

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

Interakce PAMAM dendrimerů s lidským *stratum corneum*
(Interaction of PAMAM dendrimers with the human stratum corneum)

Vedoucí práce: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

V Hradci Králové 2023

Kateřina Žofková

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

V Hradci Králové 2023

Kateřina Žofková

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala zejména své vedoucí diplomové práce PharmDr. Anně Paraskevopoulou, Ph.D., za ochotu, vstřícnost, odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a dalším členům Skin Barrier Research Group. Dále děkuji doc. PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D., za pomoc při měření na IR. Děkuji také za finanční podporu Univerzity Karlově (SVV 260 661) a Grantové agentuře České republiky (GAČR 22-20839K). Za podporu děkuji také svým přátelům a rodině.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Autor: Kateřina Žofková

Název diplomové práce: Interakce PAMAM dendrimerů s lidským *stratum corneum*

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené, monodisperzní makromolekuly. Na základě stupně větvení pak rozlišujeme jednotlivé generace dendrimerů, které v souvislosti s rozšiřováním dendrimera vznikají. Vyšší generace dendrimerů vytvářejí kulovité struktury s vnitřní dutinou, do které je možno enkapsulovat molekuly, např. léčivo. Díky své struktuře, kterou lze specificky a řízeně upravit, mají dendrimery vysoký biomedicínský potenciál. Jednou z nejrozšířenějších skupin dendrimerů jsou polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery založené na ethylendiaminovém jádru, rozvětvených jednotek amidových a aminových skupin a terminálních funkčních skupin. PAMAM dendrimery s aminovými skupinami se v minulosti prokázaly jako užitečné v oblasti akcelerace kožní penetrace léčiv. Doposud však není znám mechanismus, jakým tyto molekuly ovlivňují bariérovou funkci kůže.

Proto byl v této práci zkoumán mechanismus interakce PAMAM dendrimerů s lipidy *stratum corneum* (SC), neboli vrchní částí kůže, kde se nachází kožní bariéra. Při experimentu byly použity PAMAM dendrimery druhé, třetí a čtvrté generace, s povrchově vázanými primárními aminovými skupinami. Nejprve se připravily 1mM a 10mM roztoky dendrimerů od každé použité generace. Takto připravené roztoky dendrimerů se následně aplikovaly na hydratované izolované SC. Ke zhodnocení účinku PAMAM dendrimerů byly využity dvě metody měření. První metodou byla infračervená spektroskopie (IR). Druhou metodou byla diferenční skenovací kalorimetrie (DSC).

V rámci experimentu a dosažených výsledků bylo zjištěno, že při interakci PAMAM dendrimerů se SC, dochází ke změně uspořádání lipidů SC. To naznačuje, že by tak dendrimery mohly umožňovat intercelulární průchod léčiv přes kožní bariéru. Navíc byla zjištěna závislost tohoto účinku na generaci dendrimerů, kdy ke signifikantním změnám v uspořádání kožních lipidů došlo po aplikaci PAMAM dendrimerů čtvrté generace a tento účinek nebyl závislý na koncentraci.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Author: Kateřina Žofková

Title of the thesis: Interaction of PAMAM dendrimers with human *stratum corneum*

Dendrimers are highly branched, monodisperse macromolecules. On the basis of the degree of branching, can be distinguished different generations of dendrimers that arise as the dendrimers expand. Higher generations of dendrimers form spherical structures with an internal cavity, where molecules such as a drug can be encapsulated. Due to their structure, which can be specifically and controllably modified, dendrimers are investigated for their use in biomedicine. One of the most widely used groups of dendrimers are polyamidoamine (PAMAM) dendrimers, based on an ethylenediamine core, branched amide and amine units, and terminal functional groups. PAMAM dendrimers with amine groups have proven useful in the past as skin penetration enhancers of different drugs. However, the mechanism how these molecules affect skin barrier function is not yet known.

Therefore, in this work was investigated the mechanism of interaction of PAMAM dendrimers with lipids of *stratum corneum* (SC), the uppermost skin layer where the skin barrier is found. Second, third and fourth generation of PAMAM dendrimers with surface-bound primary amine groups were used in the experiment. First, 1mM and 10mM solutions of dendrimers from each generation were prepared. These dendrimer solutions were then applied to the hydrated isolated SC. Two measurement methods were used to evaluate the effect of PAMAM dendrimers. The first method was infrared spectroscopy (IR). The second method was differential scanning calorimetry (DSC).

Obtained results showed that during the interaction of PAMAM dendrimers with SC a change in the skin lipid arrangement occurred. This fact suggests that dendrimers could allow transportation of a drug through the skin by the intercellular route. Moreover, the dependence on the dendrimers generation was found. Significant changes in the skin lipids arrangement occurred after the application of PAMAM dendrimers of the fourth generation. This effect was not dependent on the concentration of dendrimers in the applied solution.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk	8
1. Úvod a cíle práce.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Struktura a význam lidské kůže	11
2.1.1 Hypodermis	12
2.1.2 Dermis	12
2.1.3 Epidermis	12
2.2 Stratum corneum	14
2.2.1 Korneocytární lipidová obálka	15
2.2.2 Lipidová matrix SC	15
2.2.3 Ceramidy (CER).....	15
2.2.4 Volné mastné kyseliny (VMK) a cholesterol (CHOL)	16
2.2.5 Uspořádání lipidů v lipidové matrix.....	16
2.3 Transport látek přes kožní bariéru.....	18
2.3.1 Enhancery kožní permeace.....	19
2.4 Dendrimery.....	21
2.4.1 Struktura a vlastnosti dendrimerů	21
2.4.2 Využití dendrimerů ve zdravotnictví.....	22
2.4.3 PAMAM dendrimery	23
3. Experimentální část	26
3.1 Materiál a chemikálie	26
3.2 Lidská kůže a izolace stratum corneum	26
3.3 Přístrojové vybavení.....	27
3.4 Izolace SC z lidské kůže.....	28
3.5 Příprava roztoků PAMAM dendrimerů G2-G4	28
3.5.1 Výpočet objemu	29
3.6 Hydratace SC.....	29
3.7 Aplikace roztoku dendrimerů na SC	30
3.8 Sušení	30
3.9 Metody hodnocení účinku PAMAM dendrimerů	30
3.9.1 DSC	30

3.9.2	IR.....	31
4.	Výsledky.....	32
4.1	Infračervená spektroskopie	32
4.2	Diferenciální skenovací kalorimetrie	36
5.	Diskuze.....	40
6.	Závěr.....	43
	Použitá literatura	44

Seznam zkratek

5FU	5-fluorouracil
CER	ceramidy
CHOL	cholesterol
CLE	korneocytární lipidová obálka
DPPC	dipalmytoylfosfatidylcholin
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
G_n	n generace dendrimerů
G_n -1mM	1mM roztok PAMAM dendrimerů generace n
G_n -10mM	10mM roztok PAMAM dendrimerů generace n
IR	infračervená spektroskopie
LM	lipidová matrix
PAMAM	polyamidoamino
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
SC	<i>stratum corneum</i>
SPE	skin penetration enhancer

1. Úvod a cíle práce

Nejsvrchnější vrstva kůže, *stratum corneum* (SC, neboli rohová vrstva), tvoří primární mechanickou bariéru kůže, respektive lidského těla. Slouží jako ochrana proti vnějšímu prostředí, reguluje ztráty vody a blokuje penetraci škodlivých látek nebo mikroorganismů z povrchu pokožky a vnějšího prostředí do organismu. Bariérová funkce SC je dána jejím jedinečným složením a uspořádáním.

Vedle své role kožní ochranné bariéry, představuje SC i jednu z možných cest podání léčiv. Díky svým vlastnostem představuje SC hlavní překážku pro průnik léčiv v oblasti transdermálního podání. Pro překonání kožní bariéry se mimo jiné využívají tzv. enhancery neboli akceleranty kožní permeace (SPE), mezi které se řadí i nanočásticové systémy – lipozomy, polymerické nanočástice a dendrimery. Tato práce je zaměřena na polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery, které zlepšují penetraci léčiv kůží a jejich interakci se SC. Cílem této diplomové práce je poskytnout nové a hlubší poznatky o mechanismu, kterým probíhá interakce mezi PAMAM dendrimery a lipidy SC.

2. Teoretická část

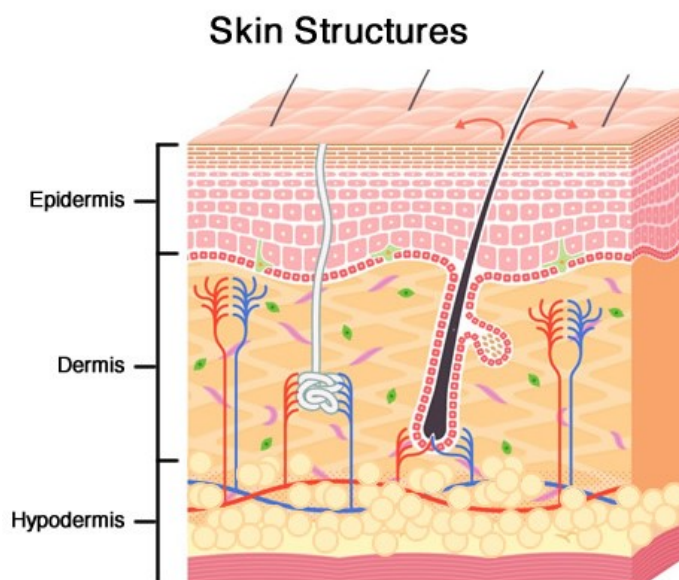
Teoretická část této diplomové práce se v úvodu věnuje popisu základních vlastností kůže a představení hlavních složek kůže. Podrobněji se pak zabývá stavbou, funkcí a uspořádáním složek SC. Součástí teoretické části je i seznámení s transportem látek přes kožní bariéru. Popisuje vlastnosti a použití SPE. V samotném závěru se zabývá z hlediska struktury a využití dendritickými molekulami a konkrétní skupinou dendrimerů PAMAM.

2.1 Struktura a význam lidské kůže

Kůže představuje nejrozsáhlejší orgán lidského těla, dosahuje v průměru 1,6-1,8 m² plochy a tvoří přibližně 10 % celkové hmotnosti člověka. Tloušťka kůže se v závislosti na různých částech těla liší a pohybuje se od 0,5 do 4,0 mm. Nejtenčí je kůže v oblasti očních víček, nejsilnější v oblasti zad.¹

Kůže plní primárně funkci vnější bariéry mezi organismem a vnějším prostředím. Kožní bariéra poskytuje účinnou ochranu vůči fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým vlivům z okolí. Dále kůže zabraňuje nadměrným ztrátám vody a elektrolytů. Podílí se na regulaci tělesné teploty. Působením slunečního záření tvoří z prekursoru (ergosterol) vitamin D. Uplatňuje se při látkové výměně a přispívá k udržení homeostázy vnitřního prostředí. Kůže je též důležitou součástí imunitního systému, jelikož obsahuje imunokompetentní buňky jako například Langerhansovy buňky, mastocyty, granulocyty, makrofágy a další. Mimo jiné, kůže zastupuje funkci senzickou, přičemž zajišťuje skrze receptory vnímání bolesti, tepla, chladu a tlaku.^{1,3}

Lidská kůže se skládá ze 3 hlavních vrstev, podkožní vrstvy – *hypodermis*, vazivové vrstvy – *dermis* a povrchové vrstvy – *epidermis*.^{1,5}



Obrázek č. 1. Přehled tří hlavních vrstev lidské kůže – *epidermis*, *dermis*, *hypodermis*.

https://www.rnceus.com/wound_care/Images/Skin_structure.jpg

2.1.1 Hypodermis

Představuje nejspodnější vrstvu kůže, která je tvořena podkožním vazivem a vrstvou tukových buněk (adipocytů). Stabilní spojení kůže k fasciím a okostici zajišťuje vazivo. Tukové buňky slouží jako tepelná izolace, ochrana před fyzickými nárazy a zásobárna energie.^{1,3,5}

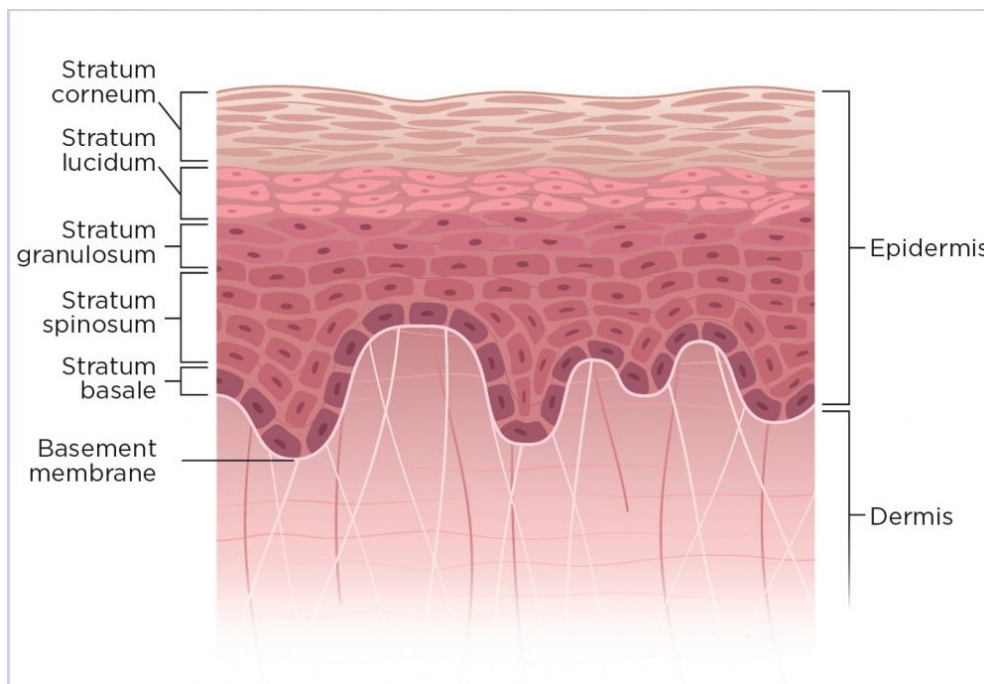
2.1.2 Dermis

Dermis tvoří střední vrstvu kůže. Skládá se z vaziva s obsahem kolagenních a elastických vláken, která zajišťují její pevnost, pružnost a odolnost vůči deformacím. V dermis se nachází systém krevního zásobení, receptory smyslového vnímání, lymfatické cévy, dále pak mazové a potní žlázy.^{1,2,5}

2.1.3 Epidermis

Epidermis je povrchovou vrstvou kůže, jejíž tloušťka se pohybuje v rozmezí od 0,06 mm do 0,8 mm, jedná se tedy o nejtenčí vrstvu kůže. V této vrstvě nalezneme několik typů buněk. Pro *epidermis* je charakteristický výskyt keratinocytů v různém stádiu jejich vývoje. Mezi další buňky patří melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy buňky. *Epidermis* je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který směrem k povrchu rohovatí.^{1,2,5}

V závislosti na vývojovém stádiu keratinocytů definujeme 5 vrstev *epidermis* – *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. *Stratum basale* tvoří nejspodnější vrstvu a dochází zde ke vzniku nových keratinocytů. Na *stratum basale* navazuje *stratum spinosum*, kde se buňky keratinocytů oplošťují a získávají kopinatý tvar. Ve *stratum granulosum* začínají keratinocyty produkovat zrna keratohyalinu (prekurzor keratinu), dále se diferencují a postupují přes vrstvu pevně stlačených bezjaderných buněk (*stratum lucidum*) až do rohové vrstvy (*stratum corneum*).^{1,5}



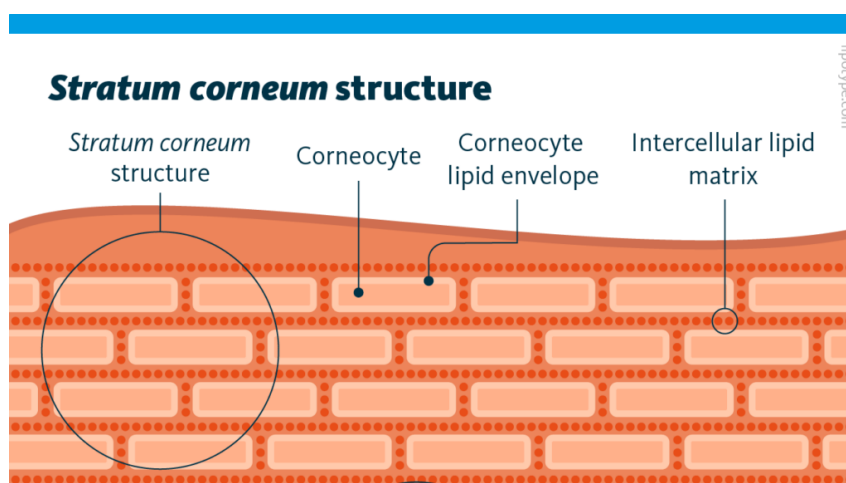
Obrázek č. 2. Jednotlivé vrstvy epidermis – *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, *stratum basale*.

<https://cdn.ps.emap.com/wp-content/uploads/sites/3/2019/11/Fig-2-Layers-of-the-skin-1024x758.jpg>

2.2 Stratum corneum

SC je nejsvrchnější vrstvou lidské kůže a plní funkci primární ochranné bariéry organismu vůči vnějšímu prostředí. Tato bariéra reguluje ztráty vody z těla a zabraňuje pronikání potenciálně škodlivých látek a mikroorganismů z povrchu kůže a vnějšího prostředí.^{1,3}

SC je nejtenčí vrstvou *epidermis* o velikosti 10-15 μm . Je tvořena plně zrohovatělými, zploštělými a protáhlými buňkami – korneocyty (bezjaderné oploštělé keratinocyty), které představují finální stádium epidermální diferenciace keratinocytů. Korneocyty se skládají z 70 až 80 % α , β -keratinu a 20 % lipidů. V kůži jsou pevným způsobem sestaveny v 18-21 vrstvách. Dále je SC tvořeno intercelulární hmotou s obsahem specifických lipidů, která společně s korneocyty vytváří typickou strukturu připomínající cihlovou zeď. Na základě toho, se korneocyty často označují jako „cihly“ a lipidová matrix v mezibuněčných prostorech jako „malta“. V této struktuře dále sehrávají roli desmozomy, pomocí nichž jsou korneocyty vzájemně spojeny.^{1,3,6}



Obrázek č.3. Struktura SC a její hlavní složky – korneocyty, korneocytární lipidová obálka a intracelulární lipidová matrix.

<https://www.lipotype.com/lipidomics-applications/skin-lipidomics-for-moisturizer-research/>

2.2.1 Korneocytární lipidová obálka

Obal korneocytů ve SC je tvořen korneocytární lipidovou obálkou (CLE). CLE se skládá z vrstvy zesíťovaných proteinů kovalentně vázaných na vrstvu lipidů. Mezi strukturální proteiny CLE, zajišťující kovalentní způsob vazby na lipidy, patří zejména lorocrin (z 80-85 %), z menší části pak involucrin. Vrstva lipidů CLE je složena z neobvykle dlouhých řetězců ω -acylovaných hydroxyceramidů s menším množstvím ω -hydroxykyselin. Lipidová část CLE je nezbytná pro tvorbu mezibuněčných lipidových lamel SC. Lipidový obal CLE, v „ukotvení“ na proteinovou matici, je důležitým aspektem bariérové funkce lidské kůže.^{3,7,8}

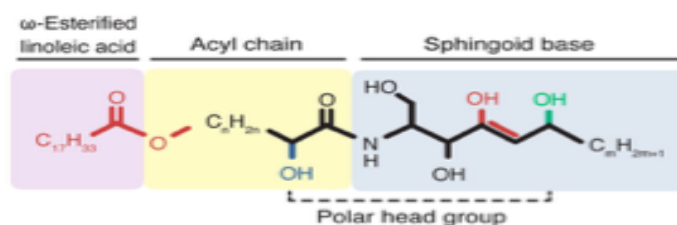
2.2.2 Lipidová matrix SC

Lipidová matrix (LM) představuje specifickou směs lipidů, která vyplňuje mezibuněčný prostor SC a obklopuje korneocyty. Hlavními složkami LM jsou ceramidy (CER), volné mastné kyseliny (VMK) a cholesterol (CHOL) v ekvimolárním poměru přibližně 1:1:1. Z menší části je LM tvořena organickými estery CHOL, cholesteryl sulfátem a glukosylceramidy. Na rozdíl od většiny biologických membrán LM neobsahuje fosfolipidy.^{3,6,12} Lipidy tvořící LM jsou lamelárně uspořádány.¹⁶ Složení a uspořádání lipidových lamel představuje důležitý prvek chemické a fyzikální odolnosti kožní bariéry.^{6, 15}

2.2.3 Ceramidy (CER)

CER jsou jednou z hlavních složek lipidů ve SC a jsou nezbytným předpokladem dobře fungující kožní bariéry. Jedná se o komplexní skupinu sfingolipidů, obsahují sfingosinové báze v podobě alifatických aminoalkoholů, zejména sfingozin, fytosfingozin a 6-hydroxysfingozin. Prostřednictvím jejich primární aminoskupiny se v poloze 2 spojují s řetězcem mastných kyselin amidovou vazbou. Délka mastné kyseliny je nejčastěji 24 uhlíků, jejich počet se však může pohybovat v rozmezí od 16–34 uhlíků. Mastné kyseliny jsou obvykle nasycené, nerozvětvené, mohou být substituovány hydroxyskupinou v poloze alfa či omega, či nesubstituovány.^{6,12,14,15} Omega hydroxyl je dále esterově vázán buď na kyselinu linolovou nebo na glutamátové zbytky proteinů (většinou na involucrin) na povrchu korneocytu.¹³ V LM se vyskytují 3 významné typy CER s obsahem ω -hydroxykyseliny o délce 30 uhlíků, které zastupují funkci molekulárních spojnůk mezi jednotlivými lamelami.¹⁴

CER můžeme rozlišovat na základě délky řetězce a typu vázané mastné kyseliny, dle jejich polaritě a typu sfingosinové báze. CER mají buď N (nehydroxylovanou), A (α -hydroxylovanou), nebo EO (ω -esterifikovaná kyselina linolová), acylovou skupinu navázanou buď na S (sfingosin), dS (dihydrosfingosin), P (fytosfingosin), nebo H (hydroxylsfingosin).^{11,16,40} V souvislosti s rozdíly v chemické struktuře dělíme CER do 16 podtříd – CER-NdS, CER-AdS, CER-EOdS, CER-OdS, CER-NS, CER-AS, CER-EOS, CER-OS, CER-NP, CER-AP, CER-EOP, CER-OP, CER-NH, CER-AH, CER-EOH a CER-OH. Snížené nebo změněné hladiny CER úzce souvisejí se změnami bariérové funkce kůže. Pokles CER ve SC vede ke zvýšení transepidermální ztráty vody a poruchám bariérové funkce kůže, což může vést ke vzniku kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida, psoriáza nebo ichtyóza.^{11,16}



Obrázek č. 4. Obecná struktura ceramidu. Acylový řetězec (může mít skupinu: ω -hydroxylovanou (O), α -hydroxylovanou (A) nebo nehydroxylovanou (N)). Na ω -hydroxylovanou skupinu může být vázána esterifikovaná kyselina linolová (esterifikovaná omega, EO). Sfingosinová báze může být buď nenasycená (sfingosin, S), nebo je nenasycená s jednou hydroxylovanou skupinou (hydroxylsfingosin, H), nebo je sfingosinová báze nasycená (dihydroxylsfingosin, dS) nebo nasycená s další hydroxylovanou skupinou (fytosfingosin, P).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198116301962>

2.2.4 Volné mastné kyseliny (VMK) a cholesterol (CHOL)

VMK v rohové vrstvě se skládají z řady nasycených kyselin s dlouhým řetězcem, z nichž nejvýznamnější jsou kyselina lignocerová (C24) a hexakosanová (C26). Ve stopovém množství se ve SC vyskytují nasycené a mononenasycené VMK s velmi dlouhým řetězcem (C32-C36).³ CHOL a estery CHOL tvoří významnou složku SC, kde slouží jako stabilizátory lipidických struktur, přičemž snižují fluiditu mezibuněčných lipidových lamel.^{3,6}

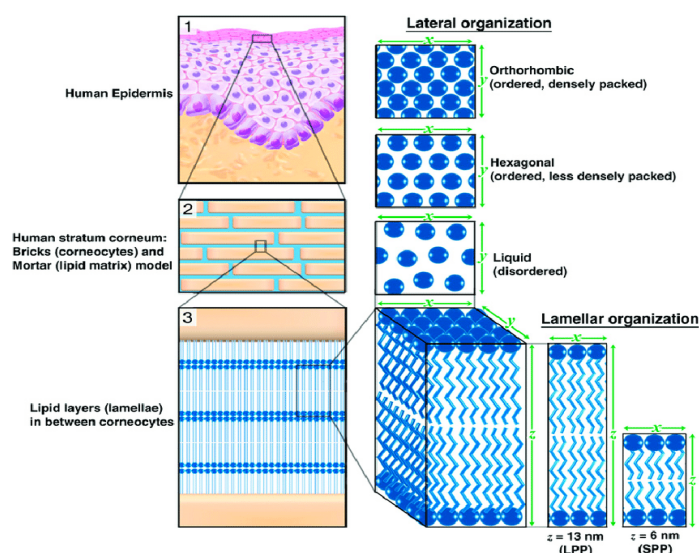
2.2.5 Uspořádání lipidů v lipidové matrix

Lipidové složky mezibuněčné LM vytvářejí lamelární struktury charakteristické pro SC. Lamely se skládají z několika dvojvrstev, ty se skládají na sebe a vytvářejí tak multivrstvé

útvary. Hydrofobní části se v těchto lipidových dvojvrstvách orientují dovnitř, naopak hydrofilní části směřují vně, do vodného prostředí.⁶ Lipidové molekuly v lamelách se vyskytují v lamelárním (podélném) nebo laterálním (příčném, bočním) uspořádání.^{13,17}

Lipidy v lamelárním uspořádání jsou orientovány paralelně k buněčné stěně korneocytů. Rozlišujeme zde dvě koexistující lamelární fáze – fáze s krátkou periodicitou s opakující vzdáleností přibližně 5,3-6,4 nm a fáze s dlouhou periodicitou s opakující vzdáleností 11,9-13,4 nm, třetí fázi lamelárního uspořádání tvoří separovaný CHOL.^{3,14} Pro tvorbu dlouhé fáze jsou nezbytné acylceramidy.¹³

V případě laterálního uspořádání bylo pomocí širokouhlé rentgenové difrakce pozorováno orthorhombické (krystalické), hexagonální (gelové) a fluidní uspořádání.^{3,13} Převládající laterální uspořádání v lidském SC je konformace orthorhombická, zde jsou lipidové molekuly uspořádány velmi těsně a mají omezenou pohyblivost. Orthorhombická konformace má hlavní podíl na propustnosti kožní bariéry.^{3,13} Směrem k povrchu kůže přechází orthorhombické uspořádání k více propustné a méně těsné hexagonální mřížkové struktuře, pro kterou je charakteristická větší rotační volnost.^{3,13,17} Fluidní uspořádání se vyskytuje u menší části lipidů a vykazuje nejvyšší propustnost.^{3,13}



Obrázek č.5. Lamelární a laterální uspořádání lipidů v lipidové matrix SC a tři možná laterální uspořádání lipidů – orthorhombické, hexagonální a fluidní.

https://www.researchgate.net/figure/Lamellar-and-lateral-organization-in-human-stratum-corneum-1-The-outermost-layer-of_fig4_231613918

2.3 Transport látek přes kožní bariéru

Jak již bylo zmíněno, hlavní funkcí kůže je zajišťovat účinnou ochranu vnitřního prostředí organismu před vnějšími vlivy, zabraňovat úniku vody a průniku toxinů. Vedle bariérové funkce představuje kůže také jednu z možných cest pro podávání léčiv, a to jak lokálně, tak i transdermálně. Lokální přípravky umožňují účinné látky působit na povrchu kůže nebo v jejích hlubších vrstvách. Transdermální přípravky jsou určeny k působení na úrovni systémové cirkulace.^{3,18}

K dosažení systémového oběhu, je nutný přechod látky/léčiva přes kůži. Transport látek je zde významně omezen mechanickými bariérami kůže, zejména povrchovou vrstvou SC a těsnými spoji v interfolikulární *epidermis* a ve vlasových folikulech.¹⁹ SC představuje hlavní bariéru při prostupu látek přes kůži, jejíž bariérová funkce je přisuzována jedinečnému uspořádání hydrofilních keratinových proteinů kompaktně obalených hydrofobními lamelárně uspořádanými lipidy.²⁰ SC obecně prostupují volnou difuzí pouze lipofilní léčiva s malou molekulou (<400 Da).¹⁸

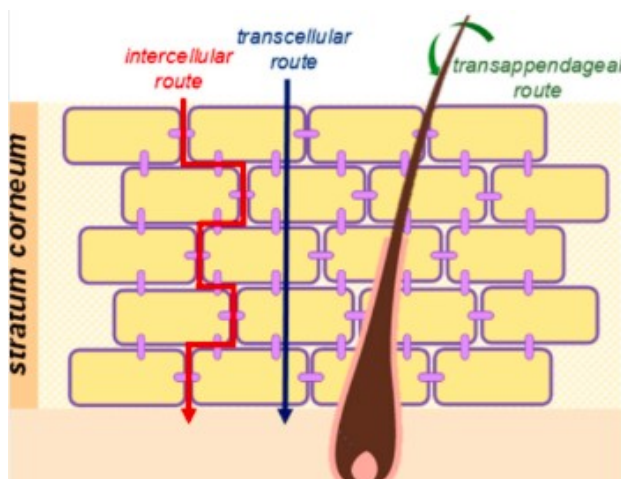
Z anatomického hlediska existují tři možné mechanismy průniku léčiv přes kůži. Mezi tyto mechanismy řadíme transcelulární (intracelulární) vstup přes korneocyty SC, průnik mezibuněčnými prostory SC, průnik přes vlasový folikul a vstup přes mazové nebo potní žlázy. Absorpci velkých molekul napomáhají také některé transportní proteiny, jako jsou efluxní transportéry (např. P-glykoprotein).²⁰

Transcelulární difuze se využívá u hydrofilních nebo polárních rozpuštěných látek, korneocyty zde poskytují vodní prostředí díky přítomnosti hydratovaného keratinu. Nicméně korneocyty jsou obklopeny lipidovým obalem, čímž spojují buňky s lipidovou dvojitou vrstvou. Transport prostřednictvím mezibuněčných prostor umožňuje difuzi lipofilních nebo nepolárních roztoků přes celistvou lipidovou matici.²¹

Transport látek přes kůži zahrnuje vstup přes lipofilní oblasti SC (lipidové dvojitou vrstvou) a hydrofilnější prostředí „živé“ *epidermis*. Látky vstupující kůží musí být dostatečně rozpustné ve vodě a zároveň dobře rozpustné v lipidech, a měly by proto vykazovat přiměřeně vysoký rozdělovací koeficient. Příliš hydrofilní látky špatně penetrují do SC. Látky vysoce

lipofilní zase vykazují přílišnou afinitu k SC a nepřechází do hydrofilnějšího prostředí *epidermis*.^{3,22}

Schopnost molekuly prostupovat kůží dále závisí na velikosti molekuly, teplotě tání a ionizaci. Ideálně by takové molekuly měly disponovat menší velikostí, nízkou teplotou tání a nízkým stupněm ionizace.²²



Obrázek č. 6. Znáznornění tří hlavních cest průniku molekul kožní bariérou.

<https://www.simplepharmanotes.com/2022/10/permeation-enhancers.html>

2.3.1 Enhancery kožní permeace

SPE jsou farmakologicky neaktivní látky, které umožňují nebo usnadňují, prostup látek skrze kožní bariéru, dočasným snížením bariérových vlastností kůže. V ideálním případě by tyto látky měly být netoxické, nedráždivé, nealergizující, farmakologicky inertní, fyzikálně a chemicky kompatibilní s penetrantem (např. léčivem), měly by disponovat dobrými rozpouštěcími vlastnostmi a neměly by způsobovat únik endogenních látek z organismu. Po eliminaci SPE, by mělo dojít u kůže k okamžité a úplné obnově bariérových vlastností.^{23,24}

Přesné mechanismy účinku SPE nebyly doposud zcela objasněny. Předpokládá se, že látky zvyšující prostupnost kůže, mohou působit jedním z následujících mechanismů nebo jejich kombinací. Prvním z těchto mechanismů je interakce SPE s mezibuněčnými lipidy SC, vedoucí k narušení vysoce organizovaných lamelárních struktur, čímž se zvyšuje difuzivita látek přes lipidovou oblast. Druhým mechanismem je interakce SPE s intracelulárními proteiny kůže, tímto se podpoří prostup látek přes vrstvu korneocytů. Další mechanismus účinku spočívá v optimalizaci hodnoty rozdělovacího koeficientu penetrantu mezi nosičem penetrující látky

a kožními membránami.^{23,25} Dle teorie *lipid-protein-partitioning*, kterou navrhl B. W. Barry, působí SPE v mezibuněčných oblastech SC na třech hlavních místech. Těmito místy jsou – oblast polárních skupin lipidů, hydratovaná oblast lipidových dvojvrstev a oblast alkylových řetězců lipidů. Tyto interakce vedou k rozrušení organizovaných struktur lipidových vrstev, čímž dochází ke zvýšení fluidity a zvýšení propustnosti kůže. V případě intracelulárně působících SPE dochází k interakci s intracelulárními proteiny korneocytů, především s α -keratinem, konkrétně s jejich polárními hlavami, tyto interakce vedou ke snížení vazebných sil mezi molekulami proteinů a změně konformace proteinových struktur.^{3, 23, 25}

V současnosti je využíváno mnoho tříd SPE, jen velmi málo z nich má však ideální vlastnosti. U některých SPE je nutné využít velmi vysokých koncentrací k dosažení účinku, značné množství SPE způsobuje příliš velké narušení lipidových vrstev SC, což může vést k podráždění kůže. Mezi používané skupiny SPE řadíme například mastné kyseliny, terpeny, dioly, alkoholy, glykoly, oxazolidinony a další. Mezi akceleranty transdermálního podání řadíme též látky s nadmolekulární strukturou – nanonosičové systémy (např. lipozomy, polymerické nanočástice nebo dendrimery).^{23,25,41}

2.4 Dendrimery

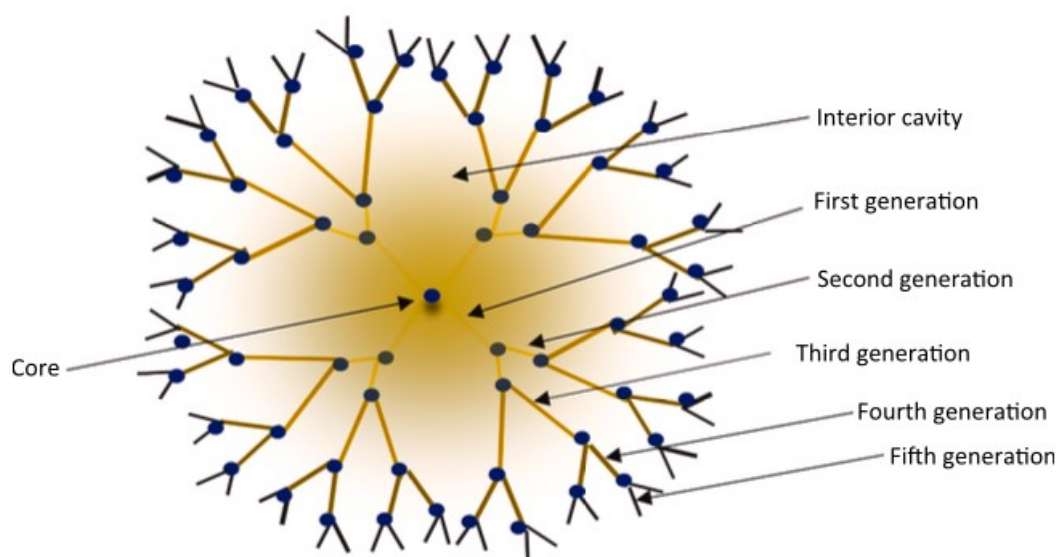
2.4.1 Struktura a vlastnosti dendrimerů

Dendrimery představují jedinečnou skupinu symetrických, multifunkčních, vysoce rozvětvených syntetických polymerů. Díky jejich kontrolované syntéze vznikají monodisperzní makromolekuly s trojrozměrnou strukturou. Velikostně se tyto makromolekuly pohybují v průměru od 1 do 20 nm. Makromolekulární struktury mohou být charakteru lineárního, rozvětveného nebo zesíťovaného, což podmiňuje jejich velikost, funkci a strukturní flexibilitu. V porovnání s tradičními polymery se dendrimery vyznačují lepšími fyzikálními, chemickými a biomedicínskými vlastnostmi.^{26,27}

Dendrimery se skládají ze tří hlavních částí – iniciačního jádra molekuly, multifunkčních větví (vycházejících z jádra) a funkčních skupin. Jádro dendrimeru představuje iniciační bod, ze kterého se molekula dendrimeru rozvětvuje (Obrázek č. 7). Je tvořeno buď jedním atomem, nebo atomovou skupinou s nejméně dvěma shodnými chemickými funkcemi. Dále můžeme jádro charakterizovat počtem chemických vazeb, které spojují monomery (větvě) s povrchem první opakující se jednotky (generace nula, G0). Vyšší generace, s přibližně dvojnásobnou molekulovou hmotností, lze získat vytvořením nových vrstev z centra větvení. Dendrimery nižších generací (0, 1 a 2) mají značně asymetrický tvar připomínající disk a otevřenější strukturu. U vyšších generací se řetězce vycházející z jádra molekuly prodlužují, rozvětvuji a vytvářejí tak kompaktní globulární struktury. Při rozšiřování dendrimeru k periferii, se jejich struktury velmi těsně a pevně zabalí v kouli, což vytváří uzavřenou strukturu podobnou membráně.^{26,27,28} Tento jev má velký vliv na reologické vlastnosti dendrimerů. Roztoky dendrimerů mají výrazně nižší viskozitu než lineární polymery. Přítomnost mnoha koncových řetězců stojí za vysokou rozpustností, mísitelností a reaktivitou. Rozpustnost dendrimerů je ovlivněna povahou (polaritou) povrchových skupin.³⁰

Zmiňované tři hlavní části dendrimeru mohou být specificky upraveny v závislosti na požadované vlastnosti nebo funkci molekuly dendrimeru, jako je např. podávání léčiv nebo molekulární senzory. Dendrimery jsou jediným typem syntetických polymerů, jejichž velikost a strukturu lze přesně řídit. Díky své jedinečné a přesně definované struktuře mají dendrimery široký aplikační potenciál a využití, zejména v biomedicíně. Mezi výhody dendritické struktury řadíme tyto vlastnosti – pravidelný tvar molekuly, vysoký počet

povrchových funkčních skupin, přítomnost vnitřních dutin tvořené větvemi nebo – speciální zapouzdřující mikroprostředí v jádru dendrimeru.^{27,28,29}



Obrázek č.7. Obecná struktura dendrimeru – iniciační jádro molekuly, z jádra vycházející větve, vnitřní dutina molekuly, funkční skupiny. Znázornění strukturních změn v závislosti na rostoucí generaci.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305722006395>

2.4.2 Využití dendrimerů ve zdravotnictví

Díky snadné modifikaci struktury a vlastností dendrimerů mají tyto molekuly velmi široké uplatnění. Co se týče aplikace v medicíně a farmacii, mohou být využity jednak pro diagnostické účely, pro cílené podávání léčiv (například oční a transdermální), zvýšení rozpustnosti léčiv, v genové terapii atd.²⁸ Nejčastější aplikace a jejich příklady jsou uvedeny dále.

Při diagnostických aplikacích, mohou dendrimery sloužit jako molekulární sondy, rentgenové kontrastní látky, případně jako kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí. Dendrimery jsou v této oblasti perspektivními především proto, že disponují velkým povrchem, s různými funkčními skupinami. Díky tomu mohou na svůj povrch navázat různé molekuly. Například dendrimery sloužící pro magnetickou rezonanci mohou mít na svůj povrch chelátované gadoliniové ionty. Bylo zjištěno, že takto upravené dendrimery, jsou účinnějšími kontrastními látkami než konvenční chelátované gadoliniové komplexy.^{28,29}

Další oblastí možného uplatnění dendrimerů je (cílené) podávání léčiv. Prostřednictvím větví a jádra dendrimeru vzniká dutina, ve které může být léčivo zapouzdřeno, což efektivně řeší špatnou biologickou dostupnost léčiv. Možností je i navázání léčiva na funkční skupiny na povrchu dendrimeru, podobně jako bylo vysvětleno u diagnostických aplikací. Díky amfifilní povaze dendrimerů je možné integrovat do jejich struktury jak hydrofilní, tak hydrofobní léčiva. V poslední době, se na základě těchto strukturních vlastností, využívají určité typy dendrimerů pro transport protinádorových léčiv, a to zejména PAMAM (polyamidoamin), PPL (polypropylenlysin) a PPI (polypropylenimin) dendrimery.³¹

Dendrimery slouží také jako látky zvyšující rozpustnost léčiv. Ve vodě rozpustné dendrimery jsou schopné vázat a rozpouštět malé kyselé hydrofobní molekuly s antimykotickými nebo antibakteriálními vlastnostmi. Dendrimery s hydrofobním jádrem a hydrofilními koncovými skupinami se označují jako unimolekulární micely. Na rozdíl od tradičních micel nemají dendrimery kritickou micelární koncentraci, díky tomu jsou dendrimery aktivní v mnohem širším koncentračním rozsahu. Tato vlastnost nabízí možnost rozpouštět špatně rozpustná léčiva jejich zapouzdřením do dendritické struktury a zvyšovat tak jejich biologickou dostupnost.^{28,29}

2.4.3 PAMAM dendrimery

První publikace o této skupině dendrimerů sahají do roku 1985, kdy prof. Dr. Donald A. Tomalia, popsal jejich charakter a představil koncept jejich syntézy.⁴² PAMAM dendrimery patří mezi nejrozšířenější skupinu dendrimerů, která obsahuje různý počet karbonylových, primárních a terciárních aminových skupin v rámci své rozvětvené struktury, spolu s multifunkčními aktivními nebo pasivními terminálními skupinami. PAMAM dendrimery jsou v poslední době velmi intenzivně zkoumány pro svoje potenciální způsoby využití v různých oblastech.³²

Struktura

Makromolekulární struktura PAMAM dendrimerů se skládá z vnitřního multifunkčního jádra, opakujících se rozvětvených jednotek amidových a aminových skupin připojených k jádru a terminálních funkčních skupin. Terminální skupiny je možné dále modifikovat spojením s různými biomolekulami, kontrastními látkami nebo léčivy. Důležitým faktorem

jejich struktury je přítomnost intramolekulárních dutin, které mají zásadní význam pro jejich další využití.³²

Klíčovou centrální částí PAMAM dendrimerů je multifunkční jádro, z něhož vycházejí větve. Jádro určené pro generování dendrimerů typu PAMAM obsahuje molekulu s otevřeným řetězcem s primárními aminy, které představují reaktivní funkční místa. Počet atomů vodíku v molekule jádra se vztahuje k násobnosti jádra, která se rovná počtu větví. Molekulou sloužící jako jádro v případě PAMAM může být např. amoniak, ethylendiamin, tris(2-aminoethyl)amin, ethyl(2-aminoethyl)amin, 4-diaminobutan, cystamin a další.³²

Vnitřní větvící se ramena PAMAM obsahují amido- a aminoskupiny, které vznikají opakovanou reakcí jádra s nenasycenými akryláty pomocí Michaelovy adice a amidační reakce. Michaelova adice zahrnuje alkylaci jádra a vytváří skupinu zakončenou esterem, která se označuje jako poloviční generace (G 0,5). Následující krok zahrnuje amidaci esterové skupiny s přebytkem molekul jádra. Výsledným produktem je úplná generace zakončená aminem (generace 1, G1). Opakováním výše uvedených kroků lze syntetizovat vyšší generace PAMAM.^{32,43}

Na periferii makromolekul PAMAM jsou umístěny terminální funkční chemické skupiny, které zajišťují specifické fyzikálně-chemické vlastnosti. Poloviční generace PAMAM (G0,5, G1,5,...) jsou většinou zakončeny esterovou nebo karboxylovou skupinou, zatímco úplné generace (G1, G2,...) disponují na povrchu primárními aminovými skupinami. Tyto reaktivní terminální skupiny se mohou dále synteticky upravit na další funkční skupiny. Terminální amino- nebo karboxylové skupiny se mohou dále chemicky nebo fyzikálně konjugovat s různými molekulami za účelem zlepšení jejich specifických chemických, biologických nebo biomedicínských aplikací.³²

PAMAM dendrimery jako SPE

PAMAM dendrimery byly v minulosti úspěšně testovány jako SPE pro podávání protizánětlivých nebo protinádorových léčiv.^{31,44} Jak již bylo uvedeno výše, struktura dendrimerů ovlivňuje jejich vlastnosti z tohoto důvodu bylo v minulosti zjišťováno, které vlastnosti jsou klíčové pro úspěšné doručení léčiv přes kůži za pomoci PAMAM dendrimerů. Například ve studii z roku 2009 bylo zjištěno, že G₄ PAMAM dendrimery s aminoskupinami na periferii zvyšují permeabilitu léčiva 5-fluorouracil (5FU) v porovnání s karboxylovanou

G_{3,5}. Ve stejné studii byl také sledován vliv koncentrace dendrimerů na prostup léčiva kůží, avšak nebyla nalezena žádná korelace.⁴⁵ Vliv generace na permeabilitu léčiv skrz kůži byl testován například ve studii Borowska et al, kde byla zjištěna vyšší permeabilita při použití G₄ v porovnání s G₃.⁴⁶ Dalším parametrem, který má vliv na permeabilitu léčiv byl stanoven náboj PAMAM dendrimerů, kdy se zdají nejvhodnější kationické dendrimery.⁴⁵

Je tedy zřejmé, že schopnosti dendrimerů na zlepšení propustnosti kůže pro léčiva jsou závislé na mnoha faktorech. Co však není doposud jasné, je mechanismus tohoto efektu. Není známo, jestli dendrimery prochází kůží společně s léčivem nebo jen narušují strukturu kožní bariéry, která se pak stává prostupnou pro samotné léčivo.⁴⁴ Ze struktury dendrimerů a experimentů nalezených v publikované literatuře je tedy pravděpodobné, že bude nejspíš docházet k interakcím dendrimerů s kožními lipidy. To potvrdily i v naší výzkumné skupině dříve provedené experimenty na monovrstevném modelu kožních lipidů po přidání PAMAM dendrimerů G₂-G₄.⁴⁷ Proto bylo cílem této práce na dřívější výzkum navázat a zjistit interakci lipidů s dendrimery v komplexnějším modelu, lidském izolovaném SC.

3. Experimentální část

Věnuje se experimentální části diplomové práce. Nejprve popisuje chemikálie, materiály a přístroje, které byly při experimentu využity. Následuje popis postupu experimentu zaměřený na interakci PAMAM dendrimerů (G₂-G₄) s nejsvrchnější vrstvou lidské kůže SC.

3.1 Materiál a chemikálie

Rozdělení vzorků kůže na menší části a odstranění podkožního tuku bylo provedeno za pomoci skalpelu. K omytí kůže byl využit fosfátový pufr z tablet (PBS, 10mM, pH – 7,4; Merck, Německo), ultračištěná voda Millipore, čištěná systémem Milli-Q (FaF, UK) a aceton. Při omývání vzorků SC byly použity kádinky. Manipulace se vzorky SC byla provedena pomocí pinzet.

PBS a trypsin z prasečí slinivky (Merck, Německo) byly použity k izolaci SC. Odstranění nečistot ze vzorků SC po izolaci bylo provedeno za využití vatových tyčinek. K osušení vzorků po očištění byla využita gáza, která sloužila také jako podložní materiál Petriho misek při sušení vzorků SC. Malé a velké Petriho misky sloužily k uložení vzorků SC během hydratace a sušení. Exsikátor, který byl využit k sušení vzorků SC, obsahoval sušidla – tuhý parafín a oxid fosforečný (P₂O₅, PENTA, ČR).

K přípravě roztoků dendrimerů byly k dispozici komerčně dostupné metanolicke roztoky PAMAM dendrimerů s ethylendiaminovým jádrem, generace G₂, G₃, G₄ (Merck, Německo). Při přípravě roztoků PAMAM dendrimerů jednotlivých generací byly využity skleněné vialky o objemu 2 ml. Skleněné vialky byly použity také k uchování vzorků SC. K překrytí Petriho misek nebo vialek sloužil parafilm. Prostřednictvím jehly byly do parafilmu vytvořeny drobné perforace.

3.2 Lidská kůže a izolace stratum corneum

Vzorky lidské kůže byly zprostředkovány z abdominoplastik pacientů privátního chirurgického centra Sanus v Hradci Králové, ČR. Experimentální využití je podmíněno podepsáním informovaného souhlasu pacientů a schválením etickou komisí privátního chirurgického centra Sanus (č. 5/4/2018) a prováděním experimentů podle Helsinské deklaráce.

3.3 Přístrojové vybavení

Pro úpravu tloušťky kůže byl použit dermatom. K navažování vzorků SC byla použita analytická váha Ohaus PR SERIES (Ohaus, USA).

Za použití pipet s nastavitelným objemem Research a Research Plus (Eppendorf, Německo) byly odměřovány kapalné látky pro přípravu roztoků dendrimerů. Homogenizace roztoku dendrimerů byla provedena za pomoci ultrazvukové lázně K-12 LE (Kraintek, ČR) a orbitální třepačky Vortex MS 3 Digital (IKA, Německo). Za využití koncentrátoru s přívodem dusíku Digital Dry Bath (Labicom, ČR) a rotační vakuové odparky Hei-VAP Core (Heidolph, Německo) bylo zajištěno odpaření organického rozpouštědla, metanolu z roztoku dendrimerů.

K sušení vzorků kůže byl využíván vakuový exsikator s obsahem sušidel oxidu fosforečného (P_2O_5) a tuhého parafinu.

Prostřednictvím inkubátoru IN30 (Mettler, Německo) byly vzorky kůže v průběhu experimentu hydratovány.

Pro měření vzorků pomocí metody diferenčně skenovací kalorimetrie (DSC) byl použit přístroj DSC 200 F3 Maia (NETZSCH, Německo). Pro vyhodnocení dat byl použit program NETZSCH Proteus Thermal Analysis. Příprava vzorků na měření DSC zahrnovala navažování v hliníkových kelímcích (NETZSCH, Německo) na analytické váze Ohaus Discovery (Ohaus, USA). Před měřením byly hliníkové kelímky utěsněny přístrojem Sealing Press 6240 (NETZSCH, Německo).

Při měření vzorků pomocí metody infračervené spektroskopie (IR) byl použit přístroj Nicolet 6700 FTIR (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro zpracování spekter byl využit program Bruker OPUS.

Při měření vzorků pomocí metody Ramanovy mikrospektroskopie (RMS) byl využit Ramanův mikrospektrometr WITec alpha300R (WITec, Německo). pro vyhodnocení byl využit software Project FIVE 5.3.

Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

3.4 Izolace SC z lidské kůže

Lidská kůže byla získána celkem od 2 dárců, kteří podstoupili abdominoplastiku. Po operaci byl z kůže skalpelem odstraněn podkožní tuk, kůže byla omyta v PBS, osušena gázou a skladována při -20 °C v mrazícím boxu až do použití.

Po vyjmutí z mrazícího boxu se vzorky kůže nechaly rozmrazit při laboratorní teplotě. Za použití skalpelu se kůže rozdělila na menší části pro usnadnění následné manipulace s dermatomem. Pomocí dermatomu byla upravena tloušťka kůže na ~5 mm.

Následně se jednotlivé vzorky kůže vložily do Petriho misek s obsahem PBS o pH 7,4 a trypsinu. Poté se uložily přes noc do inkubátoru při 32 °C. Dosavadně popisovaný postup zajistil oddělení (izolaci) rohové vrstvy od zbytku *epidermis*.⁴⁸

Po izolaci byly vzorky SC očištěny od zbylých buněk *epidermis* a nečistot pomocí vatových tyčinek. Každý vzorek SC byl následně ponořen do kádinky s vodou Millipore, pak krátce do acetonu a poté opět do kádinky s vodou Millipore. V dalším kroku se vzorky SC vyskládaly na gázu v Petriho misce, nechaly se sušit ve vakuovém exsikátoru 24 hodin.

3.5 Příprava roztoků PAMAM dendrimerů G2-G4

K dispozici byl komerčně dostupný 20% metanolicke roztoky PAMAM dendrimerů druhé (G₂) a třetí generace (G₃) a 10% metanolicke roztok PAMAM dendrimerů čtvrté generace (G₄).

Samotné přípravě roztoku dendrimerů G₂, G₃ a G₄ vždy předcházela výpočet potřebného objemu metanolickeho roztoku PAMAM dendrimerů a vody Millipore pro vznik 1 ml 10mM a 1mM roztoku dendrimerů. Dále se připravily dvě skleněné vialky. Za použití pipety se do jedné vialky přenesl daný objem metanolickeho roztoku PAMAM dendrimeru. Poté se vialka umístila do koncentrátoru, kde se nechal odfoukáváním dusíku odpařit z roztoku metanol. K odpaření metanolu byla dále využita rotační vakuová odparka. Následně se do vialky po odpaření metanolu přidal stanovený objem vody Millipore. Pro homogenizaci se vialka umístila na 1 minutu do orbitální třepačky Vortex a na 20 vteřin do ultrazvukové lázně.

Tímto způsobem se nejprve připravil 10mM roztok dendrimerů (G₂/G₃/G₄-10mM) respektive, a to v nadbytečném objemu 1,2 ml. Z tohoto roztoku, se pipetou převedlo 100 μl do druhé vialky, která byla doplněna 900 μl vodou Millipore, čímž se připravil 1 ml 1mM roztoku dendrimerů (G₂/G₃/G₄-1mM). Homogenizace roztoku byla provedena stejným postupem.

3.5.1 Výpočet objemu

Pro výpočet objemu metanolickeho roztoku PAMAM dendrimerů potrebného pro pripravu roztoku dendrimerů (G₂/G₃/G₄-10mM) byly využity molární hmotnosti a hustoty dendrimerů uvedené v Tabulce 1. V tabulce jsou také shrnuty výsledné objemy metanolickeho roztoků (vypočítány pomocí vzorce pro koncentraci; $c=m \times M^{-1}$), ze kterých byl před ředěním Millipore vodou odpařen metanol.

Tabulka 1 Hodnoty použité pro přípravu vzorků dendrimerů

Generace dendrimeru	Molární hmotnost (g/mol)	Hustota (g/ml)	Výsledný objem pro přípravu 10mM roztoku (μl)
G ₂	3256,18	0,860	226,8
G ₃	6908,84	0,863	480,3
G ₄	14214,17	0,813	2098,0

3.6 Hydratace SC

Před aplikací roztoku dendrimerů na SC se provedla hydratace vzorků SC. V první řadě se vysušené SC rozdělilo nůžkami na menší části, tak aby odpovídaly hmotnosti cca 3 mg. Vzorkům SC byla přiřazena čísla, zvažily se prostřednictvím analytické váhy a zaznamenala se jejich přesná hmotnost.

Vzorky SC umístěné v malých číselně označených Petriho miskách, se uložily (vždy po 3) do velkých Petriho misek s obsahem 40 ml vody Millipore. Velké Petriho misky se následně přiklopily víčky a vložily se do inkubátoru při 32 °C na 24 hodin, aby došlo k nasycení SC vodními parami.

3.7 Aplikace roztoku dendrimerů na SC

Po hydrataci se na vzorky SC aplikovaly roztoky dendrimerů (G₂-G₄). Prostřednictvím pipety se nanoslo 100 µl G₂-1mM, G₃-1mM, G₄-1mM, 100 µl G₂-10mM, G₃-10mM, G₄-10mM nebo 100 µl vody Millipore (kontrolní vzorky) na hydratované SC. Daný objem byl rovnoměrně napipetován na vzorek a pod vzorek v Petriho misce. K manipulaci se vzorkem byla využita pinzeta.

Po aplikaci se vzorky SC v Petriho miskách vložily na 24 hodin do inkubátoru při teplotě 32 °C.

3.8 Sušení

Vzorky SC byly po aplikaci roztoku dendrimerů omyty ve vodě (ponořením do kádinky s Millipore vodou, následně oplachem stříčkou). Poté se krátce položily z každé strany na filtrační papír pro eliminaci přebytečné vlhkosti a vložily se do vialek. Ty se překryly parafilmem, do kterého se vytvořily drobné průduchy jehlou. Vialky se vzorky se umístily do exsikátoru, kde se za působení vakua nechaly sušit 24 hodin. Sušení bylo nezbytné pro měření pomocí DSC, a provedení kontrolované hydratace vodními výparů před měřením na IR.

3.9 Metody hodnocení účinku PAMAM dendrimerů

3.9.1 DSC

Příprava vzorku a průběh měření

Pro měření na DSC bylo potřeba vzorky zalisovat do hliníkových kelímků. Nejdříve se zvažil celý kelímek bez vzorku (cca 40 mg). Poté se pomocí pinzety vzorek SC rozprostřel na dně kelímku, přiklopil se víčkem a zalisoval se na lisu. Uzavřený kelímek se zvažil, odečetla se hmotnost vzorku a společně s prázdným referenčním kelímkem se vložil do měřící cely DSC přístroje.

Průběh měření

SC bylo měřeno podle již publikovaného postupu.⁵¹ Počáteční teplota měření byla nastavena na 20 °C. Během měření byl vzorek vystaven zahřívání, poté chlazení a znovu

zahřívání. Teplota se v průběhu experimentu měnila rychlostí 2 °C/min, až dosáhla 120 °C při zahřívání, respektive 20 °C při chlazení. Celkový čas měření byl cca 2 hodiny a 50 minut. Každá generace dendrimerů byla vždy změřena v obou koncentracích, včetně kontrolního vzorku (1mM koncentrace-10mM koncentrace-kontrolní vzorek), a to ve třech opakováních.

3.9.2 IR

Příprava vzorku

Pro měření na IR byly vzorky po vysušení v exsikátoru, řízeně hydratovány v inkubátoru (při 32 °C). Vzorky v malých Petriho miskách se umístily do velkých Petriho misek s obsahem Millipore vody (cca 40 ml na každé tři vzorky). Přiklopené velké Petriho misky se vzorky určené pro hydrataci při 32 °C se uložily přes noc do inkubátoru na 32 °C.

U pilotního experimentu byla testována i hydratace při laboratorní teplotě a vlhkosti. V tomto případě se Petriho misky pouze přetáhly parafilmem, do kterého se udělaly průduchy a nechaly se v prostředí laboratoře. Tato metoda se však dále nevyužila kvůli špatné kontrolovatelnosti podmínek hydratace.

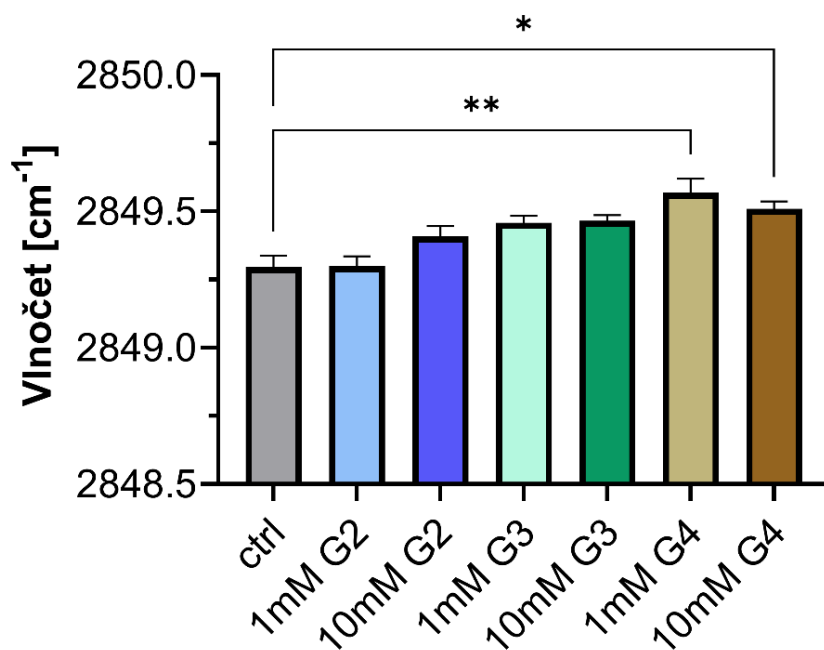
Průběh měření

Měření probíhalo na Katedře bioorganické a organické chemie, Faf UK. Byla využita IR analýza metodou Fourierovy transformace při laboratorní teplotě. Hydratované SC bylo přímo aplikováno na ATR krystal a bylo změřeno z každé strany na 128 skenů při rozlišení 2 cm⁻¹. Každá generace dendrimerů byla vždy změřena v obou koncentracích, včetně kontrolního vzorku (1mM koncentrace-10mM koncentrace-kontrolní vzorek), a to ve třech opakováních.

4. Výsledky

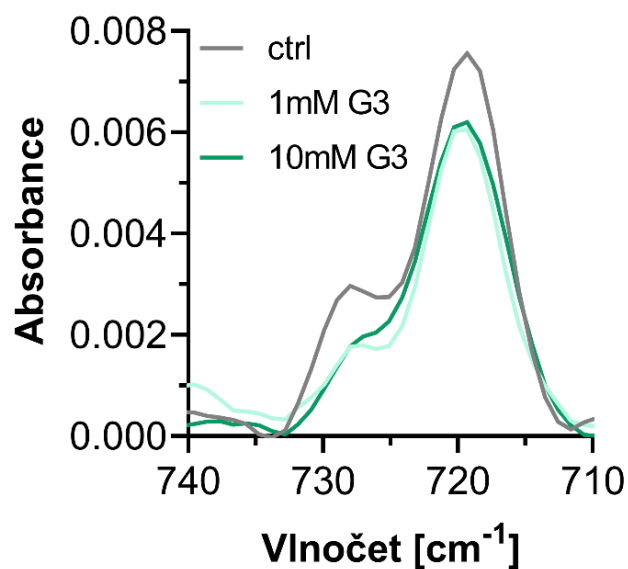
4.1 Infračervená spektroskopie

Měření pomocí IR zobrazuje několik jevů, které charakterizují uspořádání lipidů. Na grafu na Obrázku č. 8 pozorujeme v oblasti $2848\text{--}2854\text{ cm}^{-1}$ symetrickou valenční vibraci methylenových skupin typickou pro acylové řetězce lipidů SC.³³ Kontrolní vzorek je označen šedě, zatímco vzorky po aplikaci dendrimerů jsou barevně odlišené pro jednotlivé generace: G₂ modrá, G₃ zelená, G₄ hnědá. Nejnižší průměrné hodnoty dosáhl kontrolní vzorek ($2849,30 \pm 0,15\text{ cm}^{-1}$). Po aplikaci dendrimerů byl zjištěn rostoucí trend této hodnoty v závislosti na rostoucí generaci dendrimerů, avšak nebyla pozorována závislost na rostoucí koncentraci jednotlivých generací. Nejvyšších hodnot dosáhl vzorek po aplikaci 1mM roztoku PAMAM dendrimerů G₄ ($2849,57 \pm 0,12$) a statisticky signifikantní rozdíl byl zjištěn dále u 10mM G₄ ($2849,51 \pm 0,06$).



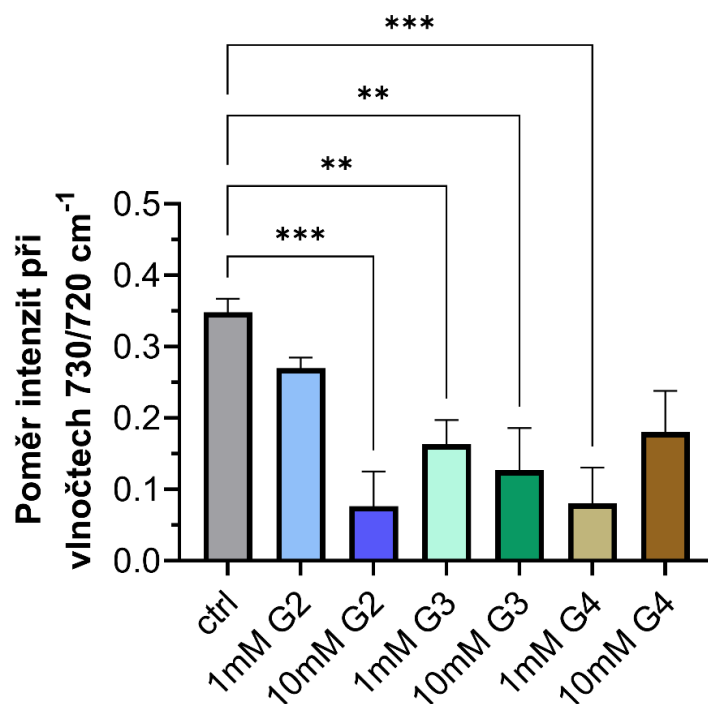
Obrázek č. 8. Hodnoty methylenové symetrické vibrace jednotlivých vzorků. Je porovnáváno kontrolní SC po aplikaci vody (ctrl) se SC po aplikaci 1 nebo 10 mM roztoku PAMAM dendrimerů G₂–G₄. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± SD, * značí statisticky signifikantní rozdíl ($p > 0,05$) hodnocený testem ANOVA, $n > 5$.

Na Obrázku č. 9 graf zobrazuje výřez spektra kolem vlnočtu $720\text{-}730\text{ cm}^{-1}$, což je hodnota charakterizující deformační kývavou vibraci vypovídající o laterálním uspořádání lipidů. Je uvedeno pouze reprezentativní spektrum pro G_3 , protože jednotlivé generace a koncentrace se mezi sebou příliš nelišily. U všech kontrolních vzorků byl v této oblasti pozorován charakteristický dublet, který odpovídá uspořádání orthorhombickému a je tedy typický pro nenarušené laterální uspořádání lipidů ve SC. Po aplikaci dendrimerů G_4 se dublet neobjevuje, je pozorován singlet, který značí hexagonální, tedy méně těsné, uspořádání lipidů.



Obrázek č. 9. Reprezentativní spektrum oblasti deformačních kývavých vibrací ($720\text{-}730\text{ cm}^{-1}$) pro kontrolní vzorek (šedě) a SC po aplikaci 1mM (světle zelená) nebo 10mM (tmavě zelená) roztoku G_3 PAMAM.

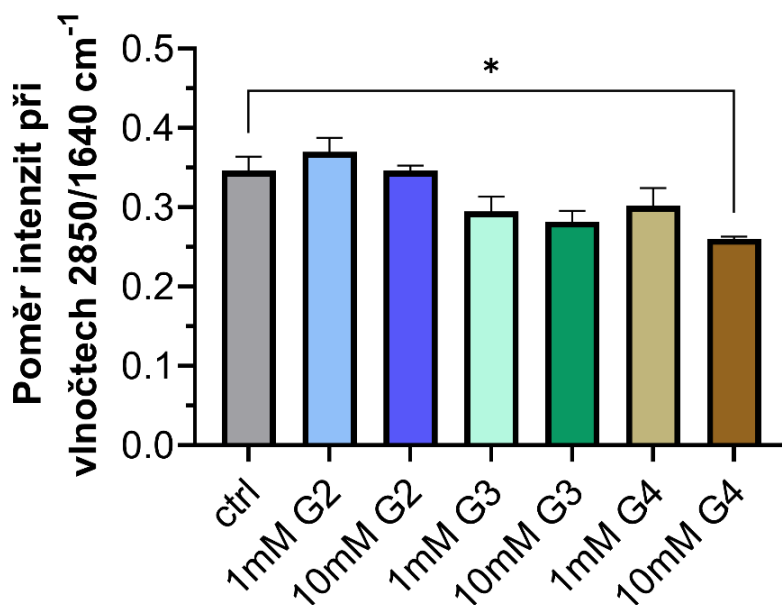
Pro lepší přehlednost byly vypočítány poměry hodnot intenzit při vlnočtu 730 cm^{-1} a 720 cm^{-1} , které kvantifikují rozdíl intenzity těchto dvou vibrací, a tedy přítomnost dubletu. Poměry pro kontrolu a jednotlivé generace a koncentrace jsou graficky znázorněny na Obrázku č. 10.



Obrázek č. 10. Hodnoty reprezentují poměry intenzit při vlnočtu ($720\text{-}730\text{ cm}^{-1}$) jednotlivých vzorků. Je porovnáváno kontrolní SC po aplikaci vody (ctrl) se SC po aplikaci 1 nebo 10mM roztoku PAMAM dendrimerů G₂-G₄. * značí statisticky signifikantní rozdíl vyhodnocený testem ANOVA, $n > 5$.

Je vidět, že nejvyšší hodnoty tohoto poměru vykazuje kontrolní SC ($0,35 \pm 0,06$), kdy v porovnání s 1mM G₂ ($0,27 \pm 0,04$) a 10mM G₄ ($0,18 \pm 0,14$) nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl. Naopak nejnižších hodnot dosahují vzorky 10mM G₂ ($0,08 \pm 0,12$) a 1mM G₄ ($0,08 \pm 0,12$).

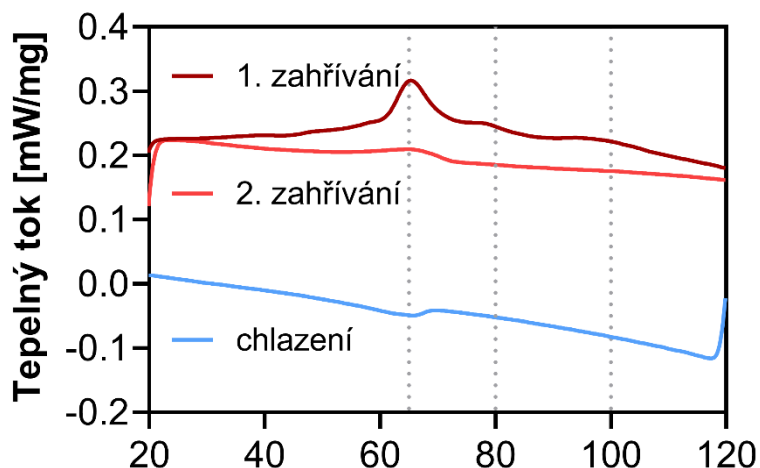
Posledním sledovaným parametrem byl poměr intenzit při vlnětu 2850 cm^{-1} (methylenová symetrická vibrace) a 1640 cm^{-1} (Amid I vibrace), což je parametr používaný pro jednoduché hodnocení poměru lipidů a proteinů ve SC.⁴⁹ Avšak kvůli vibračním amidových skupin dendrimerů v oblasti kolem 1640 cm^{-1} byl v této práci tento parametr využit pro sledování inkorporace dendrimerů do SC. Průměrná hodnota kontrolního vzorku byla $0,35 \pm 0,06$ (Obrázek č. 11) a po aplikaci dendrimerů byl pozorován klesající trend v závislosti na rostoucí generaci. Signifikantně nejnižší hodnoty vykazoval vzorek 10mM G₄ ($0,26 \pm 0,01$).



Obrázek č. 11. Hodnoty reprezentují poměry intenzit při vlnětu 2850 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} jednotlivých vzorků. Vzorky SC po aplikaci 1mM nebo 10mM roztoku PAMAM dendrimeru G₂-G₄, jsou porovnány s kontrolním SC po aplikaci vody (ctrl). *značí statisticky signifikantní rozdíl vyhodnocený testem ANOVA, $n > 5$.

4.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie

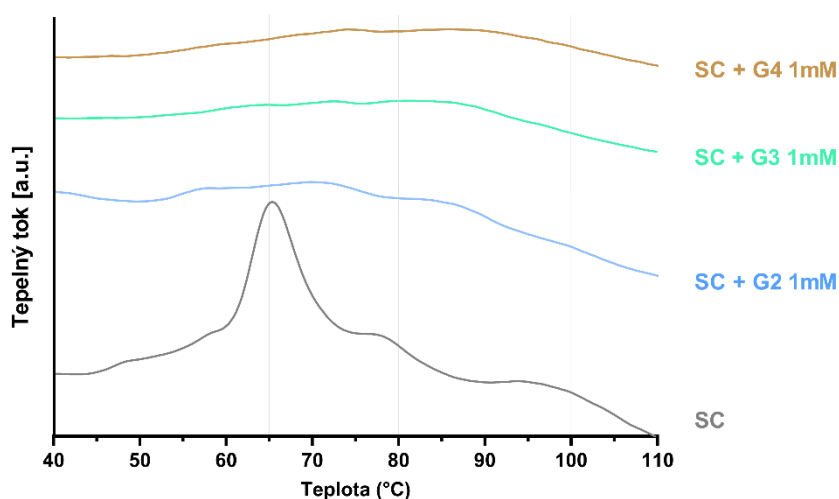
Typickým termogramem SC získaný z DSC zobrazuje tři hlavní tepelné přechody v oblasti 65 °C, 80 °C a 100 °C,⁵⁰ které jsou vidět na reprezentativní křivce prvního zahřívání kontrolního SC (Obrázek č. 12, tmavě červená barva).



Obrázek č.12. Křivky termogramu DSC kontrolního vzorku SC prvního zahřívání (tmavě červená), druhého zahřívání (červená) a chlazení (modrá). Zobrazuje tepelné přechody typické pro termickou analýzu SC.

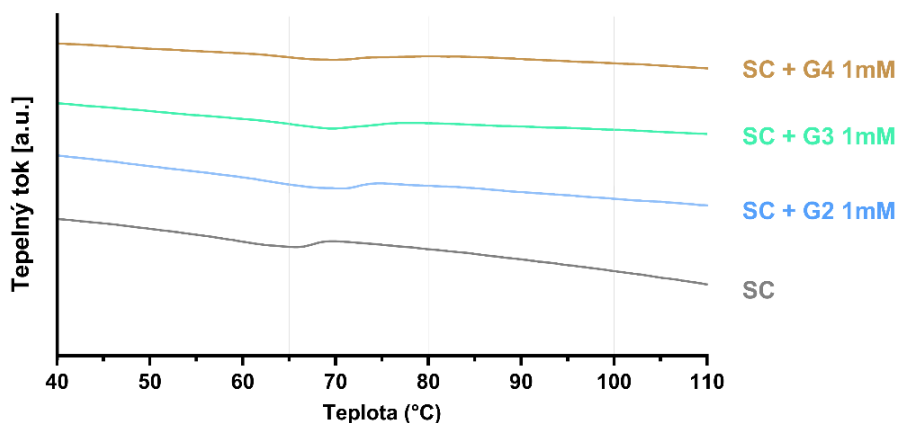
Při 65 °C pozorujeme přechod volných lipidů ve SC, kdy dochází k fluidizaci jejich struktury. Tato změna je reverzibilního charakteru a může tak být pozorována i při druhém zahřívání (světle červená křivka, Obrázek č. 12) a chlazení (modrá, Obrázek č. 12). Peak kolem 80 °C znázorňuje narušení kovaletních vazeb mezi lipidy a proteinovými strukturami korneocytů. Dochází zde k ireverzibilnímu narušení kovalentní vazby lipidů na proteiny. Teplotní přechod kolem 100 °C je spojen s nevratnou denaturací epidermálního keratinu.⁵⁰

Dále byly analyzovány jednotlivé termogramy po aplikaci dendrimerů na SC. Vždy je uveden kontrolní vzorek (šedě) a reprezentativní termogram po aplikaci 1mM koncentrace PAMAM dendrimerů. Na Obrázku č. 13 je termogram prvního zahřívání, pozorujeme křivky termogramu (hnědá, zelená, modrá), které jsou obecně plošší a teplotní přechody, jsou zde posunutější. Při rozmezí teplot 70-75 °C pozorujeme teplotní přechod volných lipidů ve SC, který se v případě kontrolního vzorku SC objevil v oblasti 65 °C. Dále je na grafu možné pozorovat teplotní přechod při 85 °C, který není příliš zřetelný a oproti kontrolnímu vzorku SC je mnohem méně výrazný. Kolem 100 °C pozorujeme teplotní přechod značící nevratnou denaturaci epidermálního keratinu. V porovnání s kontrolním vzorkem SC (šedě) je tento přechod u křivek (hnědé, zelené, modré) více plochý a plynulejší.



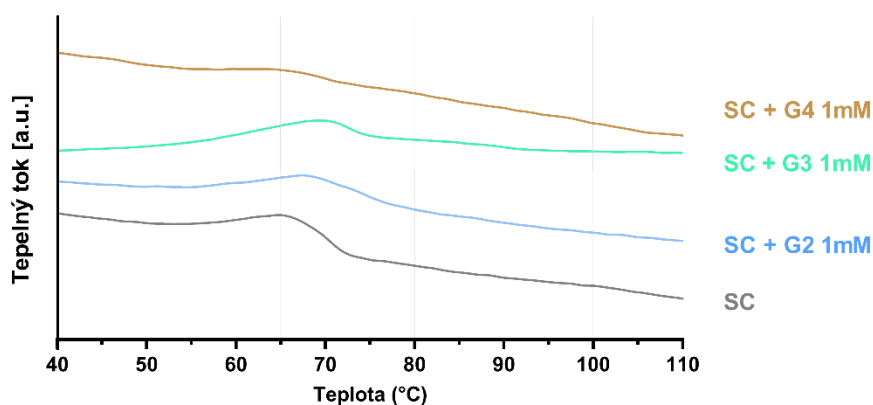
Obrázek č. 13. DSC termogram po aplikaci dendrimerů jednotlivých generací (G_4, G_3, G_2) na SC (hnědě, zeleně, modře). Šedá křivka náleží kontrolnímu SC pro porovnání.

Na Obrázku č. 14 je termogram chlazení, které následuje po prvním zahřívání. Je zde pozorován teplotní přechod při 65-70 °C, kdy dochází k reverzibilní fluidizaci lipidů. V porovnání s kontrolní SC, je přechod v případě SC po aplikaci dendrimery plošší a mírně posunutý. Vzorky SC po aplikaci dendrimerů, se mezi sebou mírně liší. Nejplošší křivku vykazuje SC+G₄ 1 mM (hnědě). Naopak nejvíce viditelný přechod je patrný u vzorku SC+G₂ 1mM.



Obrázek č. 14. DSC termogram chlazení po prvním zahřívání. Hnědě, zeleně a modře jsou vyznačeny křivky pro SC po aplikaci dendrimery. Šedě je vyznačen kontrolní vzorek SC pro porovnání.

Po chlazení následovalo druhé zahřívání (Obrázek č. 15), v porovnání s prvním zahříváním se termogramy liší. Pozorujeme pouze jeden dobře zřetelný tepelný přechod při 65 °C, charakteristický pro reverzibilní změnu uspořádání lipidů a jejich fluidizaci. U kontrolního vzorku SC vidíme tento přechod nejlépe. Křivky SC po aplikaci dendrimerů jsou v porovnání s kontrolním SC plošší, není zde však tolik patrný posun, jako tomu bylo v případě prvního zahřívání. U vzorku SC+G₄ (hnědě) 1mM je tento přechod nejméně jasný. Peaky v případě zelené a modré křivky jsou „roztáhlejší“ oproti kontrolnímu vzorku SC, ale jsou lépe pozorovatelné než v případě SC po aplikaci G₄ 1mM. Teplotní přechody, které byly patrné u prvního zahřívání, v případě druhého zahřívání nepozorujeme. Křivky SC po aplikaci dendrimerů se po tepelném přechodu velmi podobají křivce kontrolního SC.



Obrázek č. 15. Termogram druhého zahřívání. Hnědě, zeleně a modře jsou vyznačeny křivky pro SC po aplikaci dendrimerů. Šedě je vyznačena křivka kontrolního SC bez aplikace dendrimerů pro porovnání.

5. Diskuze

Co se týče výsledků získaných z IR, hodnoty symetrických vibrací naznačují, že PAMAM dendrimery nezpůsobují nežádoucí změny v uspořádání lipidů ve SC. Hodnoty symetrických methylenových vibrací se pohybují v rozmezí 2849,30-2849,57 cm^{-1} . I když po aplikaci dendrimerů je pozorován rostoucí trend této hodnoty v závislosti na rostoucí generaci, všechny naměřené hodnoty nepřesahují hodnotu 2850 cm^{-1} . To znamená, že lipidy zůstávají v konformaci orthorhombické a SC tak zůstává víceméně nepropustná. Pokud by hodnota vlnočtu přesáhla 2850 cm^{-1} , znamenalo by to, že lipidy přecházejí z uspořádaného stavu do neuspořádaného.³³

Dublet v oblasti deformační kývavé vibrace, který je typický pro těsné orthorhombické uspořádání lipidů, se v závislosti na aplikaci PAMAM dendrimerů G_2 a G_3 nemění. V případě G_4 se místo dubletu objevuje singlet, což naznačuje přechod z orthorhombické do hexagonální fáze. Singlet ukazuje na hexagonální uspořádání lipidů, které je charakterizováno vyšší propustností kožní bariéry v důsledku méně těsného uspořádání lipidů.³⁴ Pravděpodobně se zde singlet objevuje v důsledku interakce lipidů SC s G_4 PAMAM dendrimery. Tento jev odráží schopnost dendrimerů narušovat strukturu kožní bariéry. Na základě tohoto znaku, je zřejmé, že PAMAM dendrimery mohou měnit bariérové funkce kůže ve smyslu její propustnosti. I přes to, že SC bylo po působení dendrimerů důkladně omyto, z poklesu poměrů intenzit methylenové symetrické a amidové vibrace vyplývá, že dendrimery byly zřejmě zadrženy ve struktuře SC. Tento pokles byl signifikantní v případě G_4 .

Je známo, že se PAMAM dendrimery využívají jako enhancery kožního podání. Například studie z roku 2008 se zabývala interakcí PAMAM dendrimerů s 5-fluorouracilem (5FU) a ovlivnění propustnosti kožní bariéry. Při interakci PAMAM dendrimeru s 5FU došlo ke změně difuzního koeficientu, rozpustnosti a kožního rozdělení. Dále bylo zjištěno, že v důsledku hydrofilní povahy 5FU byl průnik do kůže snížen. Ovšem v případě interakce 5FU s dendrimerem může tato forma sloužit jako depotní systém a zvyšovat jeho kožní permeaci.³⁵

Dřívější studie z roku 2003 ukázala, že dendrimery zvyšují propustnost lipofilních léčiv zvýšením jejich rozpustnosti ve vodě prostřednictvím komplexace s povrchovými funkčními skupinami a/nebo enkapsulace v jádře dendrimeru.³⁶ V této studii bylo také zjištěno, že dendrimery slouží jako nosiče a transportují léčivo v solubilní formě na povrch kůže,

odkud se díky vysoké afinitě lipofilního léčiva ke kožním lipidům rozdělí do SC.³⁶ Z literatury je také zřejmé, že dendrimery zakončené aminovými skupinami jsou schopny pronikat lépe do SC než aniontové nebo neutrální dendrimery.³⁵

V dostupných zdrojích doposud není popsáno, jakým způsobem PAMAM dendrimery mohou interagovat s kožními lipidy. Zajímavým zjištěním nalezeným v literatuře je, že dendrimery interagují pravděpodobně s negativními fosfátovými skupinami polárních hlav modelových fosfolipidů a fluidizují tak lipidové dvojvrstvy.³⁹ Mezi fosfolipidy a lipidy v lidském SC můžeme najít několik podobností. Sice se od sebe liší chemickou strukturou, ale jejich molekuly se uspořádávají do podobných útvarů díky přítomnosti polárních hlav a hydrofobních částí v jejich struktuře. Důležitým rozdílem je, že molekula fosfolipidů nese ve své struktuře náboj, který však není přítomen u lipidů SC. To by mohlo hrát klíčovou roli při interakcích s nabitými PAMAM dendrimery. Proto lze očekávat, že v případě kožních lipidů bude docházet k fluidizaci částečně jiným mechanismem, než je tomu u fosfolipidů.

Z informací nalezených v literatuře tedy vyplývá, že PAMAM dendrimery ovlivňují propustnost kožní bariéry. Z dostupných dat však není zřejmé, zda se jedná o enkapsulaci léčiva do struktury dendrimerů a společný průnik do nižších vrstev kůže či narušení struktury kůže dendrimerem a průnik samotného léčiva. Výsledky IR v této práci naznačují, že by se mohlo jednat o druhý případ. Z literatury je též patrné, že zvyšující se koncentrace dendrimerů nekoreluje se změnou propustnosti kožní bariéry.³⁵ Tato skutečnost vyplývá i z výsledků experimentu, kdy nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi jednotlivými generacemi, pouze G₄ ovlivnila uspořádání lipidů signifikantně.

Pomocí diferenční termické analýzy DSC bylo podrobeno SC experimentu v teplotním rozmezí 20 až 120 °C. Hydratované kontrolní SC při termické analýze, nabídlo charakteristické teplotní přechody v oblastech 65 °C, 80 °C a 100 °C. Jak již bylo řečeno, teplotní přechod při 65 °C značí reverzibilní změnu uspořádání lipidů z lamelární na neuspořádanou, hexagonální až tekutou fázi. Teplotní přechod při 80 °C je typický pro narušení kovaletních vazeb mezi lipidy a proteiny a tato změna je ireverzibilního charakteru. Při 100 °C došlo k ireverzibilní denaturaci proteinů. Obecně jsou výsledky u kontrolního SC v souladu s pozorovanými výsledky v literatuře.³⁷

Křivky SC po aplikaci dendrimerů byly obecně posunutější a plošší v porovnání s křivkami kontrolních vzorků SC. V případě prvního zahřívání byly patrné teplotní přechody při teplotách 70-75 °C, došlo tedy k posunu přechodu k vyšším teplotám. Zploštění peaku v tomto teplotním rozmezí značí, že při vzájemné působení lipidů a dendrimerů, dochází ke změně uspořádání lipidů. Ovšem i ve srovnání s kontrolním SC, se změna uspořádání jeví mírněji. Z termogramu je také patrné, že je tato změna reverzibilního charakteru, což by mohlo dokazovat šetrnost dendrimerů, jakožto enhancerů, vůči kožní bariéře.

Dle studie z roku 2006,³⁹ která se zabývala interakcí PAMAM dendrimerů (G₄,G_{3,5}) s modelovými lipidovými membránami složenými z dipalmytoylfosfatidylcholinu (DPPC) pomocí DSC, bylo zjištěno, že inkorporace dendrimerů PAMAM G₄ a G_{3,5} do DPPC dvojvrstev způsobuje zvýšení fluidity membrány v závislosti na koncentraci dendrimerů. Zároveň bylo navrženo, že dendrimery mohou silně interagovat prostřednictvím své strukturní konformace či povrchového náboje, jak s lipofilní částí DPPC, tak s polární hlavovou skupinou fosfolipidu DPPC. Dále bylo v této studii zjištěno, že maximální procentuální podíl PAMAM G₄ a G_{3,5}, které lze začlenit do DPPC membrány, aniž by se narušila její integrita, je 5 %, resp. 3 %.³⁹

Při experimentu v této práci byly využity PAMAM dendrimery G₂-G₄ o koncentraci 1mM a 10mM. Na rozdíl od publikované studie, se mezi koncentracemi jednotlivých generací dendrimerů nejevil signifikantní rozdíl v souvislosti s interakcí s lipidy SC. Vedle koncentrace, byl zde faktor generace dendrimeru. Z výsledků je patrné, že k interakci mezi lipidy SC a dendrimery, dochází u všech použitých generací. V porovnání s uvedenou studií nebyly změny pozorované v tomto experimentu příliš znatelné. To je nejspíš způsobeno tím, že nebyly použity samotné směsi kožních lipidů, ale biologický materiál – izolované SC – kde se kromě lipidů nachází i korneocyty. Jelikož změny, ke kterým došlo při interakci mezi PAMAM dendrimery a lipidy kožní bariéry byly nejspíš velmi malé (jak je zřetelné z IR experimentů), byly jejich termické přechody nejspíš zakryty ostatními pochody ve SC. Také je potřeba dodat, že ve studii se opět jednalo o fosfolipidy a platí tedy i to, co bylo komentováno výše v rámci diskuze k IR.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce, byl proveden experiment ke zhodnocení interakce mezi PAMAM dendrimery a SC. Z výsledků, které byly získány při vyhodnocování experimentu, je patrné, že PAMAM dendrimery mají vliv na změnu uspořádání lipidů SC. Těsné, téměř nepropustné orthorhombické uspořádání lipidů SC tak v závislosti na působení PAMAM dendrimerů přechází do méně těsného uspořádání hexagonálního až fluidního. Tento přechod byl nejvýraznější po aplikaci G₄ PAMAM dendrimerů, zatímco u G₂ a G₃ byl pozorován pouze stoupající trend hodnot značící méně uspořádané lipidy v porovnání s kontrolním SC. Kožní bariéra se tak stává vlivem PAMAM dendrimerů propustnější, což je výhodné třeba i z pohledu transdermálního podání.

Z výsledků DSC je zřejmé, že při interakci PAMAM dendrimerů a lipidů SC, dochází k reverzibilní změně vlastností kožní bariéry. Použití PAMAM dendrimerů se v závislosti na tomto poznatku profiluje jako bezpečným SPE. Při experimentu se dále zkoumal vliv koncentrace a generace dendrimerů PAMAM. Mezi koncentrací a míry zvýšení či snížení ovlivnění vlastností lipidů SC nebyla zjištěna korelace. Co se týče faktoru generace, nejvíce bylo SC ovlivněno opět aplikací G₄ PAMAM dendrimerů.

Je možné shrnout, že PAMAM dendrimery G₂₋₄ interagují s lipidy kožní bariéry, což naznačuje potenciální průnik léčiv intercelulární cestou při využití těchto látek jako enhancerů kožní permeace. Zdá se, že nejvíce kožní lipidy ovlivňují dendrimery čtvrté generace, což bylo pozorováno pomocí obou metod.

Použitá literatura

¹ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3. Druhé, upravené a doplněné vydání. Praha: GRADA, 2004. ISBN 80-247-1132-X

²LANGMEIER, Miloš. Základy lékařské fyziologie. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0

³BENSON, Heather A.E. a WATKINSON, Adam C. *Transdermal and Topical Drug Delivery*. [online]. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-45029-1. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118140505>.

⁴FUCHS, Elaine a Carolyn BYRNE. The epidermis: rising to the surface. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. 1994, 4(5), 725-736. ISSN 0959437X. Dostupné z: doi:10.1016/0959-437X(94)90140-X

⁵Jak kůže funguje – Struktura a funkce kůže. *Eucerin* [online]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>.

⁶VÁVROVÁ, Kateřina a HRABÁLEK, Alexandr. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství*. 2005, 1:8-11 [online]. Dostupné z: <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2005/01/02.pdf>.

⁷LÓPEZ, Olga, et. al. New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2007, **1768**(3), 521-529. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2006.11.023

⁸ELIAS, Peter M., Robert GRUBER, Debra CRUMRINE, Gopinathan MENON, Mary L. WILLIAMS, Joan S. WAKEFIELD, Walter M. HOLLERAN a Yoshikazu UCHIDA. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*[online]. 2014, **1841**(3), 314-318. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2013.09.011

⁹ WERTZ, Philip W. Lipid Metabolic Events Underlying the Formation of the Corneocyte Lipid Envelope. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2021, 2021-3-16, **34**(1), 38-50 [cit. 2023-08-25]. ISSN 1660-5527. Dostupné z: doi:10.1159/000513261

¹⁰ BEDDOES, Charlotte M., Gert S. GOORIS a Joke A. BOUWSTRA. Preferential arrangement of lipids in the long-periodicity phase of a stratum corneum matrix model. *Journal of Lipid Research* [online]. 2018, **59**(12), 2329-2338. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M087106

¹¹ JIA, Yan, Yao GAN, Congfen HE, Zhou CHEN a Cheng ZHOU. The mechanism of skin lipids influencing skin status. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2018, **89**(2), 112-119. ISSN 09231811. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdermsci.2017.11.006

¹² ANTUNES, Egipto a Artur CAVACO-PAULO. Stratum corneum lipid matrix with unusual packing: A molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2020, **190**. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:[10.1016/j.colsurfb.2020.110928](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110928)

¹³ VÁVROVÁ, Kateřina, KOVÁČIK Andrej a Lukáš OPÁLKA. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, 2017-11-27, **64**(2), 28-35. ISSN 2453-6725. Dostupné z: doi:10.1515/afpuc-2017-0004

¹⁴ VÁVROVÁ, Kateřina a HRABÁLEK, Alexandr. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství* 2006, **2**:55-58 [online]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/02/01.pdf>.

¹⁵ YOKOSE, Urara, Junko ISHIKAWA, Yuki MOROKUMA, et al. The ceramide [NP]/[NS] ratio in the stratum corneum is a potential marker for skin properties and epidermal differentiation. *BMC Dermatology* [online]. 2020, **20**(1). ISSN 1471-5945. Dostupné z: doi:10.1186/s12895-020-00102-1

¹⁶ ŠKOLOVÁ, Barbora, JANŮŠOVÁ, Barbora, ZBYTOVSKÁ Jarmila, et al. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* [online]. 2013, 2013-12-17, **29**(50), 15624-15633. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la4037474

¹⁷ HATTA, Ichiro, OHTA Noboru, INOUE Katsuaki a Naoto YAGI. Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*

- *Biomembranes* [online]. 2006, **1758**(11), 1830-1836. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.014

¹⁸ŠVIHOVEC, Jan, BULTAS, Jan, ANZENBACHER, Pavel, CHLÁDEK, Jaroslav, PŘÍBORSKÝ, Jan et al. *Farmakologie*. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing, 2008. ISBN 978-80-247-5558-8.

¹⁹GORZELANNY, Christian, Christian MESS, Stefan W. SCHNEIDER, Volker HUCK a Johanna M. BRANDNER. Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them? *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(7). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12070684

²⁰PHATALE, Vivek, Klaudi K. VAIPHEI, Shikha JHA, Dnyaneshwar PATIL, Mukta AGRAWAL a Amit ALEXANDER. Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches. *Journal of Controlled Release* [online]. 2022, **351**, 361-380. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.025

²¹SHAHZAD, Yasser, Ruaan LOUW, Minja GERBER a Jeanetta DU PLESSIS. Breaching the skin barrier through temperature modulations. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **202**, 1-13. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.019

²²BARRY, B. William. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2001, **14**(2), 101-114. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/S0928-0987(01)00167-1

²³HRABÁLEK, Alexandr, Pavel DOLEŽAL, Zdenka ŠKLUBALOVÁ, Oldřich FARSA a Aleš KREBS. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy* [online]. 1999, 93, 107-119. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_107-119.pdf

²⁴SINHA, V. R. a Maninder Pal KAUR. Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2000, 2000-10-31, **26**(11), 1131-1140. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.1081/DDC-100100984

²⁵SARUNYOO Songkro. An Overview of skin penetration enhancers: Penetration enhancing activity, skin irritation potential and mechanism of action. *Songklanakarín J. Sci. Technol*

[online]. 2009, 31, 299–321. Dostupné z:
<https://www.thaiscience.info/Journals/Article/SONG/10617315.pdf>

²⁶ASADULLAH KHAN, Muhammad, Rui PENG, CanLi LIU a Zhen CHEN. Synthesis, dynamics and applications (cytotoxicity and biocompatibility) of dendrimers: A mini-review. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **181**. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111708

²⁷CAMINADE, Anne-Marie, Régis LAURENT a Jean-Pierre MAJORAL. Characterization of dendrimers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2005, 2005-12-14, **57**(15), 2130-2146. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2005.09.011

²⁸GUPTA, Ankita, Shaifali DUBEY a Mayuri MISHRA. Unique Structures, Properties and Applications of Dendrimers. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2018, 2018-12-15, **8**(6-s), 328-339. ISSN 2250-1177. Dostupné z: doi:10.22270/jddt.v8i6-s.2083

²⁹DYKES, Graham M. Dendrimers: a review of their appeal and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2001, **76**(9), 903-918. ISSN 0268-2575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.464

³⁰KLAJNERT, Barbara a Maria BRYSEWSKA. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 2001, 2001-03-31, **48**(1), 199-208. ISSN 1734-154X. Dostupné z: doi:10.18388/abp.2001_5127

³¹ARORA, Virali, Mohammed A.S. ABOUREHAB, Gyan MODI a Prashant KESHARWANI. Dendrimers as prospective nanocarrier for targeted delivery against lung cancer. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **180**. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111635

³²HUSSAIN, Irshad, Nadeem MUHAMMAD, Qamar SUBHANI, et al. A review on structural aspects and applications of PAMAM dendrimers in analytical chemistry: Frontiers from separation sciences to chemical sensor technologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2022, **157**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116810

³³BONCHEVA, Mila, Fabienne DAMIEN a Valéry NORMAND. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2008, **1778**(5), 1344-1355. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2008.01.022

³⁴CAUSSIN, Julia, Gert S. GOORIS, Michelle JANSSENS a Joke A. BOUWSTRA. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2008, **1778**(6), 1472-1482. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2008.03.003

³⁵VENUGANTI, Venkata Vamsi K. a Omathanu P. PERUMAL. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, **361**(1-2), 230-238. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.034

³⁶CHAUHAN, Abhay S, S SRIDEVI, Kishore B CHALASANI, Akhlesh K JAIN, Sanjay K JAIN, N.K JAIN a Prakash V DIWAN. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *Journal of Controlled Release* [online]. 2003, **90**(3), 335-343. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(03)00200-1

³⁷Low temperature calibration. *Mettler Toledo* [online]. Dostupné z: <https://www.mt.com/sg/en/home/library/usercoms/lab-analytical-instruments/thermal-analysis-usercom-9.html>

³⁸TANOJO Hanafi, et. al. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 1999, **57**(1), 313-322. ISSN 14182874. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010137807610

³⁹GARDIKIS, Konstantinos, Sophia HATZIANTONIOU, Kyriakos VIRAS, Matthias WAGNER a Costas DEMETZOS. A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of

PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **318**(1-2), 118-123. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2006.03.023

⁴⁰BOITEN, Walter, Samira ABSALAH, Rob VREEKEN, Joke BOUWSTRA a Jeroen VAN SMEDEN. Quantitative analysis of ceramides using a novel lipidomics approach with three dimensional response modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2016, **1861**(11), 1652-1661. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2016.07.004

⁴¹YUAN, Liping, Meng PAN, Kun SHI, Danrong HU, Yicong LI, Yu CHEN a Zhiyong QIAN. Nanocarriers for promoting skin delivery of therapeutic agents. *Applied Materials Today*[online]. 2022, **27**. ISSN 23529407. Dostupné z: doi:10.1016/j.apmt.2022.101438

⁴²TOMALIA, Donald A., et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* [online]. 1985, **17**(1), 117-132. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1295/polymj.17.117

⁴³ESFAND, Roseita a Donald A. TOMALIA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2001, **6**(8), 427-436. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(01)01757-3

⁴⁴SUN, Mingjing, Aiping FAN, Zheng WANG a Yanjun ZHAO. Dendrimer-mediated drug delivery to the skin. *Soft Matter*[online]. 2012, **8**(16). ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/c2sm07280g

⁴⁵VENUGANTI, Venkata Vamsi K. a Omathanu P. PERUMAL. Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **98**(7), 2345-2356. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21603

⁴⁶BOROWSKA, Katarzyna, Stanisław WOŁOWIEC, Andrzej RUBAJ, Kazimierz GŁOWNIAK, Elwira SIENIAWSKA a Sebastian RADEJ. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene—In vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, **426**(1-2), 280-283. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.041

⁴⁷NOVÁČKOVÁ, Anna. *Studium látek ovlivňujících propustnost kožní bariéry*. Hradec Králové, 2021. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Zbytovská, Jarmila.

⁴⁸KLIGMAN, ALBERT M. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of Dermatology* [online]. 1963, 1963-12-01, **88**(6). ISSN 0003-987X. Dostupné z: doi:10.1001/archderm.1963.01590240026005

⁴⁹SVOBODA, Marek, HLOBILOVÁ Marta, MAREŠOVÁ Markéta, SOCHOROVÁ Michaela, KOVÁČIK Andrej, VÁVROVÁ Kateřina a Iva DOLEČKOVÁ. Comparison of suction blistering and tape stripping for analysis of epidermal genes, proteins and lipids. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2017, **309**(9), 757-765. ISSN 0340-3696. Dostupné z: doi:10.1007/s00403-017-1776-6

⁵⁰GOH, Choon Fu, Jonathan HADGRAFT a Majella E. LANE. Thermal analysis of mammalian stratum corneum using differential scanning calorimetry for advancing skin research and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **614**. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121447

⁵¹ČUŘÍKOVÁ-KINDLOVÁ, Barbora A., VOVESNÁ Aneta, NOVÁČKOVÁ Anna a Jarmila ZBYTOVSKÁ. In Vitro Modeling of Skin Barrier Disruption and its Recovery by Ceramide-Based Formulations. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2022, **23**(1). ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-021-02154-