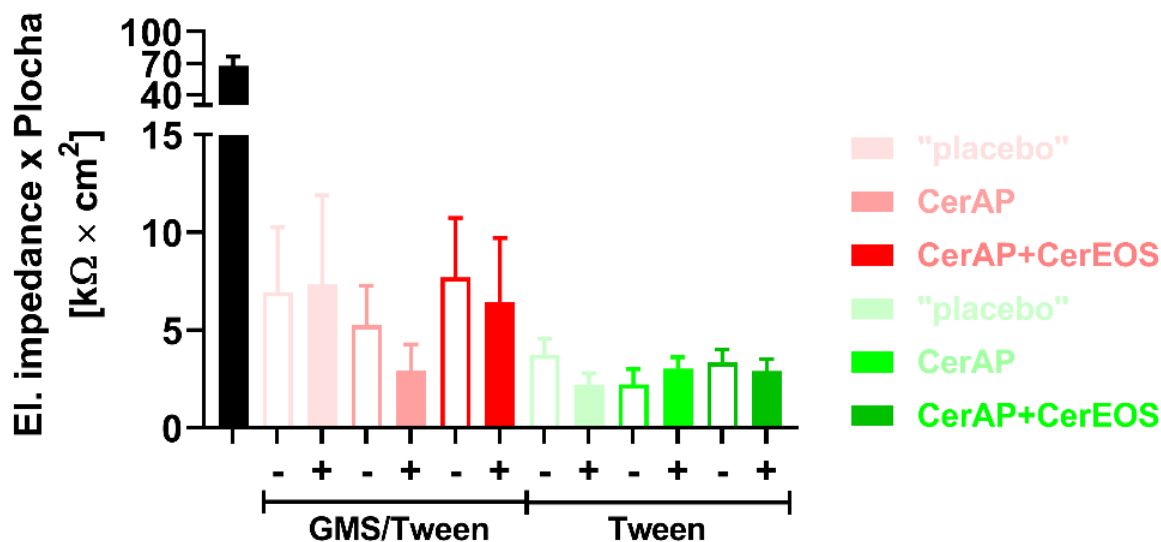
aplikaci) a  $27,10 \pm 0,56$  g/h/m<sup>2</sup> (24 h po aplikaci). Podobné hodnoty byly naměřeny i v případě formulací B1 s Cer AP ( $32,64 \pm 0,56$  g/h/m<sup>2</sup>; tmavě růžové sloupky) a Cer AP + Cer EOS ( $24,82 \pm 0,56$  g/h/m<sup>2</sup>; červené sloupky). Podobné hodnoty TEWL byly rovněž naměřeny 24 h po aplikaci formulací C1, tj. „placebo“ (světle zelené sloupky), formulace s Cer AP (neonově zelené sloupky) a formulace s Cer AP + Cer EOS (tmavě zelené sloupky), jak je uvedeno v *Obrázku 12*. Změny mezi jednotlivými hodnotami TEWL nebyly statisticky významné.



*Obrázek 12. Grafické znázornění měření TEWL [g/h/m<sup>2</sup>] v rámci prvního permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM (střední chyba průměru). Černou barvou je označena kontrola, tj. SC bez extrakce a aplikace jakékoliv formulace. Sloupky v odstínech červené patří vzorkům, na které byla aplikována formulace na bázi glycerol-monostearátu (GMS) a polysorbátu 80 (Tween®), tedy formulace B1. Sloupky v odstínech zelené patří vzorkům, na které byla aplikována formulace na bázi polysorbátu 80 (Tween®), tedy formulace C1. Bílý sloupek značí hodnotu TEWL před (znaménko mínus) a plný sloupek značí hodnotu TEWL po aplikaci příslušné formulace = měřeno 24 h po aplikaci (znaménko plus).*

Dalším permeačním parametrem byla elektrická impedance, jejíž výsledky jsou zobrazeny v grafu na *Obrázku 13*. Způsob označení vzorků se shoduje se systémem označení v rámci měření TEWL (viz výše). V grafu je hodnota elektrické impedance vztažena na jednotku plochy, tedy plochu kruhu teflonovém držáku. U kontroly (neextrahované SC; černý sloupek) byla změřena hodnota  $68 \pm 9$  k $\Omega$  × cm<sup>2</sup> (66). Pro formulace B1 byly naměřeny hodnoty elektrické impedance bez statistických rozdílů (sloupky v odstínech červené barvy). V případě formulací C1 (sloupky odstínů zelené barvy) byly hodnoty elektrické impedance nižší ve srovnání s formulacemi B1, rovněž však nebyla pozorována statisticky významná změna.

Hodnoty elektrické impedance u modelově poškozené bariéry po aplikaci formulací (24 h) C1 byly následující:  $2 \pm 9 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  („placebo“),  $3 \pm 9 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  („Cer AP (0,6%)“) a  $3 \pm 9 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  („Cer AP (0,34%) + Cer EOS (0,26%)“).

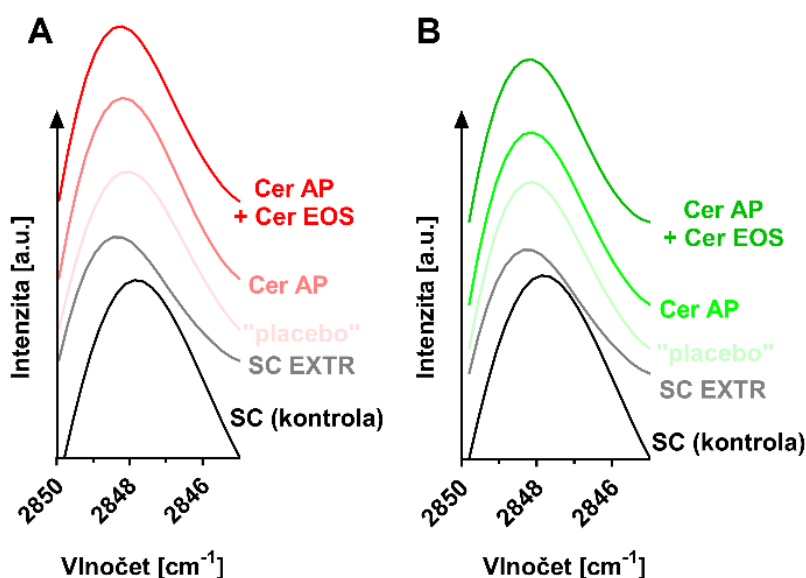


Obrázek 13. Grafické znázornění měření elektrické impedance [ $\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$ ] v rámci prvního permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru). Černou barvou je označena kontrola, tj. SC bez extrakce a aplikace jakékoliv formulace. Sloupky v odstínech červené patří vzorkům, na které byla aplikována formulace na bázi glycerol-monostearátu (GMS) a polysorbátu 80 (Tween<sup>®</sup>), tedy formulace B1. Sloupky v odstínech zelené patří vzorkům, na které byla aplikována formulace na bázi polysorbátu 80 (Tween<sup>®</sup>), tedy formulace C1. Bílý sloupek značí hodnotu elektrické impedance před (znaménko mínus) a plný sloupek značí hodnotu elektrické impedance po aplikaci příslušné formulace (znaménko plus).

Po permeačním experimentu byly vzorky SC opatrně vyjmuty z Franzových difuzních cel a vysušeny v exsikátoru po dobu 12 h. Poté byly vzorky SC převedeny do Petriho misky, kde byly hydratovány vodní parou při teplotě 32 °C po dobu 12 h. Po této době byly vzorky měřeny technikou ATR-FTIR. IR spektroskopie byla využita pro hodnocení mikrostruktury SC, tj. zda po aplikaci topických formulací došlo ke změně uspořádání lipidových řetězců ve SC. Měření bylo provedeno při laboratorní teplotě (25 °C). Pokud jsou ve studovaném vzorku kožní lipidy převážně v tzv. all-trans („cik-cak“) konformaci, jsou lipidové řetězce velmi dobře uspořádány. Toto je charakteristické tím, že hodnoty vlnočtů symetrických methylenových valenčních vibrací nejsou vyšší než  $2850 \text{ cm}^{-1}$  (67). Čím je hodnota maxima pásu vyšší, tím jsou lipidy hůře uspořádány. Pokud jsou hodnoty vlnočtů vyšší jak  $2850 \text{ cm}^{-1}$ , jsou lipidy

neuspořádaný a tvoří tzv. *gouche* konformace, což má za následek také snížení bariérových funkcí kůže. Hodnoty typické pro zdravé SC se pohybují kolem  $2848\text{ cm}^{-1}$  (67,68).

Obrázek 14 znázorňuje symetrické methylenové valenční vibrace lipidových řetězců, a to jak kontrolní membrány (černá barva), tak modelově poškozené (šedá barva) a také vibrační pásy po aplikaci formulací B1 a C1 na modelově poškozené SC. Z polohy maxima kontrolní membrány je patrné, že lipidy jsou velmi dobře uspořádaný (hodnota přibližně  $2848\text{--}2849\text{ cm}^{-1}$ ). Šedý spektrální pás, který patří modelově poškozené bariéře, tj. extrahovanému SC, je posunut k vyšším hodnotám vlnočtů, což značí horší uspořádání lipidových řetězců, a vysvětluje také zhoršení bariérové funkce SC. Po aplikaci topických formulací B1 a C1 došlo sice k poklesu maxim charakteristických vibrací, avšak tato změna nedosahuje výchozí hodnoty, jinými slovy nebyl tento pokles statisticky významný. Stejně tak nebyly viditelné statistické rozdíly mezi jednotlivými typy formulací B1 a C1.

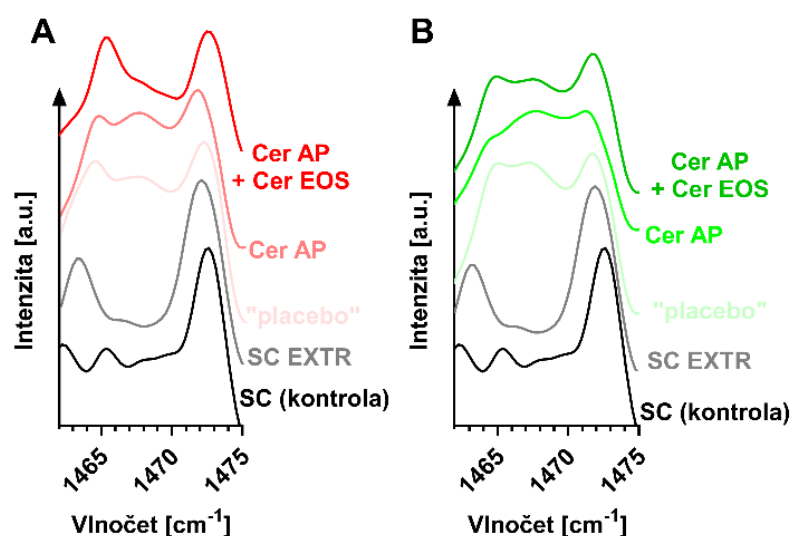


Obrázek 14. ATR-FTIR spektra znázorňující symetrické valenční vibrace methylenových skupin kontrolní modelové membrány (nativní SC; černá barva), modelově poškozené bariéry (extrahované SC; šedá barva) a modelově poškozené bariéry po aplikaci topické formulace B1 na bázi glycerol-monostearátu a polysorbátu 80 (panel A) a formulace C1 na bázi polysorbátu 80 (panel B).

Z hodnot methylenové nůžkové (deformační) vibrace (Obrázek 15), můžeme stanovit laterální uspořádání řetězců v prostoru. Za fyziologických podmínek mohou být lipidy v ortorobickém (čtvercovém) uspořádání, pro které je typické velmi těsné uspořádání lipidových řetězců. Řetězce mohou být uspořádány i volněji, a to do hexagonální či kapalné (fluidní) mřížky. Přítomnost tzv. dubletu v oblasti (vlnočty maxim přibližně  $1462$  a  $1472\text{ cm}^{-1}$ ) ve spektru vypovídá o ortorobickém uspořádání, naopak singlet (vlnočty maxima

přibližně  $1468\text{ cm}^{-1}$ ) je výsledkem hexagonálního, resp. fluidního uspořádání (viz *Tabulka 1*) (57,69).

Přítomnost dubletu lze pozorovat u všech studovaných vzorků, tj. všechny studované membrány jsou v těsném ortorombickém uspořádání. U extrahovaného SC je vidět rozšíření dubletu (šedý pás ve spektru). Po aplikaci formulací B1 je naopak možné vidět jeho zúžení, přičemž tato největší změna je patrná u formulace s obsahem Cer AP a Cer EOS. V případě, že je na extrahované SC aplikována formulace s hydrofilním polysorbátem 80 (formulace C1), k zúžení dubletu dochází, ale zároveň je možné vidět jeho proměnu v raménko a lze pozorovat i postupný nárůst hexagonálního uspořádání (centrální singlet o přibližné hodnotě  $1468\text{ cm}^{-1}$ ). U formulace C1 je tedy přítomnost dubletu méně výrazná; lipidy jsou pravděpodobně volněji uspořádány.



Obrázek 15. ATR-FTIR spektra znázorňující methylenové nůžkové vibrace kontrolní modelové membrány (nativní SC; černá barva), modelově poškozené bariéry (extrahované SC; šedá barva) a modelově poškozené bariéry po aplikaci topické formulace B1 na bázi glycerol-monostearátu a polysorbátu 80 (panel A) a formulace C1 na bázi polysorbátu 80 (panel B).

Z prvního permeačního experimentu lze shrnout několik závěrů. Topicky podávané formulace s hydrofilními kapalinami (např. glycerolem 85%) mají srovnatelné vlastnosti jako formulace, u kterých jsou tyto kapaliny nahrazeny čistěnou vodou. Pomocí optické mikroskopie byly formulace s bariérovými Cer na bázi glycerol-monostearátu a sorbitan-monostearátu, resp. sorbitan-monostearátu a polysorbátu 80, vyhodnoceny jako nevyhovující z důvodu tvorby zrn a jejich následného spojování do velkých shluků. Pomocí rentgenové difrakce byla u formulace s bariérovými Cer AP a Cer EOS na bázi polysorbátu 80 pozorována fázová separace. Modelově poškozená bariéra (extrahované SC) má po aplikaci topické formulace (bez

ohledu na použitý emulgátor) bez bariérových Cer podobné bariérové vlastnosti, jako extrahované SC, na které byla aplikována formulace s bariérovými Cer. Výsledky však nejsou zcela jednoznačné, proto byly upraveny některé podmínky a postupy, např. koncentrace bariérových lipidů ve formulacích či délka permeračního experimentu.

## 4.2. Druhý permeační experiment

### 4.2.1. Příprava a následná volba formulací použitých do experimentu

Pro další experiment byla zvolena formulace B1, tj. polotuhá emulze na bázi hydrofilního (polysorbát 80) a hydrofobního emulgátoru (glycerol-monostearát), u které byla upravena koncentrace Cer tak, aby množství aplikované formulace bylo v druhém permeačním experimentu poloviční, ale zároveň bylo zaručeno, že na modelově poškozenou kožní bariéru bude aplikováno 1 mg Cer AP (+ Cer EOS).

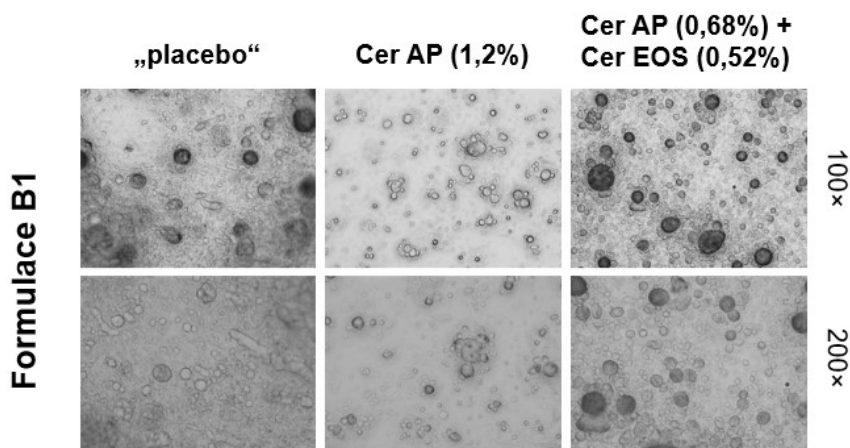
Příprava formulací do druhého permeačního experimentu probíhala ve stejném duchu jako v rámci prvního experimentu s tím rozdílem, že koncentrace Cer byla dvojnásobně větší oproti prvnímu pokusu (1,2 %) a zároveň snížení množství vodné fáze (octanového pufru). Důvodem bylo zmenšení objemu aplikované formulace na model poškozené kožní bariéry, přičemž množství aplikovaného Cer AP, resp. směsi Cer AP a Cer EOS zůstalo stejné jako v případě prvního permeačního experimentu. Poměry všech ostatních složek (zejména olejové fáze) zůstaly zachovány. Byly připraveny 3 formulace B1 založené na kombinaci polysorbátu 80 a glycerol-monostearátu, jak uvádí *Tabulka 4*.

Složení	Formulace B1		
	„placebo“	Cer AP (1.2%)	Cer AP + Cer EOS (0.68%/0.52%)
Ceramidum AP	-	0,06	0,034
Ceramidum EOS	-	-	0,026
Adeps solidus	0,15	0,15	0,15
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55	0,55
Acidum stearicum	0,09	0,09	0,09
Cholesterolum	0,08	0,08	0,08
Polysorbatum 80	0,30	0,30	0,30
Glyceroli monostearas	0,15	0,15	0,15
Helianthi ol. raff.	0,20	0,20	0,20
1,3-propandiolum	0,50	0,50	0,50
Glycerolum 85%	0,50	0,50	0,50
Sol. natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5 ad	5,0	5,0	5,0

*Tabulka 4. Kvantitativní složení formulací bez bariérového Cer nebo Cer AP nebo kombinaci Cer AP a Cer EOS, použitých v druhém permeačním experimentu.*

Po přípravě těchto formulací, která vycházela ze stejných postupů jako v případě prvního experimentu, byla provedená opět optická mikroskopie. Formulace byly pozorovány při zvětšení 100× a 200×. Na *Obrázku 16* je zobrazena mikrostruktura formulace B1 („placebo“,

„Cer AP (1,2%)“ a „Cer AP (0,68%) + Cer EOS (0,52%)“, které byly použity do druhého permeačního experimentu. V horní části nad snímky je uveden typ formulace, postranní značení vpravo pak udává zvětšení, které bylo použito. Velikost částic je přibližně stejná u všech přípravků, částice jsou relativně rovnoměrně rozvrstvené a tvoří shluky.



Obrázek 16. Zobrazení topických formulací (krémů) B1 na bázi glycerol-monostearátu a polysorbátu 80 bez bariérového Cer nebo s Cer AP nebo Cer EOS.

V důsledku časového deficitu a technických problémů s přístrojem na externím pracovišti nebylo provedeno měření mikrostruktury připravených formulací pomocí RTG difrakce.

#### 4.2.2. Aplikace topických formulací na modelově poškozenou kožní bariéru

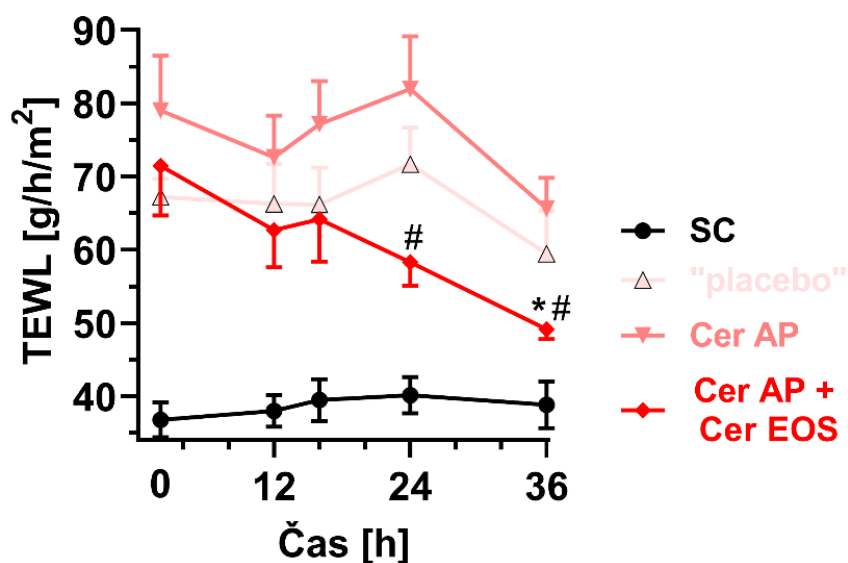
Mimo úpravu koncentrace Cer v topických formulacích byly také upraveny extrakční podmínky pro SC, za kterých byla modelově kožní bariéra poškozena. SC bylo extrahováno ve směsi HEX/EtOH 96% (2:1, v/v) po dobu 2 h a poté extrahováno další 2 h ve směsi HEX/EtOH 96% (1:1, v/v). Prodloužením extrakčního času bylo zaručeno dokonalé poškození kožní bariéry.

Na modelově poškozenou kožní bariéru bylo aplikováno poloviční množství topické formulace ve srovnání s prvním experimentem, tj. 0,083 g, přičemž množství aplikovaného Cer AP nebo Cer AP + Cer EOS bylo stejné jako v prvním případě, tedy 1 mg. Oproti prvnímu experimentu byl u druhého pokusu prodloužena délka celého experimentu, tak jak je uvedeno v metodické části práce. Pro druhý permeační experiment byly zvoleny pouze formulace B1, tj. „placebo“, formulace „Cer AP (1,2%)“ a formulace „Cer AP (0,68%) + Cer EOS (0,52%)“.

U modelů zdravé a poškozené/extrahované kožní bariéry byla měřena ztráta vody (TEWL; Obrázek 17). U kontrolních membrán (neextrahovaného SC) byla naměřena hodnota



38,54 ± 0,56 g/h/m<sup>2</sup>, která byla po celou dobu (36 h) experimentu konstantní. V případě topických formulací lze pozorovat, že po jejich aplikaci na modelově poškozenou kožní bariéru (extrahované SC) dochází k poklesu ztráty vody v čase. Je zajímavé, že po aplikaci formulace bez bariérových Cer je hodnota TEWL nižší (66,22 ± 0,56 g/h/m<sup>2</sup>) než po aplikaci formulace obsahující Cer AP, tj. 75,27 ± 0,56 g/h/m<sup>2</sup>. V případě poškozené bariéry, na kterou byl aplikován topický přípravek „Cer AP (0,68%) + Cer EOS (0,52%)“ byla naměřena nejnižší hodnota TEWL, tj. 61,16 ± 0,56 g/h/m<sup>2</sup>. Byl zaznamenán statistický významný rozdíl mezi vlivem formulací „Cer AP (1,2%)“ a „Cer AP (0,68%) + Cer EOS (0,52%)“ ve 24 a 36 hodině experimentu. Jinými slovy lze pozorovat signifikantní pokles v propustnosti bariéry po podání formulace obsahující kombinaci bariérových Cer. Statisticky významný rozdíl byl také pozorován v případě vlivu formulace „Cer AP (0,68%) + Cer EOS (0,52%)“ mezi začátkem (t = 0 h) a koncem experimentu (t = 36 h).



Obrázek 17. Grafické znázornění měření TEWL [g/h/m<sup>2</sup>] v rámci druhého permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM (střední chyba průměru), \* znázorňuje statisticky významný rozdíl po aplikaci formulace „Cer AP + Cer EOS“ mezi začátkem a koncem experimentu, # znázorňuje statisticky významný rozdíl vlivu formulací „Cer AP“ a „Cer AP + Cer EOS“.

Při druhém permeačním experimentu bylo provedeno pouze měření TEWL. V důsledku časového deficitu a technických problémů nebylo provedeno měření elektrické impedance a IR spektroskopie.

## 5. Závěr

Ceramidy jsou nedílnou součástí lidské kůže a jejich důležitost je pro život savců bezesporu velmi významná. Snížené frakce některých typů ceramidů (zejména s ultradlouhým řetězcem) byla pozorována u pacientů s atopickou dermatitidou či psoriázou, a proto lze říct, že výzkum těchto látek je pro skupinu pacientů trpící kožními onemocněními do budoucna velmi přínosná. Lékem volby v terapii těchto nemocných jsou protizánětlivě působící kortikosteroidy. Aplikace topických kortikoidů sice odstraní projevy zánětu, ale přináší s sebou řadu vedlejších účinků, ať jde o jejich imunosupresivní účinky, zvýšenou tvorbu akné, ztenčování tkáně a paradoxní snížení bariérových účinků kůže. Výše zmíněné nevýhody jsou podnětem pro intenzivní výzkum alternativních cest v léčbě poškozené kožní bariéry, jako je např. zevní podávání bariérových lipidů, a to hlavně ceramidů.

Cílem této práce bylo navrhnout a připravit poměrně jednoduchou formulaci na bázi bariérových ceramidů (s velmi dlouhým Cer AP a ultradlouhým Cer EOS), s kyselým pH vodné fáze a nenáročnou aplikací na místo podání. Dalším cílem této diplomové práce bylo hodnotit vliv formulací na bariérové vlastnosti modelově poškozené kožní tkáně. Bylo připraveno několik základních typů topicky podávaných krémů, u kterých byly hodnoceny jejich vlastnosti, jako jsou homogenita a vzhled/textura. Následně byly formulace (lišící se typem použitého emulgátoru) hodnoceny v permeačním experimentu na poškozené kožní bariéře (rohové vrstvě lidské kůže) dle validovaných postupů. Na základě získaných výsledků z prvního permeačního experimentu, kde nebyly pozorovány statistické změny, byla navržena úprava koncentrace bariérových Cer vybrané formulace, dále byly pozměněny extrakční podmínky rohové vrstvy kůže a konečně délka permeačního experimentu. Po aplikaci topických krémů v druhém permeačním experimentu bylo pozorováno, že přídavek bariérových lipidů statisticky snižuje propustnost modelově poškozené kožní bariéry. Tato skutečnost otevírá cestu k dalšímu studiu topicky podávaných přípravků s ceramidy. Výsledky této diplomové práce mohou najít uplatnění ve vývoji topicky podávaných formulací s bariérovými lipidy a být vhodným podkladem pro studium poškozené kožní bariéry a potenciálních cest jejího efektivního obnovení.

## 6. Použité zkratky

AD	atopická dermatitida
ATR-FTIR	IR spektroskopie zeslabeného úplného odrazu s Fourierovou transformací (angl. <i>attenuated total reflection-Fourier transform infrared</i> )
Cer	ceramid(y)
IR	infračervené záření
LPP	fáze s dlouhou periodicitou (angl. <i>long periodicity phase</i> )
MALDI-TOF-MS	(angl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of light mass spektrometry</i> )
MMP	matrixová metaloproteináza
NMF	přirozené hydratační faktory (angl. <i>natural moisturtizing factors</i> )
PAL	povrchově aktivní látky
ROS	reaktivní formy kyslíku
RON	reaktivní formy dusíku
RTG	rentgenové záření
SC	rohová vrstva (lat. <i>stratum corneum</i> )
SPP	fáze s krátkou periodicitou (angl. <i>short periodicity phase</i> )
TEWL	ztráta vody přes membránu (angl. <i>trans-epidermal water loss</i> )
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (angl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné světlo

## 7. Literatura

1. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res.* únor 1983;24(2):120–30.
2. Kittnar O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada; 2011. 790 s.
3. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control.* prosinec 2006;34(10):S98–110.
4. Čihák R. *Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání*. Grada Publishing, a.s.; 2016. 832 s.
5. Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada; 2003. 771 s.
6. Benson HAE, Watkinson AC. *Topical and Transdermal Drug Delivery Principles and Practice* [Internet]. 2012 [citován 4. leden 2022]. Dostupné z: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:101:1-201411068307>
7. *The Structure of Human Skin* [Internet]. Dostupné z: <https://pcaskinacademy.com/skin-intelligence/skin-anatomy-and-physiology/>
8. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. Praha: Grada; 2012. 556 s.
9. Vávrová K, Hrabálek A. Role ceramidů v kůži. *Prakt Lékáren.* 2006;(2):55–8.
10. Martínek J. *Histologický atlas*. Praha: Grada; 2009.
11. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm.* říjen 2012;435(1):3–9.
12. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* březen 2014;1841(3):295–313.
13. Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, Bras W, Portale G, Caspers PJ, et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res.* prosinec 2012;53(12):2755–66.
14. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* září 1993;1182(2):147–51.
15. Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol.* září 2018;45(9):1044–52.
16. Bryant RA, Nix DP. *Acute & chronic wounds current management concepts*. 2016.
17. Vojáčková N. Dry skin: possible causes and everyday care options. *Dermatol Praxi.* 20. listopad 2020;14(4):188–92.

18. Lacatusu I, Badea N, Murariu A, Bojin D, Meghea A. Effect of UV Sunscreens Loaded in Solid Lipid Nanoparticles: A Combined SPF Assay and Photostability. *Mol Cryst Liq Cryst.* 25. květen 2010;523(1):247/[819]-259/[831].
19. Dupont E, Gomez J, Bilodeau D. Beyond UV radiation: A skin under challenge. *Int J Cosmet Sci.* červen 2013;35(3):224–32.
20. Kielbassa C. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis.* 1. duben 1997;18(4):811–6.
21. McDaniel D, Farris P, Valacchi G. Atmospheric skin aging-Contributors and inhibitors. *J Cosmet Dermatol.* duben 2018;17(2):124–37.
22. Hladíková M, Štourač P. Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Čes Slov Neurol Neurochir - Číslo.* 2008;(5):530–6.
23. Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radek KA, Jones MK, et al. Alcohol Exposure and Mechanisms of Tissue Injury and Repair: ALCOHOL, TISSUE INJURY, AND REPAIR. *Alcohol Clin Exp Res.* březen 2011;35(3):392–9.
24. Svanström C, Lonne-Rahm S-B, Nordlind K. Psoriasis and alcohol. *Psoriasis Targets Ther.* srpen 2019;Volume 9:75–9.
25. Lachenmeier DW. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol.* 2008;3(1):26.
26. Effendy I, Maibach HI. Detergent and skin irritation. *Clin Dermatol.* leden 1996;14(1):15–21.
27. de Wert LA, Bader DL, Oomens CWJ, Schoonhoven L, Poeze M, Bouvy ND. A new method to evaluate the effects of shear on the skin: The effects of shear on the skin. *Wound Repair Regen.* 12. listopad 2015;23(6):885–90.
28. Agrawal K, Chauhan N. Pressure ulcers: Back to the basics. *Indian J Plast Surg.* květen 2012;45(02):244–54.
29. Pánková R. Atopická dermatitida - co je nového? *Solen.* 2014;5(15):257–63.
30. Ito S, Ishikawa J, Naoe A, Yoshida H, Hachiya A, Fujimura T, et al. Ceramide synthase 4 is highly expressed in involved skin of patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* leden 2017;31(1):135–41.
31. Benáková N. Psoriáza a současné léčebné možnosti. *Interní Medicína.* 2005;2(7):88–91.
32. Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, et al. Interferon- $\gamma$  Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J Invest Dermatol.* březen 2014;134(3):712–8.
33. Cho Y, Lew B-L, Seong K, Kim N-I. An Inverse Relationship Between Ceramide

- Synthesis and Clinical Severity in Patients with Psoriasis. *J Korean Med Sci.* 2004;19(6):859.
34. Chalupová Z, Masteiková R. Hydratace kůže a kosmetické prostředky. *Solen.* 2006;4(2):192–4.
  35. Zeichner JA, Del Rosso JQ. Multivesicular Emulsion Ceramide-containing Moisturizers: An Evaluation of Their Role in the Management of Common Skin Disorders. *J Clin Aesthetic Dermatol.* prosinec 2016;9(12):26–32.
  36. Primus Pharmaceuticals Inc. EpiCeram® [package insert]. Scottsdale, AZ; 2018.
  37. Sugarman JL, Parish LC. Efficacy of a lipid-based barrier repair formulation in moderate-to-severe pediatric atopic dermatitis. *J Drugs Dermatol JDD.* prosinec 2009;8(12):1106–11.
  38. Fujii M. The Pathogenic and Therapeutic Implications of Ceramide Abnormalities in Atopic Dermatitis. *Cells.* 10. září 2021;10(9):2386.
  39. Seghers AC, Cai SC, Ho MSL, Giam YC, Tan L, Grönhagen CM, et al. Evaluation of a Pseudoceramide Moisturizer in Patients with Mild-to-Moderate Atopic Dermatitis. *Dermatol Ther.* červen 2014;4(1):83–92.
  40. Draelos ZD, Raymond I. The Efficacy of a Ceramide-based Cream in Mild-to-moderate Atopic Dermatitis. *J Clin Aesthetic Dermatol.* květen 2018;11(5):30–2.
  41. Opálka L, Kováčik A, Sochorová M, Roh J, Kuneš J, Lenčo J, et al. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org Lett.* 6. listopad 2015;17(21):5456–9.
  42. Lee SE, Jung MK, Oh SJ, Jeong SK, Lee SH. Pseudoceramide stimulates peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression in a murine model of atopic dermatitis: molecular basis underlying the anti-inflammatory effect and the preventive effect against steroid-induced barrier impairment. *Arch Dermatol Res.* listopad 2015;307(9):781–92.
  43. Šklubalová Z a kol. Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie. [Internet]. 2020 [citován 9. leden 2022]. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=2431262>
  44. Plašek J. Nové pokroky optické mikroskopie. *Pokroky Mat Fyziky Astron.* 1996;(41):1–24.
  45. Kratochvíl B, Hušák M, Brynda J, Sedláček J. CO NABÍZÍ SOUČASNÁ RTG STRUKTURNÍ ANALÝZA? *Chem Listy.* 2008;889–901.
  46. Mališ J. Analytické metody v mineralogii. :1–17.

47. Gelker M, Müller-Goymann CC, Viöl W. Permeabilization of human stratum corneum and full-thickness skin samples by a direct dielectric barrier discharge. *Clin Plasma Med.* březem 2018;9:34–40.
48. Kligman AM. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch Dermatol.* 1. prosinec 1963;88(6):702.
49. Kotingová L, Borská L. TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE CHEMICKÝCH LÁTEK IN VITRO. *Chem Listy.* 2009;7.
50. Imhof RE, Xiao P, Berg EP, Ciortea LI. RAPID MEASUREMENT OF TEWL WITH A CONDENSER-CHAMBER INSTRUMENT. :7.
51. Rogiers V. EEMCO Guidance for the Assessment of Transepidermal Water Loss in Cosmetic Sciences. *Skin Pharmacol Physiol.* 2001;14(2):117–28.
52. Fasano WJ, Hinderliter PM. The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol In Vitro.* říjen 2004;18(5):725–9.
53. J. Moore, Mark E. Rerek D. Insights into the Molecular Organization of Lipids in the Skin Barrier from Infrared Spectroscopy Studies of Stratum Corneum Lipid Models. *Acta Derm Venereol.* 10. květen 2000;80(0):16–22.
54. Kania P. INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE. :31.
55. McMurry J. *Organická chemie.* 1. 2015.
56. Rouessac F, Rouessac A. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques.* 2. ed., repr. Chichester Weinheim: Wiley; 2007. 574 s.
57. Garidel P, Fölting B, Schaller I, Kerth A. The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: Mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem.* srpen 2010;150(1–3):144–56.
58. Su R, Yang L, Wang Y, Yu S, Guo Y, Deng J, et al. Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide IIIB. *Int J Nanomedicine.* červenec 2017;Volume 12:5203–21.
59. Engelbrecht T, Hauß T, Süß K, Vogel A, Roark M, Feller SE, et al. Characterisation of a new ceramide EOS species: synthesis and investigation of the thermotropic phase behaviour and influence on the bilayer architecture of stratum corneum lipid model membranes. *Soft Matter.* 2011;7(19):8998.
60. Eichner A, Sonnenberger S, Dobner B, Hauß T, Schroeter A, Neubert RHH. Localization of methyl-branched ceramide [EOS] species within the long-periodicity phase in stratum corneum lipid model membranes: A neutron diffraction study. *Biochim*

- Biophys Acta BBA - Biomembr. listopad 2016;1858(11):2911–22.
61. Kováčik A, Pullmannová P, Opálka L, Šilarová M, Maixner J, Vávrová K. Effects of (R)- and (S)- $\alpha$ -Hydroxylation of Acyl Chains in Sphingosine, Dihydrosphingosine, and Phytosphingosine Ceramides on Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Models. *Int J Mol Sci.* 12. červenec 2021;22(14):7468.
  62. 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.* 21. březen 2017;33(11):2890–9.
  63. Kováčik A, Vogel A, Adler J, Pullmannová P, Vávrová K, Huster D. Probing the role of ceramide hydroxylation in skin barrier lipid models by <sup>2</sup>H solid-state NMR spectroscopy and X-ray powder diffraction. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* květen 2018;1860(5):1162–70.
  64. Školová B, Janůšová B, Zbytovská J, Gooris G, Bouwstra J, Slepíčka P, et al. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir.* 17. prosinec 2013;29(50):15624–33.
  65. Machado M, Salgado TM, Hadgraft J, Lane ME. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int J Pharm.* leden 2010;384(1–2):73–7.
  66. Lu F, Wang C, Zhao R, Du L, Fang Z, Guo X, et al. Review of Stratum Corneum Impedance Measurement in Non-Invasive Penetration Application. *Biosensors.* 26. březen 2018;8(2):31.
  67. Mendelsohn R, Moore DJ. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem Phys Lipids.* listopad 1998;96(1–2):141–57.
  68. Wohlrab J, Vollmann A, Wartewig S, Marsch WC, Neubert R. Noninvasive characterization of human stratum corneum of undiseased skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis as studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Biopolymers.* 2001;62(3):141–6.
  69. Školová B, Janůšová B, Vávrová K. Ceramides with a pentadecasphingosine chain and short acyls have strong permeabilization effects on skin and model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* únor 2016;1858(2):220–32.