

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Skin Barrier Research Group



Dizertačná práca

ŠTÚDIUM KONJUGÁTOV SFINGOLIPIDOV
S KYSELINOU HYALURÓNOVOU A ICH APLIKÁCIE NA
KOŽU

STUDY OF CONJUGATES OF SPHINGOLIPIDS WITH HYALURONIC ACID
AND THEIR APPLICATION ON THE SKIN

Mgr. Martin Juhaščík

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

Konzultantka: Gloria Huerta-Ángeles, Ph.D.

Hradec Králové

2024

Podakovanie

Týmto by som sa rád poďakoval predovšetkým svojej konzultantke Glorii Huerta-Ángeles, Ph.D., a školiteľovi doc. PharmDr. Andrejovi Kováčikovi, Ph.D., za ich odborné vedenie, ústretovosť, trpezlivosť a za čas, ktorý mi počas vypracovania tejto práce venovali. Moje ďakovanie taktiež náleží kolegom zo spoločnosti Contipro a.s., menovito doc. RNDr. Vladimírovi Velebnému, Ph.D. a Bc. Zuzane Bubnové, MBA, že mi dali príležitosť pracovať v priebehu doktorského štúdia v ich spoločnosti. Ďalej ďakujem Bc. Kateřine Štarmanovej, Ing. Petrovi Štěpánovi, Mgr. Martine Brandejsovej, Mgr. Ondřejovi Štryplovi a všetkým ďalším, s ktorými som mal tú česť spolupracovať. Chcel by som sa taktiež poďakovať všetkým členom *Skin Barrier Research Group*, predovšetkým Mgr. Ive Hrdinovej, Mgr. Petre Pullmannovej, Ph.D., PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D. a prof. PharmDr. Kateřine Vávrovej, Ph.D., za pevné zázemie, ich výpomoc a cenné rady v priebehu výskumnej činnosti. Za finančnú podporu ďakujem spoločnosti Contipro a.s. a Univerzite Karlovej (GAUK 332821). Nemalá vďaka taktiež patrí mojej manželke i zvyšku rodiny. Bez ich podpory by to nešlo.

Táto práca vznikla vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu 260 661.

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne (pod vedením svojho školiteľa a konzultantky). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci náležite citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 2024

Mgr. Martin Juhaščík

Obsah

ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	8
Použité skratky.....	10
1 Úvod a cieľ práce.....	12
2 Teoretická časť.....	14
2.1 Funkcia a štruktúra kože.....	14
2.1.1 <i>Hypodermis</i>	14
2.1.2 <i>Dermis</i>	14
2.1.3 <i>Epidermis</i>	15
2.2 <i>Stratum corneum</i> a kožná bariéra.....	16
2.2.1 Ceramidy.....	17
2.3 Kyselina hyaluronová.....	19
2.3.1 Funkcie kyseliny hyaluronovej.....	20
2.3.2 Chemické modifikácie kyseliny hyaluronovej.....	20
2.3.3 Topická aplikácia derivátov kyseliny hyaluronovej.....	21
3 Experimentálna časť.....	26
3.1 Materiál a použité chemikálie.....	26
3.2 Nukleárna magnetická rezonancia a stupeň substitúcie.....	26
3.3 Infračervená spektroskopia pripravených látok.....	27
3.4 Príprava <i>N</i> -sukcinylfyfosfingozínu.....	27
3.5 Príprava <i>N</i> -maleinylfyfosfingozínu.....	28
3.6 Príprava kyslej formy hyaluronanu.....	28
3.7 Príprava konjugátu <i>N</i> -sukcinylfyfosfingozínu s hyaluronanom.....	28
3.8 Príprava konjugátu <i>N</i> -maleinylfyfosfingozínu s hyaluronanom.....	29
3.9 Príprava sukcinylceramidu.....	29
3.9.1 Príprava sukcinylceramidu v malom rozsahu.....	29
3.9.2 Príprava sukcinylceramidu vo väčšom rozsahu.....	30
3.10 Príprava maleinylceramidu.....	30
3.11 Príprava konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.....	31
3.12 Príprava konjugátu maleinylceramidu s hyaluronanom.....	32
3.13 Stanovenie kritickej agregáčnej koncentrácie a väzbovej konštanty pyrénu konjugátov sukcinylceramidu s hyaluronanom.....	32
3.14 Enkapsulácia kurkumínu.....	33
3.15 Stanovenie viskozity.....	33

3.16	Dynamický rozptyl svetla	33
3.17	Vylučovacia chromatografia spojená s detekciou viacuhlového rozptylu svetla .	34
3.18	Kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria	34
3.19	Termogravimetrická analýza	35
3.20	Hodnotenie cytotoxicity	35
3.21	Hodnotenie protizápalovej aktivity	36
3.22	<i>In vitro</i> penetračné experimenty s polymérnymi nanočasticami s enkapsulovanou nílskou červenou.....	36
3.23	Elektrická impedancia.....	37
3.24	Transepidermálna strata vody.....	38
3.25	<i>In vitro</i> penetračné experimenty s modelovou látkou teofylínom.....	38
3.26	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	38
3.27	Infračervená spektroskopia povrchu kože.....	38
4	Výsledky a diskusia	40
4.1	Syntéza a charakterizácia konjugátov sfingolipidov a hyaluronanu.....	40
4.1.1	Príprava konjugátov fytosfingozínu s hyaluronanom	41
4.1.2	Príprava konjugátov ceramidu s hyaluronanom.....	43
4.1.3	Agregačné chovanie konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom	48
4.1.4	Reologické chovanie konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom	49
4.1.5	Cytotoxicita a protizápalové vlastnosti konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.....	51
4.2	Vplyv polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom na vlastnosti kožnej bariéry.....	55
4.2.1	Penetračné experimenty s konjugátmi sukcinylceramidu s hyaluronanom s enkapsulovanou nílskou červenou.....	55
4.2.2	Vplyv konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom na zmeny transepidermálnej straty vody a elektrickej impedancie	56
4.2.3	Permeácia modelovej látky teofylínu	58
4.2.4	Analýza kožného povrchu pomocou infračervenej spektroskopie.....	59
5	Záver	65
6	Literatúra	68
7	Zoznam publikovaných prác	82
8	Zoznam patentov	82
9	Zoznam konferenčných príspevkov	83

Príloha: Doplnujúce informácie k experimentálnej časti práce

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové	Katedra farmaceutické technologie
Školiace pracovisko	Farmaceutická technologie
Doktorský študijný program	Mgr. Martin Juhaščík
Kandidát	doc. PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.
Školiteľ	Gloria Huerta-Ángeles, Ph.D.
Konzultantka	Štúdium konjugátov sfingolipidov s kyselinou
Názov dizertačnej práce	hyalurónovou a ich aplikácie na kožu

Hlavným cieľom tejto práce bolo systematicky navrhnuť a následne pripraviť konjugáty kyseliny hyalurónovej (HA) s vybranými sfingolipidmi, ktoré by mohli nájsť uplatnenie v ich topickom podávaní napr. pri fyziologickom poklese kožných funkcií. V rámci tejto štúdie boli fytosfingozín a ceramid chemickou cestou spojené s HA prostredníctvom linkerov, čo umožnilo úspešnú úpravu HA na hydrofobizovaný konjugát sfingolipid-linker-hyaluronát.

Ako najviac účinná sa ukázala byť príprava konjugátu sukcinylceramid-hyaluronát. Vyvinutá metóda prípravy konjugátu s využitím zmiešaných anhydridov prináša radu výhod, vrátane možnosti škálovania prípravy a prevedenia reakcií vo vodnom prostredí. Metóda bola efektívna v širokom spektre molekulových hmotností, a to od 6 do 442 kgmol⁻¹, pri čom bol dosiahnutý stupeň substitúcie až 14,2 %, z pôvodne definovaného cieľa 2,5 až 3,5 %. Úspešná modifikácia HA na konjugát sfingolipid-linker-hyaluronát bola potvrdená pomocou NMR a infračervenej spektroskopie a hmotnostnej spektrometrie.

Konjugáty sukcinylceramid-hyaluronát nevykazovali žiadne cytotoxické účinky, avšak bol pozorovaný rast buniek, čo by mohlo byť prospešné pre prípadnú kompenzáciu dermálnych atrofických zmien. Ďalej konjugát preukázal významné zníženie hladiny prozápalového cytokínu interleukínu 6, a to až o 95 %, pri relatívne nízkych koncentráciách. Agregačné vlastnosti boli skúmané pomocou kritickej agregačnej koncentrácie, väzbovej konštanty pyrénu, dynamického rozptylu svetla a viazaním modelovej lipofilnej látky kurkumínu, ktoré potvrdili spontánnu organizáciu konjugátov do polymérnych nanočastíc s veľkosťou do 40 nm.

Po aplikácii polymérnych nanočastíc konjugátov sukcinylceramid-hyaluronát s enkapsulovanou fluorescenčnou značkou nílskou červenou na prasaciu kožu *ex vivo* bola pozorovaná fluroescencia až v *dermis*. Pripravené konjugáty, aplikované na ľudskú kožu *ex vivo*, nemali negatívny dopad na priepustnosť kožnej bariéry, čo bolo hodnotené pomocou transepidermálnej straty vody, elektrickej impedancie a priepustnosti kože pre modelovú látku teofylín. Z infračervenej spektroskopie sa dá vyvodit' záver, že aplikované konjugáty sukcinylceramid-hyaluronát síce významne neovplyvnili konformáciu kožných lipidov, ale ovplyvnili sekundárnu štruktúru keratínu v prospech tzv. konformácie β -skladaného listu.

Spontánne vytvorené polymérne nanočastice pripravených konjugátov, rozpustných vo vode, by mohli byť začlenené do vodnej fázy kvapalných alebo polotuhých topických liečivých/kozmetických prípravkov na liečbu zápalových kožných ochorení alebo sa mohli použiť ako nosič hydrofóbných aktívnych látok s využitím v (trans)dermálnom podávaní liečiv.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové	
Training Workplace	Department of Pharmaceutical Technology
Doctoral Degree Program	Pharmaceutical Technology
Candidate	Mgr. Martin Juhaščík
Supervisor	doc. PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.
Advisor	Gloria Huerta-Ángeles, Ph.D.
Title of Doctoral Thesis	Study of conjugates of sphingolipids with hyaluronic acid and their application on the skin

The main goal of this study was to systematically design and subsequently prepare conjugates of hyaluronic acid (HA) with selected sphingolipids, which could find application in their topical administration during physiological decline of skin functions. In this study, phytosphingosine and ceramide were chemically linked to HA via biocompatible linkers, enabling successful modification of HA into a hydrophobized conjugate of sphingolipid-linker-hyaluronate.

The preparation of succinylceramide-hyaluronate conjugate was found to be the most effective. The developed method of preparing the conjugate using mixed anhydrides brings several advantages, including the possibility of scaling up the preparation and conducting reactions in an aqueous environment. The method was effective over a wide range of molecular weights, from 6 to 442 kgmol⁻¹, achieving a degree of substitution of up to 14.2 %, surpassing the originally defined target of 2.5 to 3.5 %. Successful modification of HA into the conjugate of sphingolipid-linker-hyaluronate was confirmed by NMR, infrared spectroscopy, and mass spectrometry.

Succinylceramide-hyaluronate conjugates showed no cytotoxic effects. However, cell growth was observed, which could be beneficial for potential compensation of dermal atrophic changes. Furthermore, the conjugate demonstrated a significant reduction in the level of the pro-inflammatory cytokine interleukin 6, up to 95 %, at relatively low concentrations. Aggregation properties were studied using critical aggregation concentration, pyrene binding constant, dynamic light scattering, and binding of the model lipophilic substance curcumin, which confirmed the self-assembling of conjugates into polymeric nanoparticles with sizes up to 40 nm.

After application of polymeric nanoparticles of succinylceramide-hyaluronate conjugates with encapsulated fluorescent marker Nile red on porcine skin *ex vivo*, fluorescence was observed in the *dermis*. Prepared conjugates applied to *ex vivo* human skin had no negative impact on skin barrier permeability, as evaluated by transepidermal water loss, electrical impedance, and skin permeability to the model substance theophylline. Infrared spectroscopy suggests that the applied succinylceramide-hyaluronate conjugates did not significantly affect the conformation of skin lipids but influenced the secondary structure of keratin in favor of the β -sheet conformation.

Self-assembled polymeric nanoparticles of prepared conjugates are soluble in water and therefore could be incorporated into the aqueous phase of liquid or semi-solid topical therapeutic/cosmetic preparations for the treatment of inflammatory skin diseases or could be used as carriers for hydrophobic active substances with application in (trans)dermal drug delivery.

Použité skratky

API	aktívna farmaceutická látka
BC	benzoyl-chlorid
CAC	kritická agregačná koncentrácia
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
Cer	ceramid(y); ceramid NP18:1
DMAP	4-dimethylaminopyridín
DMEM	Dulbeccom modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimetylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorfolínium-chlorid
DOSY NMR.....	NMR spektroskopia typu <i>diffusion ordered</i>
DS	stupeň substitúcie
EE.....	efektivita enkapsulácie kurkumínu (angl. <i>encapsulation efficiency</i>)
EI.....	elektrická impedancia
EtOH	etanol
FTIR.....	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GlcA	D-glukurónová kyselina
GlcNAc.....	<i>N</i> -acetyl-D-glukózamín
HA.....	hyalurónová kyselina, hyaluronan
HA-mCer	konjugát maleinylceramidu s hyaluronanom
HA-mP	konjugát <i>N</i> -maleinylfytosfingozínu s hyaluronanom
HA-sCer	konjugát/polymérne nanočastice konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom
HA-sP	konjugát <i>N</i> -sukcinylfytosfingozínu s hyaluronanom
HP	hydrodynamický priemer
HSTU.....	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -sukcinimidyl)urónium-hexafluorofosfát
HSQC NMR	NMR spektroskopia typu <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IL-6	interleukín 6

IPA	propán-2-ol, izopropanol
KURK	kurkumín
mCer	maleinylceramid
mP	<i>N</i> -maleinylfytosfingozín
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazólium-bromid
NF- κ B	nukleárny faktor κ B
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
P	fytosfingozín
PBS	fosfátom pufovaný fyziologický roztok, (angl. <i>phosphate buffered saline</i> , pH=7,4)
PDI	index polydisperzity
PG	propylénglykol
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
SC	<i>stratum corneum</i>
sCer	sukcinylyceramid
SD	smerodajná odchýlka
SEM	stredná chyba priemeru
sP	<i>N</i> -sukcinylfytosfingozín
TEA	trietylamín
TEWL	transepidermálna strata vody
TH	teofylín
THF	tetrahydrofurán
VK	väzbová kapacita

1 Úvod a cieľ práce

Kyselina hyalurónová je hydrofilný polysacharid, ktorý sa v koži podieľa na mnohých dôležitých funkciách. Topicky podávané prípravky s touto látkou však nedostatočne prenikajú cez hydrofóbnu kožnú bariéru, uloženú v najvrchnejšej časti pokožky. V súčasnosti nachádzajú uplatnenie prípravky na báze hyalurónovej kyseliny v hydrofobizovanej forme, ktorá je žiadúca k prekonaniu kožnej bariéry a tým dosiahnutiu požadovaného efektu (napr. hydratácie *dermis*, protizápalovej aktivity).

Cieľom tejto práce bolo racionálne navrhnúť a následne pripraviť vhodné konjugáty kyseliny hyalurónovej so sfingolipidmi, ktoré by mohli nájsť uplatnenie v ich topickom podávaní pri fyziologickom poklese kožných funkcií, prípadne by mohli poslúžiť ako nosič lipofilných farmaceutických (kozmetických) aktívnych látok v topických prípravkoch. Takéto konjugáty by mali byť jednoducho chemicky pripraviteľné, ideálne s možnosťou škálovateľnosti výroby a cieľovým stupňom substitúcie polysacharidu 2,5 – 3,5 %. Tieto látky, schopné preniknúť do hlbších vrstiev pokožky, by mali byť dobre rozpustné vo vode, biodegradovateľné, a v neposlednom rade netoxické a biokompatibilné.

V tejto práci boli ako východiskové sfingolipidy zvolené fytosfingozín a ceramid na báze fytosfingozínu a kyseliny olejovej (ceramid NP 18:1). Nespornou výhodou týchto, vo vode nerozpustných látok, je ich nižšia nákupná cena v porovnaní napr. s ceramidmi odvodenými od sfingozínu. Uvedené látky však neobsahujú vhodné funkčné skupiny pre viazanie na kyselinu hyalurónovú, a preto ich bolo nutné pred samotným viazaním na polysacharid modifikovať. Prevažne bolo pracované s kyselinou hyalurónovou o nízkej molekulovej hmotnosti, ktorá sa jednoducho modifikuje a súčasne efektívnejšie preniká do kože. Za látky, ktoré by mohli slúžiť ako linker, boli zvolené kyselina jantárová a maleínová, ktoré vstupujú do modifikácie sfingolipidov vo forme sukcinanhydridu alebo maleínanhydridu. Takto modifikované sfingolipidy obsahovali karboxylovú skupinu, ktorá výrazne zvýšila ich rozpustnosť a zväčšila ich polárnu hlavu.

Modifikovaná (hydrofobizovaná) kyselina hyalurónová je rozpustná vo vode, ľahko biodegradovateľná v biologických systémoch a súčasne sa neznižuje jej schopnosť interagovať s mnohými receptormi, napr. CD44. Pripravené konjugáty kyseliny hyalurónovej a sfingolipidov boli charakterizované pomocou nukleárnej magnetickej

rezonancie, hmotnostnej spektrometrie a ďalších analytických metód. Ich agregáčné vlastnosti boli skúmané pomocou kritickej agregáčnej koncentrácie, väzbovej konštanty pyrénu, dynamického rozptylu svetla a viazaním modelovej lipofilnej látky kurkumínu. Biokompatibilita bola overená pomocou testovania cytotoxicity na NIH-3T3 bunkovej línii a bola preskúmaná schopnosť konjugátov inhibovať produkciu prozápalového cytokínu interleukínu 6. Ich vplyv na vlastnosti kožnej bariéry bol overený *in vitro* vo Franzových celách prostredníctvom sledovania parametrov kože, ako sú elektrická impedancia, transepidermálna strata vody a priepustnosť modelovej látky teofylínu. Usporiadanie a konformácie kožných lipidov a keratínu kožnej bariéry boli po aplikácii týchto konjugátov hodnotené pomocou infračervenej spektroskopie.

2 Teoretická časť

2.1 Funkcia a štruktúra kože

Koža (lat. *cutis*, gréc. *derma*) je najväčší plošný orgán cicavcov, ktorý sa zásadne podieľa na udržovaní stálosti vnútorného prostredia (homeostáze) a jej prítomnosť je podmienkou existencie suchozemských organizmov, vrátane človeka [1]. Toto tkanivo chráni organizmus pred nežiadúcimi vplyvmi chemického, biologického alebo fyzikálneho pôvodu. U priemerne vyvinutého dospelého človeka môže nadobudnúť plochu v rozmedzí 1,6 – 2 m² a hmotnosť v rozmedzí 2,5 – 3 kg. Významne sa ďalej podieľa aj na termoregulácii tela; činnosťou potných a mazových žliaz sa podieľa na exkrekčných a respiračných procesoch. Bohato vetvené nervové zakončenia zabezpečujú adekvátne reakcie kontaktu kože s vonkajším prostredím. Koža sa zúčastňuje na tvorbe vitamínu D, čím sa nepriamo podieľa na metabolizme vápnika v tele. Tvorí aj prvú bariéru pri styku s mikroorganizmami, preto sa v nej nachádza veľké množstvo buniek imunitného systému [1,2].

2.1.1 Hypodermis

Anatomicky sa koža skladá z troch základných vrstiev – pokožka, zamša a podkožie. Podkožné väzivo (lat. *tela subcutanea*, *hypodermis*) spája kožu s príslušnými štruktúrami organizmu (šľachami a svalmi). Medzi jej úlohy patrí ukladanie energie v podobe tukových zásob a mechanická ochrana. Podkožie je tvorené hlavne adipocytmi, nervovými vláknami a krvnými a lymfatickými cievami. Taktiež sa považuje aj za endokrinný orgán, nakoľko obsahuje enzým aromatázu, ktorý konvertuje androstendión na estrón. Okrem toho produkuje hormón leptín, ktorý reguluje telesnú hmotnosť [1,2].

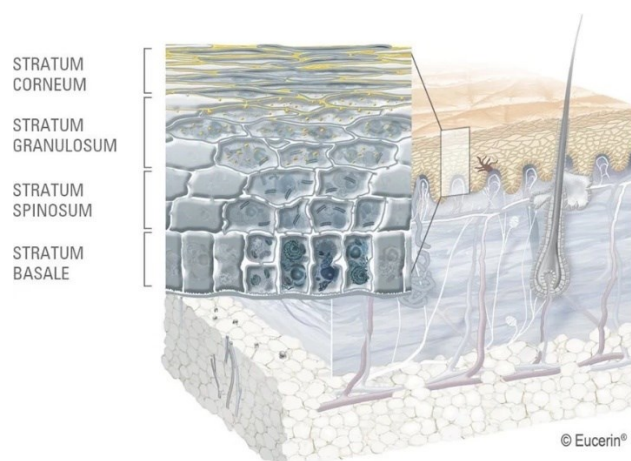
2.1.2 Dermis

Zamša (lat. *corium*, *dermis*) je najhrubšou časťou kože (3–5 mm). Je rozdelená do dvoch vrstiev – papilárnej (lat. *stratum papillare*) a retikulárnej (lat. *stratum reticulare*). Zatiaľ čo papilárna vrstva sa nachádza pod dermoepidermálnym spojom a obsahuje prevažne voľne usporiadané kolagénové vlákna, retikulárna vrstva je tvorená hrubšími zväzkami kolagénových vlákien paralelnými k povrchu kože [2,3]. Až 70 % zamše tvoria kolagénové vlákna, vďaka ktorým má požadovanú pevnosť, zatiaľ čo vďaka elastínovým vláknam je koža elastická a flexibilná [1–3]. V zamši sa nachádzajú bunky fibroblasty a fibrocyty, ďalej

bunky imunitného systému, nervové vlákna a cievy. Výrazne je tu zastúpená extracelulárna matrix, ktorá je tvorená mukopolysacharidovým gélom pretkaným kolagénovými a elastínovými vláknami [2]. Súčasťou tohto komplexného extracelulárneho systému je okrem iného aj kyselina hyalurónová (HA) [4].

2.1.3 Epidermis

Pokožka (lat. *epidermis*) je najvrchnejšia vrstva kože, ktorá dosahuje hrúbku od 0,5 mm (očné viečka) do 1,5 mm (chodidlá). Je tvorená keratinocytmi usporiadanými do viacvrstvého rohovatejúceho epitelu [1,3]. Ich jednotlivé vrstvy sa anatomicky delia na *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum* (**Obrázok 1**) [1–3,5]. Okrem keratinocytov pokožka obsahuje melanocyty (bunky zodpovedné za pigmentáciu kože), ďalej Langerhansove bunky, antigén-prezentujúce bunky a Merkelove bunky, ktoré slúžia ako mechanoreceptory [1–3].



Obrázok 1. Anatomické členenie *epidermis* cicavcov – *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale* [6].

Stratum basale (bazálna vrstva) je tvorené palisádovito radenými cylindrickými keratinocytmi, ktoré sú prichytené na bazálnu membránu. Keratinocyty z tejto vrstvy migrujú smerom na povrch *epidermis*, pričom sa postupne diferencujú [1–3]. *Stratum spinosum* (trnitá vrstva) tvorí 5–6 radov keratinocytov nad *stratum basale*, ktoré sú pospájané tesnými bunkovými spojmi – dezmozómami. V hornej časti tejto vrstvy sa začína diferenciácia keratinocytov a tiež syntéza a úprava kožného proteínu keratínu. Taktiež sa tu objavujú granule obsahujúce rôzne enzýmy a prekurzory lipidov.

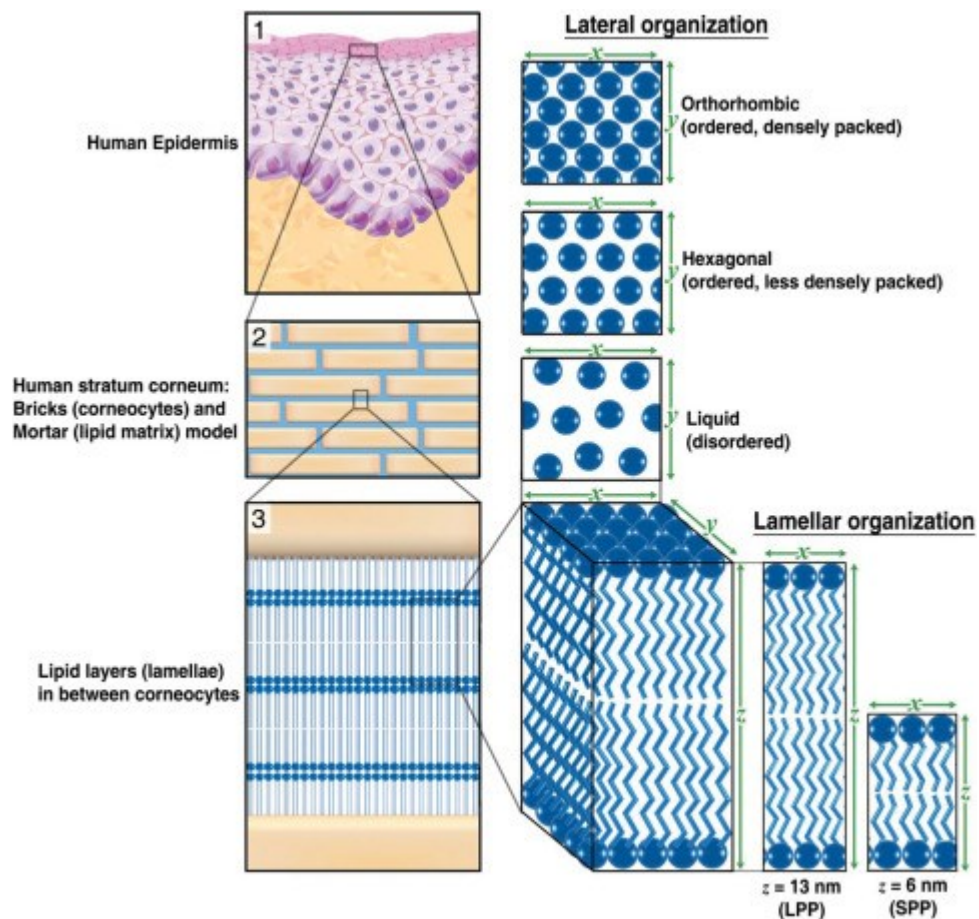
Keratohyalinové granule obsahujú aj profilaggrín, prekursor dôležitého proteínu kožnej bariéry filaggrínu. Vo vrstvách *stratum granulosum* (zrnatá vrstva) a *stratum lucidum* (vrstva jasných buniek) sa ďalej nachádzajú tranzitné keratinocyty. *Stratum lucidum* v závislosti od lokalizácie na tele nemusí byť prítomné [1–3].

Stratum corneum (rohová vrstva; SC) je najvrchnejšia vrstva *epidermis*, ktorá je tvorená oploštenými, zrohovatenými a odumretými bunkami bez jadra – korneocytmi. Tieto bunky sú vyplnené keratínom a sú obvykle zoradené v 15–20 vrstvách, ale v závislosti od polohy na tele môže mať až 100 vrstiev (napr. na chodidlách). Jednotlivé korneocyty sú navzájom pospájané korneodesmózami, ktoré sú v procese deskvamácie pokožky proteolyticky degradované [1–3,7]. Povrch SC má kyslé pH s hodnotou približne 5,5, ktoré je dôležité pre jeho správnu bariérovú funkciu [8]. Priestory medzi korneocytmi sú vyplnené intercelulárnou lipidovou matrix [8].

2.2 *Stratum corneum* a kožná bariéra

Intercelulárna lipidová matrix, vyplňujúca medzibunkové priestory korneocytov, sa skladá z vyšších nerozvetvených mastných kyselín o rôznej dĺžke, cholesterolu a ceramidov (Cer) približne v ekvimolárnom pomere 1:1:1. Z ďalších látok sú v tejto oblasti prítomné estery cholesterolu a cholesterol-sulfát, tvoriaci približne 5 % (m/m) matrix. Unikátna zmes hydrofóbných lipidov spoločne s korneocytmi sú považované za vlastnú kožnú bariéru, ktorej hlavná funkcia je chrániť organizmus pred nadmernou stratou vody. Jej ďalšie funkcie sú ochrana tela pred prienikom cudzorodých látok a mikroorganizmov z vonkajšieho prostredia do tela jedinca [8,9].

Lipidy SC sú v lipidovej matrix usporiadané do lamelových útvarov (lamiel) s rôznymi dĺžkami vzdialeností medzi rovinami. Pre správnu bariérovú funkciu SC je nevyhnutná štruktúra označovaná ako dlhá lamelárna fáza, ktorej vzdialenosť medzi rovinami je približne 13 nm (**Obrázok 2**). V zdravej rohovej vrstve je tiež možné nájsť aj kratšie lipidové zoskupenie so vzdialenosťou medzi lamelami približne 6 nm [8–14], a taktiež fázu separovaného cholesterolu [15,16]. Laterálne sú lipidy v kožnej bariére dominantne usporiadané v tesnej ortorombickej kryštalickej mriežke. No fyziologicky sú prítomné aj menej tesná hexagonálna mriežka, resp. sú lipidy v tzv. kvapalnej fáze (**Obrázok 2**) [17].

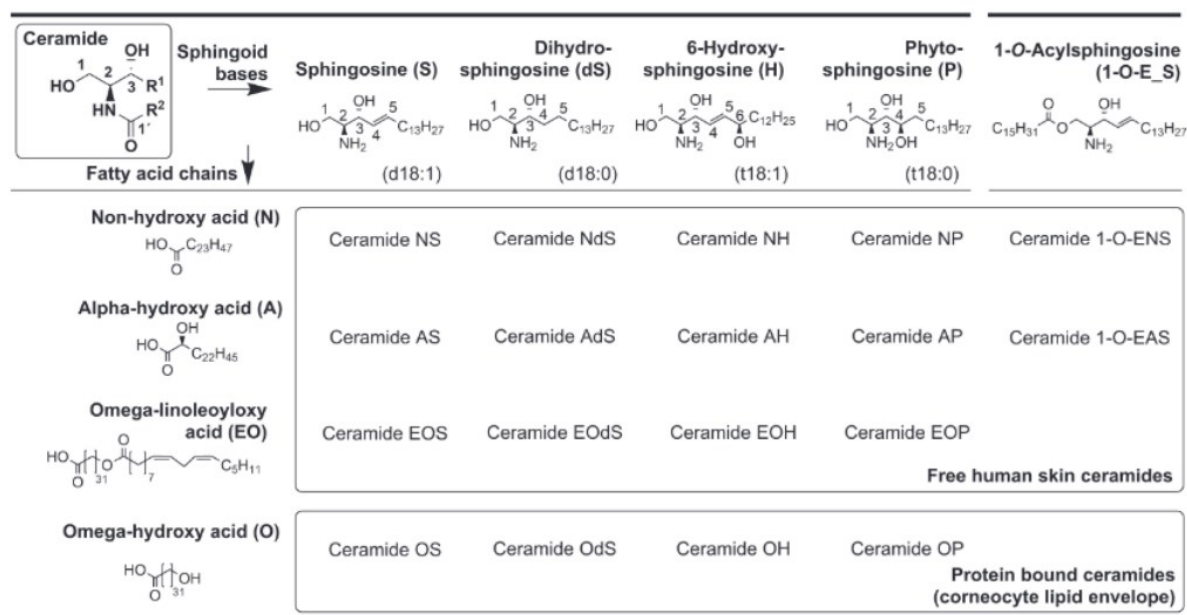


Obrázok 2. Lamelárne (dlhá lamelárna fáza (LPP) a krátka lamelárna fáza (SPP)) a laterálne (ortorombické, hexagonálne a kvapalné) usporiadanie lipidov v *stratum corneum* [18].

2.2.1 Ceramidy

Cer patriace do skupiny sfingolipidov sú v intercelulárnej lipidovej matrix zastúpené v množstve približne 50 % (m/m). Chemicky sa skladajú zo sfingoidnej báze a acylu mastnej kyseliny, ktoré sú navzájom spojené amidovou väzbou [9]. Sfingoidná báza je zvyčajne osemnásťuhlíkatý aminoalkohol, ako napr. sfingozín (S), fytosfingozín (P), dihydrosfingozín (dS) či 6-hydroxysfingozín (H). Sfingoidná báza je acylovaná vyššou mastnou kyselinou, ktorá je najčastejšie nasýtená a nerozvetvená. Dĺžka acylu je v rozmedzí 14 až 34 uhlíkov, pričom najviac zastúpené sú acyly kyseliny lignocerovej (C_{24}) a cerotovej (C_{26}). Acyly mastnej kyseliny môžu byť nesubstituované (N) alebo α -hydroxylované (A) či ω -hydroxylované (O). Koncový ω -hydroxyl môže byť acylovaný ďalšou mastnou kyselinou za vzniku ultra-dlhých Cer (EO) alebo môže byť kovalentne naviazaný na povrch korneocytu cez zvyšok kyseliny glutámovej [9,19].

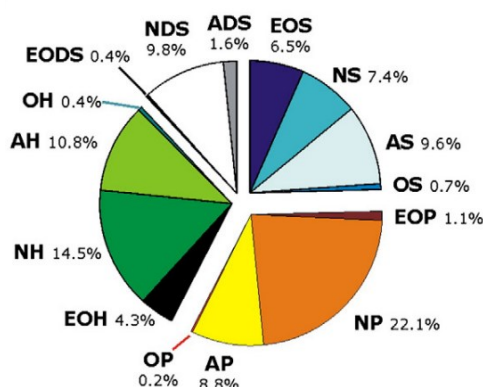
V zdravom SC existuje značné množstvo kombinácií sfingoidných báz (napr. S, dS, P a H) a acylu mastnej kyseliny (N, A, O a EO). Na ich základe bolo vytvorené prehľadné názvoslovie podľa Motta *et al.* (**Obrázok 3**). Podľa tejto nomenklatury je tak napr. *N*-lignoceroyl-fytosfingozín označený skratkou NP 24. Písmeno „P“ značí sfingoidnú bázu fytosfingozín a „N“ nesubstituovaný reťazec acylu mastnej kyseliny. Číslo za akronymom označuje, že tento acyl má dĺžku 24 uhlíkov [9,20].



Obrázok 3. Štruktúrne prvky bariérových voľných a kovalentne viazaných ľudských ceramidov v *stratum corneum* a ich názvoslovie podľa Motta *et al.* [9].

Fytoceramidy (*N*-acyl-fytosfingozíny), ktoré zaberajú približne štvrtinu hmotnosti bariérových Cer (**Obrázok 4**), sú dôležitou zložkou kožnej bariéry. V priebehu kožných ochorení ako je atopická dermatitída alebo psoriáza dochádza k úbytku fytoceramidov v zápalových ložiskách, čo spolu ďalšími faktormi zapríčiní zvýšenú transepidermálnu stratu vody (TEWL) a pruritus. V porovnaní ostatnými druhmi Cer majú fytoceramidy schopnosť interagovať s tzv. PPA receptorom (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor*; PPAR) a vykazujú zvýšenú protizápalovú aktivitu. Predpokladá sa, že mechanizmom je inhibícia zápalovej bunkovej signalizačnej dráhy nukleárneho faktoru κB (NF- κB) [21–25]. NF- κB je transkripčný faktor, ktorý reguluje viaceré aspekty vrodenej a adaptívnej imunity a slúži ako kľúčový mediátor zápalových reakcií. NF- κB indukuje

expresiu rôznych prozápalových génov vrátane génov kódujúcich cytokíny a chemokíny [26]. Voľné sfingoidné bázy, vrátane P, taktiež vykazujú antibakteriálnu aktivitu [27,28].

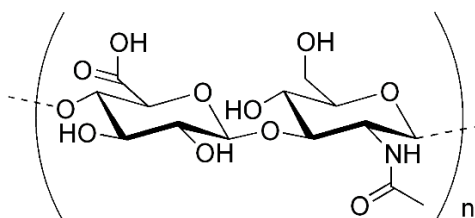


Obrázok 4. Hmotnostné zastúpenie jednotlivých typov bariérových ceramidov v zdravej rohovej vrstve [29].

2.3 Kyselina hyalurónová

HA je lineárny polysacharid zložený z opakujúcich sa jednotiek disacharidu *N*-acetyl-D-glukózamínu (GlcNAc) a D-glukurónovej kyseliny (GlcA), spojených β -(1 \rightarrow 3) a β -(1 \rightarrow 4) glykozidovou väzbou (**Obrázok 5**). V pokožke sa HA nachádza prevažne extracelulárne v oblastiach *stratum spinosum* a *granulosum*. Väčšie množstvo tohto polysacharidu sa nachádza v extracelulárnych priestoroch papilárnej vrstvy zamše [30].

Vďaka karboxylovej skupine na GlcA je molekula HA záporne nabitá a je schopná tvoriť soli, pri čom fyziologicky sa vyskytuje ako sodná soľ [31]. K významným fyzikálno-chemickým vlastnostiam HA patrí jej výrazná hydrofilita, osmotická aktivita, viskozita a schopnosť na seba viazať vodu až v 1000-násobku svojej hmotnosti [32,33].



Obrázok 5. Chemická štruktúra hyalurónovej kyseliny (HA), tj. opakujúca sa podjednotka disacharidu zloženého z D-glukurónovej kyseliny (vľavo) a *N*-acetyl-D-glukózamínu (vpravo) [34].

2.3.1 Funkcie kyseliny hyalurónovej

Molekulová hmotnosť (Mw) HA môže dosahovať až 10^7 g mol⁻¹ [32]. Nielen fyzikálno-chemické, ale aj biologické vlastnosti závisia práve od Mw polyméru. Vysokomolekulárna HA (≥ 1000 kg mol⁻¹) napomáha udržiavať štruktúru a objem (*epi*)*dermis*, zvyšuje hydratáciu, ďalej reguluje distribúciu cytoskeletálnych proteínov, ochraňuje mezenchymálne kmeňové bunky [35] a v kĺboch plní funkciu maziva [36,37], zatiaľ čo nízkomolekulárna HA (10–250 kg mol⁻¹) má na druhú stranu mierne prozápalové účinky [38–40].

HA, ako biologicky aktívna látka, je schopná interagovať s rôznymi receptormi. Za najdôležitejšiu interakciu sa však považuje interakcia HA s povrchovým receptorom CD44, pre ktorú je nevyhnutná karboxylová skupina polysacharidu [41]. Táto interakcia je významná pre imunitné reakcie pri bakteriálnych a vírusových ochoreniach [42]. Receptor CD44 zohráva úlohu aj v angiogenéze a evolúcii nádorov [43,44]. V určitých nádoroch je CD44 exprimovaný vo zvýšenej miere v porovnaní so zdravým tkanivom, čo z HA robí sľubnú molekulu pre ciele protinádorovú terapiu. V dermatológii je receptor CD44 zaujímavý z dôvodu jeho zvýšenej prítomnosti pri psoriáze [45,46]. Interakcia HA s týmto receptorom je taktiež schopná vyvolať endocytózu [47]. Ďalšie významné receptory s ktorými HA interaguje sú napr. RHAMM (angl. *receptor for hyaluronan-mediated motility*), TSG-6 (angl. *tumor necrosis factor-stimulated gene 6*) a LYVE-1 (angl. *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) [36].

2.3.2 Chemické modifikácie kyseliny hyalurónovej

Jednou z možností ako obmedziť pomerne rýchlu degradáciu podanej HA (počas degradácie po subkutánnej injekcii je 3 až 5 minút [48]), je jej chemická úprava, čo má výhodu v nižšej afinite derivátu k hyaluronidázam [49]. Po naviazaní lipofilných reťazcov na HA sa makromolekula stáva amfifílnou, pri čom je schopná tvoriť polymérne nanočastice [50].

Chemická modifikácia zahŕňa úpravu buď karboxylovej (GlcA), primárnej hydroxylovej skupiny alebo úpravu redukujúceho konca polysacharidového reťazca (na GlcNAc). Modifikáciou redukujúceho konca HA bol napr. pripravený konjugát HA s dipalmitoyl-fosfatidyl-etanolamínom pre prípravu lipozómov [51].

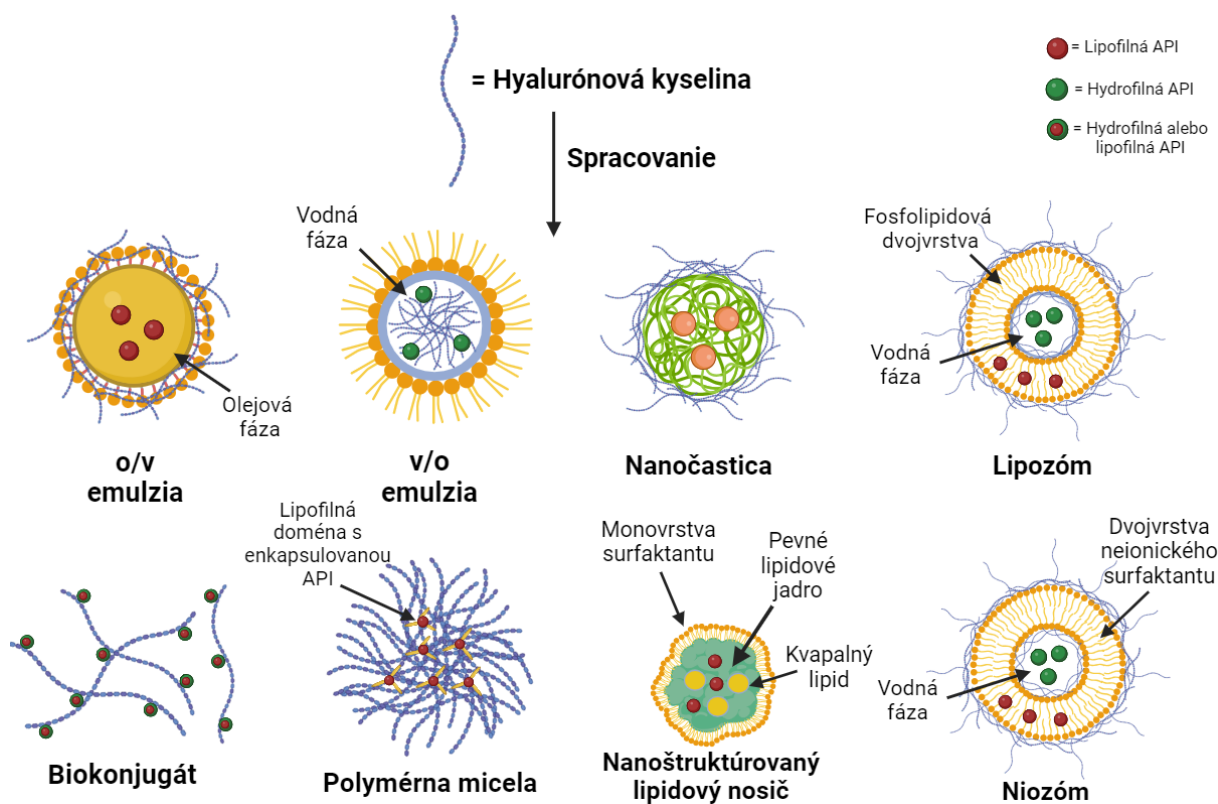
Chemická úprava karboxylovej skupiny na amid spravidla prebieha pomocou aktivačného činidla 1-etyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimidu za prítomnosti *N*-hydroxysukcinimidu. Pre tvorbu esterov sa používa katalyzátor 4-dimetylamínopyridín (DMAP) [52]. Ďalšou funkčnou skupinou HA vhodnou na modifikáciu je primárna hydroxylová skupina GlcNAc, no jej modifikácia je menej častá. Na jej modifikáciu sa používajú aktivačné činidlá ako 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI) [53,54] a *N,N,N',N'*-tetrametyl-*O*-(*N*-sukcinimidyl)urónium-hexafluorofosfát (HSTU) [55]. V prácach Huerta-Ángeles *et al.* [56] a Šmejkalová *et al.* [57] sú popísané chemické modifikácie primárneho hydroxyly HA za účelom ich aplikácie na kožu. Výhodou modifikácie primárneho hydroxyly v porovnaní s modifikáciou karboxylovej skupiny sú napr. lepšia rozpustnosť vo vode a dostupná intaktná karboxylová skupina pre interakcie s receptormi [53,58,59].

Medzi inovatívne a menej často využívané spôsoby modifikácie HA patrí tzv. Yamaguchiho esterifikácia [60], ktorá poskytuje relatívne vysoké stupne substitúcie pri nízkej teplote za krátky reakčný čas, a to v prostredí obsahujúcom až 50 % vody. Karboxylová kyselina (budúceho substituentu HA) je aktivovaná benzoyl-chloridom (BC) za vzniku zmiešaného aromatického-alifatického anhydridu [57,61–63]. Za katalýzy DMAP tento anhydrid reaguje s hydroxylovou skupinou HA. Vďaka svojej jednoduchosti a efektívnosti má uvedená metóda vhodné predpoklady pre priemyselné využitie [56,64].

2.3.3 Topická aplikácia derivátov kyseliny hyalurónovej

Efektivita priepustnosti HA v prípade jej topického podania na pokožku je ovplyvnená nielen polyanionickým charakterom so zápornou hodnotou logP polyméru [65], ale tiež veľkosťou molekuly. Platí, že s klesajúcou M_w HA rastie efektivita jej priestupu do kože [66]. Pravdepodobný mechanizmus prestupu HA do kože je transcelulárny [67], významnú rolu hrajú hydratácia, napučanie polymérnych reťazcov HA a možné rozvoľnenie SC [50]. Taktiež bola pozorovaná vysoká afinita HA ku keratínu [50] a schopnosť HA zmeniť konformáciu keratínu z α -helixu do β -skladaného listu. Najvhodnejšie vlastnosti pre ovplyvnenie keratínu preukázala HA (5 kgmol^{-1}), zatiaľ čo HA (100 kgmol^{-1} a 1000 kgmol^{-1}) ovplyvnila predovšetkým konformáciu lipidov SC [68].

Modifikované formy HA je možné topicky aplikovať napr. vo forme emulzií, lipozómov, nanočastíc alebo polymérnych micel (**Obrázok 6**).



Obrázok 6. Vybrané technologické možnosti zapracovania kyseliny hyalurónovej (HA) do systémov aplikovaných na pokožku. Horný riadok zľava: hydrofilná emulzia (o/v), hydrofóbná emulzia (v/o), nanočasticový systém a lipozóm; spodný riadok zľava: biokonjugát, polymérna micela, systém v podobe lipidového nosiča a niozóm. V prípade hydrofilných emulzií, nanočastíc, lipozómov a niozómov je HA na povrchu systému (tzv. coating). Systém obsahuje hydrofilnú (zelený kruh) alebo lipofilnú (hnedý kruh) účinnú látku (API). Obrázok je upravený z publikácie Juhaščík *et al.* [58].

2.3.3.1 Emulzné systémy

HA nachádza široké uplatnenie jednak ako aktívna látka, ale aj ako pomocná látka v kozmetických emulziách [58]. HA v týchto dvojfázových systémoch predovšetkým chráni aktívnu látku pred jej degradáciou, svojim polymérnym charakterom zvyšuje viskozitu systému, umožňuje uvoľňovanie aktívnych látok z prípravku a zlepšuje kožnú retenciu. Príkladom môže byť zvýšenie retencie azealovej kyseliny v emulzii obsahujúcej HA, ktoré viedlo k inhibícii tvorby kožného pigmentu melanínu [69]. Výhodou emulzií v porovnaní s vodnými roztokmi HA je možnosť inkorporovať do emulzného systému enhancery transdermálnej permeácie. Tým sa zvýši depozícia HA a ďalších (aktívnych) látok prípravku

v koži [70]. Vplyv na charakter finálnej emulzie má tiež koncentrácia a Mw polyméru; nízkomolekulárna HA tvorí väčšie kvapôčky emulzií typu o/v ako vysokomolekulárna HA. Pri zvyšovaní koncentrácie HA (>2 %) bol v systéme pozorovaný vznik hydrogélového jadra [71]. Hydrofobizované deriváty HA (napr. oleoyl-hyaluronát, sinapoyl-hyaluronát) môžu tiež slúžiť ako emulgátory emulzných systémov [72,73].

2.3.3.2 Systémy na báze lipozómov, etozómov a niozómov

Lipozómy a etozómy sú koloidné sférické vezikulárne útvary tvorené amfifilnými molekulami lipidov, najčastejšie fosfolipidov, ktoré tvoria jednu alebo viac dvojrvtiev. Nakoľko obsahujú lipofilné aj hydrofilné kompartmenty, môže byť do nich inkorporované široké spektrum látok [74,75]. Etozómy sa od lipozómov odlišujú predovšetkým vysokým obsahom etanolu (EtOH; 20–45 %), zatiaľ čo lipozomálne formulácie obsahujú spravidla do 10 % EtOH. EtOH obsiahnutý vo formulácii aplikovanej na kožný povrch zvyšuje fluiditu lipidov SC a tým zvyšuje jej penetračný potenciál [76]. Ako ďalšie nízkomolekulárne alkoholy môžu tieto útvary obsahovať propylénglykol (PG), prípadne izopropanol (IPA). Niozómy sa od lipozómov/etozómov líšia dvojrvtvou, ktorá neobsahuje fosfolipidy ale neionické tenzidy, a to zvyčajne estery sobitanu a polyetoxylované estery sobitanu [77,78].

HA sa v týchto vezikulárnych útvaroch používa na modifikáciu ich povrchu. To sa využíva na zvýšenie stability či zníženie zeta potenciálu [79]. Modifikovaná HA s fosfolipidmi môže znížiť zeta potenciál lipozómov, ale zároveň môže viesť k obmedzeniu fluidity dvojrvtvy. Vzhľadom ku skutočnosti, že kvapalnosť dvojrvtvy je pri kožnej aplikácii kľúčová, dá sa upravovať prídavkom EtOH [51]. Kovalentným viazaním HA na fosfolipidy získajú lipozómy schopnosť interagovať s receptormi CD44, ktoré sú up-regulované pri zápalových kožných ochoreniach, napr. psoriáze [45,80]. Benefitom inkorporácie HA je tiež zlepšenie profilu cytotoxicity lipozómov [80].

Lipozómy modifikované prídavkom HA tiež ovplyvňujú uvoľňovanie aktívnej látky [81]. Lipozómy s upraveným povrchom v podobe amfifilného konjugátu HA s cholesterolom permeovali do hlbších vrstiev kože [82]. Elhalmoushy *et al.* pripravili lipozómy s obsahom HA a s enkapsulovaným berberínom pre liečbu vitiliga. Tento systém predĺžil uvoľňovanie berberínu a zvýšil jeho kožnú retenciu [83]. Podobné výsledky boli

pozorované aj v prípade enkapsulácie extraktu z *Glycyrrhiza glabra* [81]. Etozómy obsahujúce HA sa dostávajú do hlbších úsekov kože ako etozómy bez HA [84]. Zhang *et al.* publikovali prácu, v ktorej etozómy s obsahom HA štvornásobne zvyšujú kožnú retenciu kurkumínu (KURK). Na modelovom systéme indukovanej psoriázy bola taktiež pozorovaná zvýšená expresia receptoru CD44 a aplikované etozómy znížili prozápalové markery [85]. Niozómy obsahujúce HA majú užšiu distribúciu veľkosti častíc a zlepšujú účinnosť enkapsulácie kvercetínu a KURK. Tieto niozómy vykazovali v porovnaní s kontrolou vyššiu antioxidačnú aktivitu [86]. V prípade niozómov s enkapsulovaným asiaticosidom, prítomnosť HA znížila zeta potenciál a zvýšila veľkosť častíc. Niozómy obsahujúce HA vo zvýšenej miere prenikajú až do *dermis*, pričom najvyššia kožná retencia bola pozorovaná pri koncentrácii 10 % (w/w) [87].

2.3.3.3 Nanočasticové systémy

HA môže byť súčasťou nanoštruktúrovaných lipidových systémov (angl. *nanostructured lipid carriers*), ktoré sú tvorené tekutými a tuhými lipidmi a surfaktantmi [88]. Amfifilná HA vykazuje vlastnosti povrchovo aktívnej látky a je schopná stabilizovať povrch nanočastíc [89]. Yue *et al.* pripravili konjugát HA s polyetylénglykolom a linolovou kyselinou, ktorý inkorporovali do nanočastíc s bupivakaínom. Takéto nanočastice vykazovali lepšie penetračné vlastnosti [90]. Pozitívne vplyvy konjugátov s HA boli pozorované aj pri podaní demetoxidimidínu a ropivakaínu. Formulácia navyše poskytovala intenzívnejší a dlhší antinocceptívny účinok [91]. Častice v uvedených štúdiách mali veľkosť v rozmedzí 100–155 nm.

Pre podanie HA našli využitie aj nanočastice z polyiónových komplexov na báze poly-L-arginínu či poly-L-lyzínu [92]. Takéto systémy o veľkosti približne 100 nm vykazujú dobrý prienik do kože, a to bez ovplyvnenia fluidity lipidov SC [67]. Odlišný prístup použitia HA v nanočasticových systémoch je tvorba kationických kopolymérov. Wang *et al.* takto pripravili HA s obsahom poly- β -aminoesterov a peptidov na doručenie siRNA do melanómu [93].

2.3.3.4 Systémy obsahujúce polymérne micely

Amfifilná HA tvorí pri určitej koncentrácii micely či agregáty. Šmejkalová *et al.* pripravili polymérne micely tvorené konjugátom HA s olejovou kyselinou pre topickú aplikáciu.

In vitro penetračné experimenty odhalili 3× vyššiu depozíciu fluorescenčnej značky nílskej červenej v *epidermis* a 6× vyššiu v *dermis* v porovnaní s roztokom obsahujúcim podobné množstvo modelovej látky. Pripravené micely prenikali do kože transcelulárnym mechanizmom [57]. U rovnakého derivátu bola preukázaná schopnosť vnikáť do buniek makropinocytózou [94]. V praxi sa taktiež používajú konjugáty linolovej a all-*trans*-retinovej kyseliny s HA, ktoré majú lepšie penetračné vlastnosti než samostatné látky [56,61,62,95].

Polymérne micely je možné inkorporovať aj do iných nosičových systémov. Cheng *et al.* vo svojej práci skombinovali mikroiňly s polymérnymi micelami, ktoré boli tvorené z HA modifikovanou kvercetín-ditiodipropiónou kyselinou s enkapsulovaným KURK. Micely vložené do matrice mikroiňiel uvoľnili približne 42 % KURK počas prvej hodiny a 75 % po 6 hodinách od aplikácie na kožu [96].

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál a použité chemikálie

Sodná soľ HA s Mw 6 (hodnota polydisperzity; \overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$), 9 (\overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$), 15 (\overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$), 188 (\overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$), 268 ± 30 (\overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$) a 416 ± 20 (\overline{M}_w = $1,5 \pm 0,1$) kgmol^{-1} a lyáza HA izolovaná zo *Streptococcus Pneumoniae* boli poskytnuté spoločnosťou Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika). N-oleoyl-fytosfingozín (Ceramid NP18:1; Cer; 95 %) bol zakúpený u spoločnosti Evonik Industries AG (Essen, Nemecko). Sukcinanhydrid (95 %), maleínanahydrid (99 %), KURK (97,0 %) a P (99 %) boli kúpené od spoločnosti TCI-Europe (Zwijndrecht, Belgicko). 1,4-dioxán (99 %), tetrahydrofurán (THF; 99,5 %), etyl-acetát (99,5 %), Na_2SO_4 , hexán (obsah C_6H_{14} izomérov min. 80 %), dimetylsulfoxid (DMSO; 99,0 %), EtOH a propán-2-ol (IPA; 99,7 %) boli kúpené od spoločnosti Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a trietylamín (TEA; 98 %) od spoločnosti Penta (Chrudim, Česká republika). Benzoyl-chlorid (BC; 99 %), propylénglykol (PG), nílska červená (98 %), pyrén (99 %), *terc*-butanol ($\geq 99,0\%$), sodná soľ 3-(trimetylsilyl)propiónovej-2,2,3,3- d_4 kyseliny (98% atómov D), 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorfolínium-chlorid (DMTMM) a HSTU od spoločnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). IPA, acetonitril (ACN) a kyselina mravčia v chromatografickej kvalite boli zakúpené od spoločnosti Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Deutériumoxid, $\text{ACN-}d_3$, chloroform (CDCl_3) a $\text{IPA-}d_7$ boli kúpené od spoločnosti CortecNet (Les Ulis, Francúzsko). DMAP (99,5%) a teofylín (TH) boli kúpené od spoločnosti Merck (Darmstadt, Nemecko). Fyziologický roztok pufrovaný fosfátom o $\text{pH} = 7,4$ (angl. *phosphate buffered saline*; PBS) bol pripravený rozpustením 8,0 g NaCl (Pharmasal, Ebensee, Rakúsko), 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 a 0,245 g KH_2PO_4 (všetky dodané od Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) v 800 ml demineralizovanej vody a doplnený na objem 1 l.

3.2 Nukleárna magnetická rezonancia a stupeň substitúcie

Na analýzu nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) bol použitý prístroj BRUKER Avance TM III 700 MHz (Billerica, Massachusetts, USA). Pre analýzu konjugátov HA bolo 8 mg (modifikovanej) HA rozpustených v 800 μl D_2O . Pre analýzu linker-sfingolipidu bolo 5 mg danej látky rozpustených v 800 μl CDCl_3 alebo $\text{DMSO-}d_6$. Chemický posun ^1H a ^{13}C NMR

bol referovaný na posun sodnej soli 3-(trimetylsilyl)propiónovej-2,2,3,3-*d*₄ kyseliny. ¹H-¹³C HSQC spektrá boli získané sekvenciami gradientových pulzov a 2 kHz dátových bodov, 80 skenov na inkrement, 256 inkrementov a heteronukleárny skalárny coupling C-H nastavený na 145 kHz. DOSY spektrá boli získané pomocou sekvencie simulovaného echo pulzu s bipolárnymi gradientmi (STEBPGP).

Stupeň substitúcie (angl. *degree of substitution*; DS), tj. počet molekúl sfingolipidu naviazaných na 100 disacharidových jednotiek HA, bol určený pomocou ¹H NMR a je vyjadrený v %. Hodnota DS bola získaná pomocou integrálu koncových metylových skupín sfingolipidu, ktoré rezonujú pri 0.9-0.8 ppm po normalizovaní intenzity anomérnych protónov HA, rezonujúcich pri 4.6 – 4.3 ppm. Konverzia reakcie bola vypočítaná pomocou DS a ekvivalentu sfingolipidu použitého v reakcii vzhľadom k HA, podľa nasledujúceho vzorca:

$$\text{Konverzia} = \frac{DS}{\text{ekv. sfingolipidu}} * 100$$

3.3 Infračervená spektroskopia pripravených látok

Analýza pripravených chemických látok pomocou infračervenej spektroskopie (FTIR; angl. *Fourier transform infrared spectroscopy*) boli vykonané pomocou prístroja Thermo Nicolet Nexus 870 (Waltham, Massachusetts, USA) za použitia metódy KBr tabliet. Každá vzorka bola premeraná v rozsahu 400–4000 cm⁻¹ za použitia 64 skenov pri rozlíšení 4 cm⁻¹.

3.4 Príprava *N*-sukcinylfyfosfingozínu

Substrát P (30 mg; 0,094 mmol) bol rozpustený v 3,1 ml zmesi THF/CH₂Cl₂ (3:2, v/v). Následne bol po kvapkách pod atmosférou argónu pridaný pyridín (0,002 ml; 0,2 ekv.) a sukcinanhydrid (9,5 mg; 1 ekv.) rozpustený v 0,2 ml THF. Reakcia bola udržiavaná pri teplote 0 °C počas prvých 7 h. Následne bola reakcia samovoľne zohriata na laboratórnu teplotu, pri ktorej bola miešaná 17 h. Reakčná zmes bola zahustená za zníženého tlaku. Odparok bol rekryštalizovaný v systéme etyl-acetát/hexán. Biela zrazenina bola centrifugovaná, dekantovaná a vysušená. Získaná bola biela kryštalická látka (výťažok 76 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 700 MHz): δ 12.05 (br. s, 1H), 7.57 (*d*, *J*=8.9 Hz, 1H), 4.59 (*s*, 1H), 4.46 (*s*, 1H), 4.30 (*s*, 1H), 3.93-3.85 (*m*, 1H), 3.57-3.52 (*dd*, *J*=10.7 Hz, 1H),

3.49-3.43 (*dd*, $J=8.4$ Hz, 1H), 3.40-3.20 (*m*, 2H), 2.42-2.38 (*m*, 2H), 2.36-2.32 (*m*, 2H), 1.56-1.47 (*m*, 1H), 1.46-1.37 (*m*, 1H), 1.32-1.14 (*m*, 24H), 0.87-0.82 (*m*, 3H) ppm. **FTIR** (KBr): 3363, 2918, 2850, 1733, 1649, 1551, 1468, 1418, 1245, 1168, 1075, 1039, 720 cm^{-1} .

3.5 Príprava *N*-maleinylfytosfingozínu

Substrát P (50 mg; 0,157 mmol) bol rozpustený v 5,5 ml zmesi THF/ CH_2Cl_2 (3:2; v/v). Následne bol po kvapkách pridaný pyridín (0,003 ml; 0,2 ekv.) a roztok maleínanhydridu (15,4 mg; 0,157 mmol) rozpustený v 0,2 ml THF pri teplote 0 °C pod atmosférou argónu. Vzniknutá zmes bola udržiavaná pri teplote 0 °C počas 7 h. Následne bola zmes ponechaná, aby sa spontánne zahriala na laboratórnu teplotu, pri ktorej bola miešaná 17 h. Reakčná zmes bola zahustená za zníženého tlaku. Odparok bol vykryštalizovaný zo systému etyl-acetát/hexán. Biela zrazenina bola odstredená, dekantovaná a vysušená, čím bola získaná biela kryštalická látka (výťažok 71 %). **^1H NMR** (DMSO- d_6 , 700 MHz): δ 15.74 (br. s, 1H), 9.35 (br. s, 1H), 6.50 (*d*, $J=12.58$ Hz, 1H), 6.23 (*d*, $J=12.8$ Hz, 1H), 4.82 (*d*, $J=6.0$ Hz, 1H), 4.63 (*s*, 1H), 4.47 (*d*, $J=6.3$ Hz, 1H), 4.12-4.05 (*m*, 1H), 3.69-3.64 (*dd*, $J=11.2$ Hz, 1H), 3.50-3.55 (*dd*, $J=11.2$ Hz, 1H), 3.41-3.20 (*m*, 2H), 1.56-1.36 (*m*, 2H), 1.32-1.12 (*m*, 24H), 0.89-0.82 (*m*, 3H) ppm. **FTIR** (KBr): 3494, 3272, 2920, 2851, 1702, 1635, 1585, 1471, 1408, 1318, 1216, 1076, 1034, 852 cm^{-1} .

3.6 Príprava kyslej formy hyaluronanu

5,0 g sodnej soli HA (12,5 mmol, 15 kgmol^{-1}) bolo rozpustených v 250 ml demineralizovanej vody. Následne bolo k roztoku pridaných 30 ml katexu H^+ . Reakcia bola udržiavaná pri teplote 5 °C po dobu 24 h. Následne bol katex H^+ odfiltrovaný z roztoku voľnej HA a niekoľkokrát premytý demineralizovanou vodou. Výsledný filtrát bol lyofilizovaný a skladovaný v mrazáku pri -20 °C.

3.7 Príprava konjugátu *N*-sukcinylfytosfingozínu s hyaluronanom

180 mg kyslej formy HA (0,476 mmol; 15 kgmol^{-1}) bolo rozpustených v 1,8 ml DMSO. Následne boli pridané TEA (0,066 ml; 1 ekv.) a DMAP (3 mg; 0,05 ekv.). Súčasne bol v 1,5 ml DMSO rozpustený *N*-sukcinylfytosfingozín (sP; 39,77 mg; 0,2 ekv.). Do roztoku boli potom pridané TEA (0,013 ml; 0,2 ekv.) a HSTU (34,24 mg; 0,2 ekv.). Po 7 h pri 25 °C bol roztok pridaný k roztoku obsahujúcemu HA. Reakcia potom prebiehala 72 h pri 25 °C. Následne bola reakčná zmes zriedená s 1 ml demineralizovanej vody s prídavkom NaCl

(139,1 mg; 5 ekv.). Acylovaný konjugát bol z reakčnej zmesi izolovaný vyzrážaním pomocou 5-násobku absolútneho IPA. Potom bola zrazenina dekantovaná a opakovane premytá najprv absolútnym IPA a následne 4-násobným vodným roztokom IPA (90 %; v/v). Následne bola zrazenina ešte 3× premytá absolútnym IPA. Nakoniec bola zrazenina sušená pri teplote 40 °C po dobu 48 h. **DS** = 2,8 %. **¹H NMR** (CDCl₃, 700 MHz) signály acylu: δ 2.8-2.3 (4H, -CH₂-), 1.8-1.2 (m, 26H, -CH₂-), 0.9-0.8 (m, 3H, -CH₃) ppm. **FTIR** (KBr): 3410, 2923, 2855, 1727, 1615, 1564, 1410, 1377, 1319, 1151, 1079, 1045, 613 cm⁻¹.

3.8 Príprava konjugátu *N*-maleinylfytosfingozínu s hyaluronanom

60 mg kyslej formy HA (0,159 mmol; 15 kgmol⁻¹) bolo rozpustených v 0,6 ml DMSO. Následne boli pridané TEA (0,022 ml; 1 ekv.) a DMAP (1 mg; 0,05 ekv.). Súčasne bol v 0,5 ml DMSO rozpustený *N*-maleinylfytosfingozín (mP; 13,19 mg; 0,2 ekv.). Do roztoku boli potom pridané TEA (0,004 ml; 0,2 ekv.) a HSTU (11,4 mg; 0,2 ekv.). Po 7 h pri 25 °C bol roztok pridaný k roztoku obsahujúcemu HA a reakcia prebiehala 72 h pri 25 °C. Následne bola reakčná zmes zriedená s 1 ml demineralizovanej vody s prídavkom NaCl (46,4 mg; 5 ekv.). Acylovaný konjugát bol z reakčnej zmesi izolovaný vyzrážaním pomocou 5-násobku absolútneho IPA. Potom bola zrazenina dekantovaná a opakovane premytá najprv absolútnym IPA a následne 4× vodným roztokom IPA (90 %, v/v). Následne bola zrazenina ešte trikrát premytá absolútnym IPA. Zrazenina bola sušená 48 h pri teplote 40 °C. **DS** = 1,4 %. **¹H NMR** (CDCl₃, 700 MHz) signály acylu: δ 7.75-7.35 (m, 2H, -OOC-CH=CH-COO-), 1.8-1.2 (m, 26H, -CH₂-), 0.8 (m, 3H, -CH₃) ppm.

3.9 Príprava sukcinylceramidu

3.9.1 Príprava sukcinylceramidu v malom rozsahu

K roztoku Cer (50 mg; 0,086 mmol) v 2,5 ml THF bol pod atmosférou dusíka po kvapkách pridaný TEA (5,1 μl; 0,43 ekv.). K tomuto roztoku bol pridaný sukcinanhydrid (12,9 mg; 1,5 ekv.) rozpustený v 0,5 ml THF. Výsledná zmes bola 6 h zahrievaná pri 40 °C a následne bola ponechaná 16 h pri 25 °C. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku. Odparok bol rozpustený v 10 ml CHCl₃ a extrahovaný demineralizovanou vodou (4× 10 ml). Organická frakcia bola vysušená pomocou Na₂SO₄, prefiltrovaná a odparená za zníženého tlaku, čím bola získaná bezfarebná voskovitá látka (výťažok 96 %). Selektivita modifikácie

primárnej hydroxylovej skupiny Cer bola odhadnutá na 78 % a bola vypočítaná pomocou -NH- protónov polohových izomérov, podľa vzorca:

$$\text{Modifikácia (\%)} = \frac{\int 6.54 - 6.46 \text{ ppm}}{\int 6.54 - 6.46 \text{ ppm} + \int 6.26 - 6.18 \text{ ppm}}$$

¹H NMR (CDCl₃, 700 MHz): δ 11.51 (br. s, 1H), 6.54-6.18 (d, 1H), 5.32-5.23 (m, 2H), 4.88-4.80 (m, 0.25H), 4.57-4.50 (m, 0.25H), 4.47-4.42 (dd, J=11.9 Hz, 0.75H), 4.24-4.20 (dd, J=11.6 Hz, 0.75H), 4.18-4.13 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 2H), 2.65-2.54 (m, 4H) 2.19-2.09 (m, 2H), 2.0-1.88 (m, 4H) 1.60-1.40 (m, 4H), 1.32-1.05 (m, 44H), 0.81 (m, 6H) ppm.

3.9.2 Príprava sukcinylceramidu vo väčšom rozsahu

K roztoku Cer (20,00 g; 34,367 mmol) v 690 ml THF bol pod atmosférou dusíka po kvapkách pridaný TEA (3,832 ml; 27,494 mmol). K tomuto roztoku bol pridaný sukcinanhydrid (5,155 g; 51,551 mmol) rozpustený v 90 ml THF. Výsledná zmes bola 6 h zahrievaná pri 40 °C a následne 16 h pri 25 °C. Rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku. Odparok bol rozpustený v 600 ml CHCl₃ a extrahovaný demineralizovanou vodou (4× 200 ml). Organická frakcia bola vysušená pomocou Na₂SO₄, prefiltrovaná a odparená za zníženého tlaku, čím bola získaná bezfarebná voskovitá látka (výťažok 99 %). Selektivita modifikácie primárnej hydroxylovej skupiny Cer bola odhadnutá na 55–65 % a bola vypočítaná pomocou -NH- protónov polohových izomérov, podľa vzorca:

$$\text{Modifikácia (\%)} = \frac{\int 6.53 - 6.46 \text{ ppm}}{\int 6.57 - 6.53 \text{ ppm} + \int 6.53 - 6.46 \text{ ppm} + \int 6.26 - 6.18 \text{ ppm}}$$

¹H NMR (CDCl₃, 700 MHz): δ 11.51 (br. s, 1H), 6.57-6.18 (d, 1H), 5.32-5.23 (m, 2H), 4.88-4.80 (m, 0.35H), 4.57-4.50 (m, 0.35H), 4.47-4.42 (dd, J=11.9 Hz, 0.65H), 4.24-4.20 (dd, J=11.6 Hz, 0.65H), 4.18-4.13 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 2H), 2.65-2.54 (m, 4H) 2.19-2.09 (m, 2H), 2.0-1.88 (m, 4H) 1.60-1.40 (m, 4H), 1.32-1.05 (m, 44H), 0.81 (m, 6H) ppm. **FTIR** (KBr): 3334, 2922, 2852, 2677, 1732, 1644, 1545, 1466, 1223, 1169, 1070, 721 cm⁻¹.

3.10 Príprava maleinylceramidu

K roztoku Cer (40 mg; 0,069 mmol) v 2,4 ml THF a *N*-metylmorfolínu (0,008 μl; 0,076 mmol) bol pod atmosférou dusíka po kvapkách pridaný roztok maleinánhydridu

(10,1 mg; 0,103 mmol) v 0,5 ml THF. Reakcia bola udržiavaná pri teplote 25 °C po dobu 22 h. Reakčná zmes bola zahustená za zníženého tlaku. Odparok bol rozpustený v CHCl₃ (2 ml) a premytý demineralizovanou vodou (4× 2 ml). Chloroformová frakcia bola zahustená za zníženého tlaku, čím bola získaná bezfarebná voskovitá látka (výťažok 98 %). Selektivita modifikácie primárnej hydroxylovej skupiny Cer bola odhadnutá na 55–65 % a bola vypočítaná pomocou -NH- protónov polohových izomérov, podľa vzorca:

$$\text{Modifikácia (\%)} = \frac{\int 7.69 - 7.62 \text{ ppm}}{\int 7.95 - 7.84 \text{ ppm} + \int 7.57 - 7.25 \text{ ppm} + \int 7.51 - 7.47 \text{ ppm}}$$

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 700 MHz): δ 12.75 (br. s, 1H), 7.95-7.47 (1H), 6.54-5.97 (*m*, 2H), 5.41-5.31 (*m*, 2H), 4.47-4.42 (*m*, 1H), 4.24-4.20 (*m*, 1H), 4.18-4.13 (*m*, 1H), 3.44 (*m*, 1H) 3.38 (*m*, 1H), 2.16-2.06 (*m*, 2H), 2.05-1.79 (*m*, 4H) 1.65-1.42 (*m*, 4H), 1.32-1.05 (*m*, 44H), 0.90 (*m*, 6H) ppm. FTIR (KBr): 3411, 3339 2921, 2851, 1733, 1705, 1634, 1584, 1528, 1466, 1386, 1364, 1179, 1076, 990, 864, 720 cm⁻¹.

3.11 Príprava konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom

Sodná soľ HA (3 g; 7,5 mmol), s Mw uvedenej v **Prílohe v Tabuľke P3**, bola cez noc rozpustená v 37,5 ml demineralizovanej vody. K tomuto roztoku bolo pridané 18,75 ml rozpúšťadla uvedeného v **Prílohe v Tabuľke P3** (THF, IPA, 1,4-dioxán, *terc*-butanol). Následne boli postupne pridané TEA (3,136 ml; 22,5 mmol) a DMAP (0,046 g; 0,4 mmol). V druhej reakčnej banke bol v 18,75 ml rozpúšťadla uvedeného v **Prílohe v Tabuľke P3** rozpustený sukcinylceramid (sCer) v množstve uvedenom v **Prílohe v Tabuľke P3** (0,25-1 ekv.). Potom boli pridané TEA a BC v rovnakom látkovom množstve ako sCer. Tvorba zmiešaného anhydridu prebiehala 30 min pri 40 °C. Tento roztok bol následne pridaný k roztoku, ktorý obsahoval HA. Acylačná reakcia prebiehala 2 h pri 25 °C. Reakcia bola zastavená pridaním nasýteného roztoku NaCl (2,2 g; 5 ekv.). Produkt bol vyzrážaný s IPA (400 ml), premytý s IPA (400 ml) a následne bol niekoľkokrát premytý roztokom IPA/voda (90 %, v/v; 4× 400 ml). Nakoniec bol ešte produkt premytý s IPA (3× 500 ml). Získaný prášok bol dekantovaný a sušený v sušiarňi 24 h pri 40 °C. DS = až 14,2 %. ¹H NMR (D₂O, 700 MHz) signály acylu: δ 5.5-5.22 (*m*, 2H, -CH=CH-), 2.9-2.36 (*m*, 4H, -OOC-CH₂-CH₂-COO-), 1.8-1.2 (*m*, 48H, -CH₂-), 0.9-0.8 (*m*, 6H, -CH₃) ppm. FTIR (KBr): 3616, 2925, 2855, 1727, 1616, 1410, 1377, 1320, 1152, 1079, 1045, 613 cm⁻¹.

3.12 Príprava konjugátu maleinylceramidu s hyaluronanom

66,50 mg kyslej formy HA (0,176 mmol; 15 kgmol⁻¹) bolo rozpustených v 0,8 ml DMSO. Následne bolo pridané TEA (0,012 ml; 0,5 ekv.) a DMAP (0,001 mg; 0,05 ekv.). Súčasne bol rozpustený maleinylceramid (mCer; 59,8 mg; 0,5 ekv.) v 0,8 ml DMSO. Do tohto roztoku boli pridané TEA (0,012 ml; 0,5 ekv.) a HSTU (14,26 mg; 0,5 ekv.). Po 6 h pri 60 °C bol tento roztok pridaný k roztoku obsahujúcemu HA a bol ponechaný 40 h pri 25 °C. Následne bola reakčná zmes zriedená NaCl (51,4 mg, 5 ekv.) rozpusteného v 0,3 ml demineralizovanej vody. Acylovaný konjugát bol izolovaný zrážaním pomocou 5-násobku absolútneho IPA. Potom bola zrazenina dekantovaná a opakovane premytá najprv absolútnym IPA a následne 4-násobným vodným roztokom IPA (90 %, v/v). Následne bola zrazenina ešte trikrát premytá absolútnym IPA. Nakoniec bola zrazenina sušená pri teplote 40 °C v priebehu 48 h. **DS** = 2,6 %. **¹H NMR** (CDCl₃, 700 MHz) signály acylu: δ 7.75-7.40 (*m*, 2H, -OOC-CH=CH-COO-), 5.5-5.22 (*m*, 2H, -CH=CH-), 1.8-1.2 (*m*, 48H, -CH₂-), 0.9-0.8 (*m*, 6H, -CH₃) ppm.

3.13 Stanovenie kritickej agregačnej koncentrácie a väzbovej konštanty pyrénu konjugátov sukcinylceramidu s hyaluronanom

Kritická agregačná koncentrácia (CAC) a väzbová konštanta pyrénu konjugátov sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer) boli stanovené pomocou metódy použitej v článku Štrympl *et al.* [97] s prístrojom PTI Quanta Master 400 (Oxnard, Kalifornia, USA). CAC bola stanovená pomocou emisného maxima nílskej červenej na koncentračnej závislosti HA-konjugátu. Každá vzorka bola premeraná dvakrát a dáta boli analyzované spolu. Ako CAC je označený inflexný bod, ktorý bol získaný sigmoidálnym preložením semilogaritmickej závislosti. Väzbová konštanta pyrénu v hydrofóbných doménach HA-sCer bola stanovená v systémoch nasýtených pyrénom (0,8 mgml⁻¹) a je označovaná ako K_B . Je určená zo závislosti pomeru intenzity I_1/I_3 fluorescenčných pásov pyrénu na koncentrácii HA-sCer. Pre stanovenie K_B bola každá vzorka premeraná dvakrát. Výsledná hodnota je prevrátenou hodnotou inflexného bodu semilogaritmickej závislosti na osi x, ktorá reprezentuje koncentráciu HA-sCer.

3.14 Enkapsulácia kurkumínu

100 mg konjugátu HA-sCer bolo rozpustených v 10 ml demineralizovanej vody. Do vzniknutého roztoku bol pridaný 0,1 % (m/v) roztok KURK v IPA. Roztok bol miešaný 15 min pri laboratórnej teplote. Následne bol roztok zahustený za zníženého tlaku. Suchý odparok bol rehydratovaný s 10 ml demineralizovanej vody a prefiltrovaný cez sklenený filter s veľkosťou pórov 1 μm . Filtrát bol lyofilizovaný a lyofilizát bol rozpustený. Jeho absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 425 nm pomocou spektrofotometra Cary 100 UV-VIS (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, USA). Koncentrácia KURK bola určená pomocou kalibračnej krivky a ich väzbová kapacita (VK, %) a efektivita enkapsulácie KURK (angl. *encapsulation efficiency*; EE) boli vypočítané pomocou vzťahov:

$$VK = \frac{\text{hmotnosť naviazaného KURK}}{\text{hmotnosť polymérnych nanočastíc s naviazaným KURK}} * 100$$

$$EE = \frac{\text{množstvo enkapsulovaného KURK}}{\text{celkové množstvo KURK}} * 100$$

3.15 Stanovenie viskozity

Viskozita HA a konjugátov HA-sCer (188 až 442 kgmol^{-1}) bola stanovená pri koncentráciách od 2 do 5 g l^{-1} , a to vo vode a v 0,1 – 0,9 % (m/m) vodnom roztoku NaCl. Vzorky boli pripravované miešaním v priebehu 24 h pri teplote 25 °C. Reologické merania boli vykonané na reometri Kinexus Pro+ (Malvern Instruments, Malvern, Veľká Británia) s použitím kónickej geometrie (60 mm a 1°) pri konštantnej teplote 25 °C, a v rozsahu rýchlostného spádu 1–1000 s^{-1} . Uvádzané sú nulové šmykové viskozity η_0 , vypočítané s použitím Crossovho modelu [98].

3.16 Dynamický rozptyl svetla

Veľkosť (hydrodynamický priemer; HP) polymérnych nanočastíc obsahujúcich konjugáty HA-sCer bola zmeraná dynamickým rozptylom svetla (angl. *dynamic light scattering*) pomocou prístroja Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Veľká Británia) pri vlnovej dĺžke 632,8 nm a detekčnom uhle 173° s použitím detekcie spätného rozptylu. Polymérne nanočastice boli zriedené demineralizovanou vodou na koncentráciu 1 mg ml^{-1} .

3.17 Vylučovacia chromatografia spojená s detekciou viacuhlového rozptylu svetla

Mw a jej distribúcia boli stanovené vylučovacou chromatografiou v spojení s laserovým rozptylom svetla pod viacerými uhlami s použitím degaseru G 1379A. Chromatografický systém bol zložený z čerpadla Agilent HPLC model G 1310A (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, USA), manuálneho injektora Rheodyne model 7125i, dvoch 7,8 mm ultrahydrogélových lineárnych kolón (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Chromatografické detektory pozostávali z DAWN EOS MALLS, diferenciálneho viskozimetru ViscoStar a diferenciálneho indexu lomu Optilab T-rEX v sérii (Wyatt Technology, Santa Barbara, Kalifornia). Injekčný objem 0,015–1 % (w/v) konjugátov HA bol 100 μ l. Koncentrácia bola vopred optimalizovaná podľa Mw modifikovanej HA. Koncentrácia pre konjugáty pripravené z nízkomolekulárnej HA (6–15 kgmol^{-1}) bola 1 % (w/v), zatiaľ čo pre HA s vyššou Mw (188–442 kgmol^{-1}) bola použitá koncentrácia 0,05 % (w/v). Mobilnou fázou bolo 50 mM PBS a 0,02 % roztok azidu sodného pri prietokovej rýchlosti 0,5 mlmin^{-1} . Na výpočet Mw modifikovanej HA bol použitý prírastok indexu lomu 0,155 $\text{mlg}^{-1} (\text{dn}/\text{dC})$.

3.18 Kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria

Na štruktúrnu analýzu HA-sCer po enzymatickej degradácii pomocou lyázy HA izolovanej zo *Streptococcus Pneumoniae* (približne 6500 IU ml^{-1}) bol použitý chromatografický systém Acquity UPLC pripojený k hmotnostnému spektrometru Synapt G2- Si (Waters, Milford, Massachusetts, USA). K roztoku HA-sCer (1 mgml^{-1}) bolo pridané 100 μ l roztoku lyázy (na 4 ml roztoku HA-sCer) a výsledná zmes bola inkubovaná 2 h pri 37 °C. Výsledný roztok bol zriedený na 20 mg^{-1} vodným roztokom metanolu (30 %, v/v). Separácia bola vykonaná na kolóne Waters Acquity UPLC HSS T3 (2,1 \times 100 mm, 1,8 μ m) pri teplote 25 °C. Chromatografický eluent pozostával z dvoch mobilných fáz (A: 0,1 % HCOOH vo vode, B: ACN), s prietokom mobilnej fázy 0,45 mlmin^{-1} s gradientovým režimom (0–2 min, 99 % A; 4 min, 85 % A; 5 min 55 % A). Vzorka bola injektovaná v objeme 5 μ l. Hmotnostný spektrometer bol vybavený elektrosprejovým ionizačným zdrojom pracujúcim v negatívnom režime. Na kalibráciu prístroja v rozsahu m/z 50–1850 bol použitý mravčan sodný (0,5 mmol^{-1} v zmesi voda/IPA, 10:90, v/v). Parametre hmotnostného spektrometra boli nasledovné: napätie elektrosprejovej kapiláry 2,7 kV,

teplota elektrosprejového zdroja 100 °C, napätie vzorkovacieho kónusu 60 V, napätie offset zdroja 80 V, teplota desolvácie 500 °C, prietok plynu v kónuse (N₂) 50 lh⁻¹, prietok desolvatačného plynu (N₂) 800 lh⁻¹, tlak sprejovacieho plynu (N₂) 6,0 bar, nízkoohmotnostné rozlíšenie pre výber prekursorových iónov v kvadrupóle 15, napätie kolíznej pasce 4,0 V, transférové kolízne napätie 2,0 V, prietok plynu pasce (Ar) 2,0 mlmin⁻¹, prietok plynu v hélíovej cele 180,0 mlmin⁻¹, prietok plynu pre iónovú mobilitu (driftový plyn; N₂) 90 mlmin⁻¹ a výška vlny 40,0 V. Rýchlosť vlny iónovej mobility bola nastavená na 500 ms⁻¹. Disociácia nenasýtených fragmentov HA-sCer indukovaná zrážkou sa uskutočnila v prenosovej cele so zrážkovým napätím 35 V a prietokom kolízneho plynu (Ar) 2 mlmin⁻¹. Získané údaje boli vyhodnotené pomocou softvéru MassLynx (Waters, Milford, Massachusetts, USA).

3.19 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza bola vykonaná pomocou prístroja TGA Q500 (TA Instruments, New Castle, USA) v atmosfére syntetického vzduchu. 5 mg vzorky bolo zahrievané pri rýchlosti zahrievania 10 °C/min (do 600 °C). Potom bola vzorka zahriata na 910 °C. Všetky experimenty boli vykonané v dvoch opakovaníach. Výsledky TGA analýzy sú uvedené v **Tabuľke P4**. Pomery sušiny spĺňajú špecifikáciu pre priemyselnú syntézu linolenoyl-hyaluronátu sodného [61].

3.20 Hodnotenie cytotoxicity

Cytotoxicita konjugátov HA-sCer bola hodnotená na bunkovej línii NIH-3T3. Bunky boli rozmiestnené do 96-jamkových doštičiek a kultivované 24 h. Na bunky boli aplikované HA-sCer konjugáty a nemodifikované HA v koncentráciách 10, 100, 500 a 1000 µgml⁻¹ a kultivované ďalších 72 h. Konjugáty boli rozpustené v Dulbeccom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko), glutamínom (0,3 mgml⁻¹, Merck, Darmstadt, Nemecko), glukózou (4 mgml⁻¹, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko), penicilínom (100 IUml⁻¹, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko) a streptomycínom (0,1 mgml⁻¹, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko). Viabilita buniek bola meraná v časoch 0, 24, 48 a 72 h po aplikácii (konjugátov) HA prostredníctvom testu s 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazólium-bromidom (MTT; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko). Zásobný roztok MTT (20 µl; koncentrácia

5 mgml⁻¹) bol pridaný do média každej jamky bunkovej kultúry (200 µl). Doštičky boli potom inkubované 2,5 h pri 37 °C. Následne bol roztok MTT odstránený a bol pridaný lytický roztok (220 µl) pri izbovej teplote v priebehu 30 min. Výsledný roztok bol meraný pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou čítačky mikrotitračných doštičiek EnSight (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

3.21 Hodnotenie protizápalovej aktivity

Protizápalové vlastnosti konjugátov HA-sCer boli hodnotené stanovením hladiny prozápalového cytokínu IL-6 produkovaného makrofágmi po vystavení týmto konjugátom a makrofágom, aktivovaným lipopolysacharidmi z *Pseudomonas aeruginosa* 10 (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko).

Bunky THP-1 (400 000 buniek/jamka, 6-jamková platňa) boli diferencované na makrofágy kultiváciou vo forbolmyristát-acetáte (50 ngml⁻¹, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko) počas 24 h, po ktorej nasledovala 24 h pokojová fáza. Následne boli makrofágy koinkubované s lipopolysacharidmi (1 µgml⁻¹) a konjugátmi HA-sCer (v koncentráciách 250 µgml⁻¹ a 100 µgml⁻¹). Ako pozitívna kontrola boli použité makrofágy stimulované iba s lipopolysacharidmi. Nestimulované makrofágy boli použité ako negatívna kontrola. Na porovnanie boli použité aj voľný Cer a HA (6 kgmol⁻¹), a to v rovnakých koncentráciách ako konjugáty HA-sCer (250 µgml⁻¹ a 100 µgml⁻¹). Koncentrácie voľného Cer boli upravené podľa DS konjugátov HA-sCer a ich koncentrácií. HA-sCer a HA (6 kgmol⁻¹) boli rozpustené v kultivačnom médiu; voľný Cer bol rozpustený v DMSO. Experimenty zahŕňali aj kontrolu rozpúšťadla (DMSO). Po 24 h expozícii lipopolysacharidom a testovaným látkam boli odoberané supernatanty a hladina IL-6 bola stanovená metódou ELISA (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, USA).

3.22 *In vitro* penetračné experimenty s polymérnymi nanočasticami s enkapsulovanou nílskou červenou

Kožné penetračné experimenty boli vykonané s použitím kože v plnej hrúbke (približne 1 mm) z čerstvých ušnic ošípaných získaných z bitúnku (Maso-Eko s.r.o., Letohrad, Česká republika). Experimenty boli vykonané podľa postupov OECD s použitím vertikálnych Franzových difúzných ciel. Akceptorová fáza bola naplnená PBS pufrom (pH = 7,4) pri teplote 32 °C. Vyrezané tkanivo bolo umiestnené medzi donorovú a akceptorovú časť

cely, pričom SC pokožky smerovalo nahor. Odkrytá bola difúzna plocha 1 cm². Po 30 min ekvibrácie bola donorová časť cely pomaly naplnená s 0,2 ml kontrolného roztoku (PBS, pH = 7,4) alebo polymérnymi nanočasticami HA-sCer s enkapsulovanou nílskou červenou v prostredí PBS. Cela bola následne uzavretá viečkom. Po 24 h boli Franzove cely rozmontované, koža bola premytá PBS a zamrazená. Následne bola koža laterálne nakrájaná kryosekciou na hrúbku 10 µm. Každá vzorka bola pripravená v troch opakovaniach. Na skúmanie vzoriek bol použitý konfokálny laserový mikroskop Leica CM1950 (Leica Biosystems, Wetzlar, Nemecko).

3.23 Elektrická impedancia

Elektrická impedancia (EI) kože bola meraná LCR prístrojom 4080 (Conrad electronic, Hirschau, Nemecko, merací rozsah 20 Ω – 10 MΩ, chyba pri hodnotách kΩ <0,5 %), ktorý pracoval v paralelnom režime so striedavou frekvenciou 120 Hz.

V tomto a nasledujúcich experimentoch boli skúmané účinky 1 % HA-sCer (6 kgmol⁻¹; DS = 10 ± 2 %) v PBS; 0,01 % HA-sCer (6 kgmol⁻¹; DS = 10 ± 2 %) v PBS; 1 % HA (6 kgmol⁻¹) v PBS; 0,01 % HA (6 kgmol⁻¹) v PBS a 1 % Cer v zmesi PG/EtOH (7:3, v/v) na permeabilitu kože *in vitro* pomocou Franzových difúzných ciel. V nasledujúcich experimentoch bolo používané PBS s prídavkom 0,001 % gentamicínu a koža do experimentov bola pripravená nasledujúcim spôsobom. Zamrazená ľudská koža (odobraná od donora v súlade s Helsinskou deklaráciou; schválenie etickou komisiou 3/11/2022) bola pomaly rozmrazená a dermatomovaná na hrúbku približne 400 µm. Následne boli skontrolované možné poškodenia a koža bola rozrezaná na štvorce o ploche približne 2 cm². Kúsky kože boli vložené medzi dva teflónové držiaky s priepustnou plochou 1 cm² a utesené polotuhým silikónom. Kožné vzorky v držiakoch boli vložené do Franzových ciel tak, aby dermálna časť kože bola obrátená smerom dole a akceptorové časti Franzovej cely boli naplnené PBS.

Najskôr bolo na povrch kože nanosené 0,5 ml PBS. Po 20 min bola zaznamenaná EI pomocou dvoch elektród z nehrdzavejúcej ocele ponorených do PBS donorovej a akceptorovej časti Franzovej cely. PBS bolo po meraní odstránené vatovým tampónom a povrch kože bol po každom meraní EI osušený [99–101].

3.24 Transepidermálna strata vody

Reverzibilita účinkov skúmaných vzoriek na TEWL bola meraná pomocou sondy AquaFlux™ (Biox systems Ltd., Londýn, Veľká Británia). Horná časť Franzovej cely bola odstránená a sonda prístroja bola tesne umiestnená na teflónový držiak. Merania boli uskutočnené pri teplote vzduchu 21–25 °C a relatívnej vlhkosti vzduchu 35–43 % [99–101].

3.25 *In vitro* penetračné experimenty s modelovou látkou teofylínom

Presný objem akceptorovej časti každej cely bol zmeraný ($8 \pm 0,1$ ml). Príprava kože bola metodicky zhodná s predchádzajúcim experimentom. Zmontované Franzove cely boli ekvilibrované 1 h pri 32 °C a integrita kože bola overená pomocou elektrickej impedancie. Následne boli na kožu nanesené vzorky HA alebo HA-sCer alebo Cer, ktoré boli po 12 h opatrne odstránené. Následne bola na kožu nanesená 5 % suspenzia TH v PBS (100 µl). V časoch 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h bolo odobrané 300 µl akceptorovej fáze a boli nahradené rovnakým objemom čerstvého PBS [99,101–103].

3.26 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Koncentrácia TH vo všetkých vzorkách bola stanovená pomocou prístroja Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), ktorý pozostával z čerpadiel LC-20AD s degasserom DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, tepelného boxu CTO-20AC, diode array detektoru SPD-M20A, komunikačného modulu CBM-20A a softvéru Labsolutions LCMS Ver.5.109 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Vzorky akceptorových fáz boli analyzované na kolóne LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, Merck, Darmstadt, Nemecko) pri 35 °C za použitia mobilnej fázy pozostávajúcej z 40 % metanolu v 0,1 M NaH₂PO₄ (v/v) pri prietoku 1,2 mlmin⁻¹ a detekcii pri 272 nm. Kalibračná krivka bola lineárna v rozsahu 0,5–100 µgml⁻¹ ($r^2 \geq 0,9999$, $p < 0,001$) [99,101,103].

3.27 Infračervená spektroskopia povrchu kože

Účinky skúmaných zlúčenín na lipidy a proteíny kožnej bariéry boli skúmané na ľudskej koži pomocou metódy FTIR. Hydratované dermatomované kúsky ľudskej kože o hrúbke 400 µm boli narezané na štvorce s plochou 2 cm² a umiestnené do teflónových držiakov s odkrytou plochou o veľkosti 1 cm². Príprava vzoriek bola metodicky zhodná s metodikou penetračného experimentu. FTIR spektrá boli zaznamenané na infračervenom

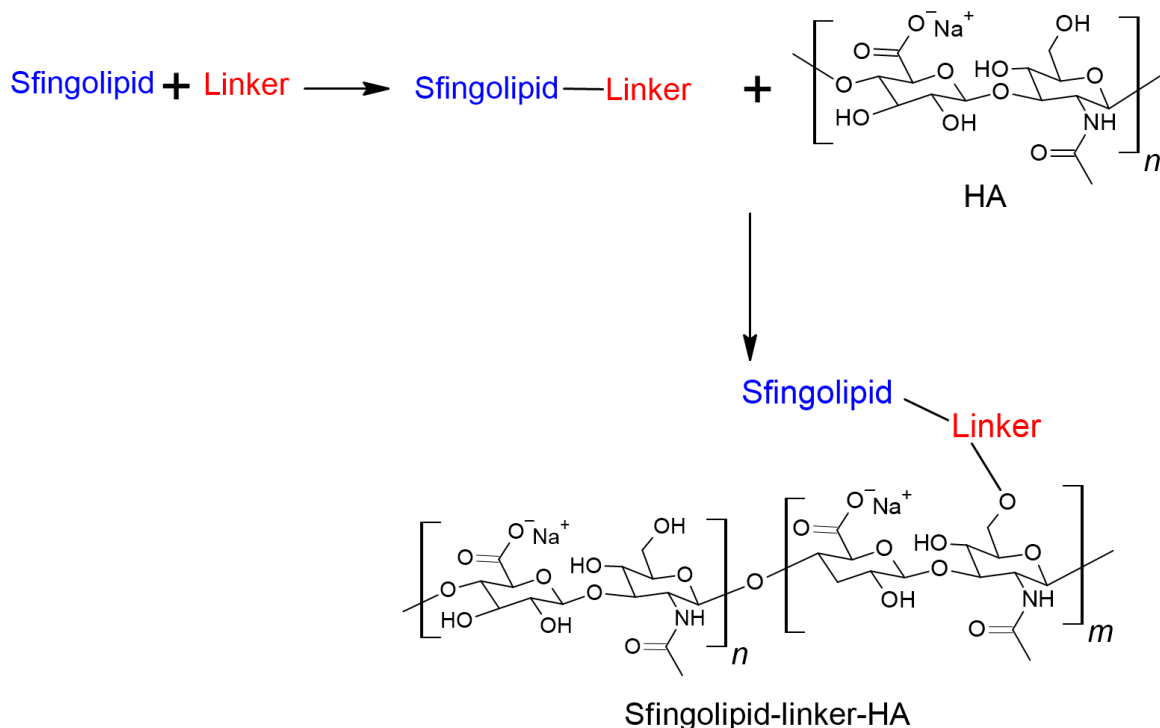
spektrometri Nicolet 6700 FT-FTIR (Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) vybavenom kryštálom ZnSe so zoslabeným celkovým odrazom MIRacle. Spektrá boli vytvorené za pomoci 128 skenov zaznamenaných s rozlíšením 2 cm^{-1} . Najskôr bola koža premeraná v čase 0 h. Následne boli aplikované donorové faze HA alebo HA-sCer v PBS, Cer v PG/EtOH, 7:3 (v/v) alebo PG/EtOH, 7:3 (v/v). Po 12 h inkubácie pri teplote 32 °C boli donorové faze opatrne odstránené a koža bola zmeraná v časoch 14, 24 a 36 h po aplikácii donorových fází. Zaznamenané spektrá, za súčasného stanovenia maximálnych absorpčných pásov, boli spracované pomocou softvéru OMNIC (Thermo scientific, Madison, Wisconsin, USA). Dekonvolúcie boli vykonané v softvéri OriginPro 2021b (Irvine, Kalifornia, USA). Dekonvoluované boli absorpčné pásy vibrácie „Amid I“ v rozmedzí $1730\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$. Pre dekonvolúciu boli použité nástroje Peak Analyzer s funkciou na úpravu základnej línie ExpDec1. Na odhalenie skrytých pásov bola použitá 2. derivácia s funkciou Smoothing (s metódou FFT filter a tzv. cut-off frekvenciou v rozmedzí 0,05 – 0,15). Plochy dekonvoluovaných pásov boli dané do pomeru so súčtom všetkých plôch dekonvoluovaných pásov vibrácie „Amid I“ a boli vyjadrené v %.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Syntéza a charakterizácia konjugátov sfingolipidov a hyaluronanu

HA je hydrofilný polysacharid, ktorý je značne nekompatibilný s vo vode nerozpustnými sfingolipidmi ako sú Cer a voľná sfingoidná báza P. Pre úspešnú modifikáciu HA je však nutné sa molekulou sfingolipidu „priestorovo priblížiť“ molekule polysacharidu. Bez predchádzajúcej modifikácie sfingolipidu tzv. linkerom teda nie je možné jeho priame naviazanie na HA [59,104].

V tejto práci boli na modifikáciu sfingolipidov zvolené ako linkery kyseliny jantárovej [105] alebo maleínovej [106], ktoré vstupovali do reakcií vo forme komerčne dostupných cyklických anhydridov. Vzniknuté intermediáty (sfingolipid-linker) obsahovali objemnejšiu polárnu hlavu zakončenú karboxylovou skupinou, ktorá umožnila rozpustenie uvedených látok vo vode v prítomnosti kosolventu. Schému prípravy zobrazuje **Obrázok 7**.

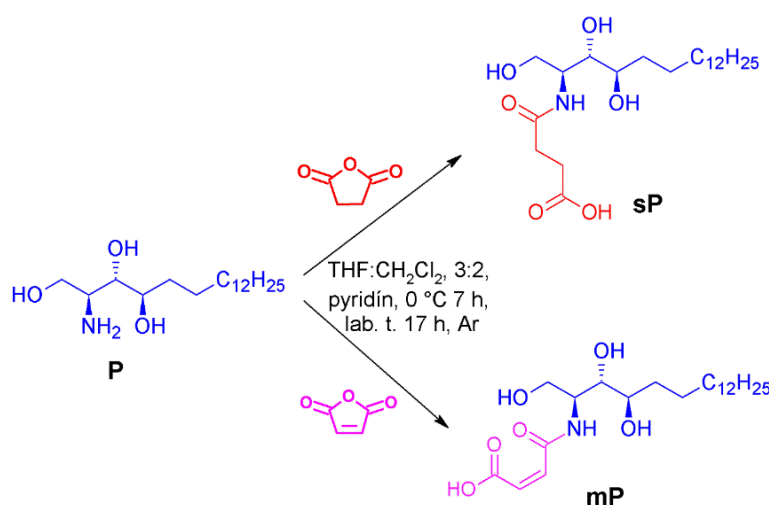


Obrázok 7. Obecná schéma prípravy spojenia sfingolipidu a kyseliny hyalurónovej (HA) pomocou tzv. linkeru (sfingolipid-linker-HA).

4.1.1 Príprava konjugátov fytosfingozínu s hyaluronanom

4.1.1.1 Príprava linker-fytosfingozínov

Voľná sfingoidná báza P obsahuje sekundárnu aminoskupinu, ktorú možno pomerne jednoducho a efektívne modifikovať pomocou cyklických anhydridov sukcinanhydridu a maleínanhydridu (**Obrázok 8**). V prípade látky P s naviazanou kyselinou maleínovou (*N*-maleinylfytosfingozínu; mP) bola dokonca v literatúre popísaná inhibícia signalizačnej dráhy NF- κ B. V porovnaní s voľnou bázou a samotnou kyselinou maleínovou vykazovala látka mP lepšie protizápalové vlastnosti [106].



Obrázok 8. Schéma prípravy *N*-sukcinylfytosfingozínu (sP) a *N*-maleinylfytosfingozínu (mP). Do reakcie vstupuje voľná sfingoidná báza fytosfingozín (P; modrá farba) a anhydrid kyseliny jantárovej (červená farba) alebo maleínovej (fialová farba); THF, tetrahydrofurán; Ar, argónová atmosféra.

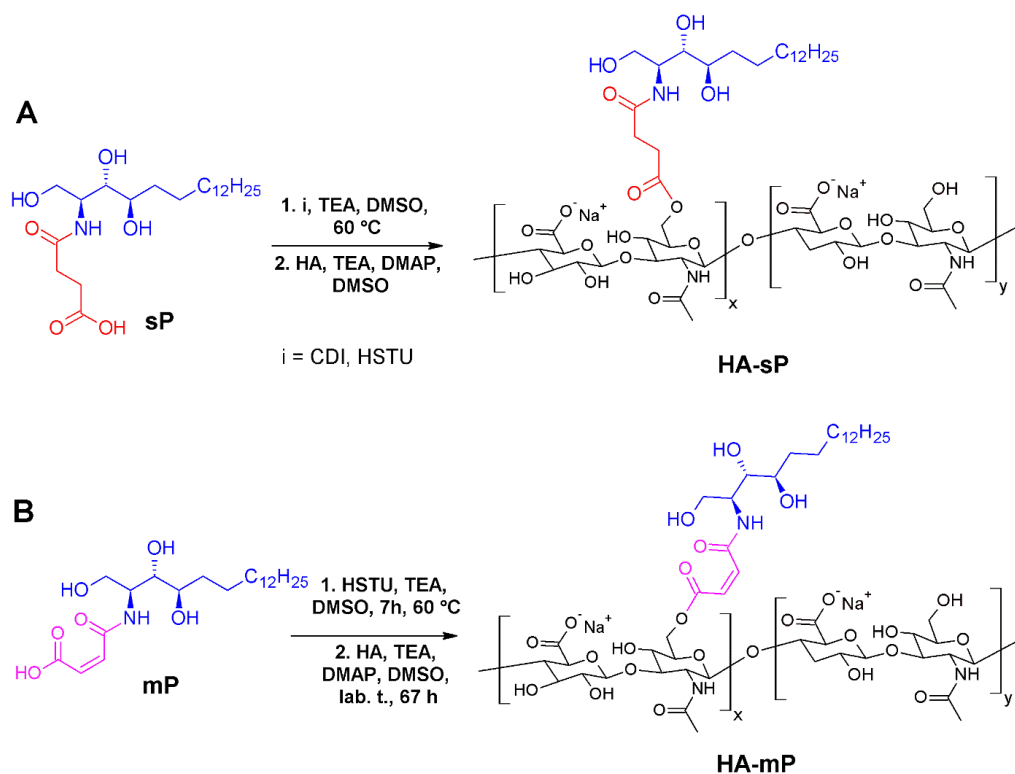
Ako prvá bola skúmaná možnosť viazania linkera bez prítomnosti organickej zásady, no pokusy neboli úspešné. Preto príprava prebiehala za pomoci vybraných zásad, a to TEA a pyridínu [107,108]. TEA je relatívne silná báza a jej použitie viedlo k nežiadúcim viacnásobne modifikovaným produktom (>40 % zastúpenie vedľajšieho esterového produktu), zatiaľ čo menej bázičkový pyridín, v katalytickom množstve (0,2 ekv.) znížil množstvo esterovo viazaného linkera. Za reakčnú teplotu bolo zvolených 0 °C v priebehu prvých 7 h za účelom termodynamickej kontroly [109]. Štruktúrna analýza (NMR a FTIR) získaných látok *N*-sukcinylfytosfingozínu (sP) a mP je znázornená v **Prílohe (Obrázky P1 až P4)**. Vzhľadom k relatívne veľkej reaktivite primárnej hydroxylovej skupiny P sa nepodarilo úplne zamedziť tvorbe esteru; v prípade látky sP bol získaný vedľajší esterový produkt v zastúpení 15 % a v prípade mP v zastúpení 10 %. Esterová väzba

produktu bola identifikovaná prostredníctvom NMR, kde dochádzalo k posunu diastereotopických protónov na C₁ sfingoidnej báze a rozdielnym chemickým posunom amidového protónu.

4.1.1.2 *Príprava konjugátov hyaluronanu s linker-fytosfingoziénom*

Konjugáty HA s linker-fytosfingoziénom boli pripravené naviazaním sP (konjugát *N*-sukcinylfytosfingoziínu s hyaluronanom; HA-sP) alebo mP (konjugát *N*-maleinylfytosfingoziínu s hyaluronanom; HA-mP) na kyslú formu HA. Prvým krokom tejto prípravy je aktivácia voľnej karboxylovej skupiny linkera jedným ekvivalentom aktivačného činidla v prítomnosti TEA v DMSO. V literatúre bolo pri príprave hydrofobizovanej HA popísaných niekoľko aktivačných činidiel, ktoré boli úspešné [53,55,61,110]. V tejto práci boli na viazanie sP a mP testované ako aktivačné činidlá BC, DMTMM, CDI a HSTU (**Príloha, Tabuľka P1**). Modifikácia HA pomocou sP s použitím BC nebola úspešná. Z aktivačnej kinetiky pomocou ¹H NMR bolo zistené, že dochádzalo k naviazaniu benzoylového substituentu na primárnu hydroxy skupinu látky sP namiesto aktivácie karboxylovej skupiny (**Príloha, Obrázok P5**). Z toho dôvodu aktivácia látky mP už nebola ďalej testovaná. Použitie aktivačného činidla DMTMM v základných podmienkach tiež nebolo úspešné, pretože DMTMM si vyžaduje mierne kyslé podmienky, v ktorých ale sP nie je dobre rozpustný [111].

V príprave konjugátov HA s aktivovanými sfingoidnými bázami bolo využité činidlo CDI (**Obrázok 9**), ktoré už v minulosti bolo použité pri modifikácii HA [53,55,112]. CDI je látka citlivá na vlhkosť [113], a preto modifikácie HA prebiehajú v bezvodom DMSO po prevedení HA na kyslú formu. Pri laboratórnej teplote bol v reakcii sP a kyslej formy HA (15 kgmol⁻¹) za prítomnosti CDI získaný konjugát HA-sP s hodnotou DS = 1 %, pri čom zvýšením aktivačnej teploty na 60 °C sa hodnota DS takmer zdvojnásobila. Najvyššie hodnoty DS však boli pozorované pri použití aktivačného činidla HSTU. Po aktivácii sP pomocou HSTU bola dosiahnutá hodnota DS konjugátu až 3,1 %. Naproti tomu pri použití rovnakých podmienok na aktiváciu mP bola táto hodnota iba 1,4 %; rozdiel sa dá pravdepodobne vysvetliť prítomnosťou dvojitej väzby maleinátového linkera, ktorá ovplyvňuje hodnoty pK_a a tým môže ovplyvniť aj reaktivitu.



Obrázok 9. Naviazanie linker-fytosfingozínu na hyaluronan (HA); panel A predstavuje naviazanie *N*-sukcinylfytosfingozínu (sP; modro-červená farba) a panel B naviazanie *N*-maleinylfytosfingozínu (mP; modro-fialová farba); CDI, karbonyldiimidazol; HSTU, *N,N,N',N'*-tetrametyl-*O*-(*N*-sukcinimidyl)urónium-hexafluorofosfát; TEA, trietylamín; DMAP, 4-dimetylamínopyridín, DMSO, dimetylsulfoxid.

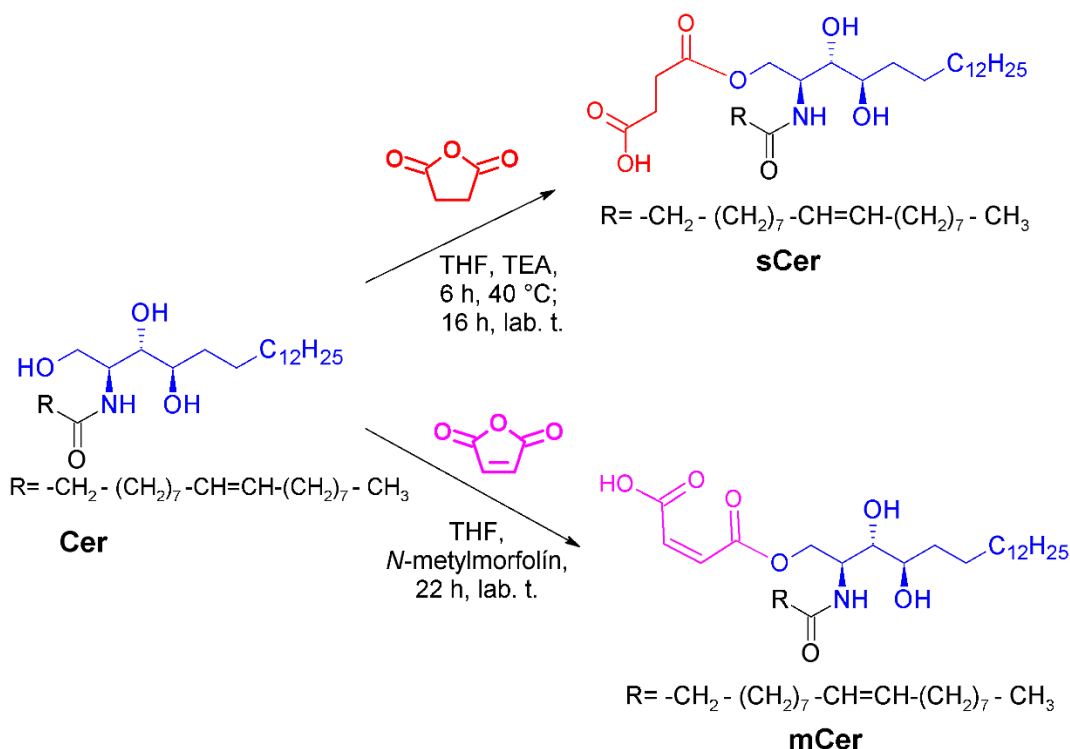
Na základe analýzy ^1H NMR spektra, v ktorom boli prítomné protóny metylových a metylénových skupín zodpovedajúcej látke sP, bola potvrdená modifikácia HA. Toto ďalej podporila aj prítomnosť protónov sukcinátového linkera a zložitejšia DOSY NMR analýza. Konjugát HA-sP, ktorého kritická agregačná koncentrácia bola $20 \mu\text{gml}^{-1}$, má záznamy zo štruktúrnej analýzy (^1H NMR, DOSY NMR a FTIR) uvedené v **Prílohe (Obrázky P6 až P8)**.

4.1.2 Príprava konjugátov ceramidu s hyaluronanom

4.1.2.1 Príprava linker-ceramidov

Podobne ako v prípade voľnej sfingoidnej báze P, tak aj Cer bol modifikovaný sukcinanhydridom a maleinánhydridom (**Obrázok 10**). Na rozdiel od P, v Cer nie je voľná aminoskupina, ale amidová skupina. Modifikácia teda prebieha len na hydroxylových skupinách Cer. V priebehu optimalizácie prípravy látky linker-Cer (látky sCer a mCer) bola vyvinutá snaha získať jeden produkt acylovaný selektívne na primárnej hydroxylovej

skupine, ale selektivita nebola dosiahnutá a výsledný produkt bol vždy v rôznom pomere zmesou polohových izomérov.



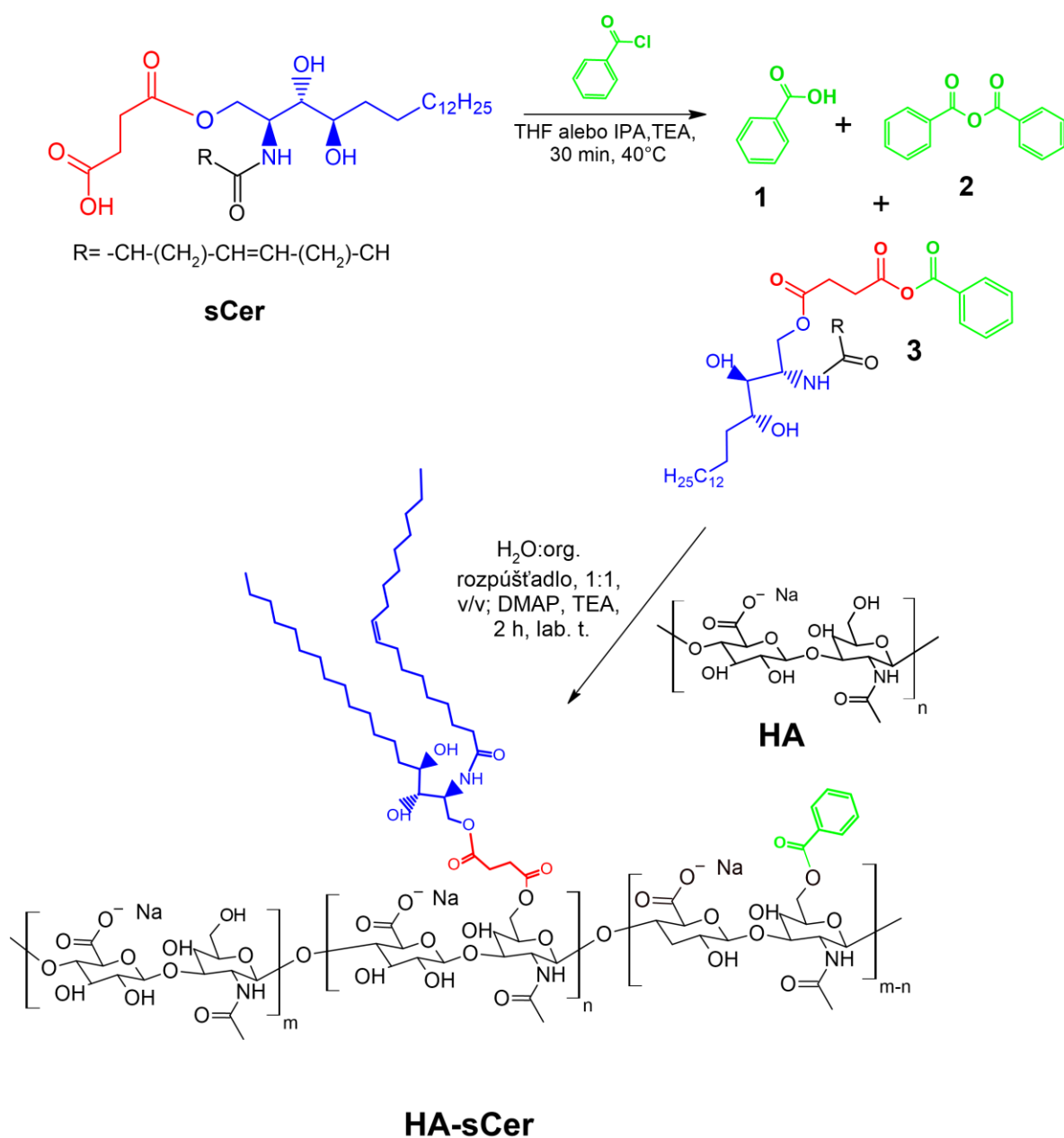
Obrázok 10. Schéma prípravy sukcinylceramidu (sCer) a maleinylceramidu (mCer). Do reakcie vstupuje ceramid s acylom kyseliny olejovej (Cer; modro-čierna farba) a anhydrid kyseliny jantárovej (červená farba) alebo maleínovej (fialová farba); TEA, trietylamin; THF, tetrahydrofurán.

Selektivita naviazania sukcinátového linkera bola testovaná pomocou báz pyridínu a TEA. Najvyššia regioselektivita modifikácie primárnej hydroxylovej skupiny (78 %) bola dosiahnutá použitím TEA počas 6 h pri 40 °C a následných 16 h pri laboratórnej teplote. Výsledky v syntéze mCer pri použití rovnakých podmienok však neboli reprodukovateľné. Preto bol v tomto prípade použitý *N*-metylmorfolín, s ktorým boli získané konzistentnejšie závery. ¹H NMR analýzy a FTIR spektrá látok sCer a mCer sú uvedené v **Prílohe (Obrázky P9, P10, P11 a P17D)**.

4.1.2.2 Príprava konjugátov sukcinylceramidu a maleinylceramidu s hyaluronanom s využitím zmiešaných anhydridov

Syntéza HA-sCer a konjugátu maleinylceramidu s HA (HA-mCer) pomocou zmiešaných anhydridov bola založená na aktivácii karboxylovej skupiny kyseliny jantárovej alebo maleínovej (sCer alebo mCer) s aktivačným činidlom BC za vzniku zmiešaného anhydridu, ktorý priamo bez predchádzajúceho čistenia vstupuje do reakcie s HA (**Obrázok 11**).

Z použitých intermediátov sCer a mCer, poskytla želaný produkt len reakcia s látkou sCer. Dôvodom môže byť rozdiel v hodnotách pKa; v prípade látky sCer je táto hodnota vyššia v porovnaní s intermediátom mCer (predikcie: 3,73 pre sCer a 2,45 pre mCer) [114]. Látka mCer je 16-krát silnejšia kyselina ako kyselina benzoová (pKa = 4,08). Keďže reaktívny intermediát s DMAP tvorí preferenčne slabšia kyselina, je preto látka sCer v porovnaní s látkou mCer uprednostňovaná [115,116]. Netreba tiež opomíňať fakt, že sukcinátový linker je vďaka flexibilitě svojich väzieb priestorovo prístupnejší, čo môže byť výhoda v porovnaní s maleinátovým linkerom, ktorý má rigidnú dvojitú väzbu.



Obrázok 11. Schéma prípravy konjugátu hyaluronanu (HA) so sukcinylceramidom (sCer; červená a modrá farba) pomocou metódy zmiešaných anhydridov s využitím benzoyl-chloridu (zelená farba). Príprava prebieha v dvoch krokoch. Prvým krokom je aktivačná reakcia, ktorej produktom sú benzoová kyselina (**1**), anhydrid kyseliny benzoovej (**2**) a zmiešaný anhydrid sCer a benzoovej kyseliny (**3**). V nasledujúcej acylácii tieto produkty reagujú s HA za vzniku konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer); THF, tetrahydrofufán; IPA, izopropanol; TEA, trietylamín; DMAP, 4-dimetylamínopyridín.

Ako sekundárne produkty aktivácie boli detegované kyselina benzoová a anhydrid kyseliny benzoovej. Kinetika reakcie bola monitorovaná pomocou ^1H NMR pri rôznych teplotách. Zmiešaný anhydrid vznikol v priebehu prvých 15–30 minút, pričom najvyššia

konverzia (približne 99 %) bola dosiahnutá pri 40 °C. Pri teplote 60 °C nedošlo k úplnej konverzii, a súčasne rozklad anhydridu prebiehal rýchlejšie. Kinetiku aktivačnej reakcie znázorňuje **Obrázok P12** a **Tabuľka P2** v **Prílohe**. Charakterizácia (FTIR spektrum a DOSY NMR) izolovaného zmiešaného anhydridu sú uvedené v **Prílohe (Obrázky P13 a P14)**.

Konjugát HA-mCer bol pripravený podobným spôsobom ako konjugáty HA-mP a HA-sP, tzn. pomocou aktivačného činidla HSTU za použitia kyslej formy HA. Avšak, výsledné DS bolo nízke (< 3 %).

Nakoľko grafting sCer na HA s aktivačným činidlom BC bol mimoriadne úspešný (DS až 14,2 %), bolo upustené od vývoja metód na prípravu konjugátov HA s mCer a fytosfingozínom. BC je v chémii relatívne bežne používaná jednoduchá zlúčenina s nízkou cenou, ktorá kontrastuje s nákladnými aktivačnými činidlami (napr. CDI a HSTU), ktoré sú viac citlivé na vlhkosť. Pri použití uvedených činidiel je nutné použiť drahé bezvodé DMSO a je nutné prekonvertovať sodnú soľ HA na jej kyslú formu, čo nielen znižuje jej Mw, ale kyslá forma HA má aj nižšiu stabilitu ako jej sodná soľ [117].

Pri esterifikácii hydroxylových skupín HA (**Obrázok 11**) bol mimo iné skúmaný vplyv koncentrácie HA, času a polarita rozpúšťadla na výsledok reakcie. Experimentálne bolo zistené, že najúčinnjším kosolventom na esterifikáciu HA je THF (**Tabuľka P3** v **Prílohe**) z dôvodu vyššej konverzie. Kľúčovým faktorom úspešnosti modifikácie bola však koncentrácia HA. Čím nižšia Mw HA bola použitá, tým bolo možné posunúť koncentráciu HA k vyšším hodnotám. Pre 6 kgmol^{-1} HA bolo možné použiť koncentrovanejšie roztoky (približne 4 %). S narastajúcou Mw vstupnej HA optimálna koncentrácia klesá až na 1 %. Tento jav sa dá odôvodniť odlišným bodom prekrytia reťazcov v roztoku pri rôznych Mw HA (angl. *coil overlap point*). Bod prekrytia reťazcov je definovaný ako bod v ktorom reťazce HA vyplnia roztok [118]. Tento bod ďalej ovplyvňuje rovnováhu a rýchlosť reakcií uvedených v **Tabuľke P3** v **Prílohe**. Kinetika acylácie pomocou zmiešaných anhydridov je preto pravdepodobne riadená možnosťou difúzie objemného aktivovaného sCer v reakčnej zmesi, tzv. *crowding efektom*. S obmedzenou možnosťou jeho difúzie dochádza hydrolyze anhydridu a k modifikácii HA dochádza len v menšej miere alebo vôbec (**Tabuľka P3** v **Prílohe**). V prípade príliš nízkej koncentrácie HA, anhydrid vo zvýšenej miere hydrolyzuje ešte predtým ako príde do kontaktu hydroxylovou skupinou HA. Opačne tomu je v prípade esterifikácie HA kyselinou laurovou, ktorá preferuje koncentrovanejšie

roztoky [119]. Štruktúrálna analýza HA-sCer (^1H , HSQC a DOSY NMR; a hmotnostná spektrometria) je podrobnejšie rozobraná v **Prílohe (Obrázky P15 až P19; a Tabuľka P3)**.

4.1.3 Agregáčné chovanie konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom

Táto podkapitola je zameraná na skúmanie vplyvu kosolventu (pri acylácii HA), Mw a DS na výslednú agregáciu reťazcov HA-sCer do polymérnych nanočastíc (**Tabuľka 3**). Bolo zistené, že veľkosť týchto častíc sa pohybovala v rozmedzí približne od 30 do 500 nm. Konjugáty HA-sCer (6 kgmol^{-1}) mali relatívne úzku distribúciu veľkosti. Bola u nich detegovaná jedna populácia častíc s veľkosťou do 40 nm a indexom polydisperzity (PDI) v hodnote 0,2–0,3. V prípade konjugátov HA-sCer (15 kgmol^{-1}) bola pozorovaná bimodálna distribúcia ich veľkosti (30-70 nm a približne 200-400 nm), čo sa prejavilo aj vo vyšších hodnotách PDI (**Tabuľka 3**).

Hodnoty kritickej agregáčnej koncentrácie (CAC) konjugátov HA-sCer zobrazuje **Tabuľka 3**. Uvedené údaje naznačujú, že hodnota CAC je veľmi citlivá na stupeň substitúcie a výrazne klesá s nárastom jeho hodnoty, čo bolo už minulosti pozorované v prípade hydrofobizovaného škrobu a pullulanu [120]. Konjugát HA-sCer s najvyšším DS a najnižšou Mw (6 kgmol^{-1}) súčasne vykazoval najnižšiu hodnotu CAC. Tento výsledok potvrdzuje, že hydrofobicita lipofilného jadra sa zvyšuje s množstvom hydrofóbných substituentov na reťazci polysacharidu [122].

Vyššie uvedené závery boli potvrdené štúdiom väzbovej konštanty pyrénu K_B (**Obrázok P20 v Prílohe; a Tabuľka 3**), čo je senzitivnejší parameter na štúdium hydrofóbného jadra nanočastice. V súlade s tým hodnoty K_B ukázali, že konjugáty HA-sCer (6 kgmol^{-1} , DS = 14,2 %) vykazovali najvyššiu väzbovosť pyrénu ($K_B = 6,31 \text{ lg}^{-1}$) (**Tabuľka 3, vstup 3**). Pre porovnanie, hodnoty K_B uvádzané pre hydrofobizované škrobové nanočastice modifikované C_3 a C_6 acylovými reťazcami sa pohybovali od 0,1 do $0,5 \text{ lg}^{-1}$ [121]. Podobne tiež publikované údaje pre hydrofobizovaný dextrans ukázajú hodnoty K_B od 0,1 do 20 lg^{-1} v závislosti od DS a dĺžky acylového reťazca [122].

Molekula HA v závislosti od reakčného média mení konformáciu, čo môže mať za následok rôzne acylovaný produkt, ktorý aj s rovnakým stupňom substitúcie nutne nemusí mať zhodné vlastnosti [123]. Preto bol skúmaný vplyv kosolventu pri syntéze (THF, IPA) na agregáčné vlastnosti konjugátov. V prípade HA-sCer (6 kgmol^{-1} ; DS = 8,3-9,7 %) boli

rozdiely zanedbateľné (**Tabuľka 3, vstupy 1 a 6**). V prípade HA-sCer (15 kgmol⁻¹) je však už možné pozorovať výrazne vyššiu CAC pri derivátoch pripravených v rozpúšťadle obsahujúcom IPA, čo značí horšiu agregáciu reťazcov polyméru (**Tabuľka 3, vstupy 5 a 7**).

Na porozumenie vplyvu stupňa substitúcie na hydrofobicitu jadra bol použitý KURK ako model hydrofóbnej aktívnej látky. Jeho VK narastala spolu s DS a bola najvyššia v prípade konjugátov pripravených s kosolventom THF (**Tabuľka 3, vstupy 2 a 3**). HA-sCer (6 kgmol⁻¹) pripravené v systéme THF/voda vykazovali z pomedzi testovaných konjugátov najvhodnejšie agregáčnne vlastnosti. Je u nich preto očakávaná lepšia penetrácia do kože a potenciálne vyšší benefit pri topickej aplikácii na kožu.

Tabuľka 3. Vplyv stupňa substitúcie (DS), molekulovej hmotnosti (Mw) a kosolventu (tetrahydrofurán; THF alebo izopropanol; IPA) použitých pri syntéze konjugátov sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer), ktoré boli použité na stanovenie väzbovej kapacity (VK) a enkapsulačnej efektivity (EE) kurkumínu, väzbovej konštanty pyrénu (K_b), kritickej agregáčnej koncentrácie (CAC), hydrodynamického priemeru (HP) a indexu polydisperzity (PDI); *bimodálne rozdelenie veľkosti častíc.

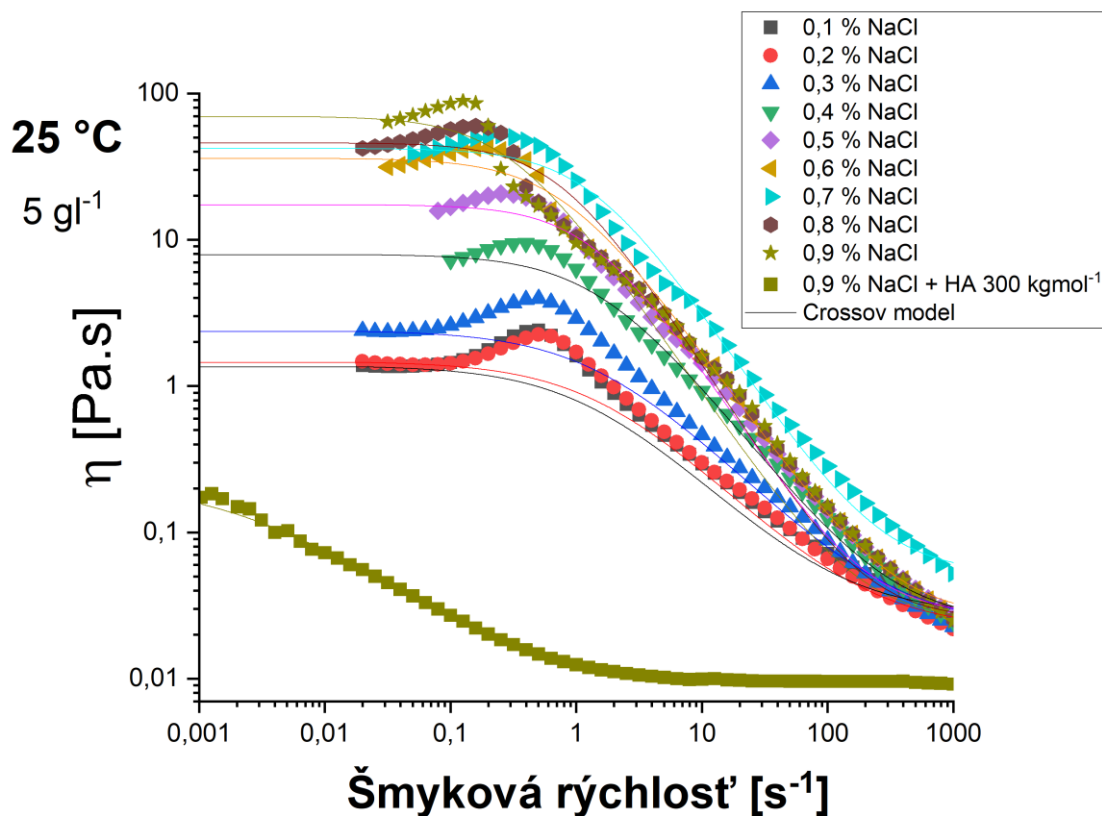
Vstup	DS	kosolvent	Mw [kgmol ⁻¹]	VK [%]	EE [%]	K_b [lg ⁻¹]	CAC [μgml ⁻¹]	HP [nm]	PDI
1	8,3±0,4	THF	6	0,76±0,16	38,0±4	2,42	6,5 ± 1,5	27	0,32
2	12,2± 0,2	THF	6	0,99±0,18	49,5±10	5,21	2,4 ± 0,6	39	0,36
3	14,3± 0,2	THF	6	1,70±0,16	85,0±7	6,31	1,9 ± 0,2	38	0,30
4	3,2± 0,2	THF	15	0,76±0,43	38,0±7	0,78	12,5 ± 6	56; 473*	0,49
5	6,9± 0,1	THF	15	0,87±0,31	43,5±7	2,18	4,1 ± 0,6	34; 278*	0,54
6	9,7± 0,2	IPA	6	0,57±0,11	28,5±5	2,29	6,1 ± 0,5	31	0,28
7	6,2± 0,1	IPA	15	0,59±0,18	29,5±5	1,89	11,5 ± 0,8	64; 462*	0,53

4.1.4 Reologické chovanie konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom

Konjugáty HA-sCer (188–442 kgmol⁻¹) vykazovali takmer 6-násobné zvýšenie viskozity v porovnaní s východiskovou látkou HA (**Príloha, Obrázok P21A a P21B**). Tento jav je možné vysvetliť hydrofóbnymi interakciami, ktoré spôsobili nekovalentné sieťovanie reťazcov polyméru vedúce k odporu voči deformácii [124]. Ešte vyšší rast viskozity (z hodnoty 135 mPa·s na 916 mPa·s) bol pozorovaný v roztokoch NaCl (0,1 – 0,9 %, *m/m*), čo je možné vysvetliť zmenou elektrostatického prostredia [125,126].

Ďalej bol skúmaný vplyv koncentrácie NaCl na výslednú nulovú šmykovú viskozitu (**Obrázok P21C v Prílohe; a Obrázok 12**), pričom bola pozorovaná exponenciálna závislosť.

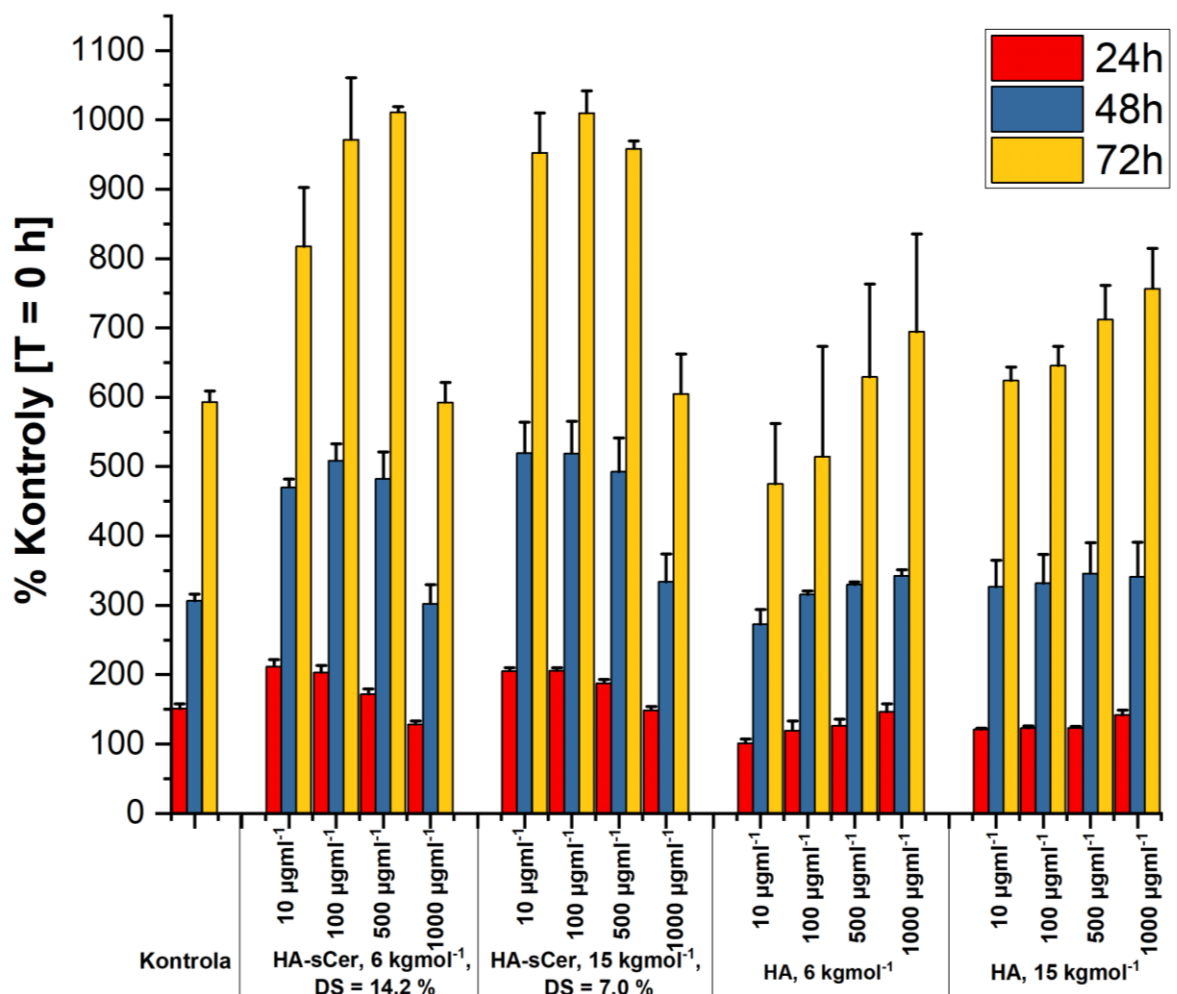
Nulová šmyková viskozita pri koncentrácii NaCl medzi 0,1 % a 0,9 % (*m/m*) sa zvýšila z 1,5 na 69,1 mPa·s, čo predstavuje 46-násobný nárast. V porovnaní s nemodifikovanou HA (300 kgmol^{-1}) sa šmykové stenšenie (angl. *shear-thinning*) začínalo pri vyšších hodnotách šmykovej rýchlosti, čo je možné pripísať hydrofóbnym modifikáciám [127]. Okrem toho, po prídavku NaCl bolo pozorované aj šmykové zahusťovanie (angl. *shear thickening*). V prípade hydrofobizovaných polymérov možno uvedené správanie pripísať rovnováhe medzi tvorbou prechodnej polymérnej siete indukovanej šmykovým napätím a agregáciou polymérnych klastrov [128,129]. Pri mechanickom namáhaní môžu hydrofóbne modifikácie podporovať tvorbu väčších agregátov alebo zhlukov makromolekúl HA. Tieto zhluky môžu navzájom interagovať a vytvárať hustejšie usporiadaný systém, ktorý spôsobuje odpor proti toku, čo spôsobuje vyššie zmienený *shear thickening*. Následný jav označovaný ako *shear thinning* možno pripísať rozpletaniu polymérnych reťazcov, ktoré je sprevádzané narušením hydrofóbných interakcií. V dôsledku toho hydrofobizovaná HA vykazuje pseudoplastické správanie [130,131].



Obrázok 12. Reologické chovanie a tokové krivky konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 188 kgmol^{-1} ; DS = 2,2 %) v roztokoch NaCl (0,1 % - 0,9 %, m/m) v porovnaní roztokom nemodifikovaného hyaluronanu (HA, 300 kgmol^{-1}) v 0,9 % (m/m). Stanovenia boli vykonané pri koncentrácii konjugátov 5 gl^{-1} a pri teplote $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.5 Cytotoxicita a protizápalové vlastnosti konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom

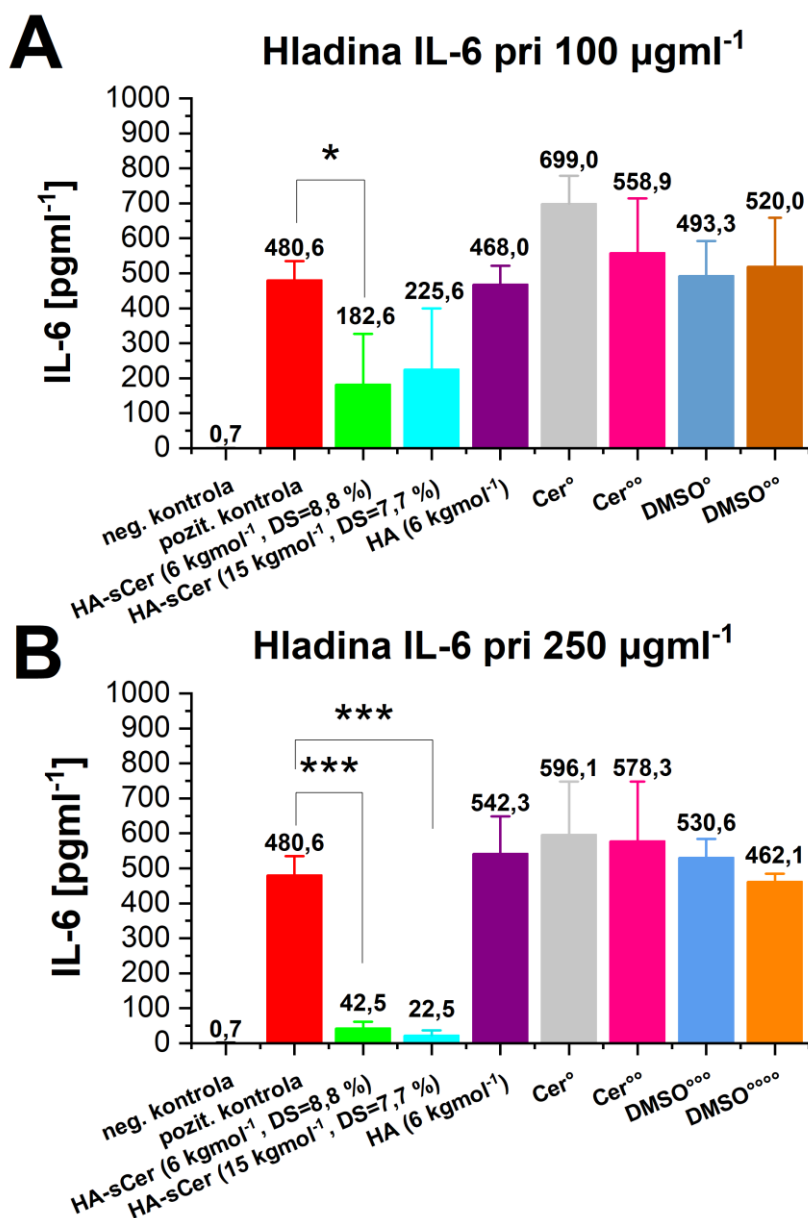
Jedna z dôležitých vlastností pripravených polymérnych nanočastíc je ich kompatibilita s biologickým materiálom vzhľadom k tomu, že by takéto látky mohli nájsť uplatnenie napr. v kozmetických prípravkoch [132]. Toto sa hodnotilo pomocou stanovenia viability buniek na fibroblastoch bunkovej línie NIH-3T3 po aplikácii polymérnych nanočastíc HA-sCer (6 a 15 kgmol^{-1}) a samotnej HA (6 a 15 kgmol^{-1}). Viabilita buniek (**Obrázok 13**) je v prípade HA-sCer, po 24 h kultivácii, porovnateľná s kontrolnými bunkami v koncentráciách 10 , 100 , 500 a $1000 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ a nenaznačuje akútnu cytotoxicitu [133]. Po 48 a 72 h od aplikácie však bol pozorovaný nárast viability, čo by mohlo byť vysvetlené stimuláciou bunkovej proliferácie a/alebo metabolizovaním testovaných látok. Tento efekt nebol pozorovaný v prípade samostatnej HA.



Obrazok 13. Relatívna viabilita fibroblastov NIH-3T3 kultivovaných s polymérnymi nanočasticami konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol⁻¹, DS = 14,2 % a 15 kgmol⁻¹ DS = 7,0 %) a nemodifikovaného hyaluronanu (HA; 6 a 15 kgmol⁻¹) v rozsahu koncentrácií 10 – 1000 µgml⁻¹ po 24, 48 a 72 h v porovnaní s viabilitou kontrolných buniek. Odchýlka merania je vyjadrená ako stredná chyba priemeru (SEM; n=3).

V literatúre boli popísané schopnosti sfingolipidov inhibovať produkciu zápalových markerov. Ako mechanizmus tohto javu bola považovaná ich aktivita na PPAR receptoroch umiestnených v jadre bunky, ktoré inhibujú signalizačnú dráhu NF-κB [21,22,106,134,135]. V tejto práci sa vychádzalo z hypotézy, že po naviazaní sfingolipidov na HA dôjde ešte k prehĺbeniu protizápalovej aktivity vďaka interakcii HA s povrchovým receptorom CD44 [94,136], ktorý indukuje pinocytózu, čím sa pripravené polymérne nanočastice (alebo ich fragmenty) dostanú vo zvýšenej miere do bunky. Potenciálna protizápalová aktivita nízkomolekulárnych polymérnych nanočastíc HA-sCer bola sledovaná meraním hladín (pgml⁻¹) prozápalového cytokínu IL-6 v makrofágoch

diferencovaných z THP-1 buniek po indukcii zápalu vyvolaným pomocou lipopolysacharidov (**Obrázok 14**). Samostatná HA (6 kgmol^{-1}) vykazovala zanedbateľný inhibičný účinok. Toto je v súlade s prácou You *et al.*, kde autori uvádzajú, že HA (10 kgmol^{-1} a 60 kgmol^{-1}) v koncentrácii 0,5 % (*m/m*) neznižuje expresiu IL-6 pri zápalovej reakcii indukovanej pomocou lipopolysacharidov a inhibičný efekt na produkciu IL-6 bol detegovaný až pri zvýšení koncentrácie na 2 % [137]. Najvýraznejší protizápalový účinok bol pozorovaný pri koncentrácii $250 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ v prípade polymérnych nanočastíc HA-sCer (15 kgmol^{-1} , DS = 7,7 %), ktoré inhibovali produkciu IL-6 až o 95,3 % (**Obrázok 14B**). Polymérne nanočastice HA-sCer (6 kgmol^{-1} , DS = 8,8 %) spôsobili pri rovnakej koncentrácii inhibíciu produkcie IL-6 o 91 %. Hypotéza, že pripravené polymérne nanočastice majú protizápalovú aktivitu bola potvrdená, avšak pre presné stanovenie mechanizmu tohto efektu by boli potrebné ďalšie pokročilé experimenty.

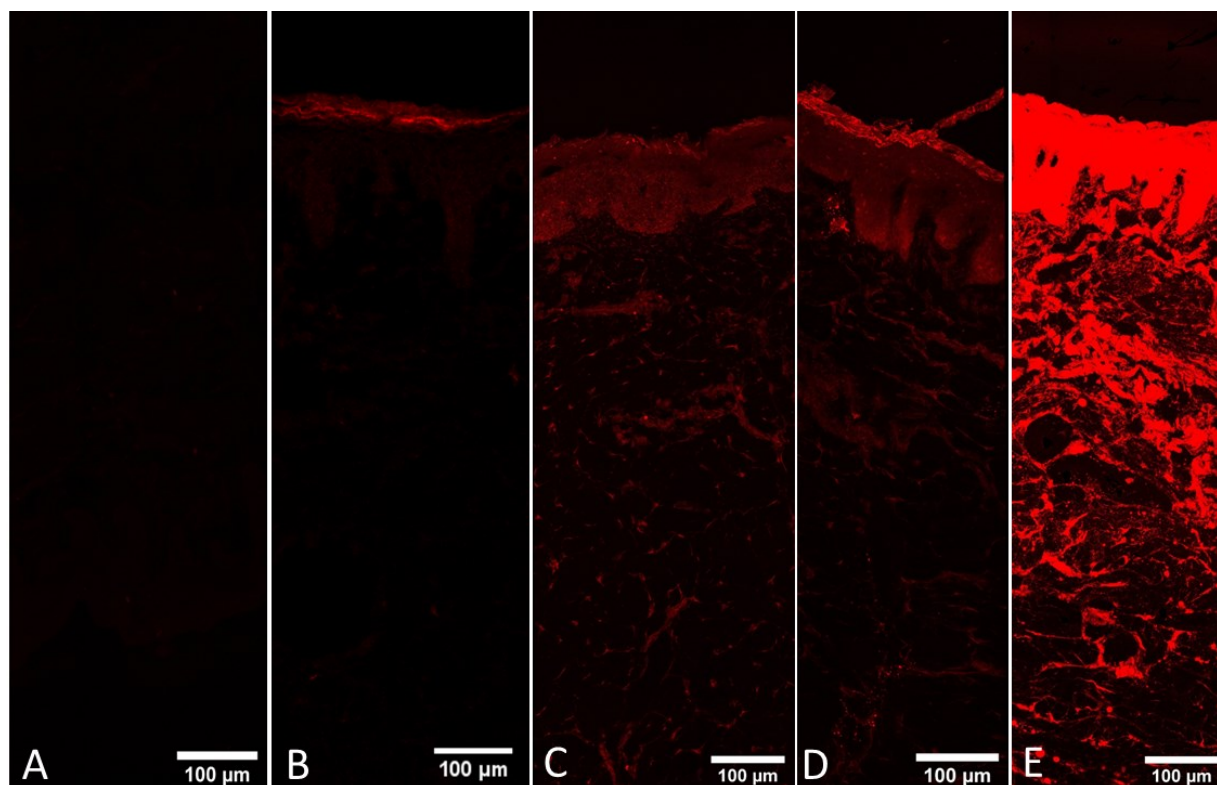


Obrázok 14. Inhibičná aktivita polymérnych nanočastíc sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer, 6 a 15 kgmol^{-1}) na produkciu cytokínu interleukínu 6 (IL-6) v porovnaní s voľným ceramidom (Cer) a hyaluronanom (HA, 6 kgmol^{-1}) s pozitívnou kontrolou (makrofágy koinkubované s lipopolysaccharidmi bez aplikovaných vzoriek) a negatívnou kontrolou (neovplyvnené makrofágy) pri koncentrácii. Panel A zobrazuje výsledky pre koncentráciu vzoriek 100 μgml^{-1} ; a panel B zobrazuje koncentráciu 250 μgml^{-1} . °koncentrácia voľného Cer, ktorá zodpovedá množstvu viazaného Cer v HA-sCer (6 kgmol^{-1} , DS = 8,8 %); °°koncentrácia voľného Cer, ktorá zodpovedá množstvu viazaného Cer v HA-sCer (15 kgmol^{-1} , DS = 7,7 %); °°°Dimetylsulfoxid (DMSO; kontrola), ktoré bolo použité na rozpustenie Cer v HA-sCer (6 kgmol^{-1} , DS = 8,8 %); °°°°DMSO (kontrola), ktoré bolo použité na rozpustenie Cer v HA-sCer (15 kgmol^{-1} , DS = 7,7 %); Odchýlka merania je vyjadrená ako smerodajná odchýlka (SD; n=3). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

4.2 Vplyv polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom na vlastnosti kožnej bariéry

4.2.1 Penetračné experimenty s konjugátmi sukcinylceramidu s hyaluronanom s enkapsulovanou nílskou červenou

Penetračné experimenty boli vykonané pre účely posúdenia potenciálu vytvorených polymérnych nanočastíc prenikat' do hlbších vrstiev kože. Nakoľko sa jedná o makromolekulu, bol očakávaný iba obmedzený prienik cez značne lipofilné SC [5,9,58]. Pre účely monitorovania prieniku do kože bola do polymérnych nanočastíc HA-sCer enkapsulovaná fluorescenčná značka nílska červená. Po aplikácii polymérnych nanočastíc na kožný povrch bola pozorovaná intenzita fluorescencie laterálneho rezu prasacej kože. V prípade podania samotného farbiva v PBS nedošlo k jeho penetrácii pod SC (**Obrázok 15B**), čo je v súlade s publikovanými prácami [56,57]. Intenzívna penetrácia až do *dermis* bola pozorovaná v prípade polymérnych nanočastíc HA-sCer (6 a 15 kgmol⁻¹). Z výsledkov tohto experimentu je možné vyvodit', že polymérne nanočastice HA-sCer s menšou Mw a vyšším DS vykazujú vyššiu intenzitu fluorescencie v hlbších vrstvách kože, čo koreluje s menšou veľkosťou ich častíc a hydrofobicitou ich jadra.

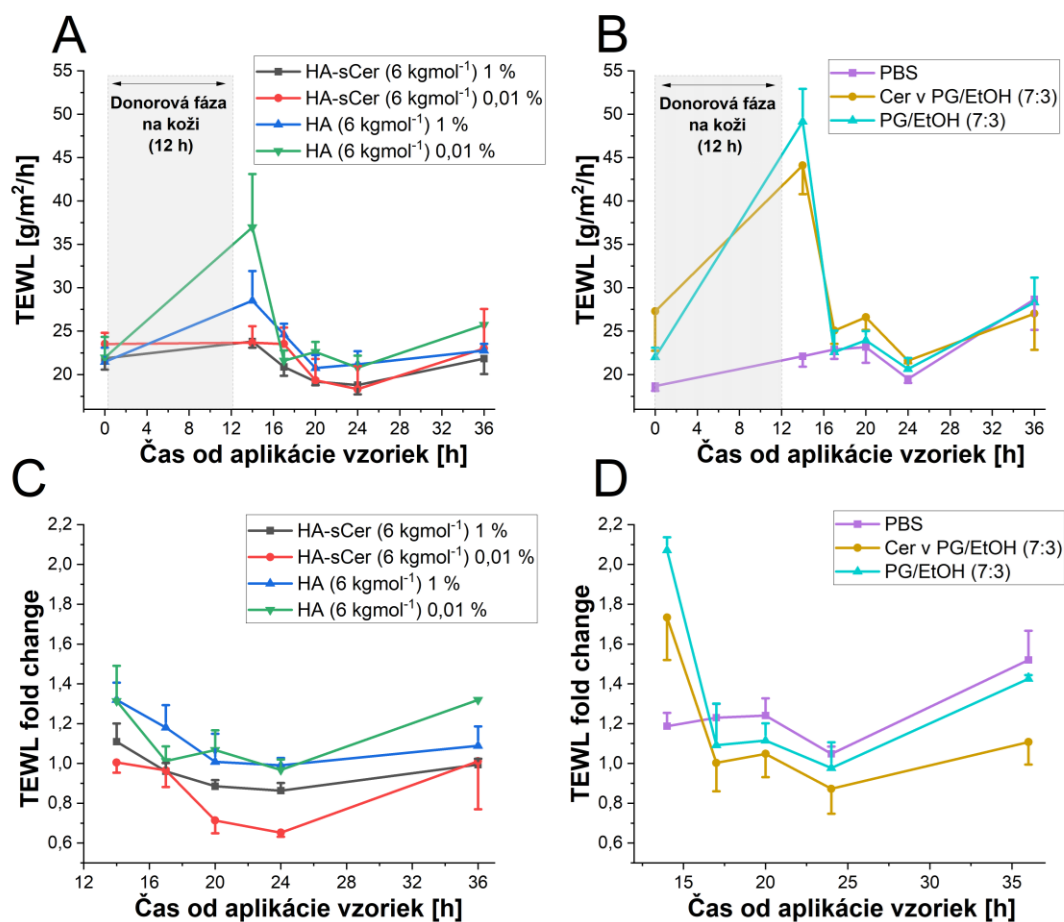


Obrázok 15. Laterálne snímky plnej kože bravčového ucha po 24 hodinách od aplikácie: panel A) PBS (pH = 7,4) ako negatívna kontrola; panel B) disperzia nílskej červenej v PBS; panel C) polymérne nanočastice konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 15 kgmol⁻¹; DS = 7,0 %) enkapsulované s nílskou červenou; panel D) polymérne nanočastice HA-sCer (6 kgmol⁻¹; DS = 8,2 %) enkapsulované s nílskou červenou; a panel E) polymérne nanočastice HA-sCer (6 kgmol⁻¹; DS = 14,2 %) enkapsulované s nílskou červenou.

4.2.2 Vplyv konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom na zmeny transepidermálnej straty vody a elektrickej impedancie

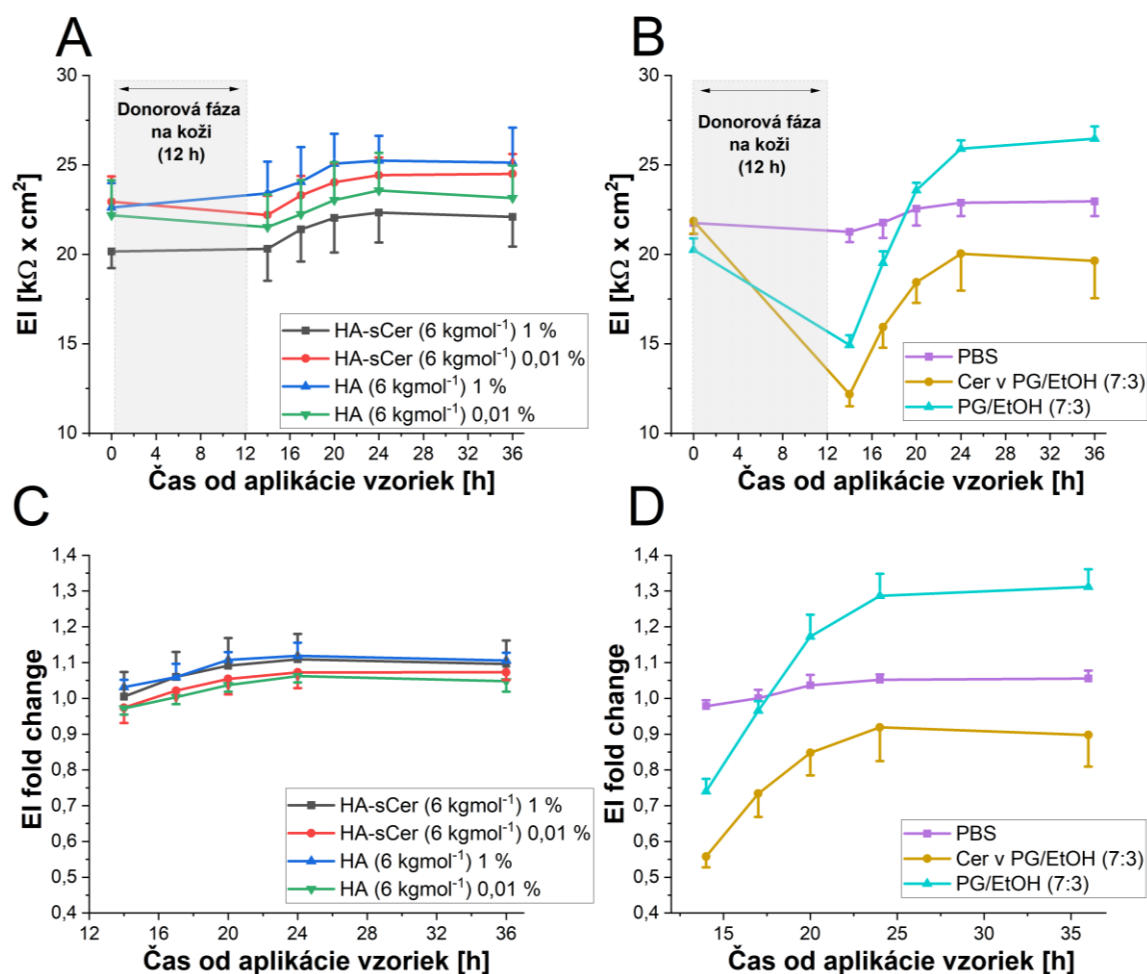
V minulosti bolo u HA a jej derivátov pozorované, že pôsobia ako enhancery transdermálnej permeácie [58,68,138,139]. Na zhodnotenie účinkov polymérnych nanočastíc HA-sCer na vlastnosti kožnej bariéry bola navrhnutá séria experimentov, ktorá bola zameraná na sledovanie parametrov, ako sú zmena TEWL a EI, priepustnosť modelovej látky teofylínu a FTIR [99,101,140,141].

Najvýraznejšie zmeny v TEWL bolo možné pozorovať v čase 14 h (**Obrázok 16**). K najväčšiemu zvýšeniu TEWL došlo po aplikácii vzoriek, ktoré obsahovali organické rozpúšťadlá, čo je v súlade s publikovanou literatúrou [5]. Zo vzoriek, ktoré obsahovali HA a jej polymérne nanočastice bolo najväčšie zvýšenie TEWL pozorované po aplikácii nemodifikovanej HA (6 kgmol⁻¹) v oboch koncentráciách. Po aplikácii polymérnych nanočastíc HA-sCer v koncentrácii 0,01 % bol pozorovaný pokles TEWL, avšak tieto rozdiely neboli štatisticky významné.



Obrázok 16. Panely A a B zobrazujú časový priebeh transepidermálnej straty vody (TEWL) izolovanej ľudskej kože po aplikácii donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol⁻¹; modrá a zelená farba) a polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol⁻¹; čierna a červená farba) v koncentrácii 0,01 % a 1 %, alebo PBS (pH = 7,4, fialová farba), alebo Cer v PG/EtOH (7:3, žltá farba) alebo PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba). Panely C a D zobrazujú hodnoty násobnej zmeny (angl. *fold change*) TEWL medzi daným časom a TEWL v čase pred aplikáciou donorových vzoriek. Odchýlka merania je vyjadrená ako SEM (n = 4). EtOH, etanol; PG, propylénglykol.

EI vyjadruje odpor prostredia, v tomto prípade kože, proti vedeniu striedavého elektrického prúdu. Vo Franzovej cele teda umožňuje relatívne jednoduchú a rýchlu detekciu zmien v permeabilite kože [99,142,143]. Najväčší pokles tohto parametra bol pozorovaný v čase 14 h (**Obrázok 17**) od aplikácie donorových vzoriek, a to vo vzorkách, ktoré obsahovali organické rozpúšťadlá. Opäť len v prípade týchto vzoriek boli badateľné významné rozdiely. Po aplikácii HA-sCer a HA (6 kgmol⁻¹) v koncentrácii 1 % došlo k zvýšeniu tohto parametra.



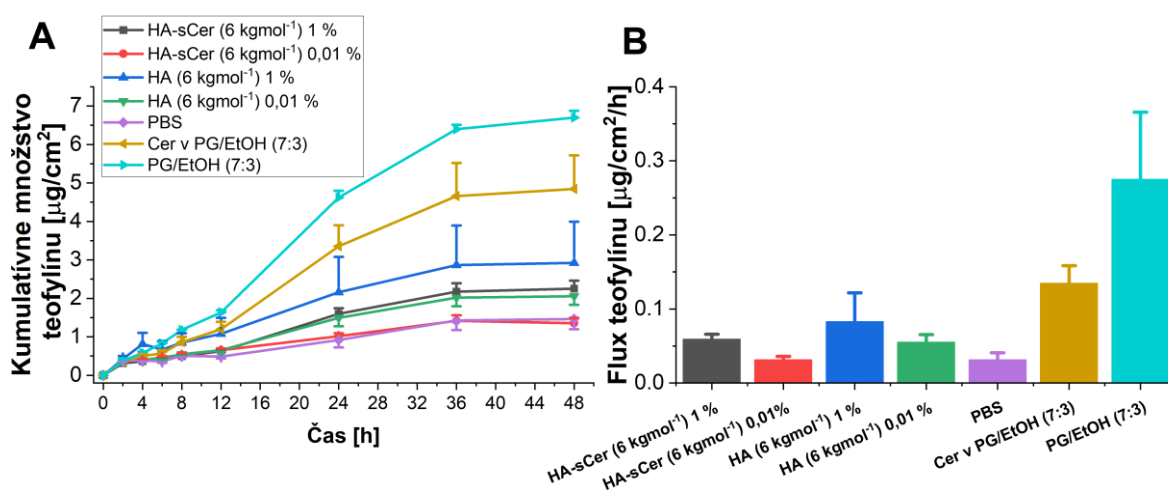
Obrázok 17. Panely A a B zobrazujú časový priebeh elektrickej impedancie (EI) izolovanej ľudskej kože po aplikácii donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol⁻¹; tmavomodrá a zelená farba) a polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol⁻¹; čierna a červená farba) v koncentrácii 0,01 % a 1 %, alebo PBS (pH = 7,4, fialová farba), alebo Cer v PG/EtOH (7:3, žltá farba) alebo PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba). Panely C a D zobrazujú hodnoty násobnej zmeny (angl. *fold change*) elektrickej impedancie medzi daným časom a elektrickej impedancie v čase pred aplikáciou donorových vzoriek. Odchýlka merania je vyjadrená ako SEM (n = 4). EtOH, etanol; PG, propylénglykol.

4.2.3 Permeácia modelovej látky teofylínu

TH je látka s vyváženým rozdeľovacím koeficientom a je často využívaná v permeačných experimentoch z dôvodu jej senzitivity na rozvoľnenie kožnej bariéry [99,144–146]. Vo vykonaných experimentoch v tejto práci bolo kvantifikované množstvo TH, ktoré prešlo cez izolovanú ľudskú kožu po aplikovaní suspenzie TH v PBS. **Obrázok 18A** znázorňuje kumulatívne množstvo TH, ktorý bol prítomný v akceptorovej fáze Franzovej cely po 48 h od aplikácie suspenzie TH. Najväčší rozdiel v permeabilite bol pozorovaný

vo vzorkách, ktoré obsahovali organické rozpúšťadlá, kde dosiahnuté množstvo TH v akceptorovej fáze bolo 4× väčšie ako v kontrole (PBS). V prípade vzoriek obsahujúcich HA a jej konjugáty bola pozorovaná koncentračná závislosť, pričom aplikácia vyšších koncentrácií spôsobila vyššie kumulatívne množstvá TH. V **Obrázku 18B** je znázornený tzv. tok (angl. *flux*) TH, stanovený zo smernice lineárnej časti kumulatívnych množstiev a vyjadruje relatívnu zmenu permeačného profilu [147].

Hoci získané výsledky z tohto experimentu naznačujú, že permeabilitu TH najviac ovplyvnila HA (6 kgmol^{-1}), je potrebné zdôrazniť, že nemodifikovaná HA nie je schopná viazať lipofilné látky, čo je značná nevýhoda v porovnaní s jej hydrofobizovanými konjugátmi. Analogicky ako u predchádzajúcich parametrov výsledky tohto pokusu nepreukázali výrazný negatívny vplyv na priepustnosť kožnej bariéry.



Obrázok 18. Panel A zobrazuje časový priebeh permeovaného teofylínu cez ľudskú kožu do akceptorovej fáze Franzovej cely, ktorému predchádzala aplikácia donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol^{-1} ; tmavomodrá a zelená farba) a polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol^{-1} ; čierna a červená farba) v koncentrácii 0,01 % a 1 %, alebo PBS (pH = 7,4, fialová farba), alebo Cer v PG/EtOH (7:3, žltá farba) alebo PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba) na kožu po dobu 12 h. Panel B zobrazuje tzv. tok (angl. *flux*) tok teofylínu z dát získaných z časového priebehu. Odchýlka merania je vyjadrená ako SEM (n = 4). EtOH, etanol; PG, propylénglykol.

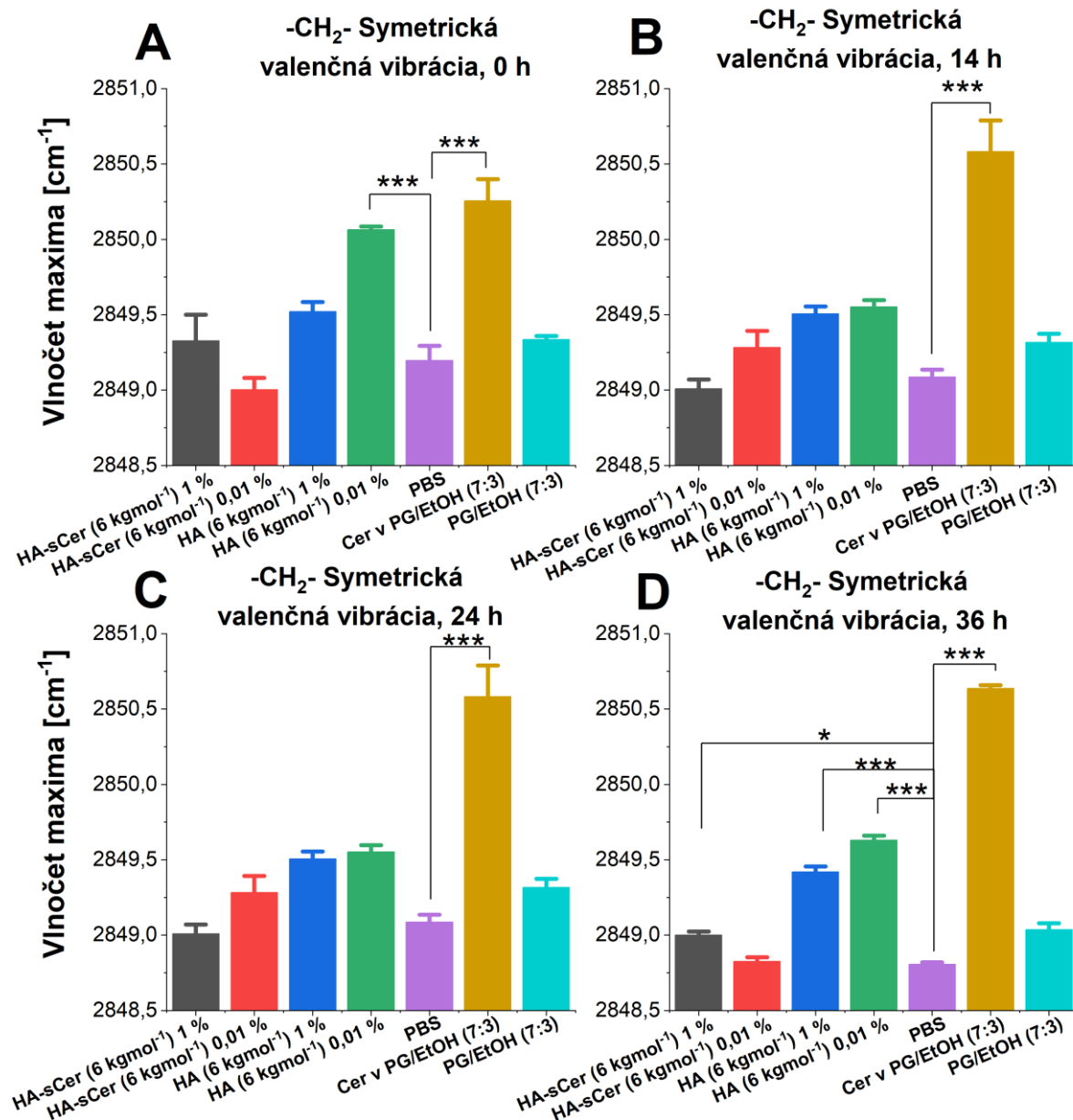
4.2.4 Analýza kožného povrchu pomocou infračervenej spektroskopie

S využitím FTIR spektrometra vybaveného ATR (angl. *attenuated total reflectance*) modulom je možné relatívne jednoducho študovať vlastnosti kožného povrchu, tj. mikroštruktúry SC. V priebehu merania cez ATR kryštál vzniká evanescentná vlna, ktorá preniká, v závislosti od použitej vlnovej dĺžky, niekoľko nižších jednotiek μm do vzorky

kože [148]. Vzhľadom k tomu, že SC je hrubé približne 20 μm , je meranie obmedzené na vrchné vrstvy SC. Majoritnou zložkou sušiny SC sú proteíny (85 %), pri čom najviac zastúpeným je keratín [149–152].

Pre posúdenie usporiadania bariérových lipidov bola z FTIR spektra (záznamu) hodnotená, mimo iných, symetrická metylénová valenčná vibrácia, ktorá má svoje maximá približne v oblasti približne 2850 cm^{-1} [17,153]. Posun k vyšším hodnotám vlnočtov týchto vibrácií naznačuje zmenu v usporiadaní (konformácii) lipidových reťazcov (hlavne z dobre usporiadanej *all-trans* konformácie na menej tesnú *gauche* konformáciu), čo často súvisí so zvýšením permeability kožnej bariéry [17,153].

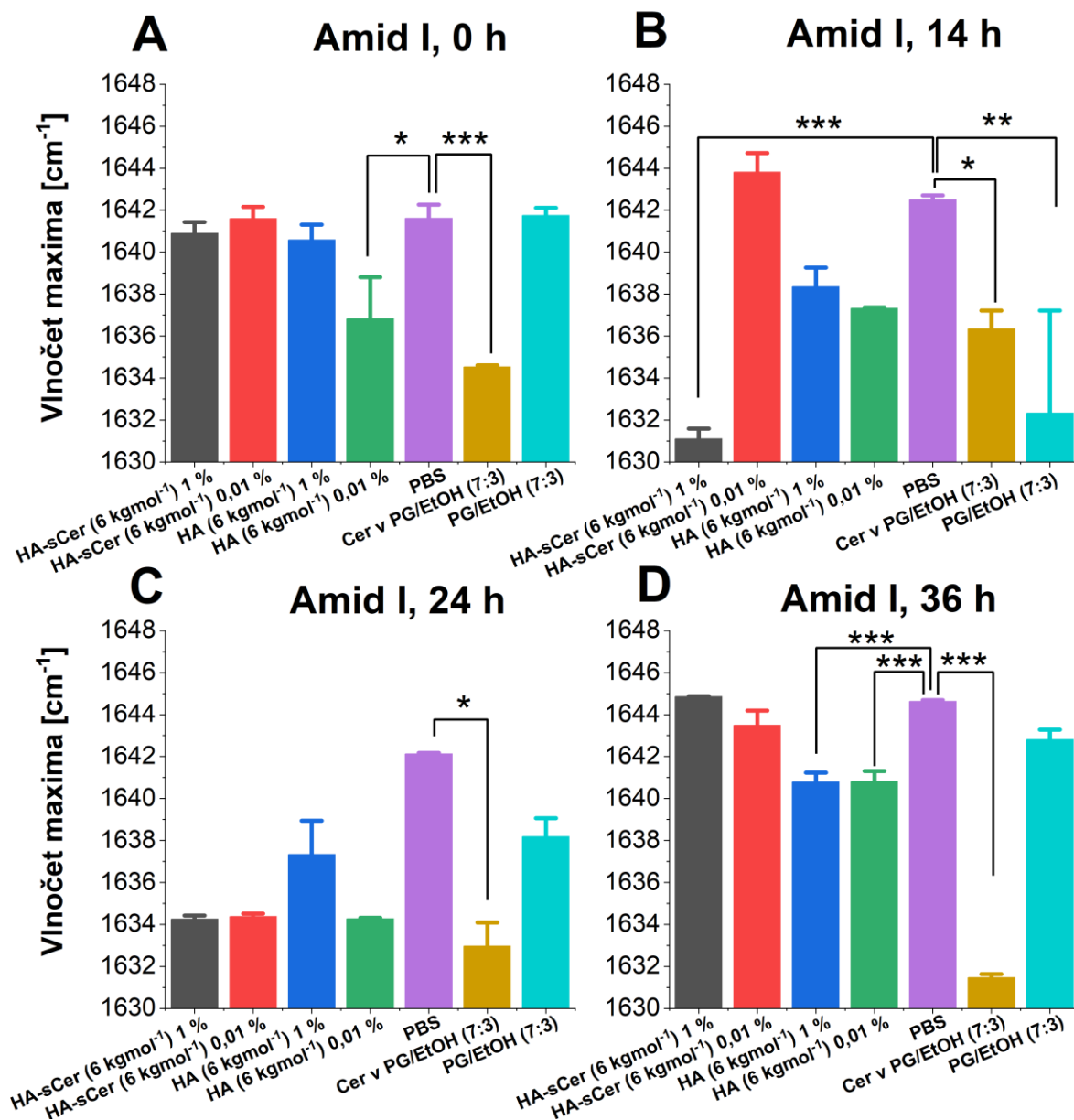
V **Obrázku 19** je možné pozorovať zmeny na úrovni desiatín cm^{-1} . Maximum absorpčného pásu žiadnej vzorky neprekročilo hranicu 2850 cm^{-1} , ktorá znamená prítomnosť zle usporiadanej *gauche* konformácie [156,157]. Je ale zaujímavé, že Witting *et al.* pozorovali zmeny v celých jednotkách cm^{-1} po aplikácii nemodifikovanej HA (100 kgmol^{-1} a 1000 kgmol^{-1}) v koncentráciách 5 až 10 % [68]. Výsledky naznačujú, že hydrofóbne modifikácie v daných koncentráciách nemajú zásadný (negatívny) vplyv na interakciu s lipidmi SC.



Obrázok 19. Hodnoty vlnočty metylénovej symetrickej valenčnej vibrácie v čase pred aplikáciou donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol⁻¹; tmavomodrá a zelená farba) a polymérnych nanočastíc konjugátov sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol⁻¹; čierna a červená farba) v koncentracii 0,01 % a 1 %, alebo PBS (pH = 7,4, fialová farba), alebo Cer v PG/EtOH (7:3, žltá farba) alebo PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba) (panel A), 14 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel B), 24 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel C) a 36 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel D). Zobrazené sú iba štatisticky významné rozdiely v porovnaní s PBS. Odchýlka je vydrená ako SEM (n=3). EtOH, etanol; PG, propylénglykol; *p ≤ 0,05; ***p ≤ 0,001.

Vibrácia, známa pod označením „Amid I“, je valenčná vibrácia karbonylu v amidovej skupine a má maximum svojho absorpčného pásu v rozmedzí

1700–1600 cm^{-1} . Táto vibrácia je veľmi často využívaná na stanovenie sekundárnej štruktúry proteínov a je aplikovateľná aj na stanovenie konformácie najviac zastúpeného proteínu v koži, keratínu [68,154–157]. Posun maxima pásu tejto vibrácie značí zmenu konformácie keratínu, ale bez presného určenia podielu konformácií. **Obrázok 20** zobrazuje porovnanie vlnočtu maxima absorpčného pásu v čase 0 h a 14, 24 a 36 h po odstránení donorových vzoriek z ľudskej kože *ex vivo*. K najvýraznejším posunom (približne k hodnotám 1635 cm^{-1}) došlo v čase 14 a 24 h u vzoriek HA-sCer v oboch koncentráciách. Posun o niekoľko jednotiek cm^{-1} bol zaznamenaný aj u HA (6 kgmol^{-1}) v koncentrácii 1 %. Po 36 h je možné sledovať reverzibilitu stavu. Výraznejší posun vibračného pásu nebol pozorovaný ani po aplikácii konjugátu HA s β -cyklodextrínom [158] či u *N,N,N*-trimetylchitozánu. V druhom prípade bola po dekonvolúcii detegovaná zmena konformácie keratínu [159].

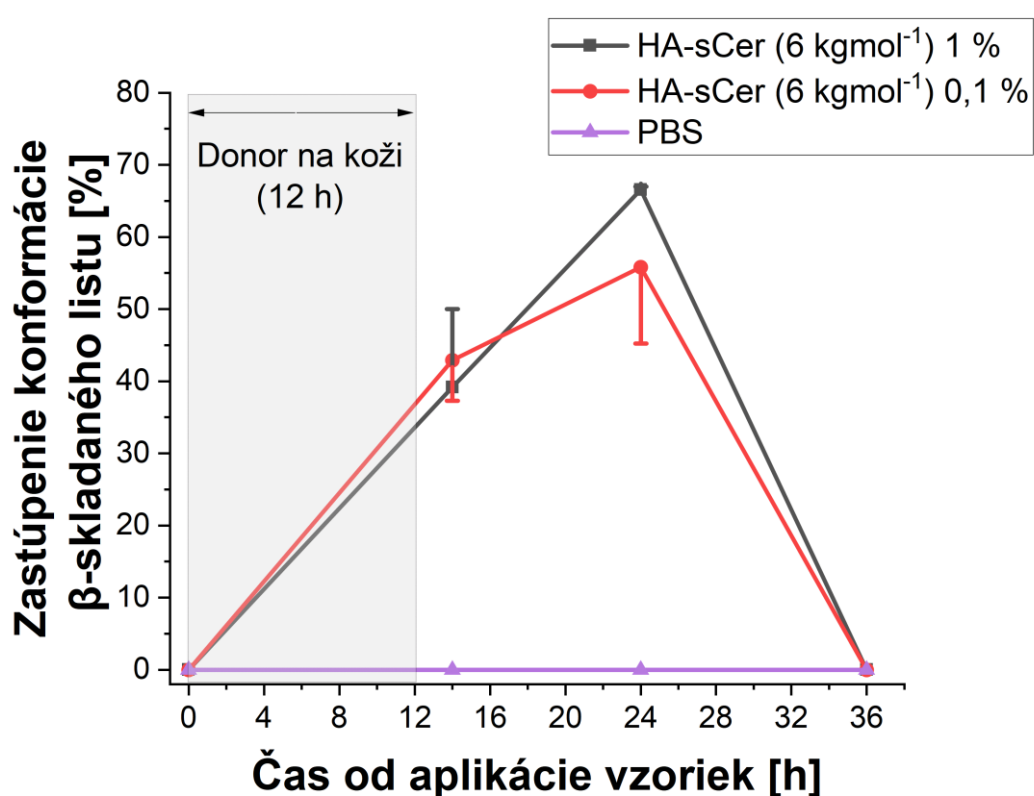


Obrázok 20. Hodnoty vlnočtu vibrácie „Amid I“ v čase pred aplikáciou donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol⁻¹; tmavomodrá a zelená farba) a polymérnych nanočastíc konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol⁻¹; čierna a červená farba) v koncentrácii 0,01 % a 1 %, alebo PBS (pH = 7,4, fialová farba), alebo Cer v PG/EtOH (7:3, žltá farba) alebo PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba) (panel A), 14 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel B), 24 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel C) a 36 h po ich aplikácii donorových vzoriek (panel D). Odchýlka je vydrená ako SEM (n=3). Zobrazené sú iba štatisticky významné rozdiely v porovnaní s PBS. EtOH, etanol; PG, propylénglykol; *p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

Jedným zo spôsobov ako stanoviť konformáciu (sekundárnu štruktúru) kožného keratínu je dekonvolúcia absorpčného pásu „Amid I“. Konformácie získané z dekonvolúcie

korelujú s dátami získanými röntgenovou difrakciou [160]. K významným konformáciám keratínu patria tzv. β -otáčanie (angl. β -turning, 1662–1695 cm^{-1}), α -helix (1645–1662 cm^{-1}), náhodné zvinutie (angl. *Random coiling*, 1638–1645 cm^{-1}) a konformácia β -skladaného listu (1615–1638 cm^{-1}) [159].

Výsledky dekonvolúcie v tomto experimente ukázali, že pripravené konjugáty HA-sCer zmenili konformáciu keratínu z fyziologickej tesnej α -helix konformácie do voľnejšej konformácie β -skladaného listu. HA-sCer vykazovali maximum zmeny konformácie z α -helix do β -skladaného listu až v čase 24 h a v čase 36 h už došlo k regenerácii konformácie keratínu (**Obrázok 21**). Najvyšší dosiahnutý podiel tejto konformácie bol 67 %, a to pri použití koncentrácie 1 %. Po aplikácii koncentrácie HA-sCer 0,01 % bol detegovaný podiel 56 %. Witting *et al.* pozorovali najväčší vplyv na konformáciu keratínu pri použití nemodifikovanej HA (5 kgmol^{-1}) v koncentrácii 5 až 10 % [59]. Výsledky ostatných vzoriek sú uvedené v **Prílohe (Obrázok P22)**.



Obrázok 21. Časový priebeh zastúpenia konformácie keratínu β -skladaného listu izolovanej ľudskej kože po aplikácii donorových vzoriek s obsahom konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol^{-1}) v koncentrácii 0,01 % (červená farba) a 1 % (čierna farba) a PBS (fialová farba). Odchýlka merania je uvedená ako SD ($n=3$).

5 Záver

V súčasnosti produkuje farmaceutický a kozmetický priemysel značné množstvo komerčne dostupných topických prípravkov s obsahom biologicky aktívnych látok. Za zmienku stojí nárast prípravkov na báze sfingolipidov (ceramidov) s cieľom doplnenia chýbajúcich bariérových lipidov, ktoré by mohli nájsť uplatnenie ako alternatíva pri liečbe psoriázy, ichtyózy alebo atopickkej dermatitídy. Na druhú stranu je limitujúcim faktorom zhotovenia funkčného prípravku mimo iného náročné začlenenie sfingolipidov do užívateľsky obľúbených hydrofilných aplikačných/liekových foriem. Pozitívny vplyv na kožu a jej funkciu má aj kyselina hyalurónová/hyaluronan, avšak nevýhodou tohto anionického polysacharidu je jeho obmedzený prestup cez hydrofóbnu kožnú bariéru.

V tejto práci boli na vybrané sfingolipidy (fytosfingozín a ceramid) chemickou cestou naviazané biokompatibilné linkery, odvodené od kyseliny jantárovej a maleínovej, pomocou ktorých bola kyselina hyalurónová úspešne upravená na hydrofobizovaný konjugát sfingolipid-linker-hyaluronát.

Najviac efektívna bola príprava konjugátu sukcinylceramid-hyaluronát s využitím metódy zmiešaných anhydridov. Prostredníctvom tejto metódy bol, v závislosti od použitej molekulovej hmotnosti, dosiahnutý stupeň substitúcie až 14,2 %, pri čom príprava bola úspešná v rozmedzí molekulovej hmotnosti hyaluronanu 6 až 442 kgmol⁻¹. Modifikácia kyseliny hyalurónovej bola potvrdená pomocou NMR spektroskopie, infračervenej spektroskopie a hmotnostnej spektrometrie. Medzi nesporné prednosti vyvinutej metódy patrí možnosť prípravy vo vodnom prostredí, čo výrazne redukuje náklady na potrebný materiál a vybavenie, čím sa otvára cesta k škálovateľnosti prípravy. V tejto práci bola dosiahnutá opakovateľná príprava z 3 g východzieho hyaluronanu.

Pripravené konjugáty boli rozpustné vo vode, v ktorej sa samovoľne usporadúvali do polymérnych nanočastíc. Ich veľkosť bola závislá od molekulovej hmotnosti polyméru, pri čom častice z 6 kgmol⁻¹ konjugátov mali veľkosť do 40 nm. V prípade 15 kgmol⁻¹ konjugátov bola pozorovaná bimodálna distribúcia veľkosti častíc. Zvyšovanie stupňa substitúcie ceramidu malo zásadný vplyv na hydrofobicitu jadra a s tým spojenú vyššiu väzbovosť modelových látok a nižšiu kritickú agregáčnú koncentráciu.

Pripravené konjugáty sukcinylceramid-hyaluronát nevykazovali žiadne cytotoxické účinky, ale je naznačený rast buniek, ktorý by mohol byť prospešný pri kompenzácii dermálnych atrofických zmien. Okrem toho konjugát vykazoval významné zníženie hladiny prozápalového cytokínu interleukínu 6 až o 95 %, a to pri relatívne nízkych koncentráciách.

Permeačné experimenty *ex vivo* s polymérnymi nanočasticami sukcinylceramid-hyaluronátu s enkapsulovanou nílskou červenou preukázali fluorescenciu v prasacej *dermis*. V permeačných experimentoch s ľudskou kožou neboli detegované výrazné zmeny v transepidermálnej strate vody ani elektrickej impedancii v porovnaní s kontrolou. Aplikované konjugáty sukcinylceramid-hyaluronát síce významne nezmenili konformáciu kožných lipidov, avšak pozmenili sekundárnu štruktúru keratínu v prospech tzv. konformácie β -skladaného listu. Pripravené konjugáty sukcinylceramid-hyaluronát teda vykazovali vynikajúcu biokompatibilitu a efektívne prenikali do kože. Po prekonaní kožnej bariéry sa predpokladá, že u konjugátu dôjde k rozštiepeniu esterových väzieb a jednotlivé jednotlivé zložky (hyaluronan, kyselina jantárová a ceramid) budú degradované svojimi prirodzenými metabolickými dráhami, avšak na overenie tejto hypotézy je potrebný ďalší výskum.

Všetky definované ciele tejto práce boli naplnené. Avšak, dosiahnutý bol výrazne vyšší stupeň substitúcie, z pôvodne definovaného 2,5 až 3,5 % bolo dosiahnuté až hodnoty 14,2 %, pričom príprava bola efektívna v širokom spektre molekulových hmotností. Zistenie tohto poznatku nás viedlo ku koncentrácii zdrojov na skúmanie konjugátu sukcinylceramid-hyaluronátu, čo vyústilo do podania patentovej prihlášky.

Spontánne usporiadané polymérne nanočastice pripravených konjugátov by v budúcnosti mohli byť využiteľné pre (trans)dermálne aplikované (liečivé) látky. Takéto konjugáty, ktoré sú rozpustné vo vode, môžu byť začlenené do vodnej fázy kvapalných alebo polotuhých topických liečivých/kozmetických prípravkov alebo sa môžu použiť aj na zapuzdrenie hydrofóbných látok. Konjugáty by vďaka svojim protizápalovým vlastnostiam mohli byť vhodnými kandidátmi v liečbe zápalových kožných ochorení. Tieto látky tak poskytujú nové možnosti v terapii kožných ochorení a obchádzaní podávania protizápalových kortikoidov, prípadne po enkapsulácii protizápalovo aktívnych látok

do konjugátov by mohlo dôjsť k efektívnejšej terapii s nižšou terapeuticky účinnou dávkou, čo by mohlo redukovať nežiadúce účinky spojené s chronickou terapiou.

6 Literatúra

- [1] R. Čihák, Anatomie, 3. vydání, Grada publishing, Praha, 2016.
- [2] Y. Gilaberte, L. Prieto-Torres, I. Pastushenko, Á. Juarranz, Anatomy and Function of the Skin, *Nanoscience in Dermatology* (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>.
- [3] J. Štork, et al., Dermatovenerologie, 2. vydání, Galén, Praha, 2013.
- [4] D. Smejkalova, G. Huerta-angeles, T. Ehlova, Hyaluronan (Hyaluronic Acid) a Natural Moisturizer for Skin Care, in: *Harry's Cosmeticology 9th Edition*, 2015: 599–621.
- [5] A. Kováčik, M. Kopečná, K. Vávrová, Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations, *Expert Opin. Drug Deliv.* 17 (2020) 145–155. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>.
- [6] Eucerin. *Eucerin: Vše o kůži | Struktura a funkce kůže: Úvod*. Online. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> [citované 2024-02-17].
- [7] L. Eckhart, S. Lippens, E. Tschachler, W. Declercq, Cell death by cornification, *Biochim Biophys Acta* 1833 (2013) 3471–3480. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.06.010>.
- [8] A. Nováčková, I. Sagrafena, P. Pullmannová, G. Paraskevopoulos, A. Dwivedi, A. Mazumder, K. Růžičková, P. Slepíčka, J. Zbytovská, K. Vávrová, Acidic pH Is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids In Vitro, *Journal of Investigative Dermatology* 141 (2021) 1915-1921.e4. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2021.02.014>.
- [9] K. Vavrova, A. Kovačik, L. Opalka, Ceramides in the skin barrier, *European Pharmaceutical Journal* 64 (2017) 28–35. <https://doi.org/10.1515/AFPUC-2017-0004>.
- [10] E.H. Mojumdar, Z. Kariman, L. Van Kerckhove, G.S. Gooris, J.A. Bouwstra, The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (2014) 2473–2483. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2014.05.023>.
- [11] E.H. Mojumdar, G.S. Gooris, J.A. Bouwstra, Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization, *Soft Matter* 11 (2015) 4326–4336. <https://doi.org/10.1039/C4SM02786H>.
- [12] K.C. Madison, D.C. Swartzendruber, P.W. Wertz, D.T. Downing, Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum Corneum, *Journal of Investigative Dermatology* 88 (1987) 714–718. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12470386>.
- [13] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, M.A.S. de Vries, J.A. van der Spek, W. Bras, Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle

- X-ray diffraction study, *Int J Pharm* 84 (1992) 205–216.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90158-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90158-X).
- [14] J.A. Bouwstra, G.S. Gooris, J.A. van der Spek, W. Bras, Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering, *J Invest Dermatol* 97 (1991) 1005–1012. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12492217>.
- [15] H.-S. Shieh, L.G. Hoard, C.E. Nordman, The structure of cholesterol, *Acta Crystallographica Section B* 37 (1981) 1538–1543.
<https://doi.org/10.1107/S0567740881006523>.
- [16] B.M. Craven, IUCr, Pseudosymmetry in cholesterol monohydrate, *Acta Cryst.* 35 (1979) 1123–1128. <https://doi.org/10.1107/S0567740879005719>.
- [17] R. Mendelsohn, C.R. Flach, D.J. Moore, Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (2006) 923–933.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2006.04.009>.
- [18] M. Janssens, J. Van Smeden, G.S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P.J. Caspers, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, S. Kezic, R. Wolterbeek, A.P. Lavrijsen, J.A. Bouwstra, Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients, *J Lipid Res* 53 (2012) 2755–2766. <https://doi.org/10.1194/JLR.P030338>.
- [19] A. Fujiwara, M. Morifuji, M. Kitade, K. Kawahata, T. Fukasawa, T. Yamaji, H. Itoh, M. Kawashima, Age-related and seasonal changes in covalently bound ceramide content in forearm stratum corneum of Japanese subjects: determination of molecular species of ceramides, *Arch Dermatol Res* 310 (2018) 729–735.
<https://doi.org/10.1007/S00403-018-1859-Z>.
- [20] Y. Uchida, K. Park, Ceramides in Skin Health and Disease: An Update, *American Journal of Clinical Dermatology* 2021 22:6 22 (2021) 853–866.
<https://doi.org/10.1007/S40257-021-00619-2>.
- [21] Y. Uchida, Ceramide signaling in mammalian epidermis, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1841 (2014) 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.09.003>.
- [22] M. Song, S. Kim, H.S. Yun, S. Kwon, Anti-inflammatory effect of the ceramide mixture extracted from genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 22 (2017) 653–658.
<https://doi.org/10.1007/s12257-017-0216-y>.
- [23] B. Školová, A. Kováčik, O. Tesař, L. Opálka, K. Vávrová, Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859 (2017) 824–834. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2017.01.019>.
- [24] Q. Li, H. Fang, E. Dang, G. Wang, The role of ceramides in skin homeostasis and inflammatory skin diseases, *J Dermatol Sci* 97 (2020) 2–8.
<https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2019.12.002>.

- [25] Y. Uchida, K. Park, Ceramides in Skin Health and Disease: An Update, *American Journal of Clinical Dermatology* 2021 22:6 22 (2021) 853–866. <https://doi.org/10.1007/S40257-021-00619-2>.
- [26] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.C. Sun, NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017 2:1 2 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [27] J. Becam, T. Walter, A. Burgert, J. Schlegel, M. Sauer, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*, *Sci Rep* 7 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18071-w>.
- [28] C.L. Fischer, D.R. Drake, D. V. Dawson, D.R. Blanchette, K.A. Brogden, P.W. Wertz, Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against gram-positive and gram-negative bacteria, *Antimicrob Agents Chemother* 56 (2012) 1157–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.05151-11>.
- [29] B. Breiden, K. Sandhoff, The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (2014) 441–452. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.08.010>.
- [30] R. Stern, H.I. Maibach, Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation, *Clin Dermatol* 26 (2008) 106–122. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2007.09.013>.
- [31] G. Abatangelo, V. Vindigni, G. Avruscio, L. Pandis, P. Brun, Hyaluronic Acid: Redefining Its Role, *Cells* 2020, Vol. 9, Page 1743 9 (2020) 1743. <https://doi.org/10.3390/CELLS9071743>.
- [32] U. Anderegg, J.C. Simon, M. Averbeck, More than just a filler – the role of hyaluronan for skin homeostasis, *Exp Dermatol* 23 (2014) 295–303. <https://doi.org/10.1111/EXD.12370>.
- [33] L. Lapčík, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabreček, Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications, *Chem Rev* 98 (1998). <https://doi.org/10.1021/CR941199Z>.
- [34] Wikipedia. *Hyaluronan - Kyselina hyaluronová*. Online. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronov%C3%A1#/media/Soubor:Hyaluronan.png [citované 2024-02-17].
- [35] T.Y. Wong, C.-H. Chang, C.-H. Yu, L.L.H. Huang, Hyaluronan keeps mesenchymal stem cells quiescent and maintains the differentiation potential over time, *Aging Cell* 16 (2017) 451–460. <https://doi.org/10.1111/accel.12567>.
- [36] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): A review, *Vet Med (Praha)* 53 (2008) 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.
- [37] K. Valachová, M.E. Hassan, L. Šoltés, Hyaluronan: Sources, Structure, Features and Applications, *Molecules* 2024, Vol. 29, Page 739 29 (2024) 739. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29030739>.

- [38] J.E. Rayahin, J.S. Buhrman, Y. Zhang, T.J. Koh, R.A. Gemeinhart, High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influence Macrophage Activation, *ACS Biomater Sci Eng* 1 (2015) 481–493. <https://doi.org/10.1021/ACSBOMATERIALS.5B00181>.
- [39] S. Radrezza, G. Baron, S.B. Nukala, G. Depta, G. Aldini, M. Carini, A. D'Amato, Advanced quantitative proteomics to evaluate molecular effects of low-molecular-weight hyaluronic acid in human dermal fibroblasts, *J Pharm Biomed Anal* 185 (2020) 113199. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113199>.
- [40] L. Vistejnova, B. Safrankova, K. Nesporova, R. Slavkovsky, M. Hermannova, P. Hosek, V. Velebny, L. Kubala, Low molecular weight hyaluronan mediated CD44 dependent induction of IL-6 and chemokines in human dermal fibroblasts potentiates innate immune response, *Cytokine* 70 (2014) 97–103. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2014.07.006>.
- [41] K.J. Wolf, S. Kumar, Hyaluronic Acid: Incorporating the Bio into the Material, *ACS Biomater Sci Eng* 5 (2019) 3753–3765. <https://doi.org/10.1021/ACSBOMATERIALS.8B01268>.
- [42] D. Naor, R. Peter Richter, V.B. Lokeshwar, A.R. Jordan, R.R. Racine, M.J. P Hennig, The role of CD44 in disease pathophysiology and targeted treatment, *Front Immunol* 6 (2015) 182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00182>.
- [43] D. Naor, S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik, Y. Faitelson, CD44 in Cancer, *Crit Rev Clin Lab Sci* 39 (2008) 527–579. <https://doi.org/10.1080/10408360290795574>.
- [44] L.M. Negi, S. Talegaonkar, M. Jaggi, F.J. Ahmad, Z. Iqbal, R.K. Khar, Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting, *J Drug Target* 20 (2012) 561–573. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.702767>.
- [45] Y. Zhang, Q. Xia, Y. Li, Z. He, Z. Li, T. Guo, Z. Wu, N. Feng, CD44 Assists the Topical Anti-Psoriatic Efficacy of Curcumin-Loaded Hyaluronan-Modified Ethosomes: A New Strategy for Clustering Drug in Inflammatory Skin, *Theranostics* 9 (2019) 48. <https://doi.org/10.7150/THNO.29715>.
- [46] K.N. How, W.H. Yap, C.L.H. Lim, B.H. Goh, Z.W. Lai, Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review, *Front Pharmacol* 11 (2020) 549139. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.01105>.
- [47] R. Racine, M. E., Hyaluronan Endocytosis: Mechanisms of Uptake and Biological Functions, in: *Molecular Regulation of Endocytosis*, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/45976>.
- [48] R.C. Gupta, R. Lall, A. Srivastava, A. Sinha, Hyaluronic acid: Molecular mechanisms and therapeutic trajectory, *Front Vet Sci* 6 (2019) 192. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00192>.
- [49] P. Žádníková, R. Šínová, V. Pavlík, M. Šimek, B. Šafránková, M. Hermannová, K. Nešporová, V. Velebný, The Degradation of Hyaluronan in the Skin, *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 251 12 (2022) 251. <https://doi.org/10.3390/BIOM12020251>.

- [50] J. Zhu, X. Tang, Y. Jia, C.T. Ho, Q. Huang, Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery – A review, *Int J Pharm* 578 (2020) 119127. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119127>.
- [51] S. Franzé, A. Marengo, B. Stella, P. Minghetti, S. Arpicco, F. Cilurzo, Hyaluronan-decorated liposomes as drug delivery systems for cutaneous administration, *Int J Pharm* 535 (2018) 333–339. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.11.028>.
- [52] P.L. Lu, J.Y. Lai, D.H.K. Ma, G.H. Hsiue, Carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels as cell sheet delivery vehicles: characterization and interaction with corneal endothelial cells, *J Biomater Sci Polym Ed.* 19 (2012) 1–18. <https://doi.org/10.1163/156856208783227695>.
- [53] E. Achbergerová, D. Šmejkalová, G. Huerta-Angeles, K. Souček, M. Hermannová, H. Vágnerová, R. Vícha, V. Velebný, In vivo monitoring of tumor distribution of hyaluronan polymeric micelles labeled or loaded with near-infrared fluorescence dye, *Carbohydr Polym* 198 (2018) 339–347. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.06.082>.
- [54] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, J. Novotný, K. Kopecká, J. Šógorková, D. Šmejkalová, V. Velebný, Grafting of steroids to hyaluronan towards the design of delivery systems for antioxidants: The role of hydrophobic core, *Carbohydr Polym* 193 (2018) 383–392. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.04.021>.
- [55] G. Huerta-Angeles, M. Brandejsová, R. Nigmatullin, K. Kopecká, H. Vágnerová, D. Šmejkalová, I. Roy, V. Velebný, Synthesis of graft copolymers based on hyaluronan and poly(3-hydroxyalkanoates), *Carbohydr Polym* 171 (2017) 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.011>.
- [56] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, P. Štěpán, V. Pavlík, J. Starigazdová, P. Orzol, K. Kopecká, P. Halamková, J. Kulhánek, V. Velebný, Retinoic acid grafted to hyaluronan for skin delivery: Synthesis, stability studies, and biological evaluation, *Carbohydr Polym* 231 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115733>.
- [57] D. Šmejkalová, T. Muthný, K. Nešporová, M. Hermannová, E. Achbergerová, G. Huerta-Angeles, M. Svoboda, M. Čepa, V. Machalová, D. Luptáková, V. Velebný, Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery, *Carbohydr Polym* 156 (2017) 86–96. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.09.013>.
- [58] M. Juhaščík, A. Kováčik, G. Huerta-Ángeles, Recent Advances of Hyaluronan for Skin Delivery: From Structure to Fabrication Strategies and Applications, *Polymers (Basel)* 14 (2022) 4833. <https://doi.org/10.3390/POLYM14224833/S1>.
- [59] M. Juhaščík, K. Štarmanová, M. Brandejsová, P. Večeřová, M. Hermannová, A. Exnerová, H. Vagnerová, O. Štrympl, K. Nešporová, A. Kováčik, V. Velebný, G. Huerta-Ángeles, Synthesis and self-assembling of hyaluronan grafted with ceramide NP for topical drug delivery, *Carbohydr Polym* 321 (2023) 121283. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.121283>.
- [60] Inanaga Junji, Hirata Kuniko, Saeki Hiroko, Katsuki Tsutomu, Yamaguchi Masaru, A Rapid Esterification by Means of Mixed Anhydride and Its Application to Large-ring Lactonization, *BCSJ* 52 (2006) 1989–1993. <https://doi.org/10.1246/BCSJ.52.1989>.

- [61] G. Huerta-Angeles, M. Brandejsová, J. Kulhánek, V. Pavlík, D. Šmejkalová, H. Vágnerová, V. Velebný, Linolenic acid grafted hyaluronan: Process development, structural characterization, biological assessing, and stability studies, *Carbohydr Polym* 152 (2016) 815–824. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.07.030>.
- [62] G. Huerta-Angeles, M. Bobek, E. Příkopová, D. Šmejkalová, V. Velebný, Novel synthetic method for the preparation of amphiphilic hyaluronan by means of aliphatic aromatic anhydrides, *Carbohydr Polym* 111 (2014) 883–891. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.05.035>.
- [63] A. Matelová, G. Huerta-Angeles, D. Šmejkalová, Z. Brůnová, J. Dušek, R. Vícha, V. Velebný, Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing-aromatic fatty acids for fabrication of polymeric micelles, *Carbohydr Polym* 151 (2016) 1175–1183. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.085>.
- [64] G. Huerta-Ángeles, F. Ondreáš, M. Brandejsová, K. Kopecká, H. Vagnerová, J. Kulhánek, T. Drmota, Formulation of hyaluronan grafted with dodecanoic acid as a potential ophthalmic treatment, *Carbohydr Polym* 246 (2020) 116578. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116578>.
- [65] ChemSpider. *Hyaluronic acid* | C28H44N2O23. Online. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2341173.html> [citované 2024-02-17].
- [66] M. Essendoubi, C. Gobinet, R. Reynaud, J.F. Angiboust, M. Manfait, O. Piot, Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy, *Skin Research and Technology* 22 (2016) 55–62. <https://doi.org/10.1111/SRT.12228>.
- [67] M. Shigefuji, Y. Tokudome, Nanoparticulation of hyaluronic acid: A new skin penetration enhancing polyion complex formulation: Mechanism and future potential, *Materialia (Oxf)* 14 (2020) 100879. <https://doi.org/10.1016/J.MTLA.2020.100879>.
- [68] M. Witting, A. Boreham, R. Brodewolf, K. Vávrová, U. Alexiev, W. Friess, S. Hedtrich, Interactions of hyaluronic Acid with the skin and implications for the dermal delivery of biomacromolecules, *Mol Pharm* 12 (2015) 1391–1401. <https://doi.org/10.1021/MP500676E>.
- [69] S. Jacobus Berlitz, D. De Villa, L.A. Maschmann Inácio, S. Davies, K.C. Zatta, S.S. Guterres, I.C. Külkamp-Guerreiro, Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid – a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders, *Drug Dev Ind Pharm* 45 (2019) 642–650. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1569032>.
- [70] S. Kozaka, A. Kashima, R. Wakabayashi, T. Nakata, T. Ueda, M. Goto, Effective Transcutaneous Delivery of Hyaluronic Acid Using an Easy-to-Prepare Reverse Micelle Formulation, *Cosmetics* 2020, Vol. 7, Page 52 7 (2020) 52. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS7030052>.
- [71] S. Kupper, I. Kłosowska-Chomiczewska, P. Szumała, Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems, *Carbohydr Polym* 175 (2017) 347–354. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.010>.

- [72] L.H. Lin, C.W. Chen, Y.Q. Zhu, Synthesis and cytotoxicity of quercetin/hyaluronic acid containing ether block segment, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 586 (2020) 124230. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2019.124230>.
- [73] W. Liu, L. Ding, J. Xu, Y. Shang, Z. Wang, H. Liu, Synthesis of sinapic acid modified sodium hyaluronate particles and the one-step processing of multiple Pickering emulsion, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 644 (2022) 128785. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2022.128785>.
- [74] L.E. Euliss, J.A. DuPont, S. Gratton, J. DeSimone, Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine, *Chem Soc Rev* 35 (2006) 1095–1104. <https://doi.org/10.1039/B600913C>.
- [75] D. Guimarães, A. Cavaco-Paulo, E. Nogueira, Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications, *Int J Pharm* 601 (2021) 120571. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571>.
- [76] N. Nainwal, S. Jawla, R. Singh, V.A. Saharan, Transdermal applications of ethosomes – a detailed review, *J. Liposome Res.* 29 (2018) 103–113. <https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1517160>.
- [77] M. Osanloo, S. Assadpour, A. Mehravaran, M. Abastabar, J. Akhtari, Niosome-loaded antifungal drugs as an effective nanocarrier system: A mini review, *Curr Med Mycol* 4 (2018) 31. <https://doi.org/10.18502/CMM.4.4.384>.
- [78] K. Masud Kazi, A. Sattwa Mandal, N. Biswas, A. Guha, S. Chatterjee, M. Behera, K. Kuotsu, Niosome: A future of targeted drug delivery systems, *J Adv Pharm Technol Res* 1 (2010) 374–380. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76435>.
- [79] M.L. Manca, D. Lattuada, D. Valenti, O. Marelli, C. Corradini, X. Fernández-Busquets, M. Zaru, A.M. Maccioni, A.M. Fadda, M. Manconi, Potential therapeutic effect of curcumin loaded hyalurosomes against inflammatory and oxidative processes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The use of fibroblast-like synovial cells cultured in synovial fluid, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 136 (2019) 84–92. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2019.01.012>.
- [80] S. Taetz, A. Bochot, C. Surace, S. Arpicco, J.M. Renoir, U.F. Schaefer, V. Marsaud, S. Kerdine-Roemer, C.M. Lehr, E. Fattal, Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells, *Oligonucleotides* 19 (2009) 103–115. <https://doi.org/10.1089/OLI.2008.0168>.
- [81] I. Castangia, C. Caddeo, M.L. Manca, L. Casu, A.C. Latorre, O. Díez-Sales, A. Ruiz-Saurí, G. Bacchetta, A.M. Fadda, M. Manconi, Delivery of liquorice extract by liposomes and hyalurosomes to protect the skin against oxidative stress injuries, *Carbohydr Polym* 134 (2015) 657–663. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.08.037>.
- [82] J.K. de Oliveira, T. Ueda-Nakamura, A.G. Corrêa, R. Petrilli, R.F.V. Lopez, C.V. Nakamura, R. Auzely-Velty, Liposome-based nanocarrier loaded with a new quinoxaline derivative for the treatment of cutaneous leishmaniasis, *Materials*

Science and Engineering: C 110 (2020) 110720.
<https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.110720>.

- [83] P.M. Elhalmoushy, M.A. Elsheikh, N.A. Matar, W.F. El-Hadidy, M.A. Kamel, G.A. Omran, Y.S.R. Elnaggar, Novel berberine-loaded hyalurosomes as a promising nanodermatological treatment for vitiligo: Biochemical, biological and gene expression studies, *Int J Pharm* 615 (2022) 121523.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121523>.
- [84] J. Xie, Y. Ji, W. Xue, D. Ma, Y. Hu, Hyaluronic acid-containing ethosomes as a potential carrier for transdermal drug delivery, *Colloids Surf B Biointerfaces* 172 (2018) 323–329. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.08.061>.
- [85] Y. Zhang, Q. Xia, Y. Li, Z. He, Z. Li, T. Guo, Z. Wu, N. Feng, CD44 Assists the Topical Anti-Psoriatic Efficacy of Curcumin-Loaded Hyaluronan-Modified Ethosomes: A New Strategy for Clustering Drug in Inflammatory Skin, *Theranostics* 9 (2019) 48.
<https://doi.org/10.7150/THNO.29715>.
- [86] Z. Sadeghi Ghadi, R. Dinarvand, N. Asemi, F. Talebpour Amiri, P. Ebrahimnejad, Preparation, characterization and in vivo evaluation of novel hyaluronan containing niosomes tailored by Box-Behnken design to co-encapsulate curcumin and quercetin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 130 (2019) 234–246.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.01.035>.
- [87] P. Wichayapreechar, S. Anuchapreeda, R. Phongpradist, W. Rungseewijitprapa, C. Ampasavate, Dermal targeting of Centella asiatica extract using hyaluronic acid surface modified niosomes, *J. Liposome Res.* 30 (2019) 197–207.
<https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1614952>.
- [88] N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application, *Adv Pharm Bull* 5 (2015) 305–313. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>.
- [89] T. Del Castillo-Santaella, Y. Yang, I. Martínez-González, M.J. Gálvez-Ruiz, M.Á. Cabrerizo-Vílchez, J.A. Holgado-Terriza, F. Selles-Galiana, J. Maldonado-Valderrama, Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy, *Pharmaceutics* 2020, Vol. 12, Page 1039 12 (2020) 1039. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12111039>.
- [90] Y. Yue, D. Zhao, Q. Yin, Hyaluronic acid modified nanostructured lipid carriers for transdermal bupivacaine delivery: In vitro and in vivo anesthesia evaluation, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98 (2018) 813–820.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.103>.
- [91] Y. Yang, D. Qiu, Y. Liu, L. Chao, Topical anesthetic analgesic therapy using the combination of ropivacaine and dexmedetomidine: hyaluronic acid modified long-acting nanostructured lipid carriers containing a skin penetration enhancer, (2019).
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S211443>.
- [92] S. Tolentino, M.N. Pereira, M. Cunha-Filho, T. Gratieri, G.M. Gelfuso, Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by chitosan or hyaluronic acid

- nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris, *Carbohydr Polym* 253 (2021) 117295. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117295>.
- [93] M.Z. Wang, J. Niu, H.J. Ma, H.A. Dad, H.T. Shao, T.J. Yuan, L.H. Peng, Transdermal siRNA delivery by pH-switchable micelles with targeting effect suppress skin melanoma progression, *Journal of Controlled Release* 322 (2020) 95–107. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.023>.
- [94] J. Starigazdová, K. Nešporová, M. Čepa, R. Šínová, D. Šmejkalová, G. Huerta-Angeles, V. Velebný, In vitro investigation of hyaluronan-based polymeric micelles for drug delivery into the skin: The internalization pathway, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 143 (2020) 105168. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.105168>.
- [95] M. Pospisilova, J. Mrazek, V. Matuska, S. Kettou, M. Dusikova, V. Svozil, K. Nesporova, G. Huerta-Angeles, H. Vagnerova, V. Velebny, Oleyl-hyaluronan micelles loaded with upconverting nanoparticles for bio-imaging, *Journal of Nanoparticle Research* 17 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3186-z>.
- [96] Z. Cheng, H. Lin, Z. Wang, X. Yang, M. Zhang, X. Liu, B. Wang, Z. Wu, D. Chen, Preparation and characterization of dissolving hyaluronic acid composite microneedles loaded micelles for delivery of curcumin, *Drug Deliv Transl Res* 10 (2020) 1520–1530. <https://doi.org/10.1007/S13346-020-00735-2>.
- [97] O. Štrympl, J. Vohlídal, M. Hermannová, M. Maldonado-Domínguez, M. Brandejsová, K. Kopecká, V. Velebný, G. Huerta-Ángeles, Oleate-modified hyaluronan: Controlling the number and distribution of side chains by varying the reaction conditions, *Carbohydr Polym* 267 (2021) 118197. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118197>.
- [98] M.M. Cross, Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems, *J Colloid Sci* 20 (1965) 417–437. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(65\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0095-8522(65)90022-X).
- [99] M. Kopečná, M. Macháček, A. Nováčková, G. Paraskevopoulos, J. Roh, K. Vávrová, Esters of terpene alcohols as highly potent, reversible, and low toxic skin penetration enhancers, *Scientific Reports* 2019 9:1 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51226-5>.
- [100] M. Kopečná, M. Macháček, E. Prchalová, P. Štěpánek, P. Drašar, M. Kotora, K. Vávrová, Galactosyl Pentadecene Reversibly Enhances Transdermal and Topical Drug Delivery, *Pharm Res* 34 (2017) 2097–2108. <https://doi.org/10.1007/S11095-017-2214-3>.
- [101] M. Kopečná, M. Macháček, E. Prchalová, P. Štěpánek, P. Drašar, M. Kotora, K. Vávrová, Dodecyl Amino Glucoside Enhances Transdermal and Topical Drug Delivery via Reversible Interaction with Skin Barrier Lipids, *Pharm Res* 34 (2017) 640–653. <https://doi.org/10.1007/S11095-016-2093-Z>.
- [102] J. Novotný, P. Kovaříková, M. Novotný, B. Janůšová, A. Hrabálek, K. Vávrová, Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation

- enhancers: Effects of linking chain length, chirality and polyfluorination, *Pharm Res* 26 (2009) 811–821. <https://doi.org/10.1007/S11095-008-9780-3>.
- [103] M. Novotný, J. Klimentová, B. Janůšová, K. Palát, A. Hrabálek, K. Vávrová, Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action, *Journal of Controlled Release* 150 (2011) 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.017>.
- [104] H.J. Cho, H.Y. Yoon, H. Koo, S.H. Ko, J.S. Shim, J.H. Lee, K. Kim, I. Chan Kwon, D.D. Kim, Self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-ceramide (HA-CE) and Pluronic® for tumor-targeted delivery of docetaxel, *Biomaterials* 32 (2011) 7181–7190. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.028>.
- [105] M. Licciardi, C. Scialabba, C. Sardo, G. Cavallaro, G. Giammona, Amphiphilic inulin graft co-polymers as self-assembling micelles for doxorubicin delivery, *J Mater Chem B* 2 (2014) 4262–4271. <https://doi.org/10.1039/c4tb00235k>.
- [106] B.H. Kim, J.M. Lee, Y.G. Jung, S. Kim, T.Y. Kim, Phytosphingosine derivatives ameliorate skin inflammation by inhibiting NF-κB and JAK/STAT signaling in keratinocytes and mice, *Journal of Investigative Dermatology* 134 (2014) 1023–1032. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.453>.
- [107] W.B. Guenther, Chemical Equilibrium Relations and the pH System, *Chemical Equilibrium* (1975) 9–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2163-7_2.
- [108] W.B. Guenther, Electronic Structure in Aqueous Acid–Base Chemistry, *Chemical Equilibrium* (1975) 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2163-7_1.
- [109] M.A. Fox, J.K. Whitesell, *Organic Chemistry*, 3rd ed., Jones and Bartlett Publishers, 2004.
- [110] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, J. Novotný, K. Kopecká, J. Šógorková, D. Šmejkalová, V. Velebný, Grafting of steroids to hyaluronan towards the design of delivery systems for antioxidants: The role of hydrophobic core, *Carbohydr Polym* 193 (2018) 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.021>.
- [111] M. D’Este, D. Eglin, M. Alini, A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water, *Carbohydr Polym* 108 (2014) 239–246. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.02.070>.
- [112] F. Picotti, M. Fabbian, R. Gianni, A. Sechi, L. Stucchi, M. Bosco, Hyaluronic acid lipolate: Synthesis and physicochemical properties, *Carbohydr Polym* 93 (2013) 273–278. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.04.009>.
- [113] K.M. Engstrom, A. Sheikh, R. Ho, R.W. Miller, The Stability of N,N-Carbonyldiimidazole Toward Atmospheric Moisture, *Org Process Res Dev* 18 (2014) 488–494. <https://doi.org/10.1021/OP400281H>.
- [114] Predikované pomocou nástroja ChemAxon <https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/chemicalterms/>, (2022).
- [115] I. Trabelsi, K. Essid, M.H. Frikha, Esterification of Mixed Carboxylic-fatty Anhydrides Using Amberlyst-15 as Heterogeneous Catalyst, *J Oleo Sci* 66 (2017) 667–676. <https://doi.org/10.5650/JOS.ESS17008>.

- [116] Y. Nishio, A. Kawazu, S. Hirano, H. Matsubara, Preparation of fluorous Yamaguchi reagents and evaluation of their reactivity in esterification, *Tetrahedron* 72 (2016) 720–725. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2015.12.026>.
- [117] P. Šedová, R. Buffa, S. Kettou, G. Huerta-Angeles, M. Hermannová, V. Leierová, D. Šmejkalová, M. Moravcová, V. Velebný, Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates, *Carbohydr Res* 371 (2013) 8–15. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2013.01.025>.
- [118] M.K. Cowman, T.A. Schmidt, P. Raghavan, A. Stecco, Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions, *F1000Res* 4 (2015). <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.6885.1>.
- [119] E. Kutálková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Ingr, G. Huerta-Ángeles, M. Hermannová, V. Velebný, The rate and evenness of the substitutions on hyaluronan grafted by dodecanoic acid influenced by the mixed-solvent composition, *Int J Biol Macromol* 189 (2021) 826–836. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.137>.
- [120] F. Gu, B.Z. Li, H. Xia, B. Adhikari, Q. Gao, Preparation of starch nanospheres through hydrophobic modification followed by initial water dialysis, *Carbohydr Polym* 115 (2015) 605–612. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.08.102>.
- [121] D. Kim, R. Amos, M. Gauthier, J. Duhamel, Applications of Pyrene Fluorescence to the Characterization of Hydrophobically Modified Starch Nanoparticles, *Langmuir* 34 (2018) 8611–8621. <https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.8B01591>.
- [122] V. Wintgens, S. Daoud-Mahammed, R. Gref, L. Bouteiller, C. Amiel, Aqueous polysaccharide associations mediated by β -cyclodextrin polymers, *Biomacromolecules* 9 (2008) 1434–1442. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bm800019g>.
- [123] E. Kutálková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Ingr, G. Huerta-Ángeles, M. Hermannová, V. Velebný, The rate and evenness of the substitutions on hyaluronan grafted by dodecanoic acid influenced by the mixed-solvent composition, *Int J Biol Macromol* 189 (2021) 826–836. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.137>.
- [124] L.N. Hassani, F. Hendra, K. Bouchemal, Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems, *Drug Discov Today* 17 (2012) 608–614. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2012.01.016>.
- [125] F. Ondreas, M. Dusankova, J. Sita, M. Cepa, J. Stepan, P. Belsky, V. Velebny, Self-assembly of hydrophobically modified hyaluronic acid, *Appl Surf Sci* 546 (2021) 149161. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2021.149161>.
- [126] N.B. Wyatt, C.M. Gunther, M.W. Liberatore, Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt, *Polymer (Guildf)* 52 (2011) 2437–2444. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2011.03.053>.
- [127] Y. Ji, W. Kang, L. Meng, L. Hu, H. Yang, Study of the solution behavior of β -cyclodextrin amphiphilic polymer inclusion complex and the stability of its O/W emulsion, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 453 (2014) 117–124. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2014.04.016>.

- [128] Y. Feng, L. Billon, B. Grassl, G. Bastiat, O. Borisov, J. François, Hydrophobically associating polyacrylamides and their partially hydrolyzed derivatives prepared by post-modification. 2. Properties of non-hydrolyzed polymers in pure water and brine, *Polymer (Guildf)* 46 (2005) 9283–9295. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2005.07.054>.
- [129] Y. Feng, B. Grassl, L. Billon, A. Khoukh, J. François, Effects of NaCl on steady rheological behaviour in aqueous solutions of hydrophobically modified polyacrylamide and its partially hydrolyzed analogues prepared by post-modification, *Polym Int* 51 (2002) 939–947. <https://doi.org/10.1002/PI.959>.
- [130] S. Pelletier, P. Hubert, E. Payan, P. Marchal, L. Choplin, E. Dellacherie, Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: Rheological properties, (2000). [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200101\)54:1<102::AID-JBM12>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200101)54:1<102::AID-JBM12>3.0.CO;2-1).
- [131] F.S. Palumbo, G. Pitarresi, D. Mandracchia, G. Tripodo, G. Giammona, New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization, *Carbohydr Polym* 66 (2006) 379–385. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2006.03.023>.
- [132] A. Plucinski, Z. Lyu, B.V.K.J. Schmidt, Polysaccharide nanoparticles: from fabrication to applications, *J Mater Chem B* 9 (2021) 7030–7062. <https://doi.org/10.1039/D1TB00628B>.
- [133] ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, (2009).
- [134] I. Murakami, Y. Wakasa, S. Yamashita, T. Kurihara, K. Zama, N. Kobayashi, Y. Mizutani, S. Mitsutake, T. Shigyo, Y. Igarashi, Phytoceramide and sphingoid bases derived from brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* activate peroxisome proliferator-activated receptors, *Lipids Health Dis* 10 (2011). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-150>.
- [135] Y. Uchida, Y. Il Kim, K. Park, Signaling roles of ceramide and its metabolites in cutaneous antimicrobial defense, *Dermatologica Sinica* 33 (2015) 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.04.004>.
- [136] S. Ganesh, A.K. Iyer, D. V. Morrissey, M.M. Amiji, Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors, *Biomaterials* 34 (2013) 3489–3502. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.077>.
- [137] N. You, S. Chu, B. Cai, Y. Gao, M. Hui, J. Zhu, M. Wang, Bioactive hyaluronic acid fragments inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via the Toll-like receptor 4 signaling pathway, (2020). <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0806-5>.
- [138] M.B. Brown, S.A. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 19 (2005) 308–318. <https://doi.org/10.1111/J.1468-3083.2004.01180.X>.

- [139] Y.-H. Liao, S.A. Jones, B. Forbes, G.P. Martin, M.B. Brown, Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery, *Drug Deliv* 12 (2005) 327–342. <https://doi.org/10.1080/10717540590952555>.
- [140] M. Sochorová, P. Audrlická, M. Červená, A. Kováčik, M. Kopečná, L. Opálka, P. Pullmannová, K. Vávrová, Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum, *J Colloid Interface Sci* 535 (2019) 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.09.104>.
- [141] M. Kopečná, M. Macháček, J. Roh, K. Vávrová, Proline, hydroxyproline, and pyrrolidone carboxylic acid derivatives as highly efficient but reversible transdermal permeation enhancers, *Scientific Reports* 2022 12:1 12 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24108-6>.
- [142] F. Lu, C. Wang, R. Zhao, L. Du, Z. Fang, X. Guo, Z. Zhao, Review of Stratum Corneum Impedance Measurement in Non-Invasive Penetration Application, *Biosensors* 2018, Vol. 8, Page 31 8 (2018) 31. <https://doi.org/10.3390/BIOS8020031>.
- [143] R. Mannweiler, S. Bergmann, S. Vidal-y-Sy, J.M. Brandner, D. Günzel, Direct assessment of individual skin barrier components by electrical impedance spectroscopy, *Allergy* 76 (2021) 3094–3106. <https://doi.org/10.1111/ALL.14851>.
- [144] A. Hrabálek, P. Doležal, K. Vávrová, J. Zbytovská, T. Holas, J. Klimentová, J. Novotný, Synthesis and enhancing effect of Transkarbam 12 on the transdermal delivery of theophylline, clotrimazole, flobufen, and griseofulvin, *Pharm Res* 23 (2006) 912–919. <https://doi.org/10.1007/S11095-006-9782-Y>.
- [145] K. Vávrová, A. Hrabálek, P. Doležal, Enhancement effects of (R) and (S) enantiomers and the racemate of a model enhancer on permeation of theophylline through human skin, *Arch Dermatol Res* 294 (2002) 383–385. <https://doi.org/10.1007/S00403-002-0344-9>.
- [146] M. Kopečná, M. Macháček, E. Prchalová, P. Štěpánek, P. Drašar, M. Kotora, K. Vávrová, Galactosyl Pentadecene Reversibly Enhances Transdermal and Topical Drug Delivery, *Pharm Res* 34 (2017) 2097–2108. <https://doi.org/10.1007/S11095-017-2214-3>.
- [147] Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD, 2004. <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>.
- [148] A. Götz, R. Nikzad-Langerodi, Y. Staedler, A. Bellaire, J. Saukel, Apparent penetration depth in attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of *Allium cepa* L. epidermis and cuticle, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 224 (2020) 117460. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2019.117460>.
- [149] C. Czekalla, K.H. Schönborn, J. Lademann, M.C. Meinke, Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender, *Skin Pharmacol Physiol* 32 (2019) 142–150. <https://doi.org/10.1159/000497475>.
- [150] Y. Gao, X. Wang, S. Chen, S. Li, X. Liu, Acute skin barrier disruption with repeated tape stripping: an in vivo model for damage skin barrier, *Skin Research and Technology* 19 (2013) 162–168. <https://doi.org/10.1111/SRT.12028>.

- [151] M. Kage, Y. Tokudome, F. Hashimoto, Permeation of hyaluronan tetrasaccharides through hairless mouse skin: An in vitro and in vivo study, *Arch Dermatol Res* 305 (2013) 69–77. <https://doi.org/10.1007/S00403-012-1252-2>.
- [152] J.W. Fluhr, H. Dickel, O. Kuss, I. Weyher, T.L. Diepgen, E. Berardesca, Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption, *British Journal of Dermatology* 146 (2002) 770–776. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2133.2002.04695.X>.
- [153] R. Mendelsohn, D.J. Moore, Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems, *Chem Phys Lipids* 96 (1998) 141–157. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00085-1).
- [154] D.J. Lyman, J. Murray-Wijelath, M. Feughelman, Effect of Temperature on the Conformation of Extended α -Keratin, *Applied Spectroscopy*, Vol. 55, Issue 5, Pp. 552-554 55 (2001) 552–554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1366/0003702011952343>.
- [155] E. Wojciechowska, M. Rom, A. Włochowicz, M. Wysocki, A. Wesełucha-Birczyńska, The use of Fourier transform-infrared (FTIR) and Raman spectroscopy (FTR) for the investigation of structural changes in wool fibre keratin after enzymatic treatment, *J Mol Struct* 704 (2004) 315–321. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2004.03.044>.
- [156] C. Czekalla, K.H. Schönborn, J. Lademann, M.C. Meinke, Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender, *Skin Pharmacol Physiol* 32 (2019) 142–150. <https://doi.org/10.1159/000497475>.
- [157] L. Norlén, Stratum corneum keratin structure, function and formation - A comprehensive review, *Int J Cosmet Sci* 28 (2006) 397–425. <https://doi.org/10.1111/J.1467-2494.2006.00345.X>.
- [158] Y. Wang, Z. Tang, X. Guo, Y. Zhao, S. Ren, Z. Zhang, H. Lv, Hyaluronic acid-cyclodextrin encapsulating paeonol for treatment of atopic dermatitis, *Int J Pharm* 623 (2022) 121916. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121916>.
- [159] W. He, X. Guo, L. Xiao, M. Feng, Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers, *Int J Pharm* 382 (2009) 234–243. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.07.038>.
- [160] Y. Wang, R.I. Boysen, B.R. Wood, M. Kansiz, D. McNaughton, M.T.W. Hearn, Determination of the secondary structure of proteins in different environments by FTIR-ATR spectroscopy and PLS regression, *Biopolymers* 89 (2008) 895–905. <https://doi.org/10.1002/BIP.21022>.

7 Zoznam publikovaných prác

- Juhaščík, M., Štarmanová, K., Brandejsová, M., Večeřová, P., Hermannová, M., Exnerová, A., Vagnerová, H., Štrympl, O., Nešporová, K., Kováčik, A., Velebný, V. & Huerta-Ángeles, G. (2023). Synthesis and self-assembling of hyaluronan grafted with ceramide NP for topical drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 121283. (D₁, IF=11,2)
- Juhaščík, M., Kováčik, A., & Huerta-Ángeles, G. (2022). Recent advances of hyaluronan for skin delivery: From structure to fabrication strategies and applications. *Polymers*, 14(22), 4833. (Q₁, IF=5,0)
- Engberg, O., Kováčik, A., Pullmannová, P., Juhaščík, M., Opálka, L., Huster, D., & Vávrová, K. (2020). The sphingosine and acyl chains of ceramide [NS] show very different structure and dynamics that challenge our understanding of the skin barrier. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(40), 17383-17387. (D₁, IF= 15,3)

8 Zoznam patentov

- Juhaščík M., Huerta-Ángeles G., Štarmanová K., Štěpán P., Exnerová A., Nešporová K., Kováčik A., Brandejsová M., Večeřová P., Polášková J., Hermannová M., Buffa R., Vágnerová H., Velebný V. (2023) Ester conjugate of sphingolipid and hyaluronan, method of synthesis thereof, composition containing thereof, use of conjugate or composition (Český patent číslo PV2023-171; [v schvaľovacom procese](#))

9 Zoznam konferenčných príspevkov

- 14th Postgraduate and Postdoc Conference (2024, Hradec Králové): „Hyaluronic acid grafted with ceramide NP as promising macromolecules for skin application“ – prednáška (3. miesto za najlepší príspevok)
- 39. Technologické Dni (2023, Bratislava): „Hyaluronic acid grafted with ceramide NP as promising macromolecules for skin application“ – prednáška
- Improving Drug Solubility: Recent Advances In Pharmaceutical Technology (2023, Hradec Králové): “Novel amphiphilic hyaluronan derivatives as promising macromolecules for skin application“ – poster
- 7. Česká lipidomická konference (2022, Hradec Králové): „Skin lipid models: a tool for the phase behavior and packing evaluation of different ceramides subtypes“ – poster
- 12th Postgraduate and Postdoc Conference (2021, Hradec Králové): Synthesis and study of amphiphilic derivatives of hyaluronic acid – prednáška

Príloha : Doplňujúce informácie k experimentálnej časti práce

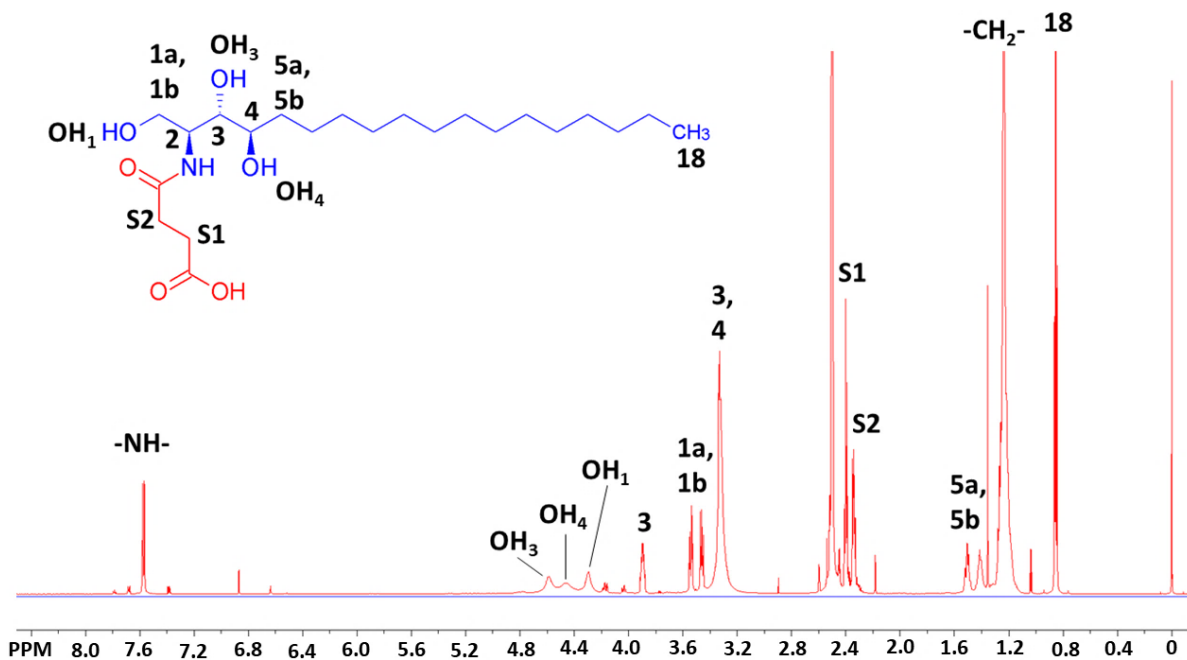
1. Štruktúrálna analýza pripravených látok

- **Obrázok P1.** Upravené ^1H NMR spektrum *N*-sukcinylfyfosfingozínu.
- **Obrázok P2.** FTIR spektrum *N*-sukcinylfyfosfingozínu.
- **Obrázok P3.** Upravené ^1H NMR spektrum *N*-maleinylfyfosfingozínu.
- **Obrázok P4.** FTIR spektrum *N*-maleinylfyfosfingozínu.
- **Tabuľka P1.** Laboratórne podmienky prípravy konjugátov linker-fyfosfingozínu s hyaluronanom.
- **Obrázok P5.** Porovnanie ^1H NMR spektier aktivačnej kinetiky *N*-sukcinylfyfosfingozínu s benzoyl-chloridom.
- **Obrázok P6.** ^1H NMR spektrum konjugátu *N*-sukcinylfyfosfingozínu s hyaluronanom.
- **Obrázok P7.** DOSY NMR spektrum konjugátu *N*-sukcinylfyfosfingozínu s hyaluronanom.
- **Obrázok P8.** FTIR spektrum konjugátu *N*-sukcinylfyfosfingozínu s hyaluronanom.
- **Obrázok P9.** Upravené ^1H NMR spektrum sukcinylceramidu.
- **Obrázok P10.** Upravené ^1H NMR spektrum maleinylceramidu.
- **Obrázok P11.** FTIR spektrum maleinylceramidu.
- **Obrázok P12.** Kinetika aktivačnej reakcie sCer vykonaná pomocou ^1H NMR spektroskopie.
- **Tabuľka P2.** Konverzia a stabilita zmiešaného anhydridu sukcinylceramidu s kyselinou benzoovou.
- **Obrázok P13.** FTIR spektrum izolovaných produktov aktivačnej reakcie sukcinylceramidu s benzoyl-chloridom.
- **Obrázok P14.** DOSY NMR spektrum produktov aktivačnej reakcie sukcinylceramidu s benzoyl-chloridom.
- **Tabuľka P3.** Optimalizácia reakčných podmienok prípravy konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Obrázok P15.** Porovnanie ^1H NMR spektier konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (6 kgmol^{-1}) a hyaluronanu (6 kgmol^{-1}) pred modifikáciou.
- **Obrázok P16.** Upravené HSQC NMR spektrum konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Obrázok P17.** FTIR spektrum konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Obrázok P18.** Tandemové hmotnostné spektrum (MS/MS) konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Obrázok P19.** DOSY NMR spektrum konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Tabuľka P4.** Termogravimetrická analýza vybraných vzoriek.

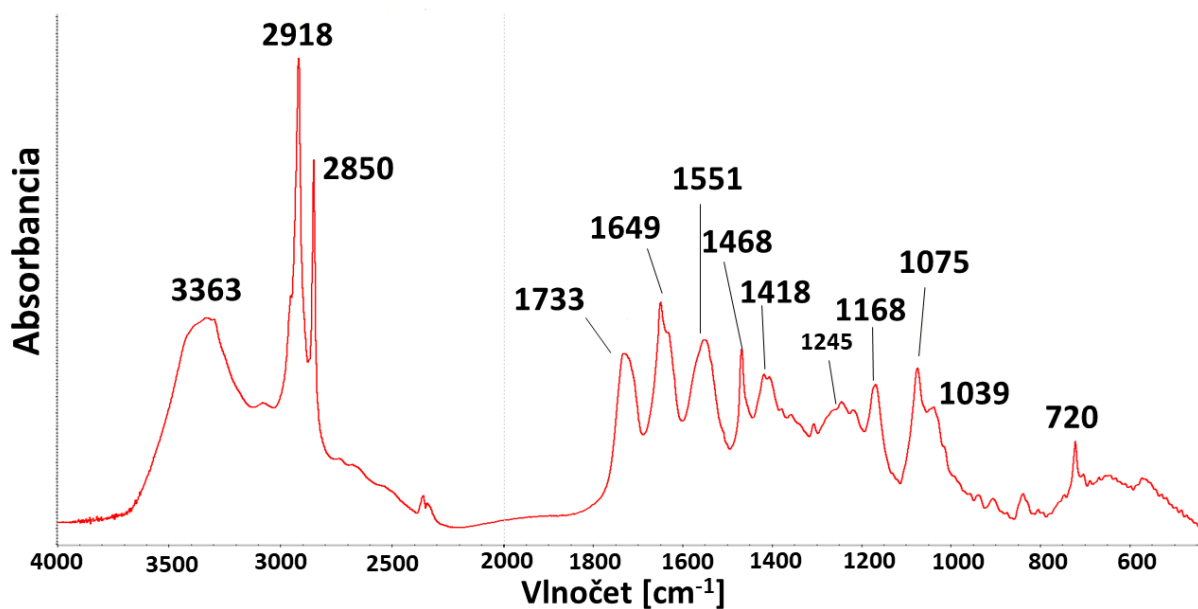
2. Charakteristika a hodnotenie pripravených konjugátov

- **Obrázok P20.** Vzorové stanovenie väzbovej konštanty pyrénu K_B .
- **Obrázok P21.** Reologická charakterizácia konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom.
- **Obrázok P22.** Časový priebeh zastúpenia konformácie keratínu β -skladaného listu izolovanej ľudskej kože.

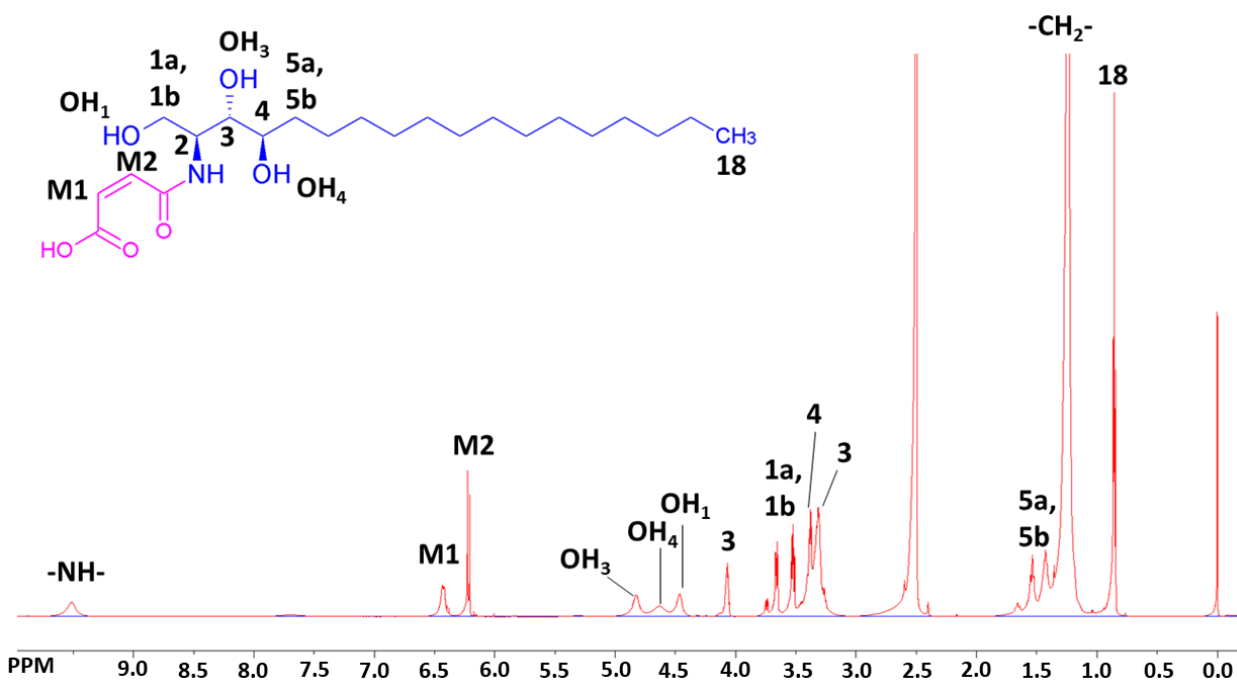
3. Literatúra



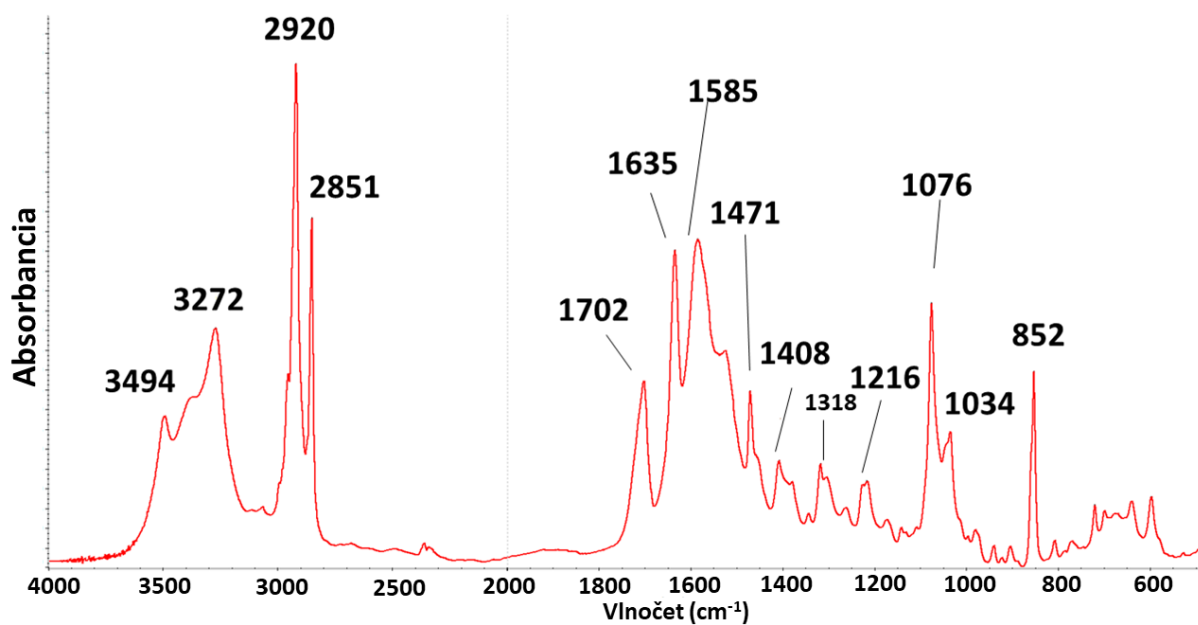
Obrázok P1. Upravené ^1H NMR spektrum *N*-sukcinylfyotosfingozínu (sP) zaznamenané v $\text{DMSO-}d_6$. Vľavo hore je zobrazená označená štruktúra sP, kde je modrou farbou zvýraznený fyotosfingozín a červenou farbou je zvýraznený naviazaný sukcinátový linker. Označenie jednotlivých protónov je ďalej priradené k signálom na ^1H NMR spektre.



Obrázok P2. FTIR spektrum *N*-sukcinylfyotosfingozínu.



Obrázok P3. Upravené ^1H NMR spektrum *N*-maleinylfytofosfingozínu (mP) zaznamenané v $\text{DMSO-}d_6$. Vľavo hore je zobrazená označená štruktúra mP, kde je modrou farbou zvýraznený fytofosfingozín a fialovou farbou je zvýraznený naviazaný maleinátový linker. Označenie jednotlivých protónov je ďalej priradené k signálom na ^1H NMR spektre.



Obrázok P4. FTIR spektrum *N*-maleinylfytofosfingozínu.

Tabuľka P1. Laboratórne podmienky prípravy konjugátov linker-fytosfingozínu s hyaluronanom (HA). CDI, karbonyldiimidazol; DMSO, dimetylsulfoxid; DMAP, 4-dimetylamínopyridín; DMTMM, 4-(4,6-dimetoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-metylmorfolínium-chlorid; HA, hyaluronan; HSTU, *N,N,N',N'*-tetrametyl-*O*-(*N*-sukcinimidyl)urónium-hexafluorofosfát; sP, *N*-sukcinylfytosfingozín; mP, *N*-maleinylfytosfingozín; TEA, trietylamín.

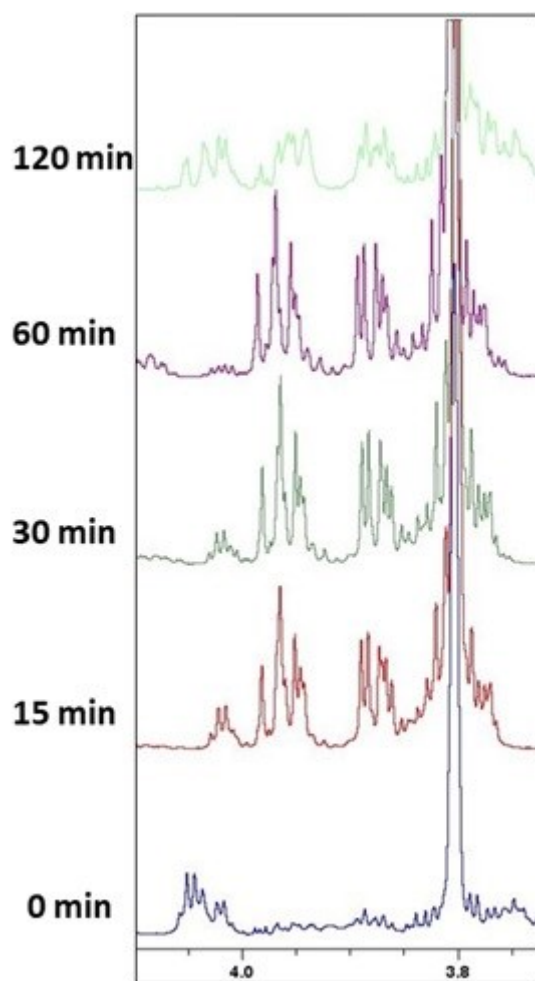
Hmotnosť HA [mg]	HA Mw ¹ [kgmol ⁻¹]	DS [%]	Výťažok [g]	Reaktant	Rozpúšťa dlo	Ekv. reaktantu	Aktiv. činidlo	Báza	Báza ekv. ²	DMAP ekv.	Čas ³ [h/h]	Konc. HA [%]	Teplota ⁴
90	15	1	0,087	sP	DMSO	0,5	CDI	TEA	0/0,5	0	3/24	2,4	lab. t./lab. t.
279	15	1,9	0,310	sP	DMSO	0,5	CDI	TEA	0/0,5	0	3/24	5,0	60 °C/ lab. t.
60	15	3,0	0,059	sP	DMSO	0,2	HSTU	TEA	0,2/ 0,2	0,05	7/43	4,5	60 °C/ lab. t.
180	15	2,8	0,183	sP	DMSO	0,2	HSTU	TEA	0,2 / 0,2	0,05	7/88	5,5	60 °C/ lab. t.
60	15	1,4	0,053	mP	DMSO	0,2	HSTU	TEA	0,2/ 0,2	0,05	7/88	5,5	60 °C/ lab. t.
60	15	2,9	0,059	sP	DMSO	0,5	HSTU	TEA	0,5/ 1	0,05	7/67	2,5	60 °C/ lab. t.
60	15	3,1	0,055	sP	DMSO	0,5	HSTU	TEA	0,5/ 1	0,05	7/67	2,5	60 °C/ lab. t.
60	15	0	0,059	sP	H ₂ O	0,2	DMMTM	TEA	2/3	0,1	2/24	4,5	lab. t./ lab.t.

¹ Bola použitá kyslá forma HA

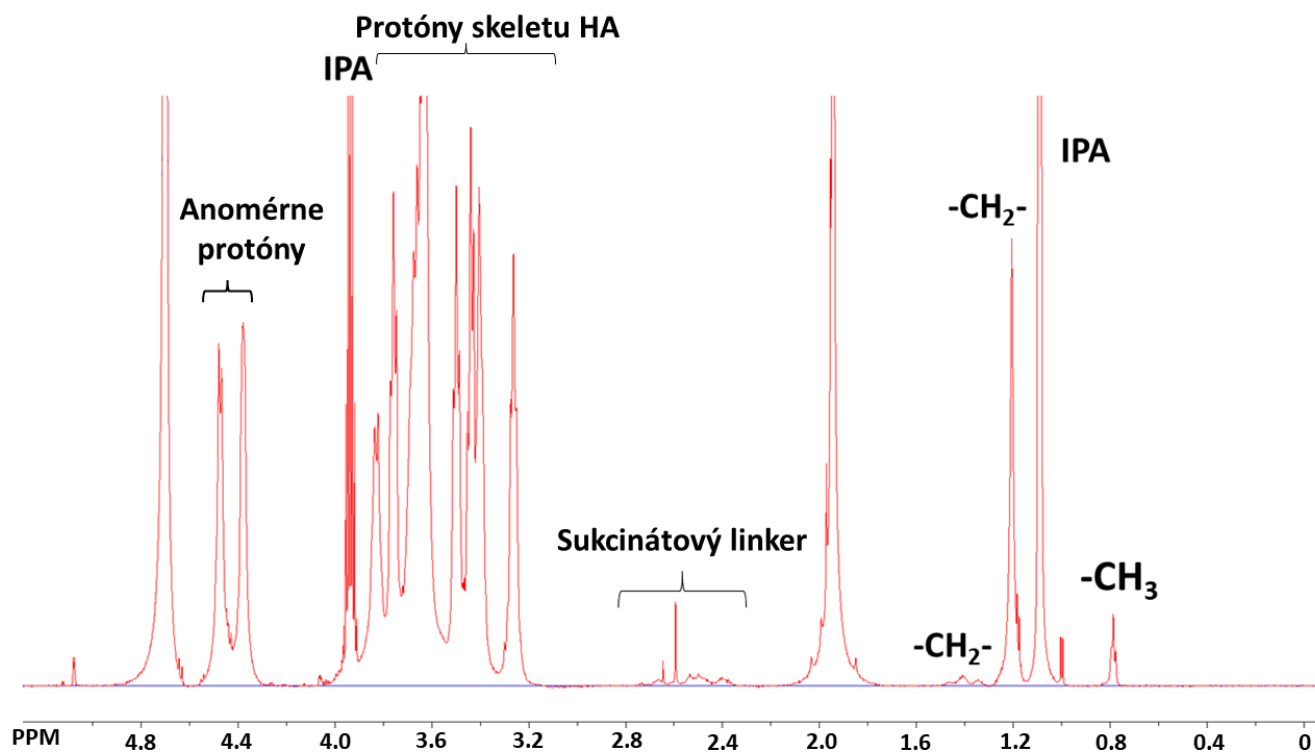
² Molárny ekvivalent aktivácie/ acylácie

³ Reakčný čas aktivácie/ acylácie

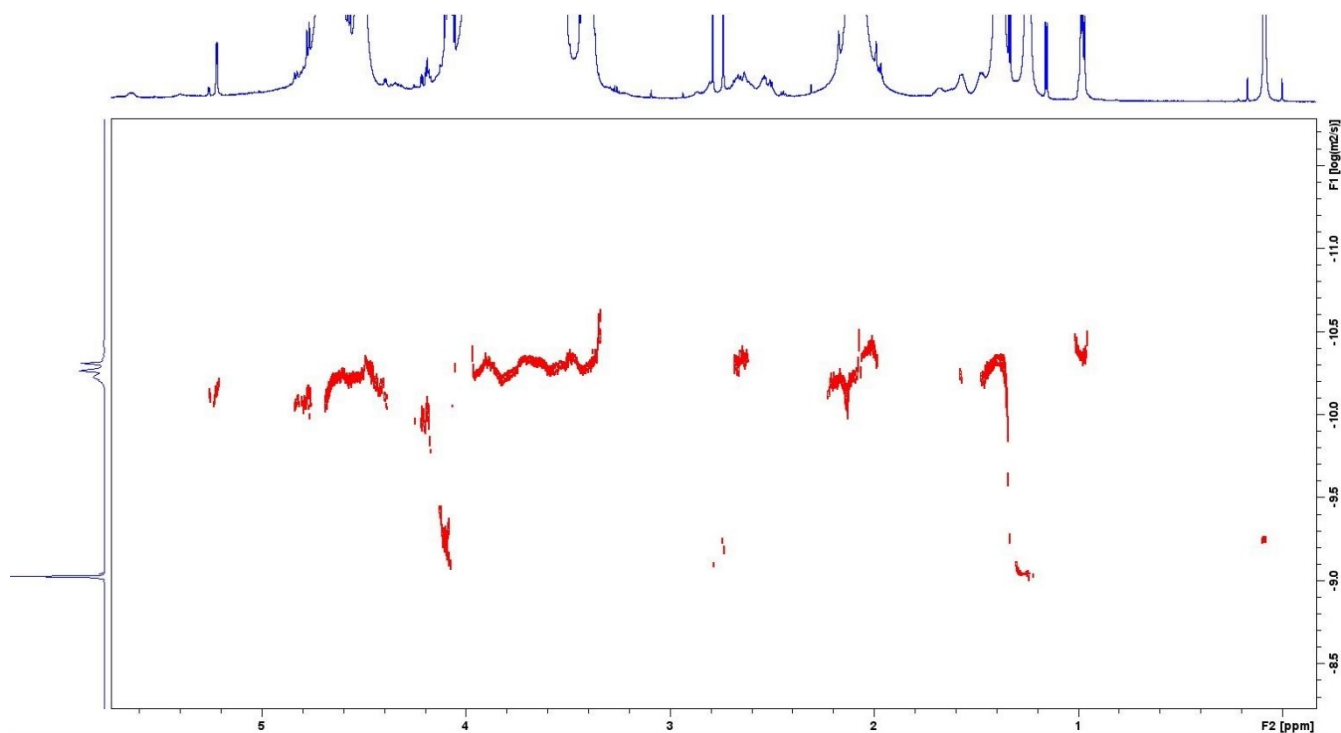
⁴ Reačná teplota aktivácie/ acylácie



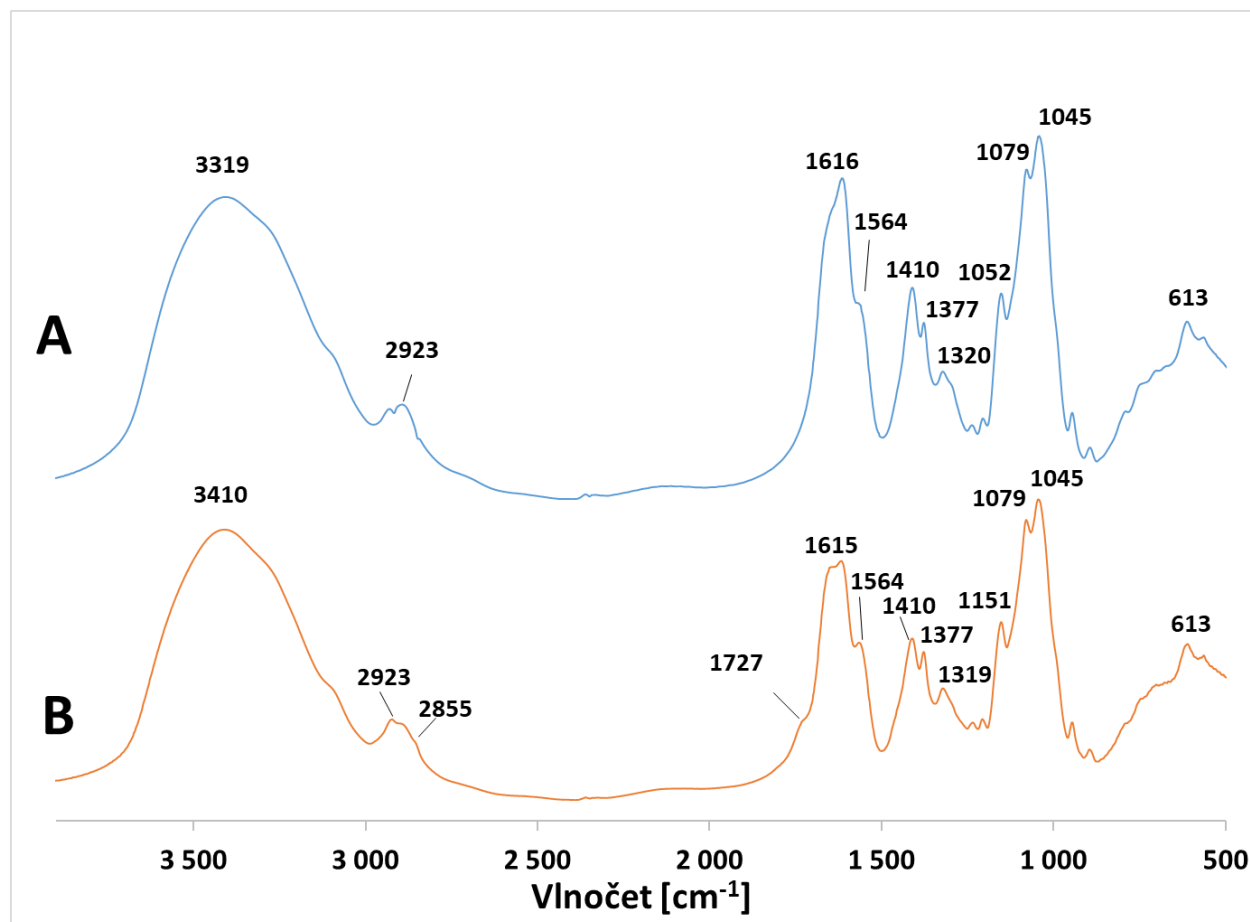
Obrázok P5. Porovnanie ¹H NMR spektier aktivačnej kinetiky *N*-sukcinylfytoingosínu pri použití jedného molárneho ekvivalentu benzoyl-chloridu a trietylamínu v izopropanole-*d*₈ pri 40 °C. Na výseku spektra je možné pozorovať posun diastereotopických protónov (3.87 a 3.97 ppm), ktorý značí modifikáciu primárnej hydroxylovej skupiny.



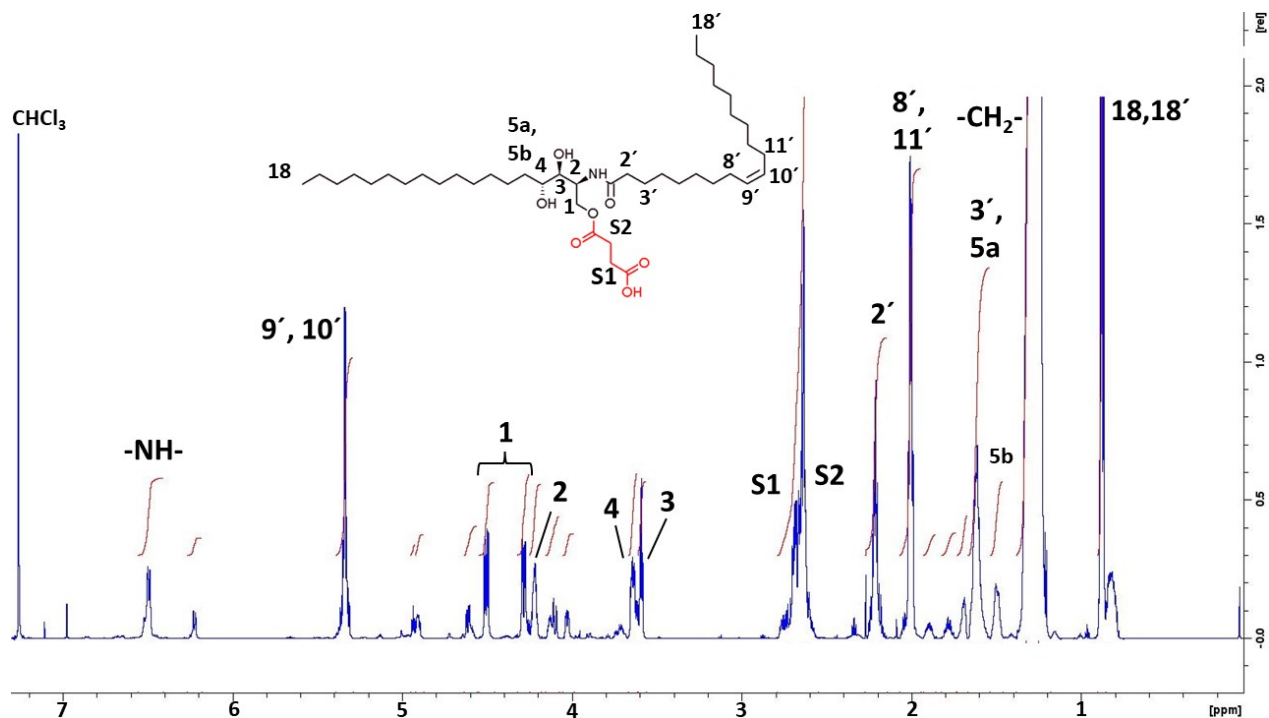
Obrázok P6. ^1H NMR spektrum konjugátu *N*-sukcinylfytophingosínu s hyaluronanom. Metylová skupina a metylénové skupiny, ktoré hyaluronan neobsahuje svedčia o jeho modifikácii, rovnako ako protóny sukcinátového linkera, ktoré nie sú prítomné ako singlet. IPA, izopropanol.



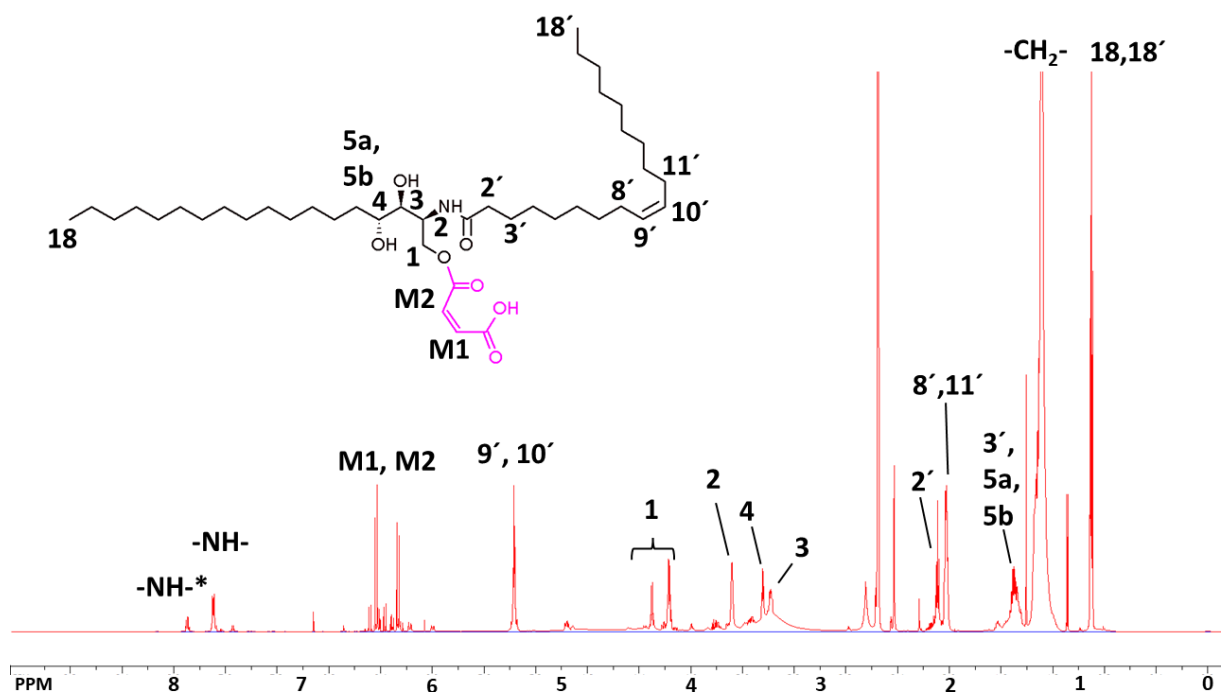
Obrázok P7. DOSY NMR spektrum konjugátu *N*-sukcinylfyfosfingozínu s HA (HA-sP) zaznamenané v D₂O: acetonitril-*d*₃, 4:1. Jedna línia v spektre, predovšetkým koncovej metylovej skupiny, ktorá rezonuje v oblasti okolo 0.8-0.9 ppm, naznačuje, že modifikácia HA prebehla úspešne.



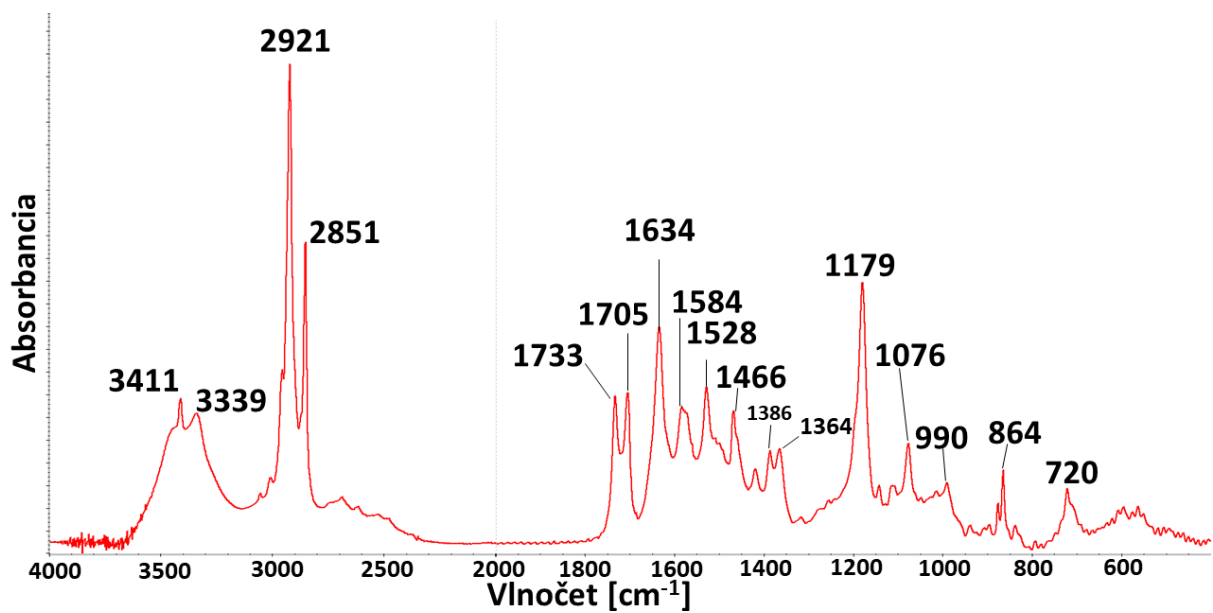
Obrázok P8. FTIR spektrum A) nemodifikovanej HA (6 kgmol^{-1}); a FTIR spektrum B) konjugát *N*-sukcinylfyfosfingozínu (HA-sP; 15 kgmol^{-1} , DS = 3,1 %). Na spektre HA-sP pribudol absorpčný pás metylénovej valenčnej vibrácie s maximom 2855 cm^{-1} . Taktiež je prítomné rameno absorpčného pásu približne pri 1727 cm^{-1} , ktoré naznačuje vznik esterovej väzby. Na to aby bolo maximum jasne viditeľné by však bol potrebný vyšší stupeň substitúcie sfingolipidového substituentu.



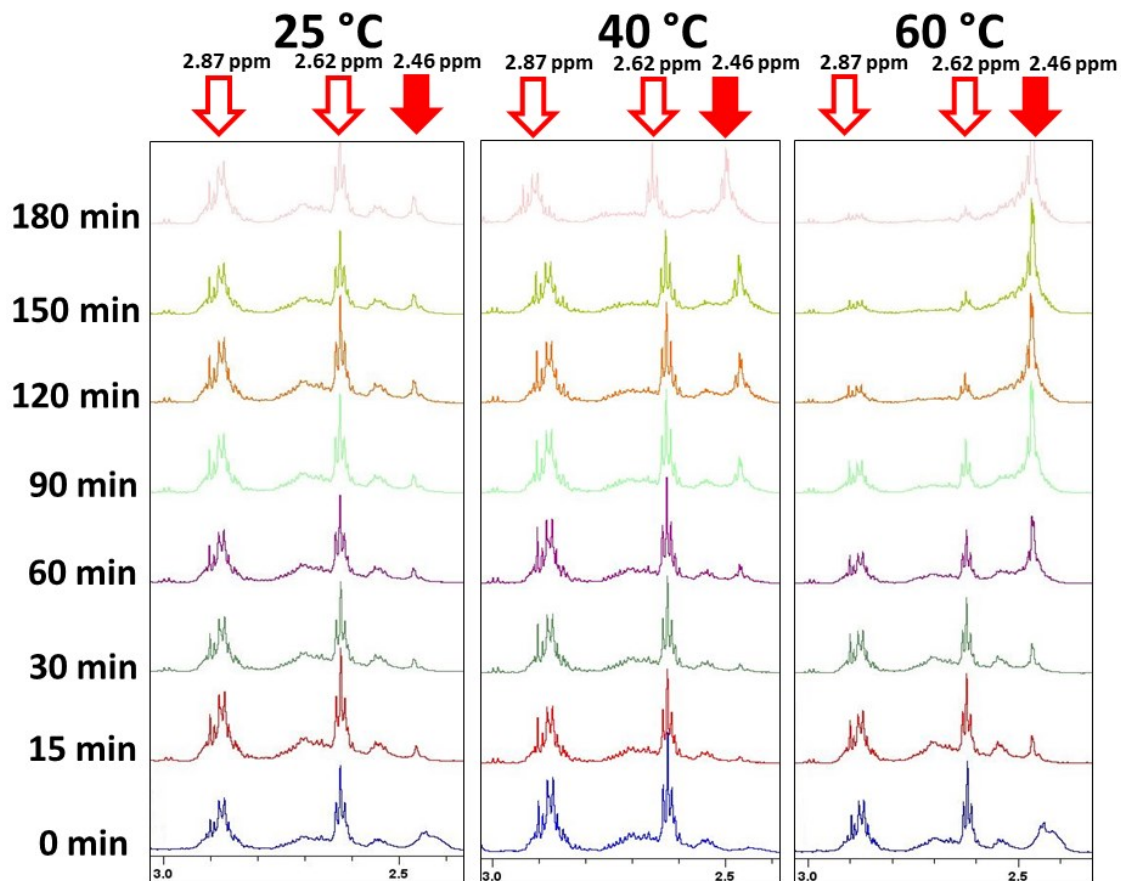
Obrázok P9. Upravené ^1H NMR spektrum sukcinylceramidu (sCer) zaznamenané v CDCl_3 . V strede v hornej časti je zobrazená označená štruktúra sCer, kde je čiernou farbou znázornený ceramid a červenou farbou je zvýraznený naviazaný sukcinátový linker. Označenie jednotlivých protónov je ďalej priradené k signálom na ^1H NMR spektre.



Obrázok P10. Upravené ^1H NMR spektrum maleinylceramidu (mCer) zaznamenané v CDCl_3 . V strede v hornej časti je zobrazená označená štruktúra mCer, kde je čiernou farbou znázornený ceramid a fialovou farbou je zvýraznený naviazaný maleinátový linker. Označenie jednotlivých protónov je ďalej priradené k signálom na ^1H NMR spektre.



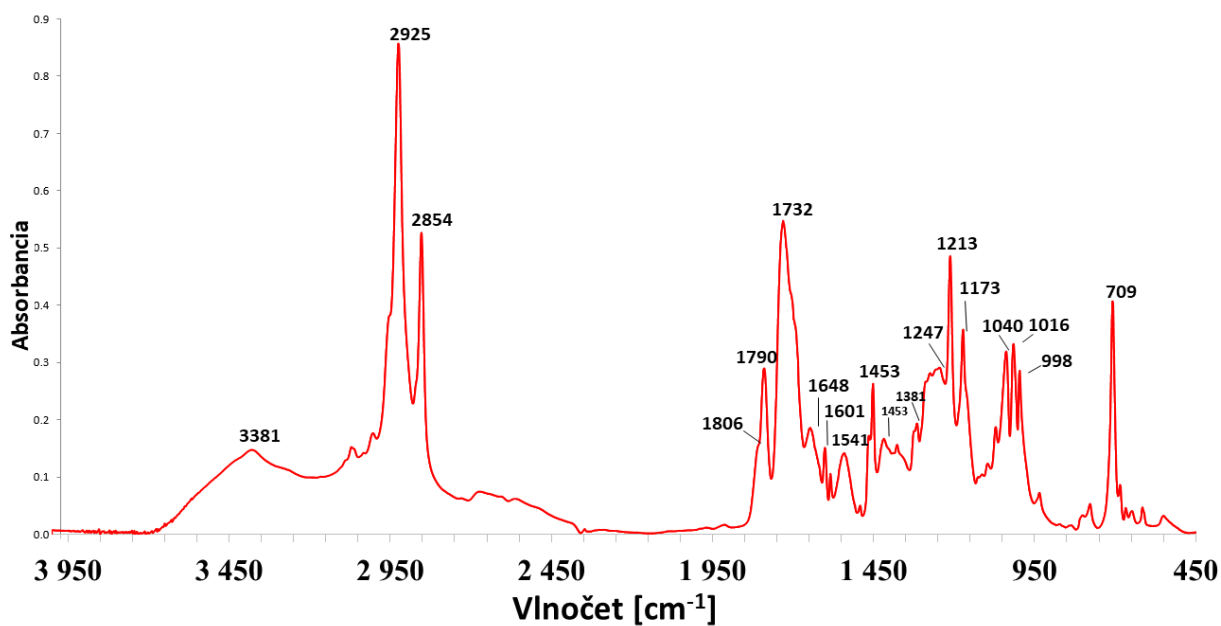
Obrázok P11. FTIR spektrum maleinylceramidu.



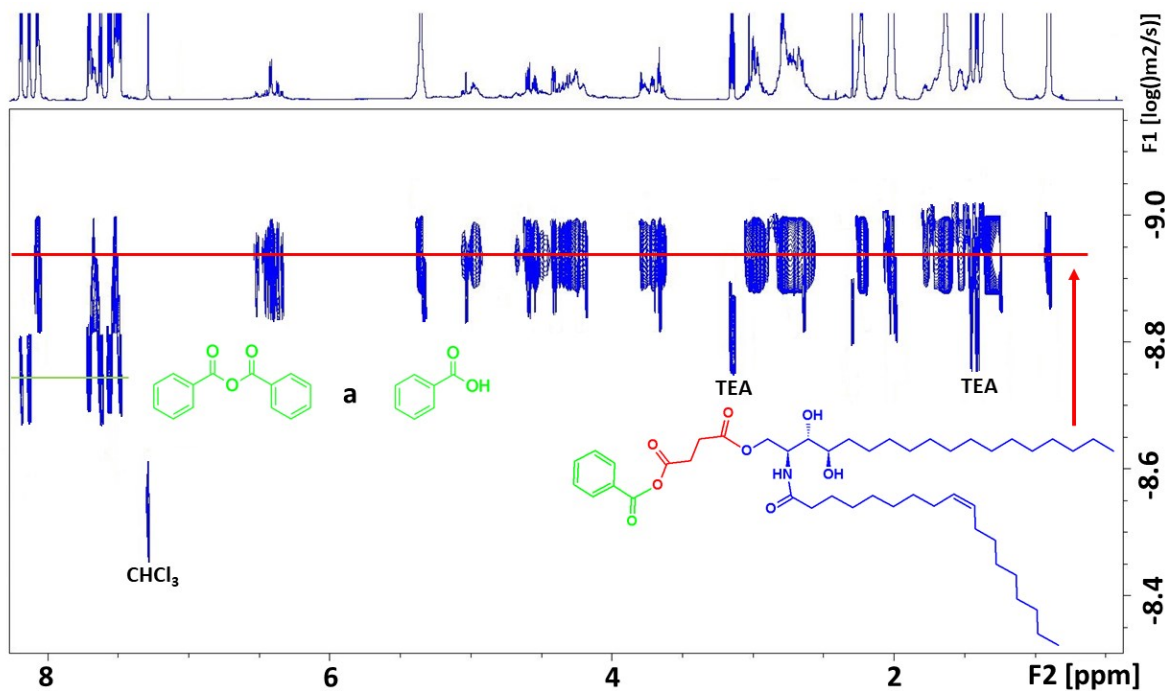
Obrázok P12. Kinetika aktivačnej reakcie sCer vykonaná pomocou ¹H NMR spektroskopie v prostredí izopropanolu-*d*₈. Signály protónov pri 2.87 a 2.62 ppm (červená šípka bez výplne) predstavujú protóny -CH₂- pri anhydridovej skupine. Protóny s posunom 2.46 ppm (červená šípka s výplňou) predstavujú degradačný produkt.

Tabuľka P2. Konverzia a stabilita zmiešaného anhydridu sukcinylceramidu s kyselinou benzoovou vyjadrená v % pri rôznych teplotách. Uvedené hodnoty boli vypočítané z integrálu signálu protónov v ^1H NMR spektier získaných v jednotlivých časoch, ktorý rezonuje pri 2.87 ppm.

Konverzia zmiešaného anhydridu [%]			
Čas	25 °C	40 °C	60 °C
15 min	91,50	99,50	77,50
30 min	89,50	99,00	73,50
45 min	89,00	97,00	60,00
60 min	88,50	96,50	59,50
90 min	88,50	89,50	49,50
120 min	87,00	86,50	37,50
150 min	87,50	80,00	28,50
180 min	85,50	74,00	23,50



Obrázok P13. FTIR spektrum izolovaných produktov aktivačnej reakcie sukcinylceramidu pomocou benzoyl-chloridu prevedenej v tetrahydrofuráne pri 40 °C.



Obrázok P14. DOSY NMR spektrum produktov aktivačnej reakcie sukcinylceramidu s benzoyl-chloridom. Červená čiara zobrazuje zmiešaný anhydrid sCer a benzoovej kyseliny. Zelená čiara zobrazuje benzoylanhydrid a benzoovú kyselinu. TEA, trietylamín.

Tabuľka P3. Optimalizácia reakčných podmienok prípravy konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom. Metodika zmiešaných anhydridov ukázala zanedbateľné zníženie molekulovej hmotnosti (M_w). V niektorých prípadoch sa M_w mierne zvýšila, čo bolo pravdepodobne spôsobené agregáciou polymérnych reťazcov. V prípade HA so strednou M_w ($\geq 200 \text{ kgmol}^{-1}$) mohli reakčné podmienky spôsobiť degradáciu (vstupy 20 - 22). V niektorých prípadoch sa však M_w nedala presne určiť v dôsledku výraznej agregácie a interakcie amfifilného polysacharidu s chromatografickou kolónou, čo je pre podobné modifikácie charakteristické. DS, stupeň substitúcie; sCer, sukcinylceramid.

Vstup ¹	Mw ² [kgmol ⁻¹]	Mw ³ [kgmol ⁻¹]	Konc.	Ekv. ⁴	Konverzia	DS	Výťažok [%]
			[%]	(sCer)	[%]	[%]	
tetrahydrofurán							
1	6	-	3	0,75	16,4	12,3±0,54	99
2		5,6	4	0,4	20,8	8,3±0,41	98
3		10,2		0,5	16,0	8,0±0,73	99
4		14,2	4	1	14,0	14,0±0,57	99
5		-	5		10	10±0,5	99
6		-	6		2,7	2,7±0,3	99
7	9	-	4,5		0,5	12	6,0±0,75
8	15	-	2	0,5	10,6	5,3±0,2	98
9		11,7	2,5	0,25	13,2	3,3±0,10	99
10		16,2	2,5	0,6	11,5	6,9±0,17	98
11		-	5	0,5	5,2	2,6	99
12		-	6		Bez reakcie	~0,26	99
13		188	184,4		1	7,4	3,7±0,51
14	268	298,5	1		4	2,0±0,72	82
15	340	-	0,75	2,8	3,3	62	
16		-	1	9,6	4,8	33	
17		-	1,5	2,4	1,6	98	
18		-	2	0,9	1,8	54	
19		-	3	Bez reakcie	~0,6 ⁵	86	
20	416	279,4	1	3,4	2,7±0,70	72	
1,4-dioxán							
21	6	-	6	1	2,7	2,7 ± 0,3	99
22	15	-	6		3,9	3,9	97
terc-butanol							
23	6	-	6	1	3,3	3,3 ± 0,3	99
izopropanol							
24	6	-	4	0,4	16,3	6,5±0,35	94
25	9	10	4,5	0,5	11,4	5,7±0,77	99
26		21	4,5	1	7,4	7,4±0,72	99
27	15	-	4,5	0,25	9,6	2,7±0,3	99

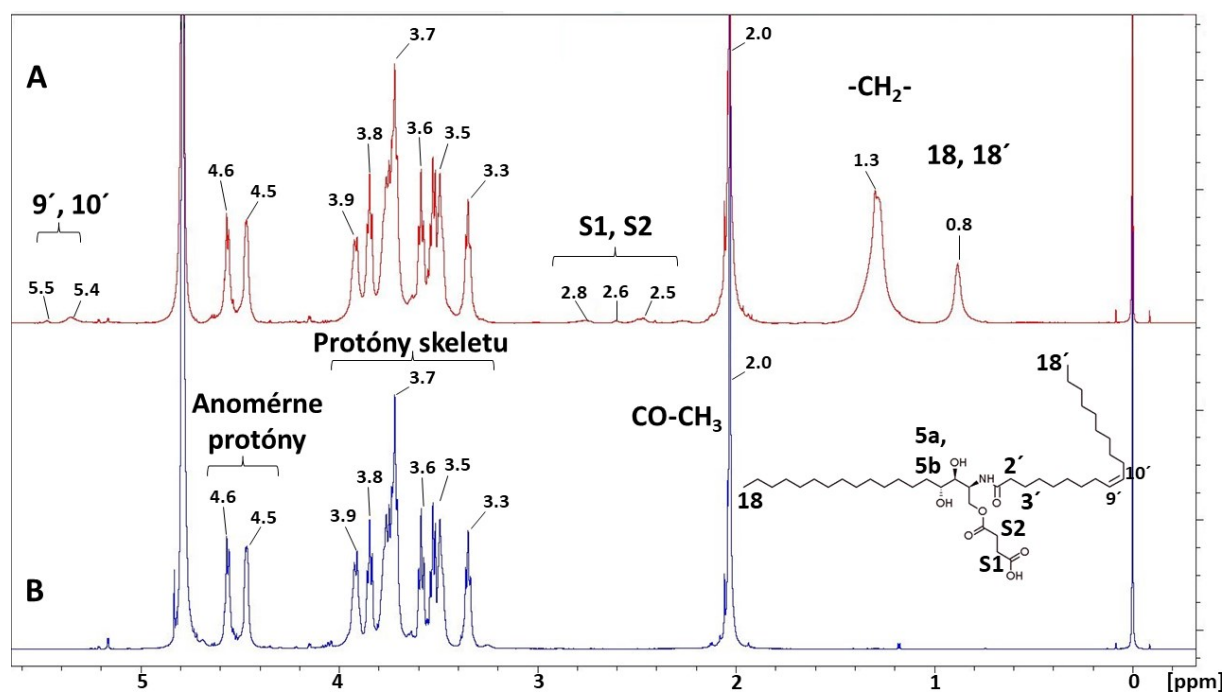
¹Aktivačná reakcia prebiehala pri 40 °C počas 30 minút v THF alebo IPA. Acylácia HA prebiehala 2 h pri 25 °C. Vybrané reakcie boli pripravené 5-krát a hodnota DS reprezentuje priemer s odchýlkou vyjadrenou ako SD.

²Mw HA použitej na acyláciu.

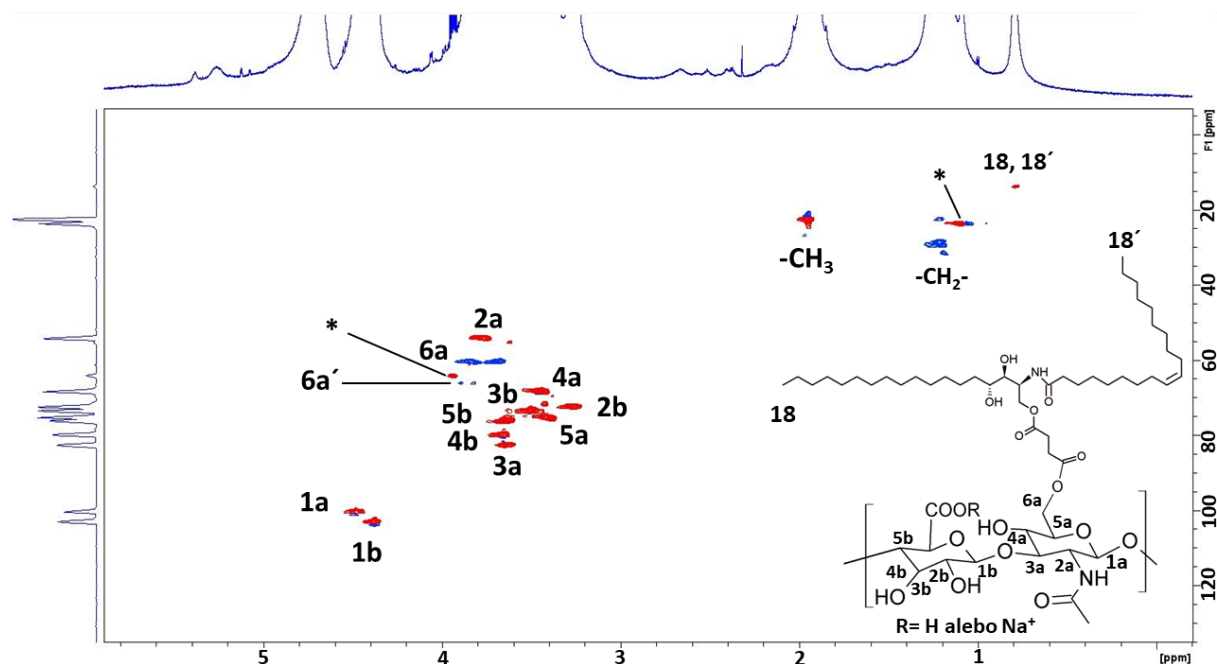
³Mw modifikovanej HA.

⁴Molárny ekvivalent sCer vzťahnutý k disacharidovej jednotke HA.

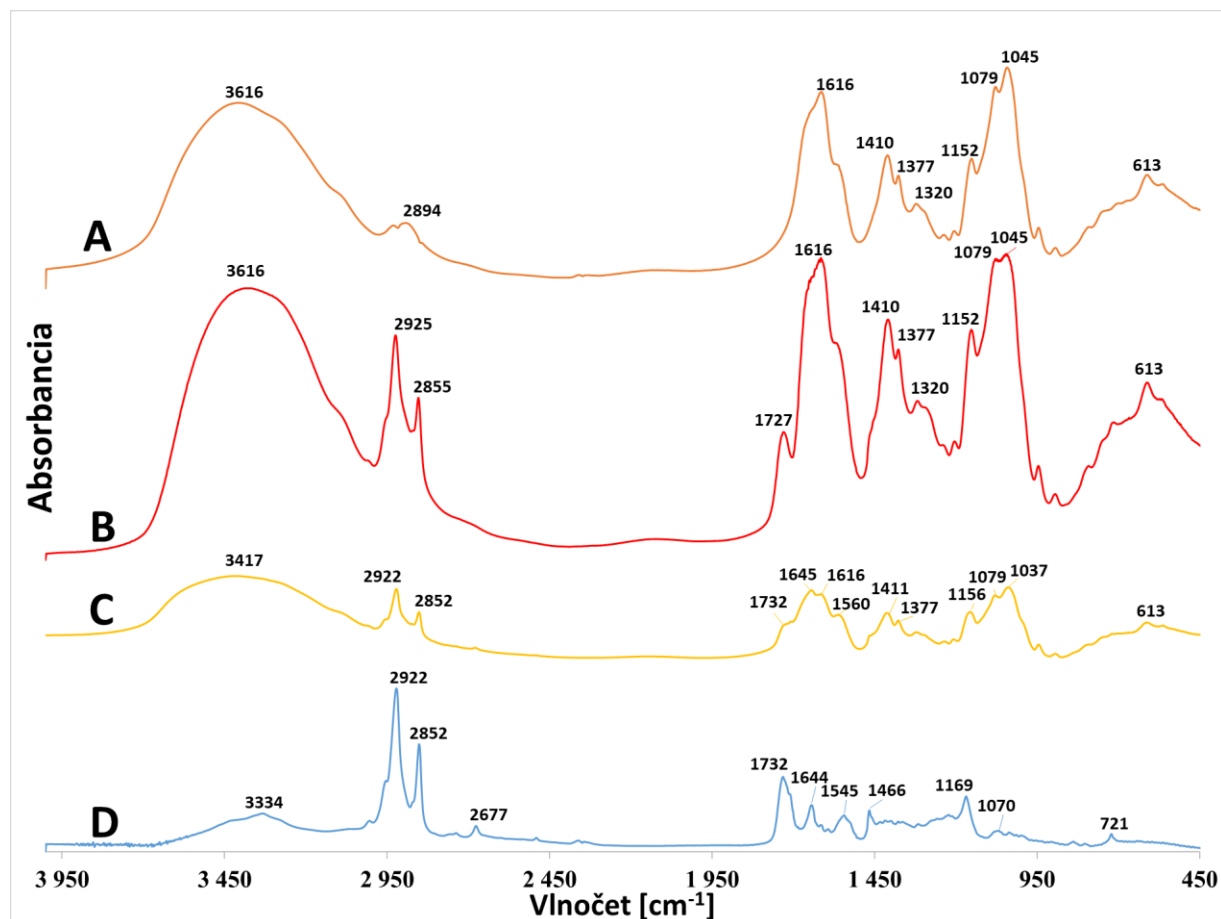
⁵ Voľný succinylceramid je prítomný v produkte ale reakcia neprebehla.



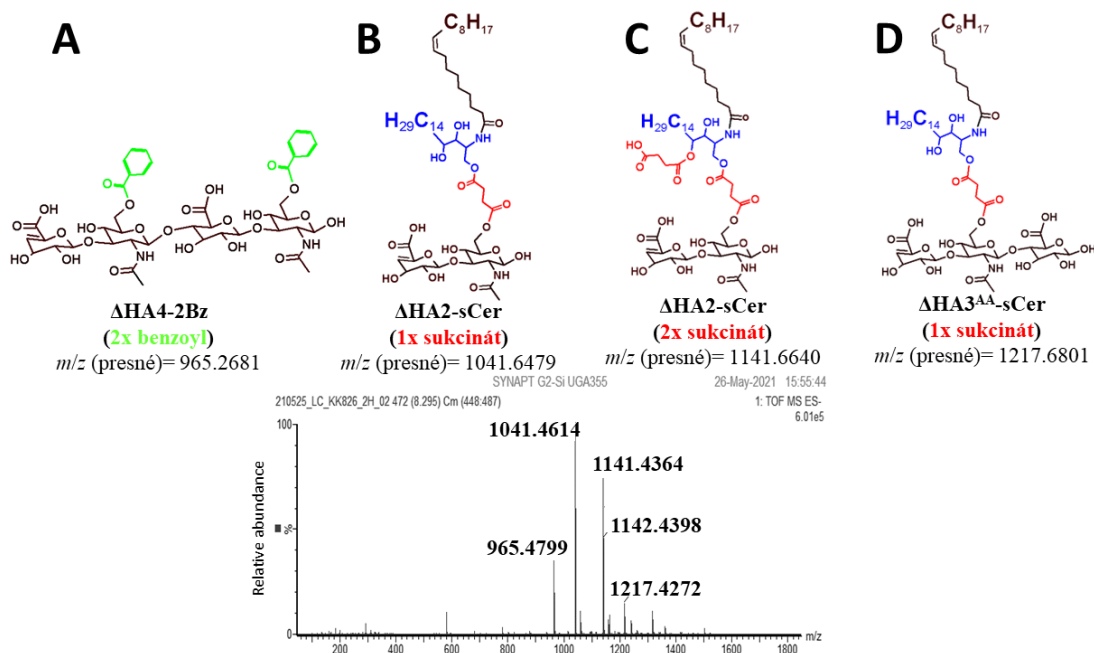
Obrázok P15. Porovnanie ^1H NMR spektier konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 6 kgmol^{-1}) (spektrum A); a hyaluronanu (6 kgmol^{-1}) pred modifikáciou (spektrum B). Obe spektrá boli zaznamenané v D_2O . Pri 2.0 ppm je prítomný signál patriaci skupine $-\text{NCOCH}_3$, skeletovým protónom patria signály v rozmedzí 3.4-3.9 ppm a anomérnym protónom sú priradené signály v rozsahu 4.4-4.6 ppm. Signály patriace sCer ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{}$ skupiny), majú priradené protóny pri 0.9; 1.3; 2.9-2.4; 5.4 a 5.5 ppm.



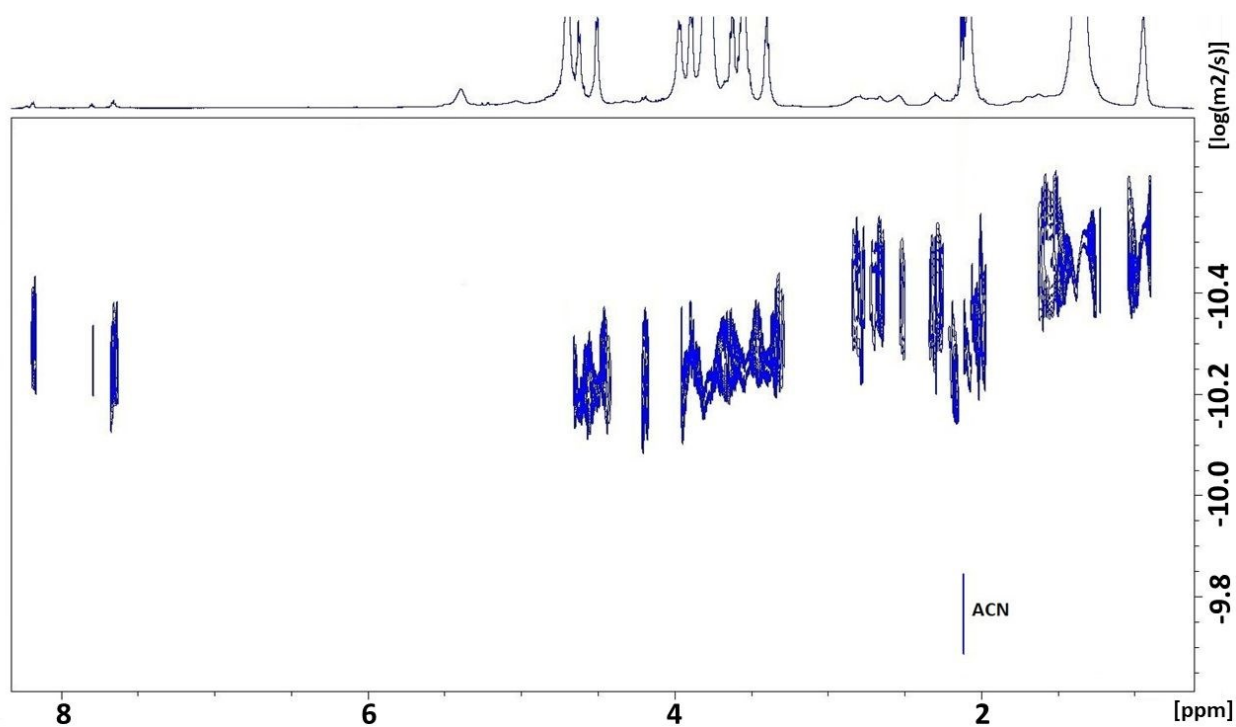
Obrázok P16. Upravené HSQC NMR spektrum konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer) zaznamenané v D₂O s priradenými signálmi do štruktúry modifikovaného disacharidového monoméru HA-sCer. Na spektre je možné pozorovať odtienenie protónov, ktoré zodpovedajú polohe 6a (z 3.8 a 3.7 ppm na 3.8 a 3.9 ppm a z 60.5 na 66.0 ppm), čo potvrdzuje prítomnosť kovalentnej väzby primárnych hydroxyloch HA v polohe C₆ N-acetyl-D-glukózamínu. * - reziduálny izopropanol.



Obrázok P17. FTIR spektrum A) natívneho hyaluronanu (HA; 6 kgmol⁻¹), B) konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer; 5,6 kgmol⁻¹), C) fyzikálnej zmesi sukcinylceramidu (sCer) a HA (6 kgmol⁻¹); a D) sCer. Pre hydrofobizované deriváty HA sú typické výrazné metylénové vibrácie nadobudnuté naviazaním alifatických reťazcov. Preto možno pozorovať absorpčné pásy v oblasti 2922 cm⁻¹ (asymetrická valenčná vibrácia -CH₂-), 2852 cm⁻¹ (symetrická valenčná vibrácia -CH₂-), 1466 cm⁻¹ (nožnicová vibrácia -CH₂-) a 721 cm⁻¹ (kývavá vibrácia -CH₂-). Absorpčný pás pri 1727 cm⁻¹ naznačuje tvorbu esterovej väzby [1]. Tento signál je možné pozorovať len pri DS vyššom ako 10 %, pretože signál sa prekrýva s vibráciou „Amid II“ HA.



Obrázok P18. Tandemové hmotnostné spektrum (MS/MS) konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer) v negatívnom režime po enzymatickej degradácii pomocou bakteriálnej lyázy hyaluronanu izolovanej zo *streptococcus pneumoniae* s detegovanými fragmentmi a s predpokladanou štruktúrou. Všetky doposiaľ uvedené metódy vznik kovalentnej väzby medzi sCer a HA len naznačovali. Na definitívne potvrdenie modifikácie bola použitá hmotnostná spektroskopia po predchádzajúcom naštípení reťazcov HA-sCer pomocou bakteriálnej lyázy. Lyáza štiepi β (1 \rightarrow 4) väzbu v HA, pričom vznikajú nenasýtené disacharidy HA s kyselinou glukurónovou na neredukujúcom konci. Konjugát HA-sCer bol analyzovaný pomocou kvapalinovej chromatografie-MS/MS experimentu v negatívnom móde. Najintenzívnejšie signály v MS/MS spektre možno priradiť modifikovanému nenasýtenému disacharidu HA (Δ HA2-sCer) s jedným sCer ako substituentom (m/z (presné)= 1041,6479; m/z (namerané)= 1041,4614 (štruktúra B)). Ako ďalšie boli pozorované nenasýtené tetrasacharidy HA (Δ HA4-2Bz) modifikované dvoma benzoylovými substituentmi (m/z (presné)= 965,2681; m/z (namerané)= 965,4799 (štruktúra A)). Dimér Δ HA2-sCer so substituentom sCer (m/z (presné)= 1141,6640; m/z (namerané) = 1141,4364; ktorý svedčil o diesterifikácii Cer (štruktúra C)). Identifikovaný bol aj modifikovaný nenasýtený trisacharid HA (Δ HA3AA-sCer) s jednou molekulou kyseliny jantárovej viazanou na sCer (m/z (presné)=1217,6801; m/z (namerané)=1217,4272 (štruktúra D)).

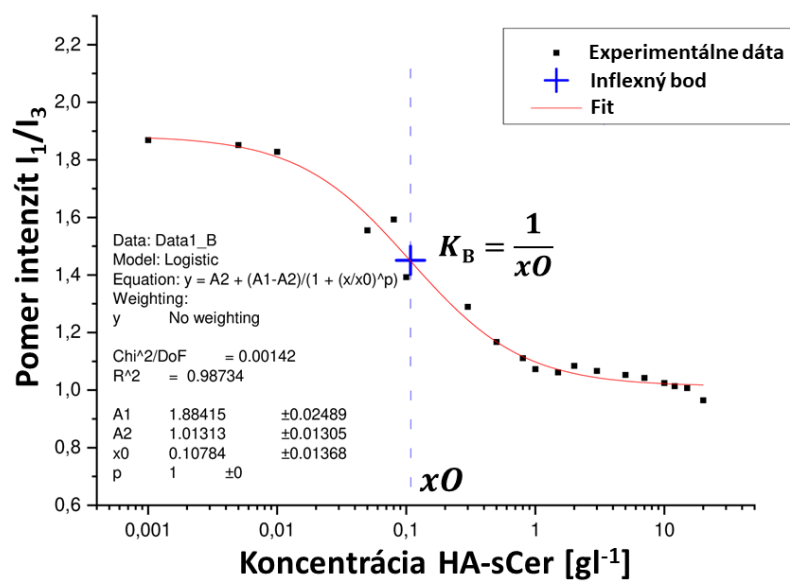


Obrázok P19. DOSY NMR spektrum konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer) zaznamenané v D₂O: acetonitril-*d*₃, 4:1 (v/v). Neprítomnosť jednej línie signálov naznačuje intenzívnu agregáciu polyméru v testovanom prostredí. ACN, acetonitril.

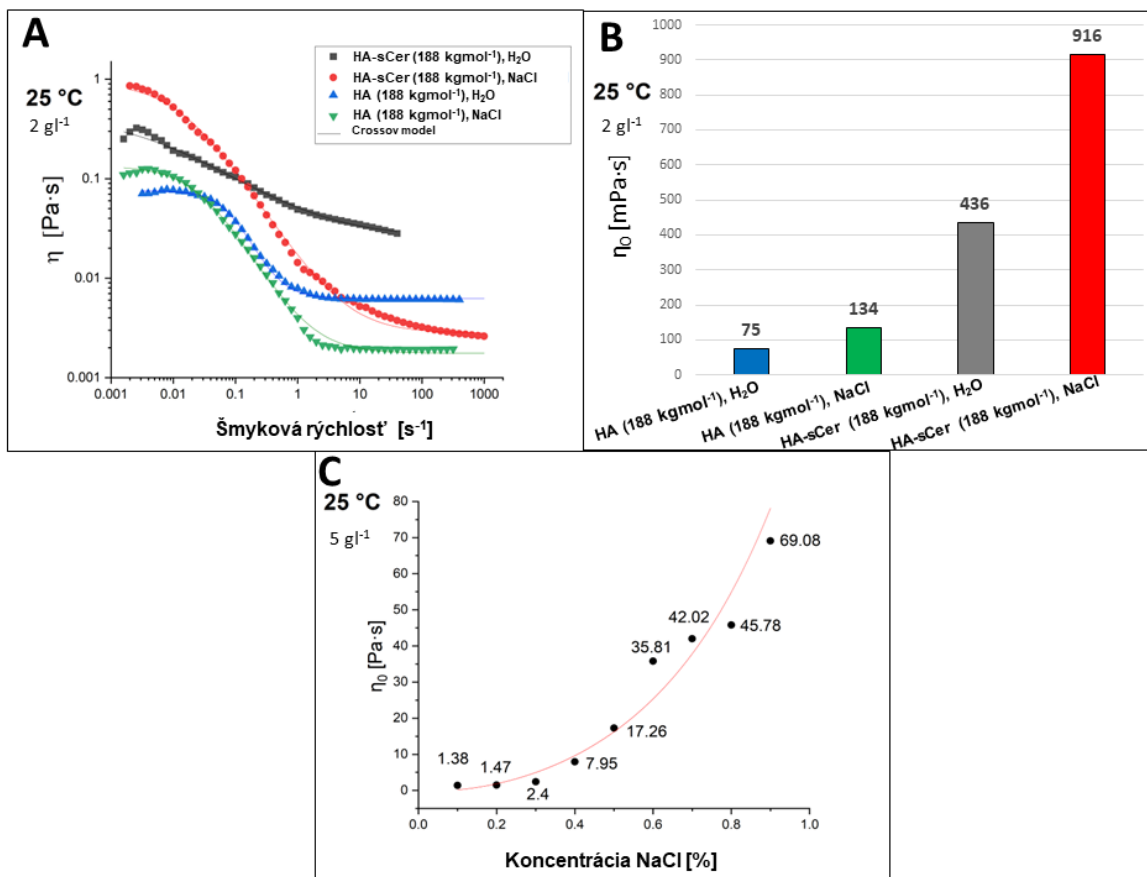
Tabuľka P4. Termogravimetrická analýza vybraných vzoriek. DS, stupeň substitúcie; IPA, isopropanol; Mw, molekulová hmotnosť, sCer, sukcinylceramid; THF, tetrahydrofurán.

Mw [kgmol ⁻¹]	DS [%]	Ekv. sCer	Použitý kosolvent	Sušina [%]	Popol prepočítaný na sušinu [%]
6	14,2	1,0	THF	92,4	5,4
6	12,0	0,6	THF	90,9	6,4
6	8,2	0,4	THF	90,4	7,4
6	9,8	0,75	IPA	91,6	7,7
9	6,2	0,50	IPA	90,5	0,0
9	6,9	0,75	IPA	90,2	0,0
9	8,0	1,00	IPA	89,5	0,0
15	3,2	0,25	THF	89,7	7,7
15	7,0	0,6	THF	90,4	8,3

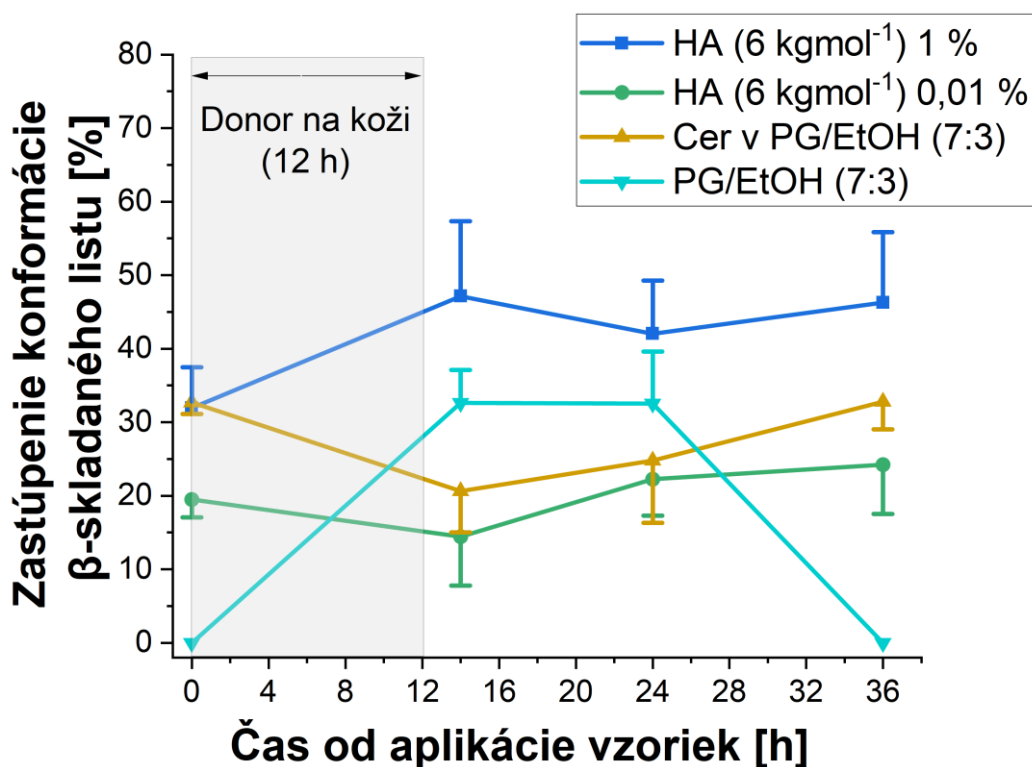
Stanovenie K_B



Obrázok P20. Vzorové stanovenie väzbovej konštanty pyrénu K_B .



Obrázok P21. Reologická charakterizácia konjugátu sukcinylceramidu s hyaluronanom (HA-sCer). Panel A zobrazuje tokové krivky HA-sCer (188 kgmol⁻¹; DS = 4,6 %) v 0,9 % NaCl alebo vo vode v porovnaní so vstupným nemodifikovaným hyaluronanom (HA; 188 kgmol⁻¹) pri koncentrácii 2 gl⁻¹. Panel B zobrazuje ich detegované nulové šmykové viskozity. Panel C zobrazuje exponenciálny rast nulovej šmykovej viskozity HA-sCer (188 kg mol⁻¹; DS = 2,2 %), o koncentrácii 5 gl⁻¹, s nárastom koncentrácie NaCl v roztoku (koncentrácie 0,1 až 0,9 %; m/m). Stanovenia boli vykonané pri 25 °C.



Obrázok P22. Časový priebeh zastúpenia konformácie keratínu β -skladaného listu izolovanej ľudskej kože po aplikácii donorových vzoriek s obsahom hyaluronanu (HA; 6 kgmol^{-1}) v koncentrácii 0,01 % (zelená farba) a 1 % (tmavomodrá farba) a kontrolných vzoriek ceramidu (Cer) v PG/EtOH (7:3, žltá farba) a PG/EtOH (7:3, svetlomodrá farba). Odchýlka merania je vyjadrená ako smerodajná odchýlka ($n=3$). EtOH, etanol; PG, propylénglykol.

3. Literatúra:

- [1] G. Huerta-Ángeles, F. Ondreáš, M. Brandejsová, K. Kopecká, H. Vagnerová, J. Kulhánek, T. Drmota, Formulation of hyaluronan grafted with dodecanoic acid as a potential ophthalmic treatment, *Carbohydr Polym* 246 (2020) 116578. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116578>.