

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Skin Barrier Research Group



Marie Svobodová

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

Hradec Králové 2023

Prohlášení

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

V Hradci Králové 2023

Marie Svobodová

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli doc. PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za jeho profesionální vedení, odborné rady a vstřícný přístup během vypracování experimentální části a jeho velkou trpělivost a čas, který mi věnoval. Poděkovat bych chtěla i dalším členům Skin Barrier Research Group za jejich zkušené rady a ochotu pomoci, ostatním kolegům z pracovní skupiny Skin Barrier Research Group a dalším pracovníkům Katedry farmaceutické technologie a Katedry organické a bioorganické chemie. Na závěr moc děkuji své rodině a přátelům za velkou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: Marie Svobodová

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

Název diplomové práce: Studium a hodnocení topicky podávaných ceramidů na poškozenou kožní bariéru

Kůže je největším orgánem lidského těla a plní několik klíčových funkcí, jako je například ochrana těla před vnějšími vlivy nebo regulace teploty. Zdravá kůže je schopna udržet integritu a stabilitu organismu díky své komplexní struktuře. Kůže je složena z několika vrstev buněk, vč. *stratum corneum* (SC), která tvoří vlastní ochrannou bariéru.

Ceramidy (CER) jsou jedním z hlavních typů bariérových lipidů, které se nacházejí právě ve SC. Tyto lipidové molekuly vytváří spolu s dalšími lipidy hydrofobní matici, která chrání pokožku před vysycháním a dalšími vnějšími vlivy. Nedostatek CER v kožní bariéře vede k narušení funkce kožní bariéry a zhoršení stavu pokožky. To souvisí s mnoha onemocněními, jako jsou dermatitidy, psoriáza a další. Studium CER ve SC je důležité proto, abychom pochopili mechanismy ochrany pokožky, a také vývoj nových terapeutických přístupů k léčbě kožních onemocnění.

Jednou z možných cest léčby kožních nemocí je topické podání bariérových lipidů, zejména CER. Proto cílem této práce bylo připravit formulace obsahující CER a posoudit jejich vliv na modelově poškozenou SC; konkrétně byly studovány CER AP a CER EOS. Bylo vytvořeno několik emulzních formulací (přípravků), u kterých byl zkoumán vliv jednotlivých složek a koncentrace CER na stabilitu formulací. Jednotlivé přípravky byly hodnoceny optickou mikroskopií a vliv bariérových lipidů na modelově poškozenou kožní tkáň byl popsán transepidermální ztrátou vody (TEWL) a infračervenou spektroskopií. V této práci byly provedeny tři permeační experimenty a výsledky ukazují, že lipidy topických formulací pronikají do poškozené SC, ale hodnoty TEWL nenaznačují statistické zlepšení bariérových vlastností této bariéry. Rovněž bylo zjištěno, že topicky podávané lipidy statisticky nezhoršují uspořádání lipidových řetězců v modelech SC.

Tato práce by mohla být základem ve studiu složení formulací a přispět tak k lepšímu poznání vlivu CER na poškozenou SC. To by mohlo přispět k tomu, abychom snáze našli jejich uplatnění v terapii patofyziologických procesů v kožní bariéře.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Marie Svobodová

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

Title of diploma thesis: Study and Evaluation of Topically Applied Ceramides onto Disrupted Skin Barrier

Skin is the largest organ of the human body and serves several key functions, such as protection against external influences and regulation of body temperature. Healthy skin is able to maintain the integrity and stability of the organism due to its complex structure. The skin is composed of several layers of cells, including the stratum corneum (SC), which forms the main protective barrier.

Ceramides (CER) are one of the main types of barrier lipids found in the SC. These lipid molecules, along with other lipids, create a hydrophobic matrix that protects the skin from dehydration and other external influences. The lack of CER in the skin barrier leads to the disruption of its function and the worsening of the skin condition. This is associated with many diseases, such as dermatitis, psoriasis, and others. The study of CER in the SC is important to understand the mechanisms of skin protection and to develop new therapeutic approaches for the treatment of skin diseases.

Topical administration of barrier lipids, especially CER, is one possible treatment route for skin diseases. Therefore, the aim of this work was to prepare formulations containing CER and assess their effect on modelled damaged SC; specifically, CER AP and CER EOS were studied. Several emulsion formulations were prepared, and the effect of individual components and CER concentration on the stability of the formulations was investigated. The individual formulations were evaluated by optical microscopy, and the effect of barrier lipids on modelled damaged skin tissue was described by transepidermal water loss (TEWL) and infrared spectroscopy. Three permeation experiments were performed in this work, and the results show that lipids from topical formulations penetrate into damaged SC, but the TEWL values do not indicate statistical improvement of the barrier properties of this barrier. It was also found that topically applied lipids do not statistically worsen the arrangement of lipid chains in SC models.

This work could serve as a basis for changing the composition of formulations and thus contribute to a better understanding of the impact of CER on damaged SC. This could facilitate their use in the therapy of pathophysiological processes in the skin barrier.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. KŮŽE	9
2.1.1. <i>Funkce</i>	9
2.1.2. <i>Hypodermis</i>	10
2.1.3. <i>Dermis</i>	10
2.1.4. <i>Epidermis</i>	11
2.1.5. <i>Lipidy ve stratum corneum</i>	12
2.1.5.1. <i>Ceramidy</i>	12
2.1.5.2. <i>Cholesterol</i>	13
2.1.5.3. <i>Volné mastné kyseliny</i>	14
2.1.6. <i>Lamelární a laterální organizace lipidů ve stratum corneum</i>	14
2.1.7. <i>Onemocnění spojená s poškozením kožní bariéry</i>	15
2.1.7.1. <i>Atopická dermatitida (AD)</i>	15
2.1.7.2. <i>Psoriáza (Lupénka)</i>	16
2.1.8. <i>Topické podávání bariérových lipidů</i>	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	19
3.2. PŘÍPRAVA TOPICKÝCH FORMULACÍ	20
3.3. OPTICKÁ MIKROSKOPIE	24
3.4. IZOLACE A ZPRACOVÁNÍ LIDSKÉ KŮŽE PRO PERMEAČNÍ EXPERIMENTY	25
3.5. PERMEAČNÍ EXPERIMENTY	26
3.5.1. <i>Franzovy difúzní cely</i>	26
3.5.2. <i>Transepidermální ztráta vody (TEWL)</i>	27
3.5.3. <i>Infračervená spektroskopie</i>	29
3.5.4. <i>Zpracování výsledků</i>	31
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1. PRVNÍ PERMEAČNÍ EXPERIMENT	32
4.1.1. <i>Příprava a charakterizace formulací</i>	32
4.1.2. <i>TEWL modelů kožní bariéry před a po aplikaci formulací</i>	37
4.2. DRUHÝ PERMEAČNÍ EXPERIMENT	39

4.3. TŘETÍ PERMEAČNÍ EXPERIMENT	41
5. ZÁVĚR.....	44
6. POUŽITÉ ZKRATKY.....	45
7. LITERATURA	46

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Zdravá pokožka je selektivně propustná bariéra organismu pro vodu, větší molekuly skrze ni nemohou za fyziologických podmínek procházet. Tak tomu však není u kožních onemocnění, u nichž dochází k poškození vlastní kožní bariéry, tedy rohové vrstvy. Hrozí tak opakované záněty a další problémy, které jsou důsledkem špatného složení a obsahu důležitých látek v epidermis, jako jsou bariérové lipidy, zejména ceramidy, jejichž hladiny jsou u kožních nemocí sníženy. Lékem volby u těchto nemocí bývají topicky podávané kortikoidy, které sice zmírňují zánět, ale jejich dlouhodobé používání může vést ke zhoršení bariérových funkcí kůže. Právě proto je důležité najít způsob, kterým by se bariérové lipidy mohly lokálně aplikovat, doplnit chybějící spektrum bariérových lipidů a přispět tak ke zlepšení stavu pacientů s onemocněními.

V této diplomové práci jsem navázala na výsledky práce PharmDr. Roksolany Kulhánkové, která v rámci své diplomové práce navrhla směs topicky podávaných lipidů. Tato formulace obsahuje bariérové lipidy, včetně ceramidů, které jsou esenciální pro správnou funkci lidské kůže. Cílem mé práce tedy byla úprava, zjednodušení složení topicky podávané formulace na bázi bariérových lipidů a zvýšení jejího účinku na bariérové vlastnosti modelově poškozené kožní bariéry. To by mělo vést ke snížení negativních projevů poškozené kožní bariéry, jako jsou vysoké hodnoty transepidermální ztráty vody nebo neuspořádanost lipidových řetězců. Vliv ceramidů na obnovu kožní bariéry touto formulací bylo popsáno permeačními parametry jako je ztráta vody a uspořádání bariérových lipidů v lipidové matici rohové vrstvy bylo hodnoceno infračervenou spektroskopií za využití deuteriem značených lipidových řetězců.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kůže

Kůže savců (člověka) je velký plošný orgán, tvořící bariéru organismu vůči okolí, její povrch tvoří u dospělého člověka téměř 2 m². Její tloušťka se odvíjí od místa výskytu od 0,5 mm do 4 mm. Nejtenčí je kůže například na očních víčkách a nejsilnější na zádech. Co se týká hmotnosti, pohybuje se kolem 3 kilogramů. Obsahuje-li však velký objem podkožního tuku, může mít až 20 kilogramů. [1, 2]

2.1.1. Funkce

Kůže chrání organismus před škodlivými vlivy prostředí, ať už to jsou chemické látky, různé druhy záření nebo mikroorganismy. Obrannou funkci lze rozdělit na fyzikální, chemickou a biologickou. Fyzikální bariéra zajišťuje mechanickou ochranu, a to díky hydratované rohové vrstvě, desmozomům, keratinocytům a také podkožní tukové tkáni. Za fyzikální bariéru se také považuje přirozená fotoprotekce před ultrafialovým (angl. *ultraviolet*; UV) zářením. To je zaručeno kožním pigmentem melaninem, betakarotenem a aminokyselinami, které jsou schopny UV záření absorbovat a rohová vrstva je schopna část záření odrazit. Elektrická bariéra je zajištěna rohovou vrstvou, která má elektronegativně nabitý povrch, a Szakallovou membránou (mezi rohovou a zrnitou vrstvou epidermis; viz dále), jež funguje jako elektrický dipól, proto je pro nabité částice penetrace kůží ztížena. Chemická bariéra je dána kyselostí kožního povrchu, jehož pH bývá 4–6. Kyselost se může mírně lišit podle místa na těle. Biologickou bariéru umožňuje samočistící schopnost kůže, a i kyselé pH. [1, 3, 4]

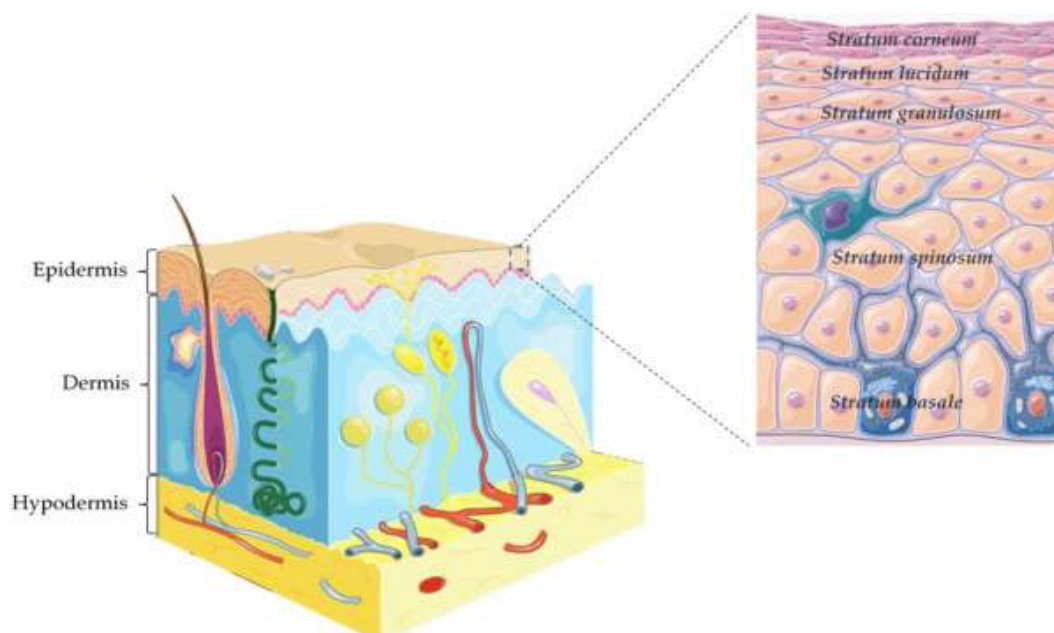
Sekreční funkce je důležitá z hlediska termoregulace organismu, což je možné díky sekreci potu (lat. *sudor*). Tělo se tak zbavuje přebytečné vody z organismu a ochlazuje kožní povrch. Pot se vylučuje ekrinními a apokrinními žlázami na celém těle. Jedná se o hypotonický sekret, který obsahuje sodné, draselné, chlorné i vápenaté ionty, dále pak fosfáty, aminokyseliny, glukózu atd. Neměl by obsahovat bílkoviny, enzymy ani tuky. Sekrece mazu (lat. *sebum*) je zprostředkována mazovými žlázami. Maz je olejovité konzistence, obsahuje triglyceridy, voskové/sterolové estery, skvalen a některé volné mastné kyseliny (angl. *free fatty acids*, FFA) a na povrchu kůže vytváří ochranný tukový film. [4]

Senzorická funkce je zprostředkována pomocí receptorů doteku, tlaku, teploty a bolesti. Organismus díky ní získává informace o zevním i vnitřním prostředí.

Termoregulační funkce je neméně důležitou funkcí. Termoregulaci ovlivňují změny průtoku krve cévami, pocení a odpařování vody. Metabolická funkce kůže se týká především metabolismu sacharidů, tuků i bílkovin. Kromě toho zde probíhá i přeměna provitaminů na vitamín D. Imunologická funkce je významná, zejména proto, že kůže se dostává do kontaktu s antigeny velmi často. Tuto funkci zajišťují buňky jako jsou keratinocyty, Langerhansovy ostrůvky v epidermis, T-lymfocyty, makrofágy a mastocyty v dermis. [3, 4]

2.1.2. Hypodermis

Kůže se skládá ze tří vrstev, jež jsou znázorněny na *Obrázku 1*. Podkožní je nejhlubší vrstva, která spojuje dermis s povrchovou fascií nebo periostem. Pochází z mezodermu a jsou v ní uloženy převážně buňky tukové tkáně tzv. *adipocyty*. Ty tvoří významnou energetickou zásobu a jsou důležité z hlediska tepelně-izolačního. Každý adipocyt je obkroužen kapilárou. [1, 3, 5, 6]



Obrázek 1: Znázornění jednotlivých vrstev kůže. Na detailu popis jednotlivých vrstev epidermis. [7]

2.1.3. Dermis

Dermis je střední vrstva kůže neboli škára. Je mezenchymálního původu. Jedná se o silnou, pevnou a pružnou vrstvu, jejímiž hlavními složkami jsou kolagen a elastin tvořící fibrily, ty se sdružují ve snopce a navzájem se proplétají. Tloušťka dermis může být 0,5 až 2,5 mm. Škára má dvě vrstvy, a to horní a spodní. Povrchová neboli papilární vrstva je

protkaná sítí kapilár a obsahuje větší množství vazivových buněk. Vrstva hlubší (lat. *stratum reticulare*) obsahuje méně buněk než vrstva papilární .[1–3]

V dermis je přítomna i hladká svalovina, jako vzpřimovače chlupů, což jsou svazky hladké svaloviny jdoucí od pochvy chlupu k povrchu dermis. Nevyskytují se všude, chybí například u vousů a vlasů. Síť buněk hladkého svalstva jsou uloženy i v hlubších vrstvách dermis, a to paralelně s povrchem. Dermis obsahuje mechanoreceptory pro vnímání doteku, tlaku, vibrací, dále termoreceptory vnímající změny teplot a nociceptivní receptory pro vnímání bolesti. Nalézají se zde i cévní a lymfatické zásobení kůže. [1, 3, 4]

Důležitou funkci dále mají fibroblasty, buňky, díky kterým je možná syntéza a degradace proteinů pojivové tkáně. Zejména v papilární dermis jsou hojně zastoupené mastocyty, jedná se o sekreční buňky, které jsou schopny ze svých granul uvolňovat například heparin či histamin. [3, 5]

2.1.4. Epidermis

Zevní vrstva kůže neboli pokožka (epidermis) je nejtenčí složka kožní tkáně. Pochází z ektodermu je tvořena 5 vrstvami kožních buněk keratinocytů (znázorněné na výřezu Obrázku 1). [1, 3]

Epidermální vrstvy odspodu ke kožnímu povrchu:

- *Stratum germinativum* (zárodečná vrstva), ta se dále dělí na *stratum basale*, kde probíhá buněčné dělení; a na *stratum spinosum*, která obsahuje 2–5 vrstev buněk, jež se směrem k povrchu oplošťují a ztenčují.
- *Stratum granulosum* (vrstva zrnitých buněk), v této vrstvě začíná proces keratinizace, tj. na buňkách se vytváří zrna keratohyalinu, ze kterého následně vzniká keratin.
- *Stratum lucidum* (vrstva jasných buněk), tenká vrstva buněk, je patrná pouze na místech, kde je kůže výrazně zrohovatělá (např. dlaně, plosky nohou aj.). Buňky jsou zde k sobě pevně stlačeny a podléhají buněčné smrti. Nemají jádro a přesnou hranicí přechází do poslední vrstvy.
- *Stratum corneum* (rohová vrstva; SC) obsahuje pouze zrohovatělé buňky, které se na jejím povrchu odlupují, čemuž se také říká proces deskvamace. Obsahuje 15-20 vrstev korneocytů, které jsou odděleny vysoce uspořádanými lipidovými vrstvami. Ty lze přirovnat k cihlové zdi, a proto díky nim má kůže tzv. bariérovou funkci. Tyto buňky tedy chrání tělo před ztrátou důležitých látek a také před vnějšími nepříznivými vlivy. [1, 5, 8–10]

Za základní epidermální buňky lze považovat keratinocyty a dále melanocyty nebo také buňky Langerhansovy či Merkelovy. Keratinocyty jsou buňky, které se postupně diferencují od místa kontaktu s dermis až k povrchu epidermis. V posledních stádiích této diferenciace jsou obklopeny hustě zesítěným proteinovým obalem, na který je kovalentně navázána lipidová monovrstva. Tato monovrstva se skládá z CER s ω -hydroxyskupinami, které jsou kovalentně vázány na proteiny keratinocytů. Keratinocyty tvoří keratinová tonofilamenta, která jsou prekurzorem keratinu. V buňce se vyskytují ve svazích upínajících se do desmosomů, což jsou buněčné spoje důležité k udržení adheze mezi buňkami.

[1, 5, 8–11]

Melanocyty jsou buňky tvořící melanin, původem jsou z neurální trubice a mají dendritické výběžky, kterými předávají melanin okolním buňkám. Jeho obsah se různí mezi populacemi. Jeho hlavní funkcí je ochrana buněk před škodlivými účinky slunečního záření. Langerhansovy buňky (tzv. buňky prezentující antigen, z angl. *antigen-presenting cells*; APC) jsou ve *stratum spinosum* s funkcí podobnou makrofágům. Merkelovy buňky jsou hmatové buňky ve spodních vrstvách epidermis. Pokožka kromě dalších struktur obsahuje také Merkelova hmatová tělíska, tedy nervová zakončení, která řadíme mezi mechanoreceptory.

[1, 5, 9, 10]

2.1.5. Lipidy ve *stratum corneum*

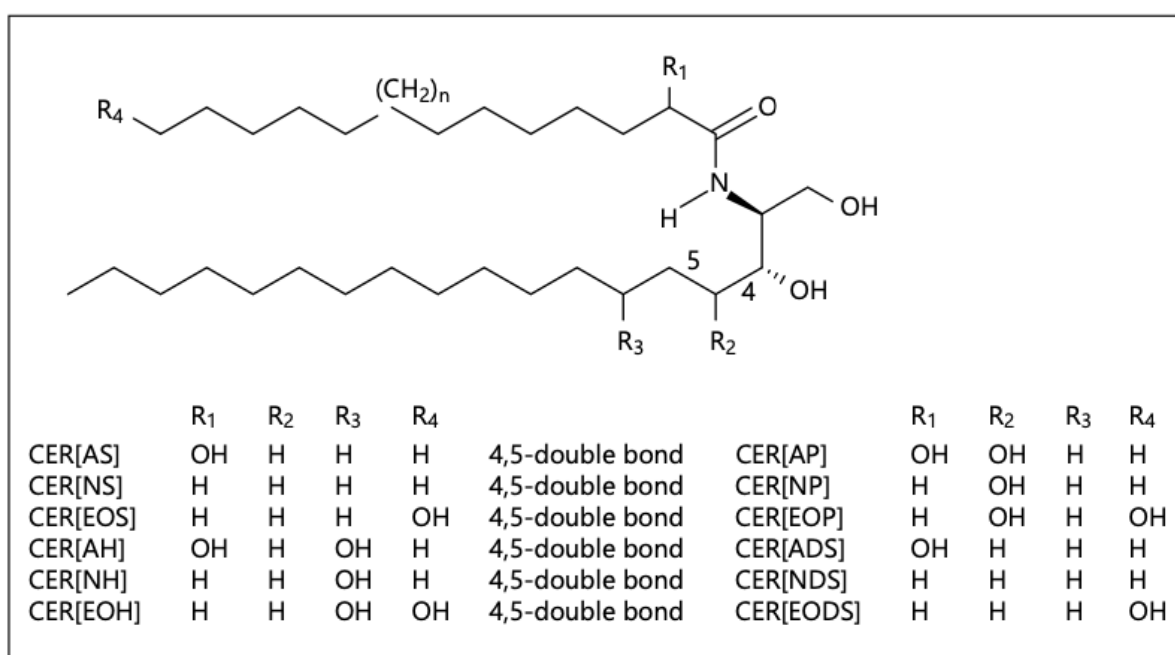
SC obsahuje 5–15 % lipidů, 75–80 % proteinů a 5–10 % dalších látek. Významnou roli sehrávají mezibuněčné lipidy, které tvoří tzv. lipidovou matici (matrix) SC. Směs lipidů v matici je tvořena z 40–50 % CER, 20–33 % cholesterolu a 7–13 % volných mastných kyselin. Lipidy tvoří mnohočetné lamely a jejich složení přímo ovlivňuje kvalitu bariérové funkce. Mezi další lipidy v lamelárních vrstvách SC patří cholesterol-3-sulfát a estery cholesterolu, které se liší podle umístění a hloubky kůže, věku, pohlaví a patologického stavu jedince, taktéž mezi jednotlivci, rasami, a například i během ročních období. Kromě strukturálních vlastních bariérových lipidů se další lipidy vyskytují i na povrchu kůže, kde jsou vylučovány mazovými žlázami a jsou součástí ochranného hydro-lipidového filmu. Mezi jejich funkce patří mimo jiné také samočisticí funkce. [9, 12]

2.1.5.1. *Ceramidy*

Ve SC jsou ceramidy (CER) uvolňovány z jejich polárních prekurzorů glukosylceramidů a sfingomyelinů pomocí hydrolytických enzymů. CER jsou tvořeny sfingoidní bází (aminoalkoholem), kterou může být zejména sfingosin (S), dihydrosfingosin (DS), fytosfingosin (P) nebo 6-hydroxysfingosin (H). Tato skupina je amidovou vazbou

napojena na skupinu mastné kyseliny, která je buď nesubstituovaná (N) nebo hydroxylovaná v poloze α - (A) nebo na konci (velmi) dlouhého řetězce (tzv. poloha ω -; O). Poslední zmíněné acyly mohou být v této poloze dále esterově vázány kyselinou linolovou (EO). Kombinací různých sfingoidních bází (S, DS, P, H) a různých acylů (N, A, O, EO) tak lze ve zdravém SC nalézt desítky podtypů bariérových CER. Velká písmena uvedená v závorkách se pak používají pro zkrácení názvosloví CER jako je uvedeno na *Obrázku 2*; pro příklad CER AP je označením α – hydroxyacyl-fytosfingosinu.

Obsah jednotlivých tříd CER se podle různých autorů liší, nicméně CER NP a CER NS mají vyšší zastoupení než CER AP a CER EOS. [10, 13–15] Dle studie *Suzuki M a kol. (2022)* je nejhojnější třídou CER NP (29,4 %), následuje CER NH (23,4 %), CER NDS (11,3 %), CER AH (9,1 %) a CER EOS (7,7 %). [16]



Obrázek 2: Chemická struktura CER, jednotlivé druhy podle substituentů. [10]

2.1.5.2. Cholesterol

Cholesterol je lipid, který má relativně nízkou molekulovou hmotnost a je jediným velkým steroidem ve SC. Je schopen membránové domény fluidizovat nebo je učinit pevnějšími, v závislosti na fyzikálních vlastnostech ostatních lipidů a poměru cholesterolu k ostatním složkám. Úlohou cholesterolu v epidermis je dodávat určitou fluiditu, aby kůže nebyla moc pevná a tím i křehká. Při procesu deskvamace v konečné fázi keratinizace se nenasycené mastné kyseliny přenášejí do molekuly cholesterolu, kde produkují jeho estery. Tyto estery se pak usazují v lipidové matrix ve SC. [17, 18]

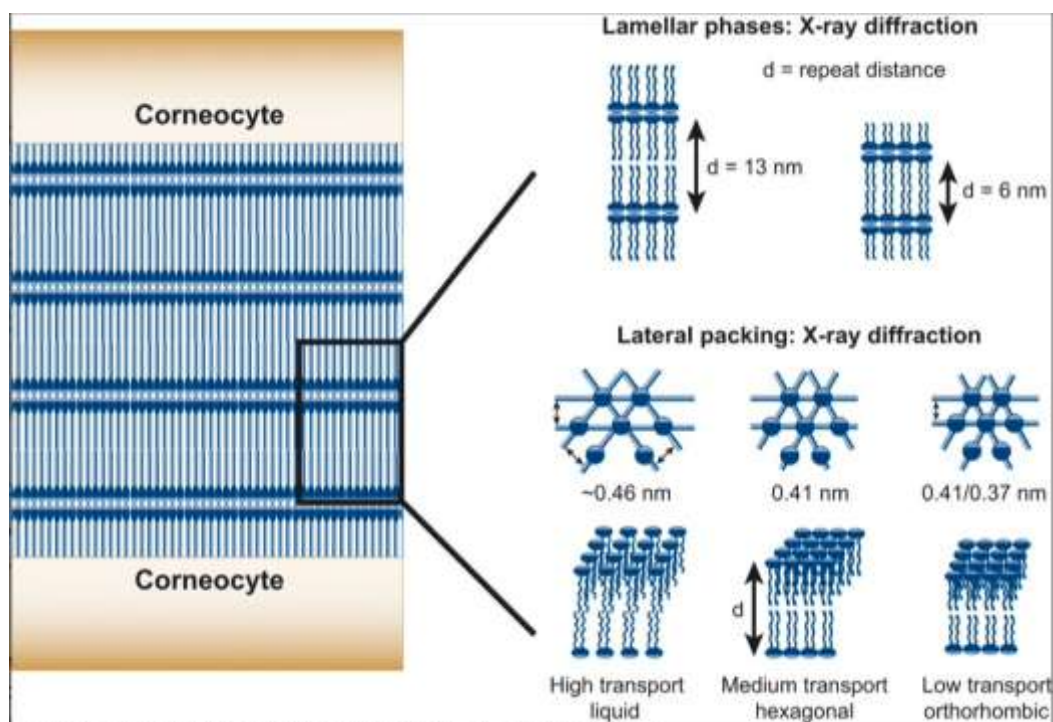
2.1.5.3. Volné mastné kyseliny

Většina volných mastných kyselin (angl. *free fatty acids*, FFA) ve SC má dlouhý řetězec o délce 14 až 28 uhlíků a jsou nasycené. Nejvíce jsou zastoupeny kyseliny palmitová (C16; 10 %), stearová (C18; 10 %), behenová (C22; 15 %), lignocerová (C24; 25 %) a hexakosanová (C26; 10 %). Jejich obsah je vyšší ve svrchních vrstvách SC než ve spodních. Dalšími (nenasyčenými) FFA jsou kyseliny olejová (C18), eikosapentaenová (C20), dokosahexaenová (C22) a linolová, což je nejhojněji zastoupená polynenasycená mastná kyselina, a její deriváty. Při nedostatku esenciálních mastných kyselin oleát nahrazuje linoleát, což způsobuje bariérové abnormality. [10, 19]

2.1.6. Lamelární a laterální organizace lipidů ve *stratum corneum*

Jak bylo uvedeno, nejen obsah, ale i organizace lipidů ve SC je klíčová pro správnou funkci kožní bariéry. Uspořádání bariérových lipidů je zobrazeno na *Obrázku 3*. Lipidy jsou v kožní bariéře organizovány do lamel, které jsou přibližně paralelně s povrchem korneocytů. Důležitá je délka řetězce CER, v případě zdravé SC tvoří lipidy dvě lamelární fáze. Fázi se vzdáleností opakování lamel přibližně 6 nm označujeme jako fázi s krátkou periodicitou (angl. *short periodicity phase*; SPP), a se vzdáleností 13 nm označujeme jako fázi s dlouhou periodicitou (angl. *long periodicity phase*; LPP). Dlouhá lamelární fáze je považována za nezbytnou pro správnou funkci kůže jako bariéry. Její vznik je podmíněn přítomností ultradlouhých CER (acylceramidů), jako je např. CER EOS. [20, 21]

Lipidy uvnitř lamel jsou uspořádány do organizovaných struktur, tzv. mřížek. Jejich uspořádání může být tzv. ortorombické (čtvercové), kde jsou molekuly velmi těsně vedle sebe uspořádané (vzdálenost lipidových řetězců v mřížce je přibližně 0,37 a 0,41 nm). Tato mřížka nepovoluje lipidovým řetězcům žádné difuzní ani rotační pohyby. Další uspořádání je tzv. hexagonální (šestiúhelníkové), kde jsou lipidové řetězce sice také uspořádané, ale jejich hustota není tak vysoká jako u ortorombického uspořádání, neboť vzdálenost lipidových řetězců v mřížce je 0,41 nm. Tato mřížka umožňuje řetězcům vykonávat různé laterální pohyby. Molekuly bariérových lipidů mohou být i v neuspořádaném stavu, jsou tedy v kapalném (fluidním) uskupení (vzdálenost mezi řetězci lipidů je přibližně 0,46 nm), díky kterému je lipidová matrice flexibilnější, aniž by došlo ke zhoršení bariérových vlastností SC. Ve zdravé SC jsou všechna uspořádání přítomna, přičemž pro správnou funkci SC jako bariéry je ortorombické uspořádání lipidových řetězců esenciální. [20, 21]



Obrázek 3: Laterální a lamelární organizace bariérových lipidů ve stratum corneum. [22]

2.1.7. Onemocnění spojená s poškozením kožní bariéry

Změny obsahu či uspořádání kožních lipidů souvisí s projevy mnoha kožních onemocnění, jako jsou například psoriáza nebo atopická dermatitida. U těchto onemocnění dochází ke snížení hladin epidermálních CER. [23, 24]

2.1.7.1. Atopická dermatitida (AD)

Atopická dermatitida (AD) je chronické zánětlivé ekzematózní onemocnění, jehož patogeneze má mnoho faktorů, jako jsou genetika, imunologická odpověď a také i vliv vnějšího prostředí. Mezi klinické projevy patří vznik zánětlivých, suchých a velmi svědivých ložisek na kůži po celém těle, což pacientům snižuje kvalitu života. Toto onemocnění, jež doprovází snížení bariérové funkce kůže, mají ve SC nižší obsah vody a CER. Studie uvádí, že u AD jsou sniženy zejména skupiny CER EOS a CER NP, ale i CER EOH, CER EOP, a CER NH, nicméně na druhou stranu je zvýšena skupina CER AS. Navíc zde také dochází ke změně složení FFA. Několik studií ukázalo, že ačkoli byly FFA s velmi dlouhým řetězcem (≥ 24 uhlíků) u AD sniženy, kratší FFA (zejména kyselina palmitová a kyselina stearová) a nenasycené FFA byly u pacientů s AD zvýšeny. Dysfunkční kožní bariéra umožňuje pronikání alergenů, jako jsou roztoči, potraviny a další patogeny. To ještě více prohlubuje patologickou reakci kůže. Pacienti s AD mají často zvýšené sérové hladiny imunoglobulinů a dalších látek, vedoucí k uvolnění histaminu, jež zvyšuje pocit svědění. [12, 25–27]

Dalším faktorem pro rozvoj AD jsou také mutace genu pro filaggrin. Jedná se o protein obsažený v korneocytech, který je v dolních vrstvách SC vázán na keratinocyty a v horních vrstvách SC dochází k jeho hydrolýze na aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou dále deaminovány za vzniku osmoticky aktivních kyselých produktů, které udržují kyselé pH a hydrataci kůže, jež je nezbytná pro správnou tvorbu SC. [28]

V současné době se léčba AD primárně řeší lokálním podáním kortikosteroidů, čímž dochází k potlačení zánětlivé imunitní reakce. Délka topické terapie steroidy záleží na klinickém zlepšení a obvykle je dva týdny. Pro minimalizaci nežádoucích účinků by měl být lokální steroid s nejnižší možnou účinností používán po co nejkratší možnou dobu. Mezi nežádoucí projevy u terapie kortikosteroidy patří atrofie kůže, změna barvy, purpura, teleangiektázie, strie nebo hypopigmentace. Kortikosteroidy nejsou dokonalým řešením pro léčbu AD, protože pouze potlačují její projevy, ale neléčí onemocnění jako takové. Důležité pro kontrolu tohoto onemocnění je každodenní promazávání kůže emolienty, mastmi či krémy, které zvyšují hydrataci pokožky. [29, 30]

2.1.7.2. Psoriáza (Lupénka)

Jedná se o chronické neinfekční kožní onemocnění s hyperproliferací. Patogeneze není zcela objasněna, ale je spojena se zvýšenou aktivitou buněk imunitního systému a nadměrnou expresí zánětlivých agens. Roli může hrát genetická predispozice nebo typ rasy, protože výskyt psoriázy je nejvyšší u rasy europoidní. [31–34]

Kůže u psoriázy má zvýšenou hodnotu TEWL, z důvodu snížených hladin CER i FFA. Dochází také ke změnám v zastoupení jednotlivých CER v porovnání se zdravou kůží. Obsah CER EOS a CER obsahující fytosfingosinovou bázi je nižší, kdežto obsah CER obsahující sfingosin je vyšší. [33, 34]

Obdobně jako u léčby AD je zde základním přístupem lokální terapie kortikosteroidy, jejíž síla záleží na závažnosti a rozsahu ložisek. Dalšími přístupy jsou například podání analog vitamínu D₃ u ambulantní léčby a cignolinu, popřípadě ichthamolu u hospitalizační léčby. Stejně jako u všech kožních onemocnění je důležité časté promazávání emolencií a keratolytiky, které změkčují vytvářející se šupiny kůže a usnadňují tak jejich odstranění. Kromě farmakologické terapie se uplatňuje i fototerapie, kdy se využívá především UVB spektrum o vlnové délce 311 nm. U nejtěžších případů, kdy nepomáhá žádná z předchozích možností, se může uvažovat o nasazení systémové terapie. Nejvíce se používá acitretin, cyklosporin A a methotrexát. Mezi nové přístupy dnes patří biologická léčba, jejíž velkou nevýhodou je finanční nákladnost. [35, 36]

2.1.8. Topické podávání bariérových lipidů

Topická aplikace je způsob podání léčiv, při níž látka působí pouze lokálně na poškozenou tkáň bez systémového účinku. Přípravky pro toto použití jsou nejčastěji polotuhé (např. masti, krémy, gely) nebo tekuté (např. roztoky, emulze – lotiony). [37, 38]

Pro topicky podávané přípravky je velmi důležité, aby jejich hodnota pH byla v kyselé oblasti, ovšem velmi záleží i na výběru látek, které pomáhají přispívat ke zlepšení bariérových vlastností kůže, mezi ty řadíme humektanty a emolienty. Humektanty jsou hygroskopické látky, které se chovají podobným způsobem jako přirozený hydratační faktor (angl. *natural moisturizing factor*; NMF) v kůži, ten zahrnuje látky se silným hydratačním účinkem, především aminokyseliny a jejich deriváty. NMF zadržuje a přitahuje vodu v kůži a některá zvlhčovačla mají také změkčující vlastnosti. Jako humektanty se používají například glycerol, propylenglykol, panthenol, sorbitol, močovina a kyselina hyaluronová. Emolienty vyplňují prostory mezi korneocyty a působí v kůži pocitu měkkosti a plasticity., čímž jí brání ztrácet vodu. Mezi emolienty řadíme například cholesterol, skvalen, kyselinu linolovou, kyselinu stearovou, kyselinu olejovou a mastné alkoholy. [37, 38]

Protože se snížené hladiny CER ve SC ukázaly být hlavním důvodem výskytu kožních poruch, přichází v potaz možnost zlepšení kožních onemocnění pomocí aplikace chybějících CER. CER lze extrahovat z přírodních živočišných zdrojů, ale tento proces je zdlouhavý, drahý a omezeně dostupný. Dále existují obavy, že při tomto procesu mohou vznikat toxické produkty a je zde i riziko přenosu infekcí. Více než přírodní CER se dnes používají syntetické tzv. pseudoceramidy, které mají dobrý bezpečnostní profil a jsou levnější. [39]

V USA existuje registrovaný léčivý přípravek obsahující CER s názvem EpiCeram[®], který vyvinula biofarmaceutická společnost Ceragenix Pharmaceutical zabývající se vývojem produktů pro dermatologii a infekční onemocnění. Tato společnost v roce 2006 získala pro EpiCeram[®] registraci a v roce 2008 ho společnost Primus Pharmaceuticals uvedla na trh. EpiCeram[®] je emulze, obsahující CER, konjugovanou kyselinu linolovou a cholesterol v poměru 3:1:1. V tomto přípravku jako CER využívají molekulu hydroxypropyl bispalmitát monoethanolamidu, která by měla mít účinky srovnatelné s CER NP. Je zde využita patentovaná technologie MultiSal[™], což je systém dvojitého zapouzdření, který umožňuje delší působení a lepší absorpci látek. [40]

Také produkty značky Ceradan[®] obsahují CER, cholesterol a FFA v poměru 3:1:1. Produkty jsou vylepšeny systémem Active pH Control pro udržitelné snížení pH pokožky a díky této technologii jí byl udělen britský patent. Tato firma má sídlo v Singapuru a produkty jsou zatím dostupné pouze v Asii a Oceánii. [41]

V České republice zatím není registrovaný léčivý přípravek, na trhu jsou pouze volně prodejné kosmetické přípravky. Mezi ně patří produkty značky CeraVe[®], které obsahují CER EOS, CER NP a CER AP, dále také cholesterol, FFA a fytofingosin. [42] Dále značka The Inkey List[™] má na trhu krém Ceramide Night Treatment, který obsahuje 3% směs CER, včetně AP a EOP. [43] Přípravek Bepanthen[®] sensiderm krém obsahuje tzv. LLT lipidy, jejichž struktura je podobná CER pokožky. V České republice je dostupný jako registrovaný zdravotnický prostředek Kadermin[®] obsahující CER NP. [44]

Používání těchto produktů má především preventivní význam, zabraňuje se tak těžkým projevům kožních onemocnění. Cílem používání CER je snížení spotřeby steroidů, které se při těžkých projevech onemocnění používají. *Huang a kol. (2008)* zkoumali vliv CER emulzí s obsahem CER EOS, CER NP a jejich směsi. Emulze byly aplikovány na modelově poškozené kůže u zdravých pacientů. Jejich závěrem je, že emulze měly příznivý účinek na funkci kožní bariéry a směs CER EOS + CER NP zlepšila stav pokožky nejméně. [45] Kromě aplikace CER pomocí krémů či masťů bylo také studováno použití nanočástic, které umožňují efektivnější a rychlejší vstřebávání CER do kožní bariéry. *Takada a kol. (2022)* pozorovali působení nanoemulze, která ve svém složení obsahovala i CER NP. Jejich výsledky ukazují, že formulace má zřetelný potenciál ke zmírnění atopických symptomů suché kůže u pacientů s AD. Účinky jsou ale pravděpodobně důsledkem působení dalších obsahových látek, protože nedošlo ke zlepšení samotné bariérové funkce. [46] Ve studii *Tokudome a kol. (2014)* zkusili aplikovat CER jinou metodou, kde CER uzavřeli v liposomech, což umožnilo hlubší a cílenou penetraci CER do kožních buněk. Takto zkoumali působení CER AP, CER AS, NP a CER NS na kvalitu a kvantitu kožní bariéry. Dobré výsledky vykazoval vzorek s obsahem CER AS, protože jeho hladiny se v pokožce statisticky zvýšily. [47]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie a materiály

Farmaceutické suroviny *Adeps solidus*, *Alcoholum cetylicus*, *Cholesterolum*, *Helianthi oleum raffinatum*, *1,3-propandiolum*, *Glycerolum 85 %*, *Polysorbatum 80*, *Glyceroli monostearas* byly zakoupeny od společnosti Fagron a.s. (Olomouc, Česká republika).

Jednotlivé FFA byly zakoupené od společnosti Merck – Sigma Aldrich (Schellendorf, Německo) a deuterované FFA (DFFA) od společnosti CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Směs FFA byla připravena smísením jednotlivých FFA podle daného poměru (viz níže). Molární zastoupení a molární hmotnosti FFA jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Procentuální zastoupení (mol%) a molární hmotnost (M_w) jednotlivých FFA ve směsi.

FFA	mol%	M_w
C_{16:0} PALMITOVÁ	1,8 %	256,40
C_{18:0} STEAROVÁ	4,0 %	284,48
C_{20:0} ARACHIDOVÁ	7,6 %	312,53
C_{22:0} BEHENOVÁ	47,8 %	340,58
C_{24:0} LIGNOCEROVÁ	38,8 %	368,63

Nejdříve byla vypočítána průměrná molární hmotnost ($M_{FFA\emptyset}$) všech FFA dle vzorce:

$$M_{FFA\emptyset} = mol\%_{C16} \times M_{wC16} + mol\%_{C18} \times M_{wC18} + mol\%_{C20} \times M_{wC20} + mol\%_{C22} \times M_{wC22} + mol\%_{C24} \times M_{wC24}$$
$$M_{FFA\emptyset} = 345,57236$$

Posléze byla navážka jednotlivých FFA vypočítána tak, aby celkové množství ($m_{směsi}$) bylo 200 mg. Pro příklad lze uvést výpočet pro kyselinu palmitovou (C16), zbylé FFA byly vypočítány analogicky:

$$m_{C16} = \frac{m_{směsi}}{M_{FFA\emptyset}} \times M_{wC16} \times \%C16$$
$$m_{C16} = \frac{0,2}{345,57236} \times 256,40 \times 0,018$$

Výsledné navážky [mg] pro jednotlivé FFA byly:

m_{C16} 2,67 mg

m_{C18} 6,59 mg

m_{C20} 13,75 mg

m_{C22} 94,22 mg

m_{C24} 82,78 mg

Obdobným způsobem byla připravena také směs DFFA. 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 v rámci jiného projektu dle validovaných postupů. [48] Další chemikálie jako jsou trypsin, anorganické soli pro přípravu octanového a fosfátového pufru, polykarbonátové filtry (s průměrem pórů 0,015 μm) a další pomůcky byly nakoupeny u společnosti Merck – Sigma Aldrich (Schelldorf, Německo).

3.2. Příprava topických formulací

Pro přípravu topicky podávaných formulací se použila melaminová třenka s těrkou, lékárenská infralampa, analytické váhy a další lékárenské laboratorní pomůcky. Formulace byly vytvořeny anglickou metodou přípravy emulzních systémů, tj. spojováním olejové a vodné fáze za stejných teplotních a tlakových podmínek. Do vytárované melaminové třenky s těrkou byly naváženy nejprve pevné lipofilní složky, které se pod infračervenou lampou roztavily. Poté byla k zahřáté směsi po částech přidána vodná fáze, zahřátá přibližně na stejnou teplotu jako olejová fáze ve třence (± 5 °C). Po spojení obou fází byla výsledná emulze míchána až do vychladnutí. Poté byla kvantitativně převedena do šroubovacích lékovek, uzavřena víčkem a chráněna před světlem na temném a suchém místě. Složení jednotlivých formulací použitých v prvním a druhém permeačním experimentu (viz dále), je uvedeno v *Tabulce 2–10*. V tabulkách je v levé části složení přípravku bez CER-složky (tzv. placebo) a v části pravé je složení daného přípravku obohaceného o CER-frakci.

Tabulka 2: Kvantitativní složení základní formulace MS1A a MS1B.

MS1	MS1A: placebo	MS1B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Adeps solidus	0,15	0,15
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Helianthi ol. raff.	0,2	0,2
1,3-propandiolum	0,5	0,5
Glycerolum 85 %	0,5	0,5
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 3: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 % a 1,3-propandiolum MS2A a MS2B.

MS2	MS2A: placebo	MS2B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Adeps solidus	0,15	0,15
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Helianthi ol. Raff.	0,2	0,2
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 4: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum a Adeps solidus MS3A a MS3B.

MS3	MS3A: placebo	MS3B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Helianthi ol. raff.	0,2	0,2
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 5: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum a Alcoholum cetylicus MS4A a MS4B.

MS4	MS4A: placebo	MS4B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Adeps solidus	0,15	0,15
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Helianthi ol. Raff.	0,2	0,2
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 6: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum a Helianthi oleum MS5A a MS5B.

MS5	MS5A: placebo	MS5B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Adeps solidus	0,15	0,15
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 7: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum, Adeps solidus a Alcoholum cetylicus MS6A a MS6B.

MS6	MS6A: placebo	MS6B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Helianthi ol. raff.	0,2	0,2
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 8: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum, Adeps solidus a Helianthi oleum MS7A a MS7B.

MS7	MS7A: placebo	MS7B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Alcoholum cetylicus	0,55	0,55
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 9: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum, Alcoholum cetylicus a Helianthi oleum MS8A a MS8B.

MS8	MS8A: placebo	MS8B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
Adeps solidus	0,15	0,15
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Tabulka 10: Kvantitativní složení formulace bez obsahu Glycerolum 85 %, 1,3-propandiolum, Adeps solidus, Alcoholum cetylicus a Helianthi oleum MS9A a MS9B.

MS9	MS9A: placebo	MS9B: CER AP (0,5 %)
Ceramidum AP	/	0,025
FFA mixtura	0,0125	0,0125
Cholesterolum	0,0125	0,0125
Polysorbatum 80	0,3	0,3
Glyceroli monostearas	0,15	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0	ad 5,0

Výše uvedené formulace byly dále modifikovány, tj. CER-složka byla tvořena CER EOS (formulace MS10; *Tabulka 11*), nebo kombinací dvou typů CER (formulace MS11; *Tabulka 12*). Pro lepší pochopení chování bariérových lipidů formulace s kožní bariérou byla připravena modifikovaná formulace MS10 s tím rozdílem, že FFA směs byla nahrazena směsí DFFA ve stejném kvantitativním zastoupení jednotlivých kyselin. Složení značené formulace MS12 je uvedeno v *Tabulce 13*. Formulace MS12 byla připravena s DFFA směsí proto, aby pomocí IR spektroskopie mohly být studovány interakce bariérových lipidů a kožní bariéry.[49]

Tabulka 11: Kvantitativní složení formulace jako MS9B, pouze CER AP je zaměněn za CER EOS.

MS10: CER EOS (0,5 %)	
Ceramidum EOS	0,025
FFA mixtura	0,0125
Cholesterolum	0,0125
Polysorbatum 80	0,3
Glyceroli monostearas	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0

Tabulka 12: Kvantitativní složení formulace jako MS9B, ale CER jsou ve směsi CER AP a CER EOS.

MS11: směs CER AP + CER EOS (0,5 %)	
Ceramidum AP	0,0145
Ceramidum EOS	0,0105
FFA mixtura	0,0125
Cholesterolum	0,0125
Polysorbatum 80	0,3
Glyceroli monostearas	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0

Tabulka 13: Kvantitativní složení formulace jako MS10 se směsí DFFA.

MS12: CER EOS (0,5 %) a DFFA	
Ceramidum EOS	0,025
DFFA mixtura	0,0125
Cholesterolum	0,0125
Polysorbatum 80	0,3
Glyceroli monostearas	0,15
Sol. Natrii acetatis cum acido acetico pH 5,5	ad 5,0

Pro třetí experiment byly připraveny formulace MS13A („placebo“), MS13B (CER AP 1 %) a MS13C (směs CER AP + CER EOS 1 %), jejichž složení vychází z formulací MS9A, MS9B a MS10 s tím rozdílem, že byla zdvojnásobena koncentrace lipidů („zahuštěním“ formulace na polovinu se docílilo zvýšení koncentrace CER na 1 %), což umožnilo aplikaci formulace v polovičním množství, ale stejným množstvím bariérových lipidů. Vzhledem k nedostatku ultradlouhého CER EOS formulace obsahující pouze CER EOS nebyla připravena.

3.3. Optická mikroskopie

Optická mikroskopie je základní zobrazovací metoda, která pracuje se světlem o vlnové délce 380–720 nm, které je viditelné pro lidské oko. Používá se pro vizualizaci jemných detailů pozorovaných objektů. Pozorovaný předmět dokáže zvětšit pomocí řady

skleněných a konvexních čoček. Zatímco skleněné čočky nejprve zaostří paprsek světla na objekt nebo skrz něj, čočky konvexní zvětšují vytvořený obraz. Jedná se o velmi univerzální metodu, protože ji lze využít u celé řady vzorků často s minimální přípravou studovaného vzorku. Obraz ze světelného mikroskopu je barevný a lze jej pozorovat přímo okem, pořizovat fotografické nebo videové záznamy a počítačově analyzovat jeho jednotlivé složky. Rozsah zvětšení sahá od 10× do 1000×, s rozlišovací schopností řádově 0,2 μm v závislosti na typu mikroskopu. Další důležitou veličinou je rozlišení mikroskopu, které charakterizuje nejmenší velikost objektu rozlišitelného při daném celkovém zvětšení okem. Optický mikroskop se skládá z mechanických dílů, jako je stativ, stolek mikroskopu, revolverový měnič mikroskopu, šrouby pro hrubé a jemné ostření aj. Z optických dílů je to pak objektiv, okulár, kondenzor. Důležitou součástí jsou také zdroj světla a clony. [50]

Při řešení této práce byl pro všechny vzorky použit mikroskop Olympus BX51 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Německo). Připravené formulace byly v tenké vrstvě nanесeny na podložní sklíčka a poté překryty sklíčkem krycím. Vzorky byly za běžných laboratorních (teplotních, vlhkostních) podmínek sledovány nejdříve pod 100 a poté 200, resp. 400násobným zvětšením. Z každého vzorku byly pořízeny alespoň dva charakteristické snímky.

3.4. Izolace a zpracování lidské kůže pro permeační experimenty

Lidské kůže, které byly využity k izolaci SC, byly od pacientů podstupujících operace v rámci plastické chirurgie díky spolupráci Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové se Sanatoriem Sanus a.s. v Hradci Králové. Postup izolace tkáně je v souladu se stanoviskem Etické komise centra Sanus (3/11/2022) a s kůžemi bylo nakládáno v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Všichni dárci poskytli ústní a písemný informovaný souhlas.

U prvního a třetího permeačního pokusu byly použité kůže od zdravých pacientek, u druhého pokusu byla kůže od pacientky trpící diabetem. Je nutno poznamenat, že zdravotní stav donorů nebyl podrobněji zkoumán; donoři neměli žádnou kožní abnormalitu či jinou nemoc. Kůže byla odebrána z abdominální části těla. Příprava kožní tkáně začala odstraněním podkožního tuku, následně se kůže musela důkladně omýt v čištěné vodě (tzv. voda Millipore) a po této úpravě byly části kůže zamrazeny (-20 °C), aby nedošlo k jejich poškození. [14]

Před samotným permeačním experimentem byly kůže rozmrazeny v Millipore vodě ohřáté na 60 °C (cca 2 min) a jejich jednotlivé části byly pomocí skalpelu rozděleny na menší kusy, u nichž se pomocí pinzet a vatových tyčinek opatrně oddělila epidermis od dermální části. Takto získané preparáty epidermis se přesunuly do Petriho misek, celé se zalily

fosfátovým puftrem o pH 7,4 a přidal se roztok trypsinu. V něm byly ponechány po dobu 12 h při teplotě $32 \pm 0,5$ °C. Trypsin byl přidán do roztoku, aby rozdělil spodní vrstvu epidermis od vrchní, která neobsahuje živé buňky, tj. SC. Po inkubaci byly jednotlivé části SC opět opláchnuty v Millipore vodě a na několik vteřin ponořeny do acetonu, čímž se odstranily povrchové lipidy a zbylé nečistoty. [51]

V dalším kroku se pro experiment musely připravit modelově poškozené kožní bariéry, a to extrakcí nejprve v roztoku hexan/ethanol 96 % v poměru 2:1 (v/v) po dobu 2 h, následně 2 h v roztoku hexan/ethanol 96 % v poměru 1:1 (v/v). [14] Všechny vzorky („zdravé“ i modelově poškozené) se vložily do Petriho misek s Millipore vodou, kde se části SC převáděly na polykarbonátové podpůrné filtry, které nemají vliv na bariérové vlastnosti a díky nimž se se vzorky lépe manipuluje (Obrázek 4). SC na filtrech se poté připevnilo na teflonové držáky s difúzní plochou 1 cm^2 , které se skládají ze dvou částí: SC s filtrem se upevňuje na spodní (tenčí) destičku, na niž se následně pomocí silikonové pasty upevní destička horní (silnější) a celý držák se zafixuje. Je důležité, aby SC směřovala nahoru směrem do vzduchu.



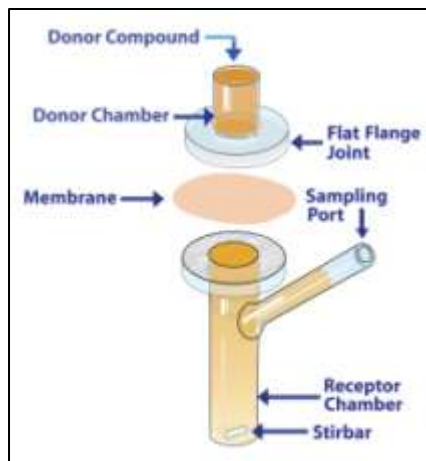
Obrázek 4: Zleva: lidská kůže použita k druhému permeačnímu pokusu, příprava SC na podpůrných filtrech, zblízka připravená SC na filtru, připravené teflonové držáky

3.5. Permeační experimenty

3.5.1. Franzovy difúzní cely

Franzovy difúzní cely se používají k hodnocení permeačních parametrů kůže, jejich použití poskytuje informace o vztazích mezi pokožkou, léčivem a formulací. Jsou vyrobené z inertního materiálu, skládají se ze dvou skleněných částí – vrchní donorová a spodní akceptorová (receptorová) část s objemem $6,5 \pm 0,5$ ml. Donorová část je určena k aplikaci zkoumaných permeantů (připravených formulací) na membránu. Akceptorová (receptorová) část má raménko, kterým je možno celu plnit kapalným médiem (puftrem) a také odebírat

vzorky např. pomocí injekční stříkačky. Do spodní části se vždy musí dát magnetické míchadlo, které udržuje konstantní koncentraci a teplotu pufru. Mezi jednotlivé části cely se následně upevní pomocí silikonové fixační pasty teflonový držák, v němž je upevněna SC na podpůrném filtru. Jednotlivé části Franzovy cely jsou znázorněny na *Obrázku 5*. [52]



Obrázek 5: Popis jednotlivých částí Franzovy cely [53]

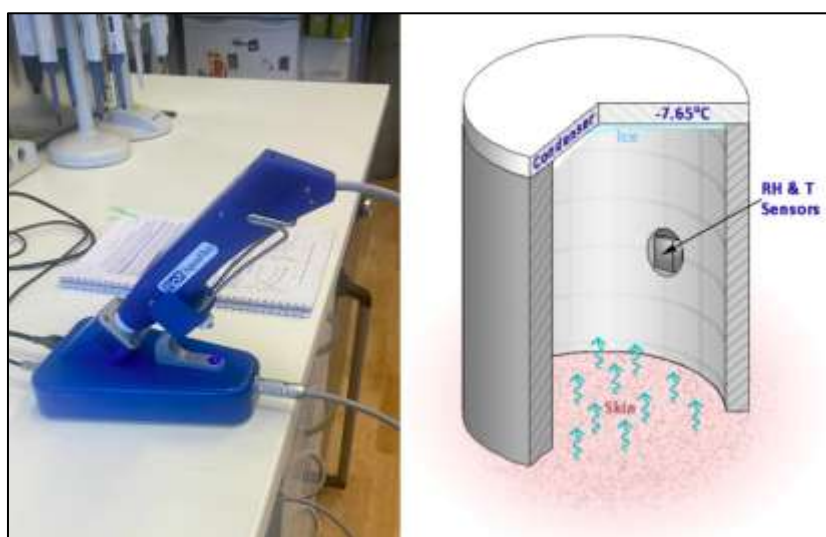
V této diplomové práci byla receptorová část Franzovy cely přes odběrové raménko naplněna fosfátovým pufrům o pH 7,4 ve složení $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol/l), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (8 mmol/l), NaCl (137 mmol/l) a KCl (2,7 mmol/l), s přidavkem gentamicin-sulfátu (50 mg/l) jako protimikrobní přísady. [54] Naplněné cely byly vloženy do držáků vodní lázně a ponechány 12 h při $32 \pm 0,5$ °C, tj. teplotě kožního povrchu.

3.5.2. Transepidermální ztráta vody (TEWL)

TEWL je parametr, který posuzuje permeabilitu SC, prostřednictvím měření množství ztráty vody. Obecně platí, že jeho zvýšená hodnota je spojena s poškozenou kožní bariérou, jako je tomu u výše popsaných kožních onemocnění. Měření TEWL v této práci bylo provedeno pomocí přístroje AquaFluxTM AF200 (Biox Systems Ltd, Londýn, Anglie), který je propojen s počítačem. Tento přístroj je možno kalibrovat, nastavovat potřebné parametry a sledovat výsledné hodnoty. Měření spočívá v přiložení sondy (hlava přístroje) kolmo k difúzní ploše membrány. Sonda je tvořena měřicí komorou, která je z jedné strany otevřená a z druhé uzavřená kondenzátorem (*Obrázek 6*). Ten je udržován pod bodem mrazu vody, řídí vlhkost v komoře nezávisle na okolních podmínkách. Funguje jako jímka páry tak, že na svém povrchu tvoří led, a tím je v jeho okolí nízká vlhkost. SC je naopak zdrojem páry a má ve svém okolí vlhkost vyšší. Tento rozdíl vlhkosti způsobí, že vodní pára migruje ze zdroje do jímky tzv. pasivní difúzí. Dochází tedy k lineární distribuci, která je rovnoběžná s osou

komory za ustálených podmínek. Tok vodní páry se vypočítá z měření tohoto gradientu vlhkosti a prvního Fickova zákona difúze. Přístroj vyhodnotí tzv. flux (tok), neboli hmotnost vody, která během definované doby měření prošla membránou s definovanou difúzní plochou (g/h/m^2). [55, 56]

V této práci byly nejdříve změřeny hodnoty TEWL všech Franzových cel („zdravá“ i modelově poškozená SC) před aplikací formulací a poté v jednotlivých časových intervalech, tj. po 24 h, 48 h a 72 h po odstranění formulace.



Obrázek 6: Zleva: sonda pro měření transepidermální ztráty vody, měřící komora přístroje AquaFlux™ AF200 [56]

Pro první permeační experiment byla použita modelově poškozená kožní bariéra (extrahované SC), na kterou byly naneseny jednotlivé emulze, jak uvádí *Tabulka 14*. V experimentu byla pro kontrolu použita „zdravá“ (Franzovy cely 1–5) a modelově poškozená SC (Franzovy cely 6–10), na kterou po celou dobu konání experimentu nebyla aplikována žádná formulace. Na další extrahované SC byly aplikovány formulace MS9A („placebo“), MS9B a dále MS10-12. Na modelově poškozené membrány byly u prvního experimentu aplikovány připravené formulace pomocí inzulinových stříkaček v množství 200 mg (1 mg CER-frakce). Poté byly formulace z membrány odstraněny. Po odstranění formulací byly membrány dvakrát opláchnuty Millipore vodou (cca 1 ml) a ponechány 12 h při teplotě 32 °C.

Tabulka 14: Rozdělení pozorovaných SC podle očíslovaných Franzových cel pro první permeační experiment.

Číslo Franzovy cely	
1, 2, 3, 4, 5	Kontrola 1: „zdravá“ SC
6, 7, 8, 9, 10	Kontrola 2: extrahovaná SC
11, 12, 13, 14, 15	Extrahovaná SC + MS9A – „placebo“
16, 17, 18, 19, 20	Extrahovaná SC + MS9B – CER AP 0,5 %
21, 22, 23, 24, 25	Extrahovaná SC + MS10 – CER EOS 0,5 %
26, 27, 28, 29, 30	Extrahovaná SC + MS11 – CER AP 0,29 % + CER EOS 0,21 %
31, 32, 33, 34, 35	Extrahovaná SC + MS12 – CER AP 0,5 % a DFFA

Provedení celého druhého pokusu bylo jako u prvního permeačního experimentu s tím rozdílem, že dávka aplikované formulace byla po celou dobu permeačního experimentu ponechána na SC. V pokusu byly použity následující vzorky – zdravá/nemocná kontrola, dále „placebo“ formulace a formulace s obsahem CER AP, CER EOS, a nakonec jejich kombinace. V případě třetího permeačního experimentu (Tabulka 15) bylo množství formulace sníženo na polovinu (100 mg), přičemž množství CER-frakce zůstalo stejné (1 mg). Z časových a technických důvodů byla v případě třetího permeačního experimentu délka experimentu zkrácena na 48 h.

Tabulka 15: Rozdělení pozorovaných SC podle očíslovaných Franzových cel pro třetí permeační experiment.

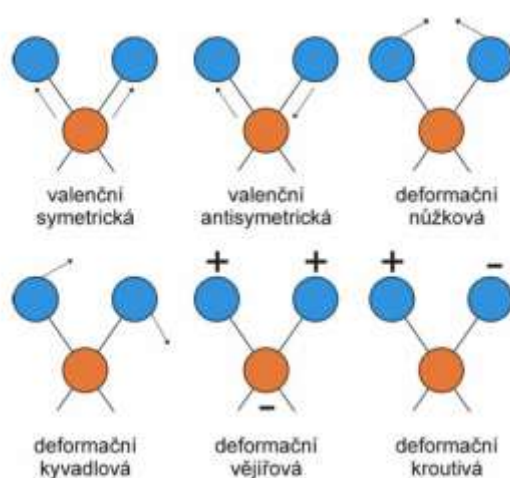
Číslo Franzovy cely	
1, 2, 3, 4, 5	Kontrola 1: „zdravá“ SC
6, 7, 8, 9, 10	Kontrola 2: extrahovaná SC
11, 12, 13, 14, 15	Extrahovaná SC s formulací MS13A – „placebo“
16, 17, 18, 19, 20	Extrahovaná SC s formulací MS13B – CER AP 1 %
21, 22, 23, 24, 25	Extrahovaná SC s formulací MS13C – CER AP 0,6 %+ CER EOS 0,4 %

3.5.3. Infračervená spektroskopie

Infračervená (z angl. *infrared*, IR) spektroskopie patří mezi neinvazivní zobrazovací metody s širokým využitím. Podstatou je interakce IR záření se zkoumanou látkou. Pokud dochází k pohlcení fotonů, jedná se o absorpční IR spektroskopii, jestliže však látka fotony vyzařuje, jde o emisní IR spektroskopii. IR záření je v rozsahu vlnových délek od 700 nm do 1000 μm a vlnočtů 12 821–10 cm^{-1} . Na tomto základě můžeme IR spektroskopii rozdělit na blízkou (z angl. *near infrared*, NIR), střední (z angl. *middle infrared*, MIR) a vzdálenou

(z angl. *far infrared*, FIR). Největší význam v určování strukturálního uspořádání molekul má MIR.

IR záření má velmi malou energii, proto při interakci s částicemi hmoty dochází pouze ke změně vibračně – rotačního stavu molekuly. Pokud dochází k absorpci záření v rozmezí vlnočtu cca 4000–1500 cm^{-1} , dojde ke změně vibrací přítomných vazeb a funkčních skupin v molekule. Jedná se o tzv. valenční vibrace (ν). V molekule může docházet i ke změně valenčních úhlů, a to při absorpci záření o vlnočtu cca 1500–500 cm^{-1} , tyto změny označujeme jako tzv. deformační vibrace (Obrázek 7). Aby byla vibrace v IR spektru viditelná, musí při ní docházet ke změně dipólového momentu. Například polární vazby (např. C=N) jsou obvykle aktivní, kdežto nepolární vazby v symetrické molekule (např. C=C) budou záření absorbovat velmi slabě. [57, 58]



Obrázek 7: Příklady typů vibrací [59]

Pro studium bariérových lipidů ve SC se nejčastěji používá IR spektroskopie zeslabeného úplného odrazu s Fourierovou transformací (angl. *attenuated total reflection-Fourier transform infrared*, ATR-FTIR). Výhodou ATR je minimální příprava vzorku pro analýzu a jeho principem je násobný úplný odraz záření na fázovém rozhraní zkoumaného vzorku a měřicího krystalu z materiálu s vysokým indexem lomu. Krystaly jsou většinou planární, ve tvaru lichoběžníkového hranolu a jsou např. ze selenidu zinečnatého (ZnSe), germania, křemíku či safíru. Měřený vzorek je v úplném kontaktu s ATR krystalem a záření částečně proniká do zkoumané látky. Průnik záření do zkoumané látky se zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou. FTIR spektroskopie poskytuje biochemický profil proteinů, nukleových kyselin, lipidů a sacharidů v biologickém vzorku, též nazývaný „biomolekulární fingerprinting“. Ten je dostatečně citlivý na to, aby postřehl jemné změny v molekulární

strukturu a mikroprostředí, jako je sekundární struktura proteinů, mutace nukleových kyselin a peroxidace fosfolipidů. [59]

Po permeačních experimentech byly vzorky SC vyjmuty z teflonových držáků, vysušeny v exsikátoru a po 12 h teplotě (32 °C v termostatu) byly měřeny na ZnSe ATR krystalu za laboratorní teploty, bylo pořízeno 128 skenů s rozlišením 2 cm⁻¹. Získaná spektra byla analyzována pomocí programu OPUS.

3.5.4. Zpracování výsledků

Všechny výsledky jednotlivých permeačních experimentů byly zpracovány v programech Microsoft Excel a GraphPad. Byla provedena statistická analýza (ANOVA).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této kapitoly je pojednáno o výsledcích experimentu, tj. přípravě a složení topických formulací s bariérovými lipidy, jejich hodnocení a následném výběru pro aplikaci na modelově poškozenou kožní bariéru. Veškeré výsledky všech permeačních experimentů jsou prezentovány ve formě grafů a zároveň doplněny slovním popisem.

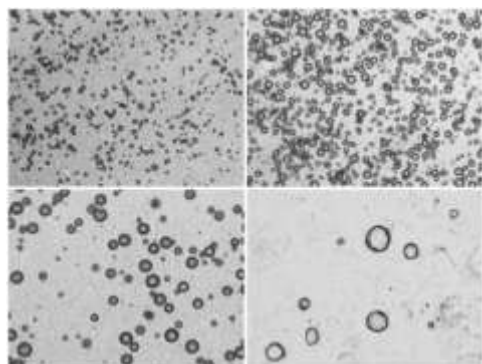
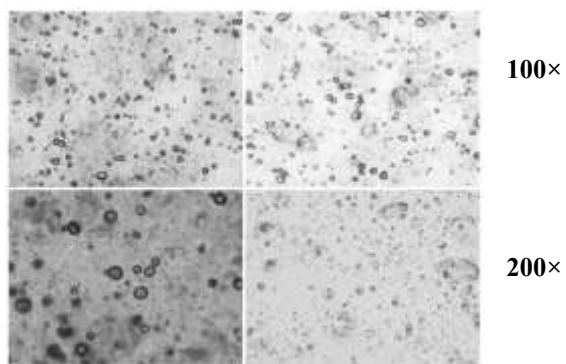
Cílem této práce bylo připravit topicky podávanou směs bariérových lipidů, která by po aplikaci na poškozenou kožní bariéru mohla zlepšit její propustnost a mikrostrukturu. Tato práce vychází z předchozích výsledků dr. Kulhánkové, které byly představeny v její diplomové práci. [60] Základním požadavkem bylo ekvimolární zastoupení bariérových lipidů, tj. CER, FFA směs a cholesterolu. V tomto experimentu byly jednotlivé bariérové lipidy zastoupeny v hmotnostním poměru 2:1:1 (CER/ směs FFA /cholesterol), což odpovídá fyziologickému molárnímu poměru jednotlivých složek, tj. 1:1:1. [61]

4.1. První permeační experiment

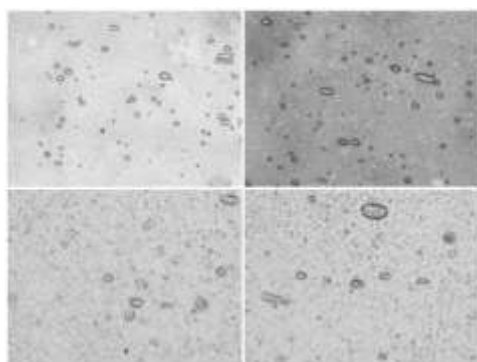
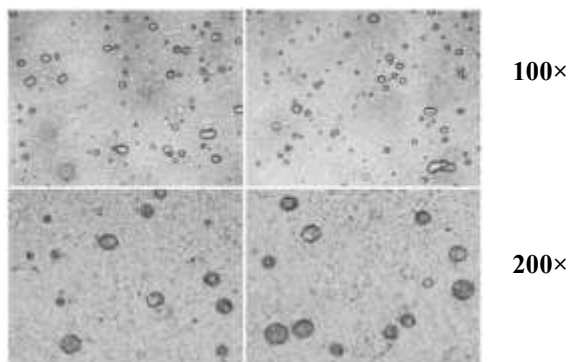
4.1.1. Příprava a charakterizace formulací

Pro první permeační experiment, v němž byly vzorky formulací MS1 až MS12, které vycházely z již hodnocené formulace dr. Kulhánkové. Samotnou přípravu formulací předcházela příprava směsi FFA, jejíž složení bylo v souladu s kvantitativním zastoupením ve zdravém SC. [62] Nejprve byla připravena základní formulace, jejíž složení je uvedeno v *Tabulce 10*. Do olejové fáze byla přidána fáze vodná, včetně emulgátoru polysorbátu 80. [63] Součástí vodné fáze byl octanový pufr o pH 5,5, simulující přirozeně kyselé prostředí kožního povrchu. [64] Jelikož základní myšlenkou této práce bylo připravit co nejjednodušší topickou formulaci bariérových lipidů, v této práci byla modifikována základní formulace. Další přípravky se od původní lišily absencí hydrofilních kapalin (glycerol 85 % a 1,3-propandiol) a částečnou nebo úplnou absencí některé/některých z hydrofobních složek.

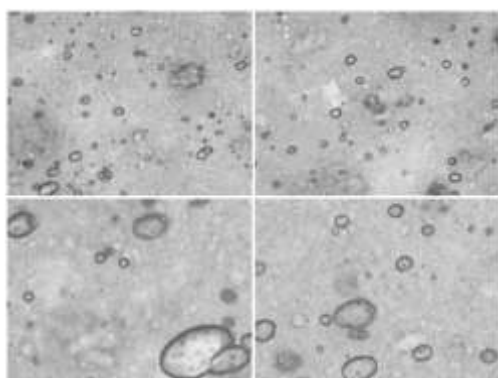
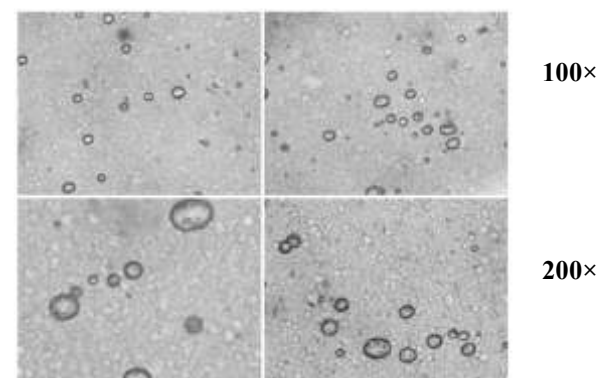
Formulace MS1-9 byly pozorovány optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení, přičemž některé formulace obsahovaly zrna/kapénky. Pravděpodobně by se mohlo jednat o částice cholesterolu a/nebo oddělené kapky čištěného slunečnicového oleje či jiných komponent. V následujících obrázcích (*Obrázek 8–16*) jsou ukázky připravených formulací při obou zvětšení; u každé formulace jsou při daném zvětšení zobrazeny dva snímky (levý a pravý v daném řádku).

MS1A**MS1B**

Obrázek 8: Zobrazení topických formulací MS1A a MS1B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

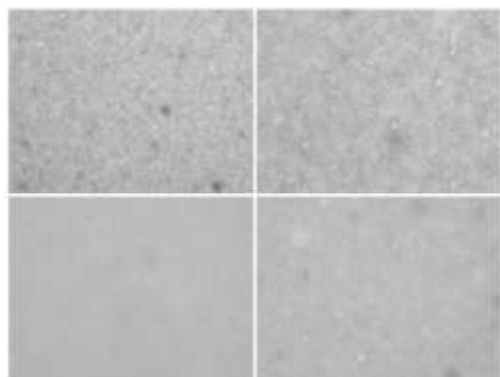
MS2A**MS2B**

Obrázek 9: Zobrazení topických formulací MS2A a MS2B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

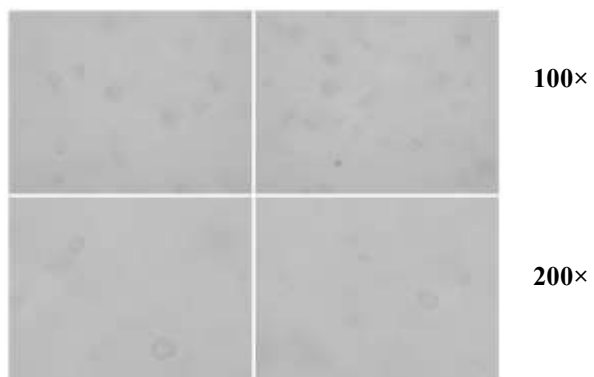
MS3A**MS3B**

Obrázek 10: Zobrazení topických formulací MS3A a MS3B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS4A

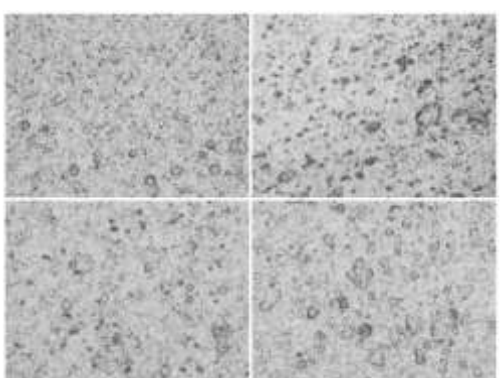


MS4B

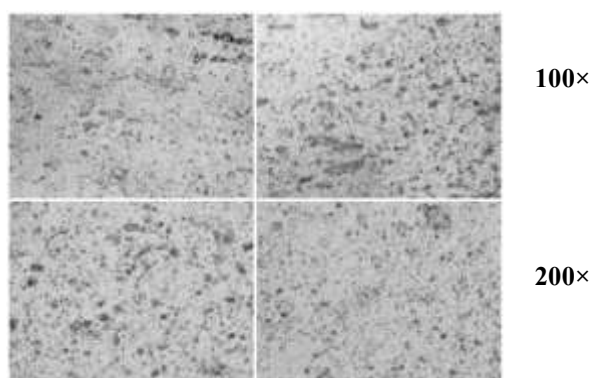


Obrázek 11: Zobrazení topických formulací MS4A a MS4B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS5A

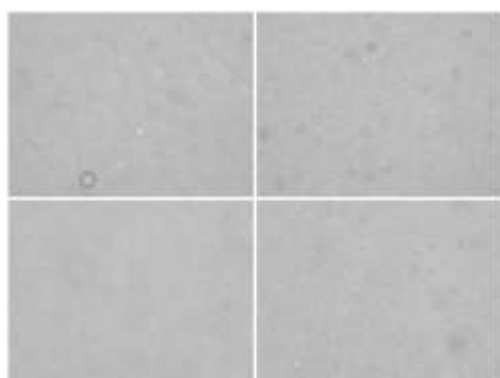


MS5B

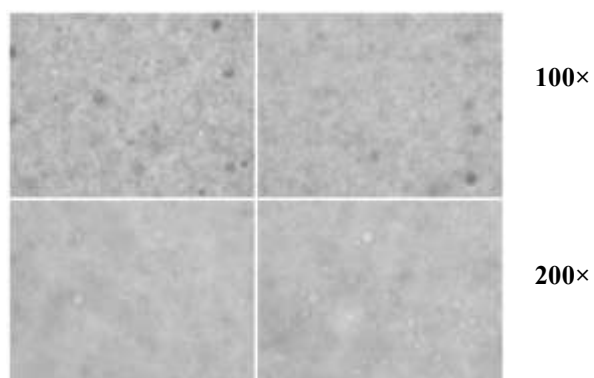


Obrázek 12: Zobrazení topických formulací MS5A a MS5B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS6A

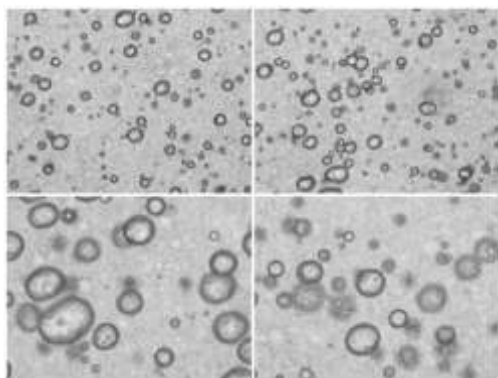


MS6B

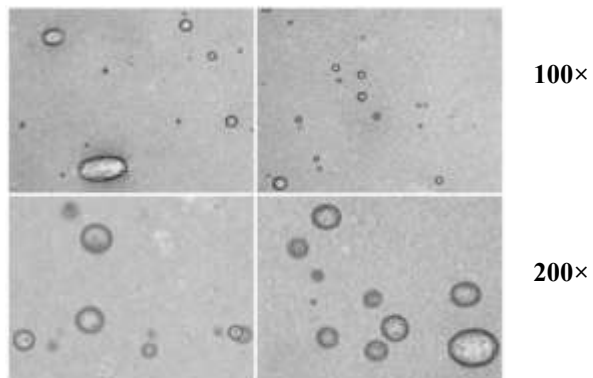


Obrázek 13: Zobrazení topických formulací MS6A a MS6B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS7A

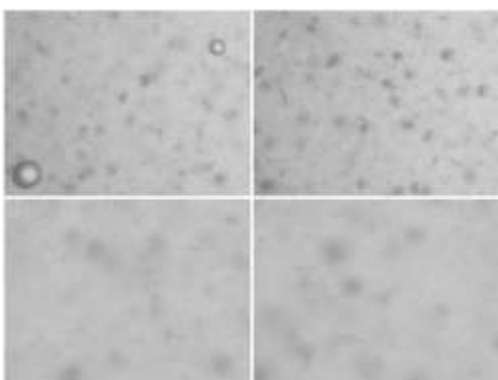


MS7B

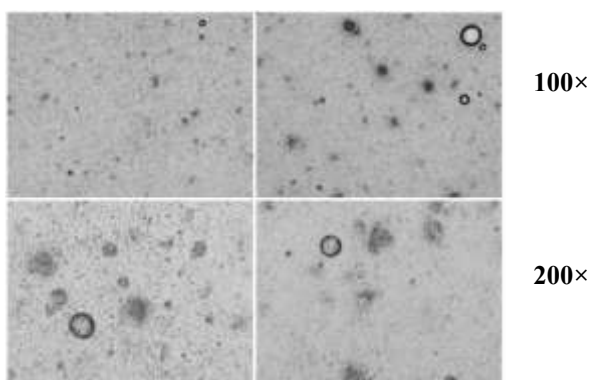


Obrázek 14: Zobrazení topických formulací MS7A a MS7B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS8A

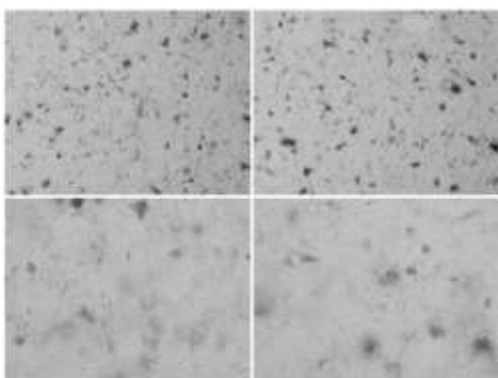


MS8B

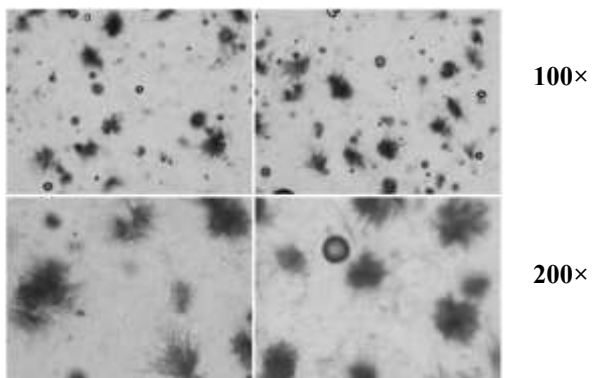


Obrázek 15: Zobrazení topických formulací MS8A a MS8B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

MS9A



MS9B



Obrázek 16: Zobrazení topických formulací MS9A a MS9B optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

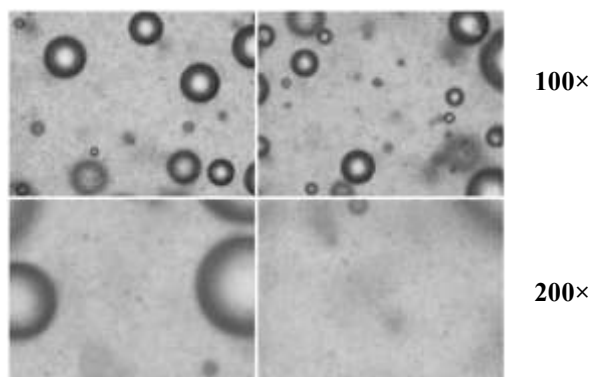
Formulace bez pomocných konstitutivních látek byly více tekuté, pouhým okem se jevíly jako stabilní a homogenní. Vzhledem k tomu, že u formulací nebyla pozorována fázová separace ani jiné větší změny ve stabilitě, pro další část experimentu byly dále studovány formulace MS9A a MS9B obsahující nejméně surovin (nepřítomnost hydrofobních konstitutivních látek a hydrofilních kapalin), což by mohlo odstranit potenciální interakce excipientů v dalších fázích experimentu.

Vzhledem ke skutečnosti, že klíčovou složkou v kožní bariéře jsou ultradlouhé acylceramidy, byly podle formulace MS9B připraveny formulace obsahující samotný ultradlouhý CER EOS (0,5 %; MS10) a kombinaci obou typů CER, tj. CER EOS a CER AP (MS11), jejíž molární poměr činil 0,7:0,3. [60] Stejně jako předchozí, také modifikované formulace byly pozorovány pod optickým mikroskopem. Emulze se jevíly homogenní a nevykazovaly fázovou separaci, pouze vzorek MS11 (*Obrázek 17*) obsahoval více vzduchových bublin. Formulace na bázi ultradlouhého CER EOS (MS10, MS11 a MS12) byly stejně jako formulace MS9A a MS9B použity pro permeační experiment.

MS10



MS11



MS12

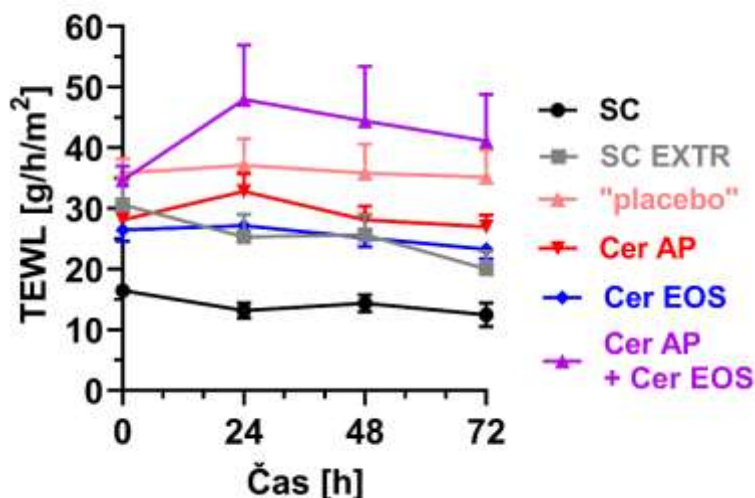


Obrázek 17: Zobrazení topických formulací MS10, MS11 a MS12 optickým mikroskopem při 100× a 200× zvětšení.

4.1.2. TEWL modelů kožní bariéry před a po aplikaci formulací

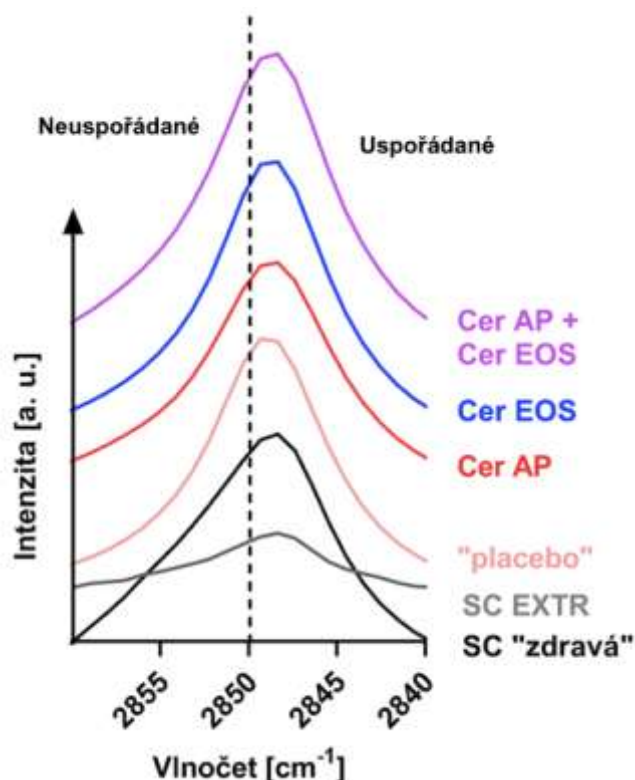
Nejdříve byly u všech hodnocených Franzových cel změřeny hodnoty TEWL v čase 0 h. Poté byly na každý vzorek poškozené kožní bariéry aplikovány formulace v takovém objemu, aby množství formulace bylo 200 mg a hmotnost CER frakce byla 1 mg. Aplikované množství bývá 300 μl , ale i 600 μl [65, 66], kde se jedná více o kapalně formulace a záleží pak na hustotě dané formulace, aby příliš nezatížila zkoumané SC. [60]

U zdravé kontroly (v *Obrázku 18* černě) byla změřena hodnota $14,13 \pm 0,73 \text{ g/h/m}^2$; zatímco u poškozené kožní bariéry (extrahované SC) byla hodnota TEWL $25,41 \pm 1,84 \text{ g/h/m}^2$. Hodnota TEWL extrahované SC je nižší, než obvykle bývá u onemocnění jako je například AD, ty jsou obvykle $10\text{-}70 \text{ g/h/m}^2$, s průměrnou hodnotou kolem 30 g/h/m^2 . [67] Očekávalo by se, že její hodnoty budou ze všech vzorků nejvyšší. Je tedy možné, že při modelovém poškození SC nedošlo k řádné extrakci bariérových lipidů, proto je hodnota nižší. Počáteční hodnoty extrahovaných SC se mírně liší, přestože extrakce byla provedena stejným způsobem. Po aplikaci formulace bez CER-frakce („placebo“; světle růžová) na poškozenou bariéru byla po 24 h naměřena ztráty vody $35,98 \pm 1,91 \text{ g/h/m}^2$; dále u formulace s CER AP (znázorněno červenou barvou) $29,01 \pm 1,12 \text{ g/h/m}^2$; a formulace CER EOS (znázorněno modrou barvou) $25,53 \pm 0,82 \text{ g/h/m}^2$. Mezi vlivy jednotlivých formulací nebyly pozorovány statistické rozdíly. Jak je patrné z *Obrázku 18*, v průběhu celého experimentu (časy 48 a 72 h) byl pozorován pouze nepatrný pokles v hladinách TEWL.



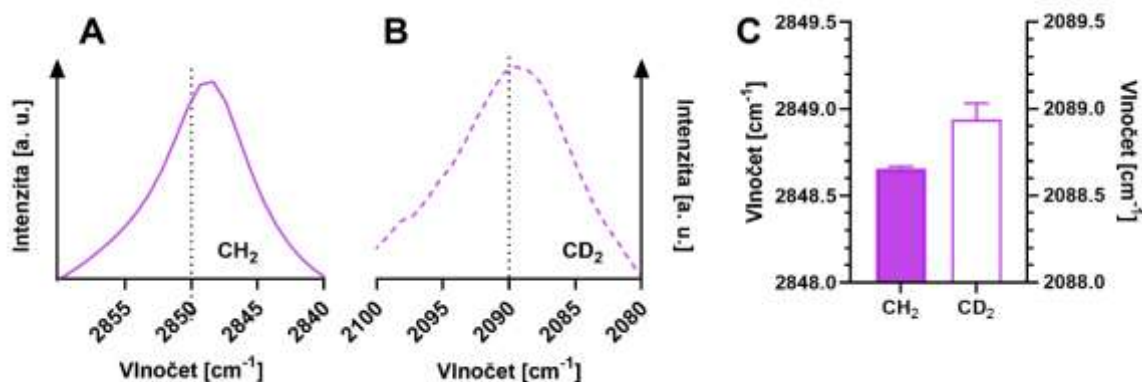
Obrázek 18: Grafické znázornění měření TEWL [g/h/m²] prvního permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC) v závislosti na čase (h). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM (střední chyba průměru) všech pěti vzorků u každé skupiny. Černou barvou je znázorněna kontrola 1, šedou kontrola 2. Další barvy představují vzorky s aplikovanými formulacemi dle popisu.

Po dokončení měření TEWL byly vzorky měřeny technikou ATR-FTIR. Konformace lipidů lze odvodit ze symetrických valenčních vibrací methylenových vazeb. Pokud jsou kožní lipidy v tzv. *all-trans* („cik cak“) konformaci [68], znamená to, že řetězce jsou správně uspořádány a vlnočty symetrických methylenových valenčních vibrací tak nejsou vyšší než 2850 cm^{-1} . [69] Pokud jsou hodnoty vlnočtů vyšší než tato hodnota, lipidy jsou méně uspořádané až neuspořádané, jelikož se zvyšuje množství tzv. *gouche* konformerů. [70] Na Obrázku 19 jsou reprezentativně znázorněny pásy methylenové symetrické vibrace.



Obrázek 19: Symetrické valenční vibrace methylenových skupin bariérových lipidů v jednotlivých formulacích u ATR-FTIR spektra. Černou barvou je znázorněna kontrola 1, šedou kontrola 2. Další barvy představují vzorky s aplikovanými formulacemi dle popisu.

Maxima vlnočtů methylenových symetrických vibrací naznačují dobré uspořádání řetězců ve studovaných vzorcích, tj. $2848,4\text{ cm}^{-1}$ („zdravá“ SC), $2848,9\text{ cm}^{-1}$ („placebo“), $2848,6\text{ cm}^{-1}$ (formulace s CER AP), $2848,7\text{ cm}^{-1}$ (formulace s CER EOS) a $2848,6\text{ cm}^{-1}$ (formulace se směsí CER AP a CER EOS). To značí, že po podání CER formulace došlo ke zlepšení organizace lipidů ve SC, ale bez statistického významu. Extrahovaná SC nevykazovala silné vibrace v tomto spektru, protože kvůli extrakci neobsahuje mnoho methylenových skupin, a tudíž odezva v naměřeném spektru nebyla příliš velká.



Obrázek 20: Valenční vibrace methylenových skupin bariérových lipidů ve formulaci obsahující DFFA u ATR-FTIR spektra. Panel A zobrazuje valenční vibrace methylenových skupin protonovaných a panel B deuterovaných řetězců. Panel C znázorňuje průměr ze všech vzorků (\pm směrodatná odchylka) těchto dvou skupin u všech vzorků ($n=5$).

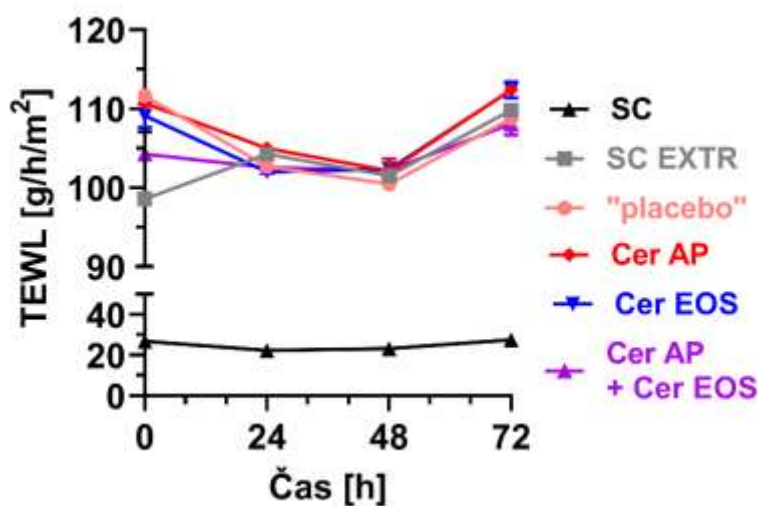
Pro lepší pochopení chování bariérových lipidů byla na poškozenou kožní bariéru aplikována značená formulace. IR spektroskopie u vzorku obsahující DFFA je zobrazena na Obrázku 15. IR hodnoty ukazují, že směs DFFA pronikla do SC, jak naznačuje přítomnost symetrických methylenových vibrací protonovaných (panel A) a deuterovaných řetězců (panel B). [71, 72] Zatímco lipidy CH_2 řetězců jsou relativně dobře uspořádány ($2848,6 \text{ cm}^{-1}$), řetězce DFFA jsou uspořádány hůře, což je patrné z posunu maxima CD_2 vibrace na hodnotu $2089,1 \text{ cm}^{-1}$ (panel C).

Z prvního permeačního experimentu lze vyvodit několik závěrů. Ačkoliv připravené formulace obsahovaly bariérové lipidy, jejich topické podání na poškozenou kožní bariéru nepřinesly statisticky významný pokles TEWL. Z výsledků prvního experimentu však lze říci, že připravené formulace neměly negativní vliv na uspořádání lipidových řetězců a také na TEWL.

4.2. Druhý permeační experiment

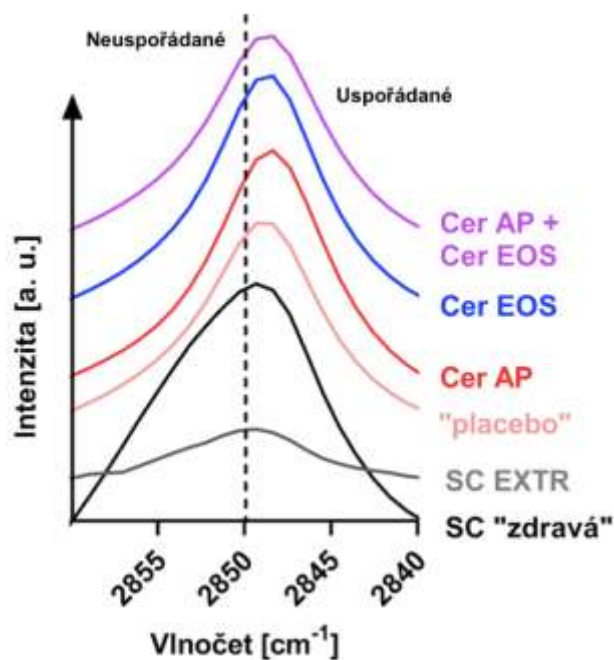
Neúspěšné obnovení kožní bariéry v prvním experimentu mohlo být pravděpodobně způsobeno odstraněním formulací po aplikaci, a proto v tomto experimentu byly formulace na vzorcích SC po celou dobu ponechány. Pro permeaci byly použity stejné vzorky jako v prvním případě (Tabulky 10-12), konkrétně tedy MS9A (bez CER; „placebo“), MS9B (CER AP; 0,5 %), MS10 (CER EOS; 0,5 %) a MS11 (0,5 %; CER AP + CER EOS). Změny hodnot TEWL v časech 0 h (před aplikací) a 24, 48 a 72 h po aplikaci jsou zobrazeny v Obrázku 21. Z výsledků kontrol vyplývá, že extrakce proběhla řádně, protože poškozená SC má mnohem

vyšší hodnoty TEWL než „zdravá“ SC.[60] Celkově jsou výsledky oproti prvnímu experimentu více konzistentní. Při měření po 48 h se zdálo, že se hodnoty začaly snižovat, ale po třech dnech došlo k paradoxnímu zvýšení TEWL.



Obrázek 21: Grafické znázornění měření TEWL [g/h/m²] druhého permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC) v závislosti na čase (h). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± SEM (střední chyba průměru) všech pěti vzorků u každé skupiny (n = 5). Černou barvou je znázorněna kontrola 1, šedou kontrola 2. Další barvy představují vzorky s aplikovanými formulacemi dle popisu.

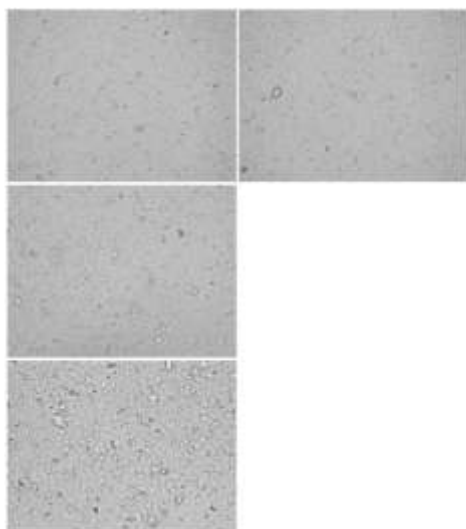
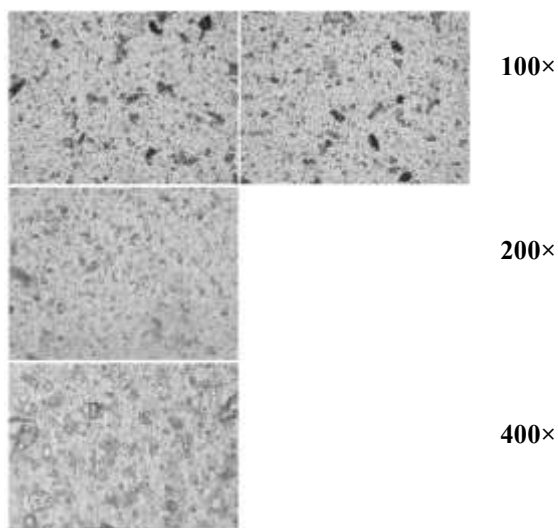
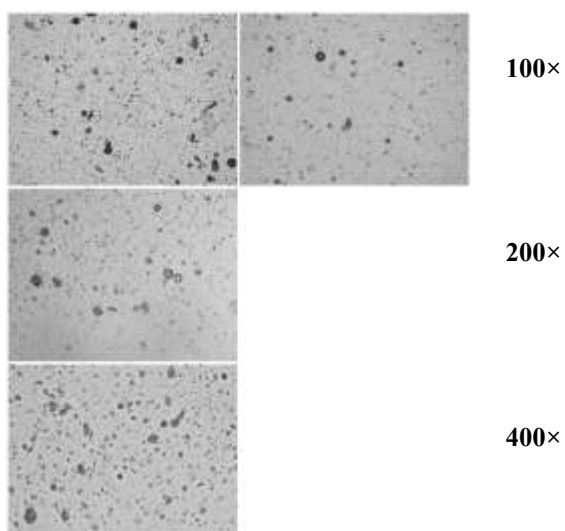
Výsledky IR spektroskopie, znázorněny na Obrázku 22, naznačují podobné závěry jako u prvního permeačního experimentu. Z maxim vlnočtů symetrických methylenových vibrací („zdravá“ SC – 2848,8 cm⁻¹; „placebo“ – 2848,8 cm⁻¹; s CER AP – 2848,4 cm⁻¹; s CER EOS – 2848,6 cm⁻¹; se směsí CER AP + CER EOS – 2848,6 cm⁻¹) lze konstatovat, že ponechání formulace se výrazně neprojeví ani na zlepšení, ani na zhoršení bariérových vlastností studovaných modelů poškozené bariéry včetně její mikrostruktury.



Obrázek 22: Symetrické valenční vibrace methylenových skupin bariérových lipidů v jednotlivých formulacích u ATR-FTIR spektra. Černou barvou je znázorněna kontrola 1, šedou kontrola 2. Další barvy představují vzorky s aplikovanými formulacemi dle popisu.

4.3. Třetí permeační experiment

Vzhledem k tomu, že množství topických formulací s obsahem bariérových lipidů nebývá příliš velké [65], třetí experiment byl proveden s polovičním množstvím formulací, ale stejným množstvím CER-fraction. Připravené formulace byly pozorovány optickou mikroskopií se zvětšením 100×, 200× a 400×. Připravené emulze byly díky nižšímu podílu octanového pufru viskóznější, nicméně podle výsledků z optické mikroskopie (Obrázek 23) nebyly pozorovány projevy nestability či fázové separace připravených formulací.

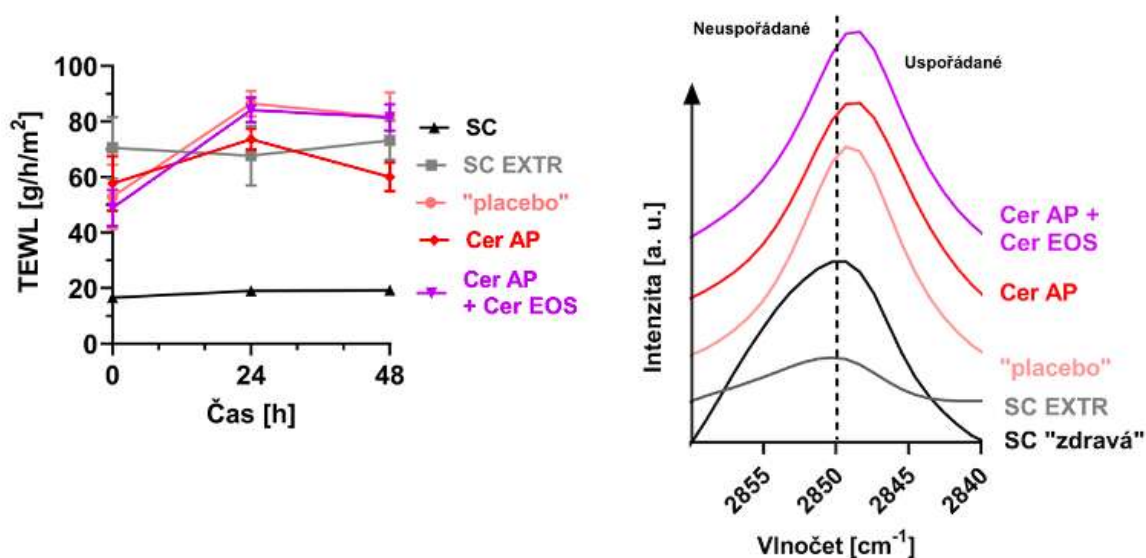
MS13A**MS13B****MS13C**

Obrázek 23: Zobrazení topických formulací optickým mikroskopem při 100×, 200× a 400× zvětšení.

Výsledky TEWL a IR spektroskopie jsou znázorněné na *Obrázku 24*. Výsledná hodnota TEWL u zdravé kontroly byla $18,31 \pm 0,86 \text{ g/h/m}^2$. U poškozené kožní bariéry byla hodnota $70,49 \pm 1,59 \text{ g/h/m}^2$, u „placebo“ formulací vyšly hodnoty $73,66 \pm 10,46 \text{ g/h/m}^2$, dále s CER AP bylo změřeno $63,78 \pm 4,95 \text{ g/h/m}^2$ a u směsi CER EOS + CER AP byly hodnoty $71,49 \pm 11,33 \text{ g/h/m}^2$. Po podání formulací na poškozenou kožní bariéru nedošlo ke statistickému poklesu hodnot TEWL.

U IR spektroskopie (provedena shodně s předešlými experimenty) stanovené hodnoty vlnočtů ukázaly, že u vzorků s obsahem CER je více řetězců dobře uspořádaných. Hodnoty maxim vlnočtů methylenových vibrací po aplikaci „placebo“ formulace byly srovnatelné ($2848,8 \text{ cm}^{-1}$) s těmi, které byly naměřeny u membrán po aplikaci formulace s CER AP nebo dokonce směsí CER AP + CER EOS (u obou typů vzorků hodnota $2848,7 \text{ cm}^{-1}$). Kromě

symetrických valenčních vibrací, vykazovaly vzorky vibrace i v oblasti deformačních nůžkových (oblast 1470–1460 cm^{-1}) a kývavých vibrací (oblast 750–700 cm^{-1}), avšak změny mezi jednotlivými vzorky nebyly statisticky významné (nezobrazeno).



Obrázek 24: Vlevo: Grafické znázornění měření TEWL [g/h/m^2] třetího permeačního experimentu u modelově poškozené kožní bariéry (SC) v závislosti na času (h). Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM (střední chyba průměru) všech pěti vzorků u každé skupiny ($n = 5$). Vpravo: Symetrické valenční vibrace methylenových skupin bariérových lipidů v jednotlivých formulacích u ATR-FTIR spektra. Černou barvou je znázorněna kontrola 1, šedou kontrola 2. Další barvy představují vzorky s aplikovanými formulacemi dle popisu.

Výsledky třetího permeačního experimentu rovněž nenaznačují příznivý vliv topicky podávaných bariérových lipidů na poškozenou kožní bariéru. Tato skutečnost mohla být způsobena několika faktory. V potaz přichází úprava poměru CER/cholesterol/FFA ze 2:1:1 na 3:1:1 podobně jako u registrovaného přípravku EpiCeram[®] v USA. [40] Také je možné, že extrakce SC byly nevhodně provedené a samotnou extrakcí tak došlo k mechanickému poškození tkáně. Otázkou tedy zůstává způsob a provedení modelového poškození kožní bariéry. Kupříkladu *De Paepe a kol. (2002)* poškozovali kůži na zdravých dobrovolnících pomocí acetonu a lauryl-sulfátu sodného. Z jejich výsledků je patrné, že poškození kůže bylo velmi povrchové, a proto vliv aplikace zkoumaných formulací nebyl možný pozorovat. [73] Právě proto je důležité prověřit i další možnosti modelového poškození SC, např. pomocí stripování (angl. *tape stripping*) či jinými způsoby. Dále mohla hrát roli nevhodná aplikace CER nebo jejich interakce s dalšími složkami formulace. Tyto faktory musí být zváženy, což značí potřebu dalšího výzkumu v této oblasti.

5. ZÁVĚR

Ceramidy jsou klíčovou složkou ve *stratum corneum*, kde hrají důležitou roli v udržování kožní bariéry a ochraně před vnějšími vlivy. Vzhledem k tomu, že ceramidy jsou přirozenou složkou kožní tkáně, jsou velmi dobře snášeny a mají minimální vedlejší účinky. To znamená, že použití ceramidů v topických přípravcích může být velmi efektivní a bezpečné. Z těchto důvodů je stále důležité zkoumat vliv ceramidů na poškozenou kožní tkáň a objevovat nové možnosti v léčbě a péči o pokožku.

Cílem této práce bylo vytvořit formulaci obsahující v kosmetice často používaný fytoceramid AP a ultradlouhý acylceramid EOS, který hraje nezastupitelnou roli v udržení bariérových funkcí kůže. Formulace vycházely z již publikované práce; cílem bylo jejich zjednodušení, následně hodnocení a studium jejich vlivu na modelově poškozenou kožní bariéru. Toto bylo studováno měřením ztráty vody a dále infračervenou spektroskopií, díky které lze hlouběji nahlédnout do mikrostruktury studovaných modelů. Výsledky ukazují, že ceramidy se do poškozené *stratum corneum* vstřebaly, ale nebyly schopné integrovat s poškozenou tkání natolik, aby dostatečně zlepšily její bariérové vlastnosti. Přestože tato práce neposkytuje očekávané výsledky topického podání bariérových lipidů na poškozenou kožní bariéru, může sloužit jako podklad pro budoucí výzkumy v oblasti bariérových lipidů, jejich uspořádání, chování s dalšími látkami a pochopit tak jejich roli, a to nejen ve fyziologických, ale také patofyziologických stavech organismu.

6. POUŽITÉ ZKRATKY

AD	atopická dermatitida
ATR-FTIR IR	spektroskopie zeslabeného úplného odrazu s Fourierovou transformací (angl. attenuated total reflection-Fourier transform infrared)
CER	ceramid(y)
DFFA	deuterované volné mastné kyseliny (angl. <i>deuterated free fatty acids</i>)
FFA	volné mastné kyseliny (angl. free fatty acids)
IR	infračervené záření
LPP	fáze s dlouhou periodicitou (angl. long periodicity phase)
NMF	přirozené hydratační faktory (angl. natural moisturizing factors)
SC	rohová vrstva (lat. stratum corneum)
SPP	fáze s krátkou periodicitou (angl. short periodicity phase)
TEWL	ztráta vody přes membránu (angl. trans-epidermal water loss)
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné světlo

7. LITERATURA

- [1] Čihák, R., *Anatomie*. 2., upr. dopl. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 978-80-7169-970-5
- [2] Langmeier, M., *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0
- [3] Kittnar, O., *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4
- [4] Štork J., et al., *Dermatovenerologie*. Galén. ISBN 978-80-7262-898-8
- [5] Salavec M. a kol., *Diferenciální diagnostika v dermatologii*. Maxdorf jessenius, ISBN 978-80-7345-699-3
- [6] Vokurka, M., Hugo J., *Velký lékařský slovník*. 9. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2009. ISBN 978-80-7345-202-5
- [7] Almeida, C., Filipe, P., Rosado, C., Pereira-Leite C., Nanodelivery Strategies for Skin Diseases with Barrier Impairment: Focusing on Ceramides and Glucocorticoids. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 2022, 12(2), 275
- [8] Eucerin®: Jak kůže funguje – Struktura a funkce kůže, k 20.10.2022, dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
- [9] Tessema, E.N., Gebre-Mariam, T., Neubert, R. H. H., Wohlrab, J., Potential Applications of Phyto-Derived Ceramides in Improving Epidermal Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2017, 30(3), 115–138
- [10] Sahle, F. F., Gebre-Mariam, T., Dobner, B., Wohlrab, J., Neubert, R. H., Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2015, 28(1), 42–55
- [11] Delva, E., Tucker, D. K., Kowalczyk, A. P., The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009, 1(2), a002543
- [12] Boer, D. E. C., van Smeden, J., Al-Khakany, H., Melnik, E., van Dijk, R., Absalah, S., Vreeken, R. J., Haenen, C. C. P., Lavrijsen, A. P. M., Overkleeft, H. S., Aerts, J. M. F. G., Bouwstra, J. A., Skin of atopic dermatitis patients shows disturbed β -glucocerebrosidase and acid sphingomyelinase activity that relates to changes in stratum corneum lipid composition. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020, 1865(6), 158673
- [13] Kováčik A., Pullmannová P., Opálka L., Šilarová M., Maixner J., Vávrová K., Effects of (R)- and (S)- α -Hydroxylation of Acyl Chains in Sphingosine, Dihydrosphingosine, and Phytosphingosine Ceramides on Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(14), 7468
- [14] Pullmannová P., Staňková K., Pospíšilová M., Školová B., Zbytovská J., Vávrová K., Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of

- model stratum corneum lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014, 1838(8), 2115–2126
- [15] Kawana, M., Miyamoto, M., Ohno, Y., Kihara, A., Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *Journal of Lipid Research*. 2020, 61(6), 884–895
- [16] Suzuki, M., Ohno, Y., Kihara, A., Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *Journal of Lipid Research*. 2022, 63(7), 100235
- [17] Wertz P. W., Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum*. 2000, 208, 7–11
- [18] Kahraman E, Kaykın M, Şahin Bektay H, Güngör S., Recent Advances on Topical Application of Ceramides to Restore Barrier Function of Skin. *Cosmetics*. 2019, 6(3), 52
- [19] Wertz, P. W., Lipids and the Permeability and Antimicrobial Barriers of the Skin. *Journal of Lipids*. 2018, 2018, 1–7
- [20] Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P., Bouwstra, J. A., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research*. 2012, 53(12), 2755–2766
- [21] Iwai, I., Han, H., den Hollander, L., Svensson, S., Ofverstedt, L. G., Anwar, J., Brewer, J., Bloksgaard, M., Laloef, A., Nosek, D., Masich, S., Bagatolli, L. A., Skoglund, U., Norlén, L., The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2012, 132(9), 2215–2225
- [22] Ananthapadmanabhan, K. P., Mukherjee, S., Chandar, P., Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, 35(4), 337–345
- [23] Holleran, W. M., Takagi, Y., Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS letters*. 2006, 580(23), 5456–5466
- [24] Murata, Y., Ogata, J., Higaki, Y., Kawashima, M., Yada, Y., Higuchi, K., Tsuchiya, T., Kawainami, S., Imokawa, G., Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *The Journal of Investigative Dermatology*. 1996, 106(6), 1242–1249

- [25] Kanda, N., Hoashi, T., Saeki, H., Nutrition and Atopic Dermatitis. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*. 2021, 88(3), 171–177
- [26] Fujii, M., The Pathogenic and Therapeutic Implications of Ceramide Abnormalities in Atopic Dermatitis. *Cells*. 2021, 10(9), 2386
- [27] Kezic, S., McAleer, M. A., Jakasa, I., Goorden, S. M. I., der Vlugt, K. G., Beers-Stet, F. S., Meijer, J., Roelofsen, J., Nieman, M. M., van Kuilenburg, A. B. P., Irvine, A. D. Children with atopic dermatitis show increased activity of β -glucocerebrosidase and stratum corneum levels of glucosylcholesterol that are strongly related to the local cytokine milieu. *The British Journal of Dermatology*. 2022, 186(6), 988–996
- [28] Kezic, S., Jakasa, I., Filaggrin and Skin Barrier Function. *Current Problems in Dermatology*. 2016, 49, 1–7
- [29] Frazier, W., Bhardwaj, N., Atopic Dermatitis: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*. 2020, 101(10), 590–598
- [30] Benáková, N., Léčba atopické dermatitidy v ordinaci dětského lékaře. *Pediatric pro praxi*. 2008, 9(1), 36–40
- [31] Łuczaj, W., Wroński, A., Domingues, P., Domingues, M. R., Skrzydlewska, E., Lipidomic Analysis Reveals Specific Differences between Fibroblast and Keratinocyte Ceramide Profile of Patients with Psoriasis Vulgaris. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020, 25(3), 630
- [32] Bowcock, A. M., Krueger, J. G., Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews. Immunology*. 2005, 5(9), 699–711
- [33] Alessandrini, F., Stachowitz, S., Ring, J., Behrendt, H., The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001, 116(3), 394–400
- [34] Borodzicz, S., Rudnicka, L., Mirowska-Guzel, D., Cudnoch-Jedrzejewska, A., The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids in Health and Disease*. 2016, 15, 13
- [35] Benáková, N., Psoriáza a současné léčebné možnosti. *Interní medicína pro praxi*. 2006, 7(2), 88–91
- [36] Reid, C., Griffiths, C. E. M., Psoriasis and Treatment: Past, Present and Future Aspects. *Acta Dermato-Venereologica*. 2020, 100(3)
- [37] Barnes, T. M., Mijaljica, D., Townley, J. P., Spada, F., Harrison I. P., Vehicles for Drug Delivery and Cosmetic Moisturizers: Review and Comparison. *Pharmaceutics*. 2021, 13(12), 2012

- [38] Kamińska, E., The role of emollients in atopic dermatitis in children. *Developmental Period Medicine*. 2018, 22(4), 396–403
- [39] Seghers, A. C., Cai, S. C., Ho, M. S., Giam, Y. C., Tan, L., Grönhagen, C. M., Tang, M. B. Evaluation of a Pseudoceramide Moisturizer in Patients with Mild-to-Moderate Atopic Dermatitis. *Dermatology and Therapy*. 2014, 4(1), 83–92
- [40] EpiCeram[®]; About EpiCream; k 2.2.2023; dostupné z: <https://www.epiceramrx.com/index.html>
- [41] Ceradan[®]; The Science; k 2.2.2023; dostupné z: <https://www.ceradan.com/the-science/>
- [42] CeRaVe[®]; Co jsou ceramidy?; k 16.1.2023; dostupné z: <https://www.cerave.cz/o-cerave/co-jsou-ceramidy>
- [43] The Inkey List[™] USA. Ceramide Night Treatment; dostupné z <https://www.theinkeylist.com/products/ceramide-serum>
- [44] Bepanthen[®]; Sensiderm krém; k 2.2.2023; dostupné z <https://www.bepanthen.cz/bepanthen-sensiderm-krem/>
- [45] Huang, H. C., Chang, T. M., Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin. *International Journal of Dermatology*. 2008, 47(8), 812–819
- [46] Takada, M., Ishikawa, Y., Numano, K., Hirano, S., Imokawa, G., A Nano-Emulsion Containing Ceramide-like Lipo-Amino Acid Cholesteryl Derivatives Improves Skin Symptoms in Patients with Atopic Dermatitis by Ameliorating the Water-Holding Function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(21), 13362
- [47] Tokudome, Y., Endo, M., Hashimoto, F. (2014). Application of glucosylceramide-based liposomes increased the ceramide content in a three-dimensional cultured skin epidermis. *Skin pharmacology and physiology*, 27(1), 18–24
- [48] Opálka, L., Kováčik, A., Sochorová, M., Roh, J., Kuneš, J., Lenčo, J., Vávrová, K., Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Organic Letters*. 2015, 17(21), 5456–5459
- [49] Uche, L.E., Gooris, G.S., Bouwstra, J. A., Beddoes, C.M., Barrier Capability of Skin Lipid Models: Effect of Ceramides and Free Fatty Acid Composition. *Langmuir*. 2019, 35(47), 15376–15388
- [50] Hejtmánek, M., *Úvod do světelné mikroskopie*: Skripta UP Olomouc, 2001. ISBN 80-244-0333-1
- [51] Kligman, A. M., Christophers, E., Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of Dermatology*. 1963, 88(6), 702–705

- [52] Ng, S. F., Rouse, J., Sanderson, D., Eccleston, G., Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*. 2010, 2(2), 209–223
- [53] Franz Cell - The Original - PermeGear; k 27.3.2023, dostupné z: <https://permegear.com/franz-cells/>
- [54] Čuříková-Kindlová, B. A., Vovesná, A., Nováčková, A., Zbytovská, J., In Vitro Modeling of Skin Barrier Disruption and its Recovery by Ceramide-Based Formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2021, 23(1), 21
- [55] Green, M., Kashetsky, N., Feschuk, A., Maibach, H. I., Transepidermal water loss (TEWL): Environment and pollution—A systematic review. *Skin Health and Disease*. 2022, 2(2), e104
- [56] Aquaflux comparison studies. 10.2.2023, dostupné z: <https://www.bioxsystems.com/wp-content/uploads/Aquaflux-comparison-studies-1.pdf>
- [57] Morris, M. D., Berger A. J., Mahadevan-Jansen A., Infrared and Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2005, 10(3): 031101
- [58] Kania, P., Infračervená spektrometrie: 31
- [59] Novotná, R., Šilha, T., Trávníček, Z., Spektrální Metody Studia Chemických Látek, UP Olomouc 2011
- [60] Kulhánková, R., Studium topicky podávaných ceramidů, 2022
- [61] Rawlings, A. V., Scott, I. R., Harding, C. R., Bowser, P. A., Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level. *Journal of Investigative Dermatology*. 1994, Volume 103 (5), 731-740
- [62] Groen, D., Gooris, G. S., Bouwstra, J. A., Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir*. 2010, 26(6), 4168–4175
- [64] Cho, W. G., Kim, K. A., Jang, S. I., Cho, B. O., Behaviour of Nanoemulsions Containing Ceramide IIIB and Stratum Corneum Lipids. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2018, 44(1), 31–37
- [66] Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R., Ponc, M., Phase Behavior of Stratum Corneum Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: The Role of Natural and Synthetic Ceramide 1. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2002; 118(4): 606-17
- [63] Novotný, J., Janušová, B., Novotný, M., Hrabálek, A., Vávrová, K., Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2009, Vol. 22: 22-30

- [65] Vovesná, A., Zhigunov, A., Balouch, M., Zbytovská, J., Ceramide liposomes for skin barrier recovery: A novel formulation based on natural skin lipids. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, 596, 120264
- [67] Lyubchenko, T., Collins, H. K., Goleva, E., Leung, D. Y. M. Skin Tape Sampling Technique Identifies Proinflammatory Cytokines in Atopic Dermatitis Skin. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2021, 126(1), 46-53.e2
- [68] Vávrová, K., Kováčik, A., Opálka, L., Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, 64(2), 28–35
- [69] Mendelsohn, R., Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998, 96(1), 141–157
- [70] Wohlrab, J., Vollmann, A., Wartewig, S., Marsch, W. C., 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), 141–146. I
- [71] Gorcea, M., Hadgraft, J., Moore, D. J., Lane, M. E., Fourier transform infrared spectroscopy studies of lipid domain formation in normal and ceramide deficient stratum corneum lipid models. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, 435(1), Advances in Topical Drug Delivery, 63–68
- [72] Oguri, M., Gooris, G. S., Bito, K., Bouwstra J. A., The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014, 1838(7), 1851–1861
- [73] De Paepe, K., Roseeuw, D., Rogiers, V., Repair of acetone – and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002, 16(6), 587–594