

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra anorganické a organické chemie

Doktorská disertační práce
VLIV DERIVÁTŮ AMINOKYSELIN A CERAMIDŮ
NA BARIÉROVOU FUNKCI KŮŽE

Mgr. Barbora Janůšová
Červenec 2012

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Mgr. Barbora Janůšová

Ráda bych poděkovala především své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D za pečlivé a odborné vedení, za veškerou podporu, rady a nedocenitelnou pomoc během celého studia, bez níž by tato práce nikdy nespátřila světlo světa.

Mé poděkování patří též jak současným, tak i bývalým členům kolektivu naší pracovní skupiny v čele s prof. PharmDr. Alexandrem Hrabálkem, CSc., jmenovitě pak PharmDr. Michalu Novotnému, Ph.D., PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D, PharmDr. Jakubu Novotnému, Ph.D, Mgr. Barboře Školové a Mgr. Kateřině Hruškové za příjemné pracovní prostředí, pozitivní náladu a přátelskou podporu.

Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter, PharmDr. Karlu Palátovi, CSc., Ivě Vencovské a Haně Mikešové za měření IR spekter, Daně Cardové, Kateřině Kolovratníkové za měření teplot tání a Ivaně Astapenkové za pomoc při administrativní činnosti.

Za pomoc a rady při řešení administrativních záležitostí grantového úkolu děkuji Ing. Martině Doležalové z Vědeckého oddělení Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Můj dík patří také doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D, Lee Wojnarové, Kataríně Tükörové za hodnocení cytotoxicity, dále pak PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D, Mgr. Tomáši Filipskému a Mgr. Michalu Říhovi za provedení *in vivo* studií.

Nemalý dík patří i Dr. rer. Nat. Jarmile Zbytovské za pomoc, poskytnuté rady a provedení DSC analýz.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli za morální podporu a trpělivost a také celé rodině, zejména babičkám za hlídání naší dcery.

Za významnou finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (92007/2007/B-CH/FaF), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV-2010-261-001, SVV-2012-265-001) a Grantové agentuře České Republiky (207/11/0365).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Mgr. Barbora Janůšová

Školitel: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Název disertační práce: Vliv derivátů aminokyselin a ceramidů na bariérovou funkci kůže

Hlavním cílem této disertační práce bylo přispět k porozumění chování ceramidů a modulátorů bariérové funkce kůže na bázi derivátů aminokyselin, stejně jako osvětlit vztahy mezi jejich strukturou a účinkem.

Akceleranty transdermální permeace jsou látky, které dočasně snižují funkci kožní bariéry a usnadňují tak průnik léčiv. V první části práce byly studovány akceleranty aminokyselin prolinu, sarkozinu, alaninu, β -alaninu a glycinu spojených s hydrofobním řetězcem pomocí biologicky rozložitelné esterové vazby. Dvouřetězcové akceleranty nevykázaly žádný akcelerační účinek, zatímco látky s jedním řetězcem výrazně zvýšily propustnost kůže. Nejúčinnější akcelerační účinek, derivát prolinu L-Pro2, dosáhl hodnot akceleračního poměru až 40 při 1% koncentraci, byl aktivnější než standardní akceleranty Azon, DDAIP, DDAK a Transkarbam 12 a navíc působil synergicky s propylenglykolem. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v účinnosti mezi jednotlivými enantiomery. Mechanismus účinku L-Pro2 studovaný infračervenou spektroskopií spočívá ve fluidizaci lipidů kožní bariéry bez významného účinku na bílkoviny stratum corneum. Účinek L-Pro2 měřený elektrickou impedancí kůže byl alespoň částečně reverzibilní. Toxicita připravených látek na buněčných liniích keratinocytů (HaCaT) a fibroblastů (3T3) dosahovala hodnot IC_{50} v rozmezí od desítek do stovek μM , což je srovnatelné se standardními akceleranty. *In vivo* transdermální permeační studie u potkanů potvrdily akcelerační účinek L-Pro2 a ukázaly jeho zanedbatelnou kožní toxicitu a minimální vliv na transepidermální ztrátu vody. Kromě toho L-Pro2 podléhal rychlému enzymatickému rozkladu v plazmě. Tyto vlastnosti dělají z L-Pro2 vhodného kandidáta pro případné klinické použití.

Ceramidy stratum corneum hrají zásadní roli v bariérových vlastnostech kůže. Nicméně vztahy mezi jejich strukturou a účinkem nejsou prozatím dostatečně známy. V našich nedávných studiích jsme ukázali, že délka řetězce acylu u sfingosinového typu (NS) ceramidů je velmi důležitá pro jejich bariérovou funkci a že jeho zkrácení snížilo difúzní odpor kůže s maximem u ceramidů s délkou řetězce 4 a 6 uhlíků. V návaznosti na tyto studie jsme v druhé části této práce zkoumali vliv délky řetězce acylu u ceramidů typu NS na propustnost a termotropní fázové chování modelových membrán lipidů SC složených z ceramidu, kyseliny lignocerové, cholesterolu a cholesterolu sulfátu za účelem získat základní znalosti k pochopení pozorovaných rozdílů v propustnosti. Ceramidy s krátkým řetězcem snížily elektrickou impedanci membrán a zvýšily propustnost theofylinu modelovými membránami stejně jako bylo pozorováno v kůži. Termotropní fázové chování bylo studováno pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a infračervené spektroskopie. Ceramidy, které měly největší vliv na propustnost, rozšířily a snížily teplotu fázového přechodu modelových membrán SC. ATR-FTIR studie prokázaly, že za teploty kůže všechny membrány vykazují organizované řetězce lipidů převážně v *trans* konformaci spolu s orthorhombickým laterálním uspořádáním a velmi podobnou oblastí polárních hlav. Z termálního chování membrán však vyplývá, že krátkořetězcové ceramidy tvoří samostatné domény bohaté buď na ceramidy, nebo kyselinu lignocerovou. Také jsme zaznamenali slabší relativní intenzitu CH₂ vibrací při 32 °C u nejpropustnějších membrán, což naznačuje přítomnost ceramidových domén s nižší hustotou lipidů. Výsledky této práce potvrdily, že dlouhé hydrofobní řetězce v ceramidech typu NS jsou nezbytné pro udržení bariérové funkce kůže. Kromě toho modelové membrány lipidů SC nanesené na porézní poklad ukázaly, že jsou cenným nástrojem pro studium vztahů mezi strukturou ceramidu a propustností, stejně jako souvisejících mechanismů na molekulární úrovni.

V poslední části disertační práce byla připravena řada nových homologů pseudoceramidu 14S24 se záměrem studia jejich potenciálních regeneračních účinků a objasnění vlivu délky hydrofobních řetězců na jejich aktivitu. Tato část práce zahrnovala jak studium různých metod poškození bariérové funkce kůže, tak studium různých vehikul. Nicméně v této části práce jsme nebyli schopni ohodnotit aktivitu připravených látek, neboť jsme zaznamenali značnou variabilitu v propustnosti kůže. Možností, jak obejít tuto komplikaci, se jeví studium těchto látek za použití modelových membrán SC, které byly připraveny v druhé části práce. Nicméně metody a výsledky uvedené v této části však mohou být nápomocny při dalším studiu této problematiky.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of inorganic and organic chemistry

Candidate: Mgr. Barbora Janůšová

Supervisor: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Effect of amino acids derivatives and ceramides on skin barrier function

The main goal of my thesis was to contribute to the understanding of behavior of the ceramides and skin barrier function modulators based on amino acids derivatives, as well as to elucidate the relationship between their structure and activity.

Transdermal permeation enhancers are compounds that temporarily decrease skin barrier properties to promote drug flux. In the first part of my thesis, enhancers with amino acids (proline, sarcosine, alanine, β -alanine, and glycine) attached to hydrophobic chain(s) via a biodegradable ester link were investigated. The double-chain lipid-like substances displayed no enhancing effect, whereas single-chain substances significantly increased skin permeability. The most active enhancer - proline derivative L-Pro2 reached enhancement ratios of up to 40 at 1% concentration, which is higher than that of the well-established and standard enhancers Azone, DDAIP, DDAK, and Transkarbam 12. No stereoselectivity was observed. L-Pro2 acted synergistically with propylene glycol and infrared studies revealed that its mechanism of action includes fluidization of skin barrier lipids with no significant effect on stratum corneum proteins. L-Pro2 action was at least partially reversible as measured by skin electrical impedance. Toxicity in keratinocyte (HaCaT) and fibroblast (3T3) cell lines showed IC_{50} values ranging from tens to hundreds of μM , which is comparable with standard enhancers. *In vivo* transdermal absorption studies in rats confirmed the enhancing activity of L-Pro2 and showed its negligible skin toxicity and minimal effect on transepidermal water loss. Furthermore, L-Pro2 was rapidly decomposed in plasma. These properties make L-Pro2 a good candidate for potential clinical use.

Stratum corneum ceramides play an essential role in the barrier properties of skin. However, their structure–activity relationships are poorly understood. We have recently shown that the acyl chain length in non-hydroxy acyl sphingosine-type (NS) ceramides is highly important for their barrier function and that its shortening decreased the skin diffusion resistance with maxima at ceramides with 4-6C chain length. In the second part of this thesis we investigated the effects of acyl chain length of NS type ceramides on the permeability and the thermotropic phase behavior of a model SC lipid membranes composed of ceramide, lignoceric acid, cholesterol and cholesterol sulfate to gain some basic understanding of the observed differences in permeability. Short-chain ceramides decreased membrane electrical impedance and increased the permeability of theophylline in the model SC membranes similar to their effects found in the skin. The thermotropic phase behavior was studied by differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy. Those ceramides that had the greatest impact on the membrane permeability broaden and downshift phase transitions of the model SC membranes. ATR-FTIR studies revealed that, at the skin temperature, all membranes showed high lipid chain conformational order and presence of orthorhombic chain packing together with very similar polar head region. Thermal phase behavior of membranes revealed that membranes with short-chain ceramides form separate domains rich either in ceramides or lignoceric acid. Moreover relative CH₂ intensity at 32°C was weaker in the most permeable membranes suggesting presence of ceramide-rich domains with lower lipid density. In conclusion, this work confirmed that the long hydrophobic chains in the NS-type ceramides are essential for maintaining the skin barrier function. Moreover, the model SC lipid membranes reconstituted on a filter support proved to be a valuable tool to study the relationships between the ceramide structure and SC membrane permeability as well as the underlying mechanisms on a molecular level.

In the last part of my thesis a number of new homologs of pseudoceramide 14S24 were synthesized to study their barrier-repair ability and to evaluate the influence of the length of hydrophobic chains on their activity. This work included evaluation of two different methods for barrier perturbation and study of various donor vehicles. However, in this part of the work we were unable to assess the activity of the prepared compounds, because considerable variation in the permeability of the skin was observed. The possibility to avoid observed variability is the study of these homologs by model SC lipid membranes, which were developed in the second part of the thesis. Nevertheless, methods and results presented in this section may be helpful in further studies of this issue.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
OBSAH	8
CÍL PRÁCE	11
1 ÚVOD	12
1.1 KŮŽE	13
1.1.1 Stratum corneum	14
1.1.1.1 Lipidy stratum corneum	15
1.1.1.2 Organizace lipidů stratum corneum.....	17
1.1.2 Molekulární modely organizace stratum corneum	19
1.1.3 Změny složení lipidů stratum corneum u poškozené a suché kůže.....	21
1.1.4 Cesty prostupu látek kůží	23
1.2 MODULÁTORY BARIÉROVÉ FUNKCE KŮŽE.....	24
1.2.1 Akceleranty transdermální permeace	24
1.2.2 Látky regenerující poškozenou kožní bariéru	25
1.2.3 Retardanty.....	26
1.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE VE STUDIU SC	27
1.3.1 FTIR spektroskopie ve studiu intra a inter molekulární organizace lipidů stratum corneum	27
1.3.1.1 Vibrace řetězců	30
1.3.1.2 Vibrace polární oblasti.....	34
1.3.2 Další aplikace FTIR spektroskopie ve studiu stratum corneum	36
1.3.2.1 Studium fázového chování lipidů SC	36
1.3.2.2 Studium kinetiky fázové separace FFA.....	37
1.3.2.3 Průnik vody do SC.....	37
1.3.2.4 Studium mechanismu účinku akceleraantů transdermální permeace.....	38
2 DERIVÁTY AMINOKYSELIN JAKO AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PERMEACE	39
2.1 ÚVOD.....	40
2.2 MATERIÁL A METODY	41
2.2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení	41
2.2.2 Syntéza	42
2.2.3 Kůže.....	48
2.2.4 Donorové vzorky	48
2.2.5 Permeační experimenty	49
2.2.6 Dermální elektrická impedance	49
2.2.7 Izolace SC a lipidů SC.....	50
2.2.8 FTIR spektroskopie	51
2.2.9 Buněčné linie	51
2.2.10 Buněčná toxicita	52
2.2.11 Aktivita kaspáz	53
2.2.12 In vivo hodnocení transdermální permeace, TEWL a dermální toxicity	53
2.2.13 Viabilita kůže.....	54
2.2.14 Stabilitní studie	55

2.2.15	HPLC analýza.....	55
2.2.16	Analýza dat.....	56
2.3	VÝSLEDKY	56
2.3.1	Syntéza	56
2.3.2	Aktivita jedno a dvouřetězcových akceleračních, vliv donorového vehikula.....	58
2.3.3	Aktivita chirálních akceleračních.....	60
2.3.4	Akcelerační aktivita pro modelové látky jiných fyzikálně-chemických vlastností.....	60
2.3.5	Reverzibilita účinku L-Pro2	61
2.3.6	Mechanismus účinku L-Pro2 a PG.....	62
2.3.7	Buněčná toxicita	64
2.3.8	In vivo studie	65
2.4	DISKUZE	67
3	VLIV DÉLKY ACYLOVÉHO ŘETĚZCE CERAMIDŮ NA PERMEABILITU MODELOVÝCH MEMBRÁN SC A STUDIUM JEJICH TERMOTROPNÍHO CHOVÁNÍ.....	72
3.1	ÚVOD.....	73
3.2	MATERIÁL A METODY	74
3.2.1	Chemikálie.....	74
3.2.2	Příprava modelových membrán SC.....	74
3.2.3	Permeační experimenty	75
3.2.4	HPLC analýza.....	76
3.2.5	Diferenční skenovací kalorimetrie	76
3.2.6	FTIR spektroskopie	76
3.2.7	Analýza dat.....	76
3.3	VÝSLEDKY	77
3.3.1	Hodnocení propustnosti různých filtrů a různé délky inkubace.....	77
3.3.2	Permeabilita membrán s ceramidy	79
3.3.3	Diferenční skenovací kalorimetrie	80
3.3.4	FTIR spektroskopie	81
3.3.5	Shrnutí výsledků FTIR spektroskopie.....	90
3.4	DISKUZE	92
4	DERIVÁTY AMINOKYSELIN JAKO LÁTKY REGENERUJÍCÍ POŠKOZENOU KOŽNÍ BARIÉRU	96
4.1	ÚVOD.....	97
4.2	MATERIÁL A METODY	97
4.2.1	Chemikálie a přístrojové vybavení.....	97
4.2.2	Syntéza	98
4.2.3	Kůže a modelové poškození kožní bariéry.....	105
4.2.4	Donorové vzorky	106
4.2.5	Permeační experimenty	106
4.2.6	Dermální elektrická impedance.....	107
4.2.7	HPLC analýza.....	107
4.2.8	Analýza dat.....	107
4.3	VÝSLEDKY	107
4.3.1	Syntéza	107
4.3.2	Experimentální poškození kůže.....	108
4.3.3	Donorové vehikulum	109

4.3.4	Permeační studie.....	111
4.4	DISKUZE.....	112
5	ZÁVĚR.....	115
6	SEZNAMY.....	118
6.1	SEZNAM ZKRATEK.....	118
6.2	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	121
6.3	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	134
6.3.1	Publikace jako první autor.....	134
6.3.2	Publikace jako spoluautor.....	134
6.3.3	Abstrakta z konferencí.....	135
7	PŘÍLOHY.....	136

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této disertační práce bylo přispět k porozumění chování ceramidů a modulátorů bariérové funkce kůže na bázi derivátů aminokyselin (AMK) v kožní bariéře a osvětlení vztahů mezi jejich strukturou a účinkem. Získané znalosti tak mohou přispět k vymezení rozhodujících kritérií pro navrhování struktur kožních modulátorů, jako jsou akceleranty transdermální permeace s nízkou toxicitou a dermální dráždivostí vyhovující klinickému použití nebo vhodných analogů ceramidů pro léčbu kožních onemocnění.

Vlastní práce je rozdělena do tří oddílů s následujícími dílčími cíli:

1. Deriváty aminokyselin jako akceleranty transdermální permeace:

- Syntéza řady nových derivátů AMK včetně jednotlivých enantiomerů
- Hodnocení jejich akcelerační aktivity *in vitro* a *in vivo*
- Hodnocení vlivu:
 - A) struktury polární hlavy
 - B) přítomnosti 1 nebo 2 hydrofobních řetězců
 - C) absolutní konfigurace v místě polární hlavy na akcelerační účinek
- Hodnocení reverzibility, stability a mechanismu účinku vybraných akceleračních látek
- Hodnocení toxicity vybraných akceleračních látek

2. Vliv délky acylového řetězce ceramidů na permeabilitu modelových membrán a studium jejich termotropního chování

- Vytvoření vhodného nástroje, tj. modelové membrány stratum corneum (SC), pro studium modifikovaných ceramidů
- Hodnocení permeability modelových membrán stratum corneum
- Studium termotropního chování modelových membrán stratum corneum

3. Deriváty aminokyselin jako látky schopné regenerovat poškozenou kožní bariéru

- Syntéza řady nových homologů pseudoceramidu 14S24 s různou délkou hydrofobních řetězců
- Výběr vhodného modelu poškození kožní bariéry a donorové vehikulum
- Studium schopnosti těchto látek regenerovat poškozenou kožní bariéru

1 ÚVOD

Kůže je největší orgán lidského těla s plochou 1,5–2 m² a tvoří 10 % celkové tělesné hmotnosti.¹ Tvoří bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím a plní několik funkcí – hraje velmi důležitou roli při ochraně proti mikrobům, toxinům, alergenům, UV záření, udržuje rovnováhu tekutin, zajišťuje výměnu plynů, vylučování škodlivých látek a regulaci teploty.² Jelikož je kůže nejpřístupnější orgán lidského těla, stává se tak zjevným cílem pro aplikaci léčiv. Ovšem pouze omezené množství léčiv je schopno projít kůží v té míře, aby dosáhlo terapeutických koncentrací v plazmě. Transdermální podání léčiv přitom představuje potenciálně velmi perspektivní aplikační cestu. Je však značně limitováno bariérovou funkcí kůže, kterou představuje nejsvrchnější vrstva pokožky *stratum corneum*.

Snahy ovlivnit bariérovou funkci kůže, a to především ve smyslu zvýšit její propustnost, jsou známy již po desetiletí. K tomuto účelu bylo vyvinuto již několik jak fyzikálních, tak i chemických metod. Mezi fyzikální metody řadíme například elektroforézu, ultrazvuk nebo v současnosti hojně studovanou elektroporaci spočívající v tvorbě mikropórů působením elektrických výbojů.³ Nevýhodou těchto metod je použití často velmi složitých a finančně nákladných aplikačních zařízení. Z tohoto důvodu se jako nejschůdnější jeví ovlivnit kůži chemicky – aplikací akceleračních transdermálních permeací.^{4,5} V poslední době se ovšem vyskytla i otázka transdermální retardace, tedy snížení propustnosti kůže. Tyto látky by měly zvýšit odolnost kožní bariéry, a tak zabránit vstřebávání nežádoucích látek, jako jsou pesticidy, opalovací krémy nebo repelenty, či dokonce bojové chemické látky, přes kůži do organismu.^{6,7} Třetím typem látek modulující kožní bariéru jsou látky schopné její regenerace. Není bez zajímavosti, že některá významná kožní onemocnění, například atopická dermatitida či psoriáza, mají souvislost s poškozenou kožní bariérou danou sníženým obsahem kožních ceramidů. Nedostatečná funkce kožní bariéry umožňuje průnik dráždivých látek, alergenů a mikrobů, což stimuluje uvolnění cytokinů a následný zánět. Průběh zánětu pak vede k dalšímu snížení integrity kožní bariéry.⁸

Všechny tři zmíněné skupiny látek souhrnně označované jako modulátory bariérové funkce kůže mají stejné místo účinku – kožní bariérové lipidy *stratum corneum*. Zásadní význam pro pochopení funkce kožní bariéry a její modulaci nám přinášejí znalosti o stavbě, organizaci a biofyzikálních vlastnostech mezibuněčné lipidické matrix *stratum corneum*, zejména pak ceramidů.

V první části následující kapitoly bude poskytnut teoretický základ pro pochopení tvorby a struktury SC včetně složení a organizace mezibuněčné lipidové matrix SC. Druhá část souhrnně popisuje jednotlivé modulátory bariérové funkce kůže a jejich mechanismus účinku. Ve třetí části této kapitoly bude vysvětlen základní princip FTIR techniky, která se hojně využívá ve studiu SC a modulátorů bariérové funkce kůže.

1.1 KŮŽE

Kůže je složena ze tří základních funkčních vrstev:

- subcutis
- dermis
- epidermis

Subcutis je vnitřní vrstva tvořena adipocyty. Zajišťuje tepelnou izolaci a mechanickou ochranu těla. Dermis o tloušťce 600-3000 μm obsahuje pojivová vlákna, která jsou odpovědná za vysokou pevnost a pružnost kůže. Krevní cévy, které jsou přítomny v dermis, poskytují kůži živiny a kyslík. Epidermis je svrchní avaskularizovaná vrstva o tloušťce 100-150 μm , tvořena převážně keratinocyty (90 %), dále pak melanocyty, Langerhansovými a Merkelovými buňkami. Keratinocyty jsou produkovány bazální, nejspodnější, vrstvou epidermis a postupně migrují směrem ke kožnímu povrchu (cca 28 dní). Mezitím procházejí zráním a buněčnou diferenciací – keratinizací, kdy dochází ke zploštění buněk, zániku organel, ukládání keratinu a lipidů. Dle stadia diferenciaci keratinocytů můžeme v epidermis rozlišit čtyři vrstvy (Obr. 1):

- bazální vrstva (*stratum basale*)
- vrstva ostnitých buněk (*stratum spinosum*)
- vrstva zrnitých buněk (*stratum granulosum*)
- rohová vrstva (*stratum corneum*).

Kromě toho lze identifikovat další vrstvu mezi *stratum granulosum* a *corneum*, ta se nachází v místech, kde je epidermis kryta silnou rohovou vrstvou, tj. na ploskách a dlaních. Jedná se o vrstvu lesklých buněk – *stratum lucidum*.

Stratum basale je nejvnitřnější epidermální vrstva tvořena jednou řadou cylindrických kmenových buněk, které se neustále dělí a jsou pevně spojeny s bazální membránou hemidesmozomy.

Ve *stratum spinosum* buňky získávají vřetenovitý tvar a jsou vzájemně propojeny desmozomy. V jejich cytoplazmě se nachází vlákna keratinu, začínají se tvořit prekurzory proteinů korneocytálního obalu a lamelární granula obsahující prekurzory lipidů matrix SC.

Stratum granulosum je poslední vrstva vitální epidermis tvořena oplošťujícími se keratinocyty. Ty obsahují četná keratohyalinní granula vyplněná zvláště proteiny profilagrinem, lorikrinem a keratinem. V nejsvrchnějších keratinocytech se exocytosou uvolňuje obsah lamelárních granul. Lipidy lamelárních granul jsou nezbytné pro vytvoření kožní bariéry.

Stratum corneum je poslední vrstva epidermis tvořena bezjadernými zrohovatělými korneocyty, které na povrchu deskvamují.⁹⁻¹¹



Obr. 1 Stavba epidermis

1.1.1 Stratum corneum

Nejsvrchnější vrstva pokožky, *stratum corneum*, nazývaná také rohová vrstva, tvoří podstatu kožní bariéry. Vynikající bariérové vlastnosti SC lze přičíst jeho neobvyklému složení s vysokým obsahem ceramidů a výjimečnému uspořádání. SC je přibližně 10–15 μm silné v nehydratovaném stavu, ale jeho tloušťka se může při plné hydrataci několikrát zvětšit.¹² Obsahuje 20 až 25 vrstev korneocytů, což jsou keratinocyty v terminálním stádiu diference. Ty jsou obklopeny zrohovatělým obalem a zasazeny do lipidické matrix. Tato struktura je označována jako model „cihly a malty“.^{10, 13}

Korneocyty jsou zploštělé a navzájem propojené korneodesmozomy, které zabezpečují celistvost rohové vrstvy. V nejvyšších vrstvách SC označované jako

stratum disjunctum podléhají korneodesmozomy degradaci proteolytickými enzymy a dochází tak k přirozené deskvamaci kůže.^{14, 15} Vnitřek korneocytů je zcela vyplněn komplexní matrix zesíťovaných vláken keratinu.¹⁶ Na povrchu korneocytů se ukládá tzv. korneocytální obálka vznikající příčným zesíťováním proteinů jako je involukrin a lorikrin pomocí kalcium-dependentní transglutaminázy.^{17, 18} Z vnější strany se pak na korneocytální obálku kovalentně váže monovrstva lipidů tvořena ceramidy s ω -hydroxy mastnou kyselinou.^{19, 20} Obě vrstvy zajišťují soudržnost korneocytů s lipidovou matrix.

Jak již bylo zmíněno výše, lipidy lipidové matrix SC pocházejí z lamelárních granul. Jedná se o organely s membránovým obalem a s vnitřní lamelární submikroskopickou strukturou.^{21, 22} Granula obsahují prekurzory lipidů, a to glykosylceramidy, cholesterol, sfingomyeliny a fosfolipidy, které vytváří stohy lipidických disků, a dále enzymy jako fosfolipázu A₂, β -glukocerebrosidázu a kyselou hydrolázu.^{23, 24} Při fúzi granul s plazmatickou membránou buněk *stratum granulosum* dochází k uvolnění lipidických disků do mezibuněčného prostoru SC, jejich reorganizaci a metabolizaci. Jednotlivé disky fúzí tzv. „edge-to-edge“ systémem a vytváří několikavrstvé vzájemně propojené mezibuněčné lamely.²⁵ Jak orientace, tak i struktura lipidů lamel přispívají k bariérové funkci. Současně s reorganizací probíhá složitá přeměna polárních lipidů lamel na nepolární lipidy SC, kdy β -glukocerebrosidáza štěpí glykosylceramidy stejně jako kyselá hydroláza sfingomyeliny na ceramidy a fosfolipáza A₂ fosfolipidy na volné mastné kyseliny.²⁶

1.1.1.1 Lipidy stratum corneum

Složení lipidů SC je jedinečné a je tvořeno přibližně ekvimolární směsí ceramidů (Cer), cholesterolu (Chol) a volných mastných kyselin (FFA) a méně než 5 % (w/w) ostatních lipidů, z nichž nejdůležitější je cholesterol sulfát (CholS).²⁷ Na rozdíl od jiných biologických membrán SC neobsahuje fosfolipidy.

Ceramidy

Ceramidy jsou strukturně různorodé a obecně se jedná o amfifilní molekuly sestávající ze dvou hydrofobních řetězců a malé polární hlavy (Obr. 2). Základem molekuly ceramidu je báze sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydrosfingosin (dS). Na tuto bázi je amidickou vazbou navázána buď α -hydroxy (A),

ω -hydroxy (O), nebo nehydroxylovaná (N) mastná kyselina. Obvykle se jedná o nasycené mastné kyseliny s délkou 16 až 30 uhlíků, přičemž nejčastější délka řetězce je 24 uhlíků. Koncový ω -hydroxyl může být dále esterifikován esenciální mastnou kyselinou, kyselinou linolovou (E). Jak obměny v řetězci mastné kyseliny, tak i obměny ve struktuře sfingoidní báze dávají vznik široké škále podtříd ceramidů, které se liší délkou řetězce. Dosud bylo v lidském SC identifikováno 12 podtříd ceramidů,²⁸⁻³¹ přičemž poslední ceramid byl publikován v roce 2011.³² Z hlediska uspořádání lipidové matrix jsou důležité ceramidy typu EO, u nichž je ω -hydroxyskupina mastné kyseliny o délce 30-34 uhlíků esterifikována kyselinou linolovou, které tvoří jakousi matici, kolem níž se organizují ostatní ceramidy.³³

Pokud se zaměříme na tvar molekuly ceramidů, byly popsány dvě konformace, a to vlásečková, kdy oba řetězce ceramidů směřují na stejnou stranu, nebo rozevřená, kdy každý řetězec směřuje na opačnou stranu. Rozevřená konformace zajišťuje vyšší soudržnost lamel díky propojení ceramidovými řetězci.³⁴

Co se týká značení ceramidů, původně bylo založeno na jejich číslování arabskými číslicemi dle rozdělovacího koeficientu na tenkovrstvé chromatografii (čím vyšší polarita, tím vyšší číslo).³⁵ S narůstajícím počtem identifikovaných ceramidů a znalostmi o jejich struktuře bylo nutné zavést nové systematické názvosloví. Tato nomenklatura nazývaná jako dle Motty je založena na dvou, případně třípísmenných kódech.³⁶ Poslední písmeno označuje bázi, před ním stojící navázanou mastnou kyselinu, písmeno E označuje esterově vázanou kyselinu linolovou a stojí na začátku kódu.

Volné mastné kyseliny

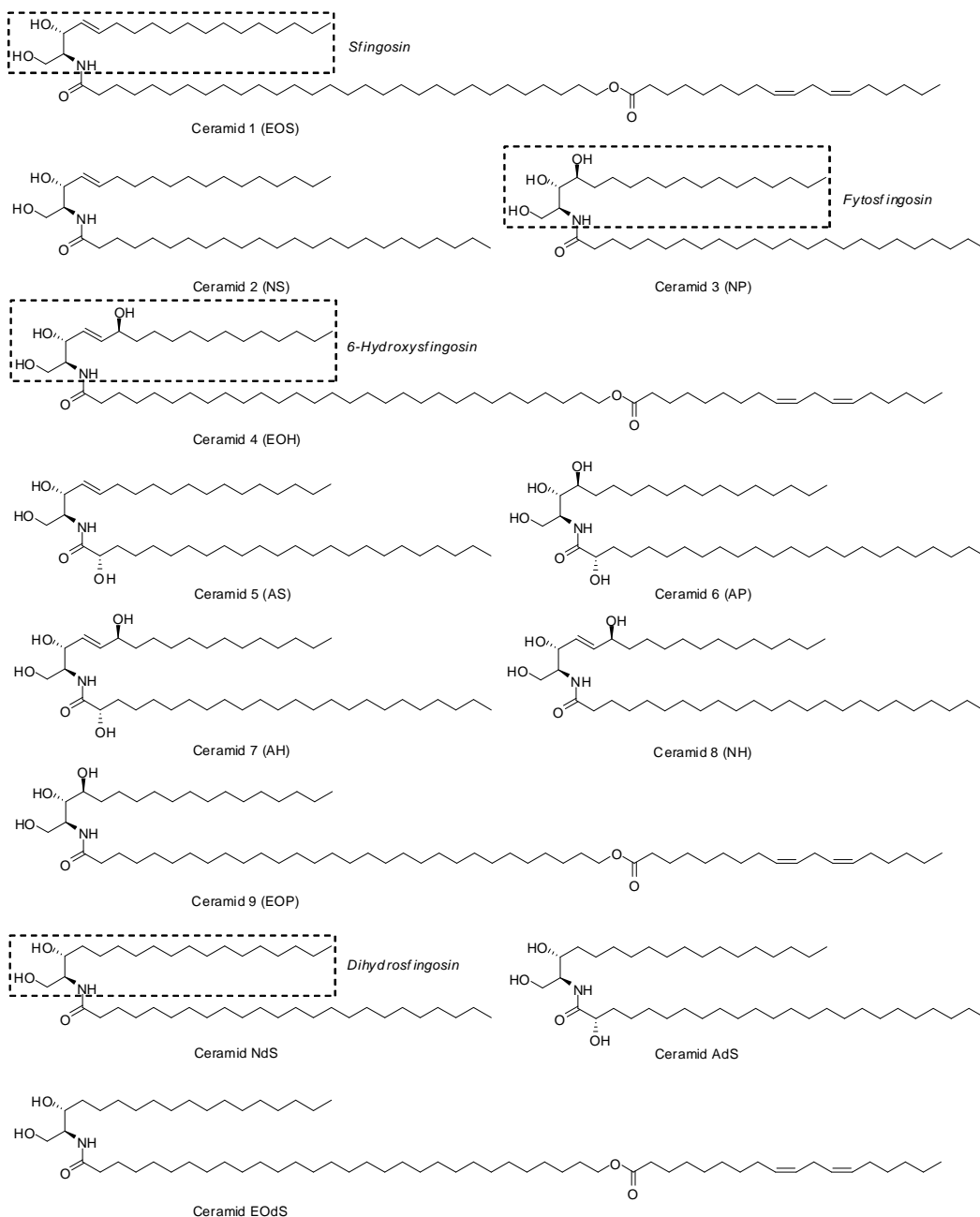
Jedná se především o kyseliny s dlouhými nasycenými řetězci o délce 16 až 30 uhlíků. Nejvíce jsou zastoupeny kyseliny s délkou řetězce 22 a 24 uhlíků. Z nenasyčených mastných kyselin jsou zastoupeny kyselina olejová a linolová.³⁷

Cholesterol a cholesterol sulfát

Cholesterol je součástí všech biologických membrán a je zodpovědný za míšení lipidů odlišných struktur. Může zvyšovat nebo snižovat fluiditu membrán v závislosti na jeho množství a charakteru ostatních součástí membrány. Cholesterol sulfát tvoří minoritní složku lipidů SC (2-5 % w/w). Hraje důležitou roli při deskvamaci SC.³⁸

Estery cholesterolu

Estery cholesterolu, především oleát, se nachází izolovaně mimo lamely a nepodílí se na tvorbě lamel. Mohou tak separovat zbylé nenasyčené mastné kyseliny a zabránit fluidizaci.³⁹



Obr. 2 Strukturní typy ceramidů v lidské kůži s původním i novým značením

1.1.1.2 Organizace lipidů stratum corneum

Lipidy SC jsou v mezibuněčném prostoru uspořádány v mnohovrstevné lamely, jež byly poprvé vizualizovány roku 1973 Breathnachem za užití elektronového mikroskopu a vzorku připraveného metodou mrazového lámání.⁴⁰ Ovšem tyto lamely nebyly viditelné pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Nyní je již známo, že nasycený charakter lipidů SC neumožňuje reakci s oxidem osmičelým, běžně používaným pro fixaci preparátů TEM biologického původu.⁴¹ Použití silnějšího post-fixačního oxidačního

čínidla oxidu rutheničelého umožnilo zobrazení specifického uspořádání lamel, tj. několikavrstvé lamely sestávající ze sekvence tří pásů (široké-úzké-široké) s nízkou elektronovou hustotou, uložené paralelně s povrchem korneocytů a opakující se šířkou přibližně 13 nm.⁴² Tato sekvence je označována jako fáze s dlouhou periodicitou (LPP). Kromě této fáze byla v SC identifikována i další lamelární fáze s periodicitou 6 nm, označovaná jako krátká lamelární fáze (SPP). Na rozdíl od SPP LPP fáze byla prokázána v lidském, prasečím i myším SC a má velmi ojedinělou molekulární strukturu.⁴³⁻⁴⁷ Z tohoto důvodu se vyvozuje, že LPP má důležitou roli v bariérové funkci kůže. Předpokladem pro vytvoření LPP je přítomnost ceramidu EOS, kdy jeho ω -hydroxyacylový řetězec prochází skrz celou dvojvrstvu lamely, zatímco linoleátový zbytek zasahuje až do sousední lamely. Ceramid EOS tak slouží jako molekulová spojka, neboli „zip“ mezi jednotlivými lamelami.⁴⁸ Vedle již zmíněných lamelárních fází byl ve SC identifikován i fázově separovaný krystalický cholesterol.^{45, 49}

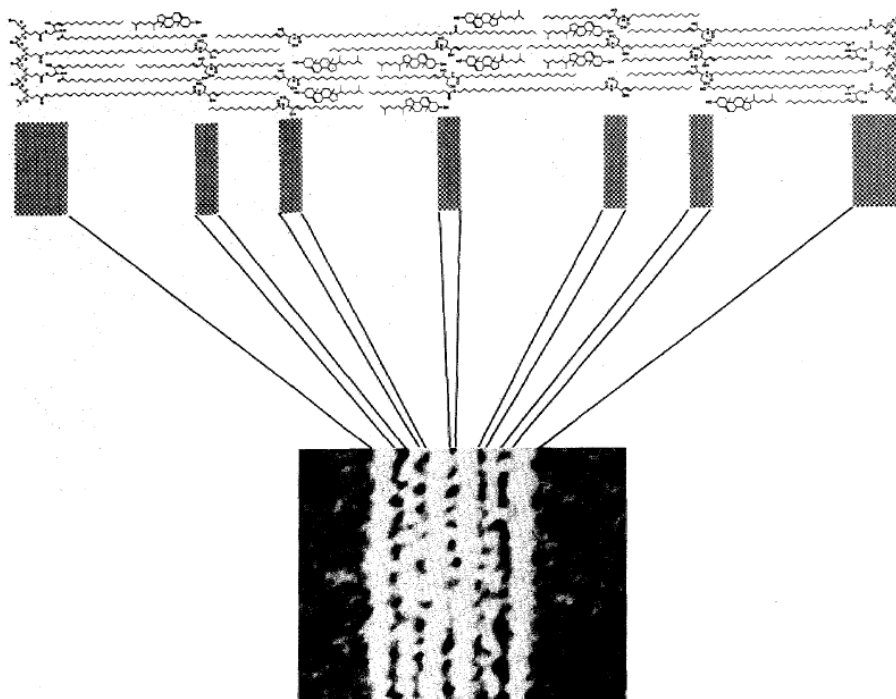
Mimo lamelární organizaci má důležitý význam i krystalinita lipidů SC daná uspořádáním lipidů v rovině kolmé na směr lamel, tzv. laterární uspořádání řetězců. V této rovině jsou lipidy uspořádány buď orthorhombicky v krystalické fázi, hexagonálně v gelové fázi, nebo neuspořádaně v kapalně-krystalické fázi.³³ Orthorhombické laterární uspořádání je velmi husté a tato struktura je nejméně propustná, zatímco kapalně-krystalická fáze je nejpropustnější. Pomocí širokouhlé rentgenové difrakce byla prokázána přítomnost převážně orthorhombického laterárního uspořádání lipidů při teplotě kůže okolo 32 °C současně s malou částí lipidů v hexagonálním uspořádání.^{50, 51} Prozatím zůstává neobjasněno, zdali současně koexistuje i kapalná fáze, jelikož její reflexe v difraktogramu je překryta reflexí keratinu korneocytů.

Předpokládá se, že jak lamelární organizace, tak i laterární uspořádání jsou důležité pro kompetentní funkci kožní bariéry.^{44,52,53} Výsledky nedávné studie však naznačují, že změna orthorhombického uspořádání na hexagonální v lidském SC nemá vliv na propustnost. Tudíž vhodná lamelární organizace je důležitější pro kožní bariéru než přítomnost orthorhombického laterárního uspořádání.⁵⁴

1.1.2 Molekulární modely organizace stratum corneum

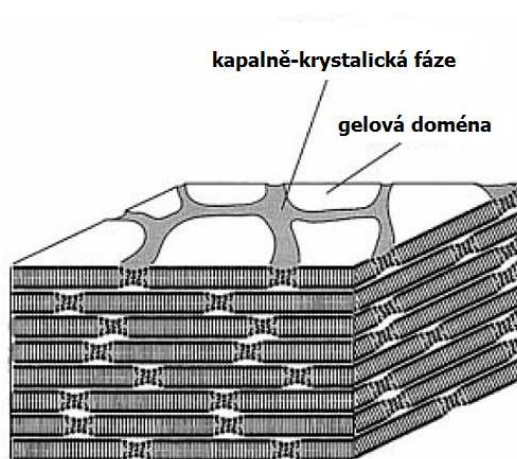
Na základě zmíněných skutečností bylo navrženo několik koncepcí organizace lipidů SC, které by vysvětlovaly sekvenci pásem pozorovaných TEM, koexistenci gelové a krystalické fáze nebo strukturu LPP a ostatní hlediska bariérové funkce.

První model byl navržen roku 1989 a snaží se osvětlit molekulární organizaci SC na základě sekvence tří pásm s nízkou elektronovou hustotou viditelných TEM (Obr. 3). Dle toho konceptu zaujímají ceramidy rozevřenou konformaci, kdy řetězce směřují každý na jinou stranu a jsou sdíleny mezi lamelami. Ceramidy typu EO slouží jako spojky mezi jednotlivými lamelami. Tento model je v literatuře označován jako „stacked monolayer“ model.⁵⁵



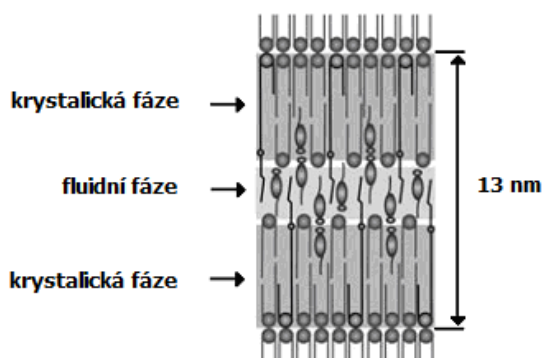
Obr. 3 „Stacked monolayer“ model vysvětlující strukturu lipidových lamel mezi dvěma korneocyty na základě 6 pásm s nízkou elektronovou hustotou. Dva světlé krajní široké pásy reprezentují lipidovou obálku kovalentně vázaných ceramidů korneocytů. Úzké pásy představují „zipovou“ monovrstvu a dva široké vnitřní pásy tvoří tzv. Landmannovu jednotku (dvě lipidové dvojvrstvy vznikající fúzí lipidických disků lamelárních granul).⁵⁵

Roku 1994 představil Forslind doménový mozaikový model kožní bariéry (Obr. 4), v němž je většina lipidů oddělena do krystalických/gelových domén, které jsou ohraničeny kapalně-krystalickou fází, a vytváří tak „mozaiku“. Tekutý charakter hraničních oblastí mezi krystalickými doménami umožňuje difúzi hydrofilních a hydrofobních molekul přes kožní bariéru, zatímco krystalické/gelové domény brání ztrátám vody.⁵⁶



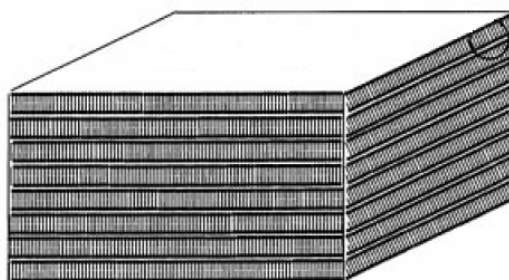
Obr. 4 Doménově mozaikový model⁵⁷

Sendvičový model (Obr. 5) navržený roku 2000 popisuje přítomnost krystalických a kapalných domén horizontálně na rozdíl od doménově mozaikového modelu. V tomto modelu jsou lipidy LPP uspořádány do třívrstvé struktury, v níž jsou dvě široké krajní vrstvy s krystalickou fází odděleny úzkou centrální fluidní vrstvou.⁵⁸ Cholesterol a jeho deriváty spolu s linoleátovými řetězci ceramidů typu EO tvoří centrální vrstvu, kdežto krystalicky uspořádané ceramidy jsou na obou stranách této střední vrstvy.⁵⁹



Obr. 5 Sendvičový model⁵⁸

Snad nejspornější a také nejvíce diskutovaný je model jednotné gelové fáze (Obr. 6) navržený Norlénem roku 2001. Mezibuněčné lipidy SC tvoří na rozdíl od doménově mozaikového modelu jedinou koherentní gelovou fází. V této gelové fázi jsou současně řetězce lipidů uspořádány v blízkosti jejich polární hlavy orthorhombicky, zatímco ke konci jejich řetězce hexagonálně. Jelikož se zde předpokládá přítomnost homogenní distribuce lipidů, nedochází zde k fázové separaci.⁵⁷



Obr. 6 Model jednotné gelové fáze⁵⁷

Prozatím poslední navržený model označovaný jako „armature reinforcement“ model se snaží objasnit strukturní změny lamel v závislosti na hydrataci. Podle tohoto modelu jsou lipidy přítomny při nízké hydrataci jak v rozevřené, tak i vláseňkové konformaci. Při nadměrné hydrataci dochází k překlopení řetězců lipidů z rozevřené do vláseňkové konformace, které umožní průnik vody mezi lamelami.⁶⁰

Všechny zde předložené koncepty mají svá pro i proti a nemusí se nutně vylučovat. Konečný teoretický model zatím stále není vytvořen a rovněž neexistuje shoda, který z modelů nejlépe vystihuje uspořádání lipidové matrix SC a všechny aspekty bariérové funkce kůže. Uvedená fakta jsou podnětem k pokračujícímu výzkumu v této oblasti.⁶¹

1.1.3 Změny složení lipidů stratum corneum u poškozené a suché kůže

Nemocná kůže obvykle vykazuje nedostatky ve struktuře SC, které mohou vést ke snížení bariérové funkce kůže. Mezi nejvíce studované onemocnění s ohledem na bariérovou funkci kůže a změny složení lipidů SC patří atopická dermatitida, psoriáza a různé formy ichtyózy.

Atopická dermatitida (AD) je neinfekční chronický kožní zánět postihující až 10 % dětí charakterizovaný suchou kůží a nedostatkem ceramidů. Onemocnění současně doprovází zvýšená transepidermální ztráta vody a snížená hydratace.⁶² Mezi možné mechanismy vysvětlující snížené množství ceramidů u pacientů s AD patří pokles de novo syntézy ceramidů EOH a NP,⁶³ aktivita enzymu glukosylceramid-sfingomyelin deacylázy

degradující prekurzory ceramidů, tj. sfingomyeliny a glykosylceramidy,^{64, 65} zvýšená aktivita epidermálních⁶⁶ a bakteriálních ceramidáz⁶⁷ katalizující přeměnu ceramidů na sfingosin nebo snížená činnost enzymu sfingomyelinázy štěpící sfingomyeliny na ceramidy.⁶⁸ Tyto enzymatické změny mají za následek výskyt abnormálních typů ceramidů, změny uspořádání lipidových lamel a nedostatek kovalentně vázaných ceramidů.

Psoriáza, nebo-li lupénka, je charakterizována hyperproliferací a poruchami diferenciací keratinocytů s vyšší propustností kůže.⁶⁹ U psoriatického SC ve srovnání s normálním SC bylo nalezeno snížené množství ceramidu EOS a fytosfingosinových ceramidů současně se zvýšenou hladinou sfingosinových ceramidů.³⁶ Možnými příčinami jsou nedostatečná exprese enzymu serin-palmitoyl transferázy,⁷⁰ klíčového enzymu syntézy ceramidů de novo ze serinu, dále enzymu β -glukocerebrosidázy štěpící glykosylceramidy na ceramidy⁷¹ nebo prosaposinu, prekurzoru sfingolipidy aktivujícího proteinu, zodpovídajícího za lysozomální degradaci sfingolipidů.⁷²

Ichtyózy zahrnují rozsáhlou a heterogenní skupinu dědičných a získaných onemocnění všeobecně vykazujících zhoršenou deskvamaci kůže, která se klinicky manifestuje jako hyperkeratóza a šupinatost. Příčinou mohou být poruchy bílkovin keratinocytů, anebo poruchy v metabolismu, ukládání a transportu lipidů SC.⁷³ Například u X vázané recesivní ichtyózy dochází k mutaci enzymu steroid sulfatázy a tím k defektu katabolismu CholS vedoucí ke snížené deskvamaci a ztluštění SC.⁷⁴

Abnormality ve složení a organizaci lipidů SC byly zaznamenány taktéž u suché kůže. Za zmínku stojí výrazné sezónní změny v profilu lipidů SC, kdy bylo během zimních měsíců pozorováno snížené množství všech složek lipidů SC.⁷⁵ Podobně jako kůže psoriatiků obsahuje suchá kůže nižší hladinu fytosfingosinových a zvýšenou hladinu sfingosinových ceramidů.⁷⁶ Jedna z navrhovaných cest biosyntézy fytosfingosinu zahrnuje adici vody na odpovídající dvojnou vazbu sfingosinu. Pozorované změny v poměru sfingosinových a fytosfingosinových ceramidů mohou být tedy způsobeny narušenou dostupností vody spojené se suchou kůží.³⁶

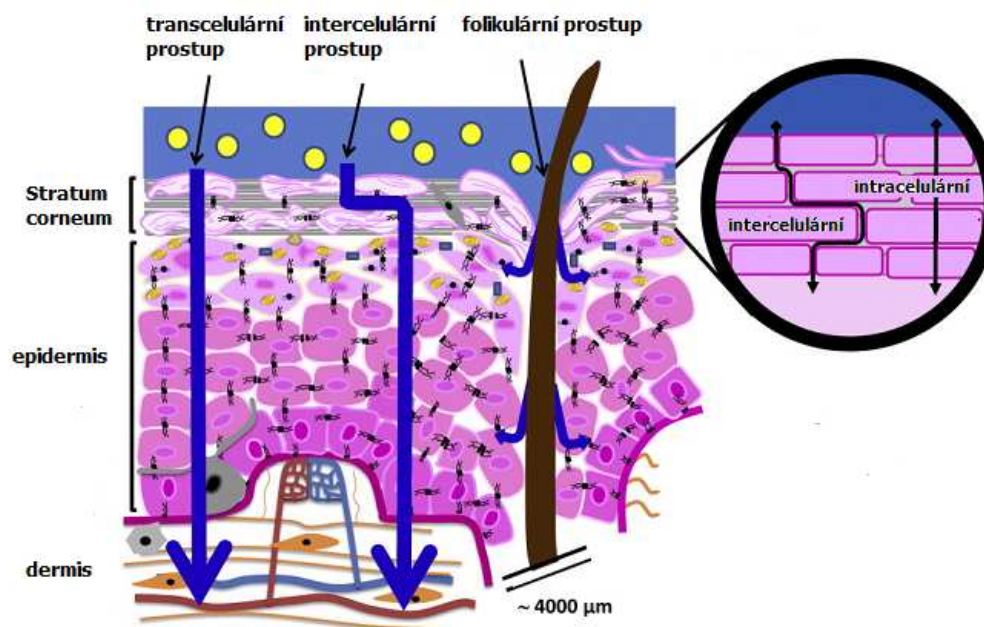
1.1.4 Cesty prostupu látek kůží

Látky mohou pronikat přes neporušenou lidskou kůži dvěma způsoby:

- skrz kožní adnexa
- transepidermální cestou

Cesta skrz kožní adnexa zahrnuje vstup vlasovými folikuly, kožními a potními žlázami. Tato kožní adnexa však zaujímají pouze 0,1 % kožního povrchu. Původně se předpokládalo jejich podíl na permeaci látek jako malý a důležitý pouze pro omezený počet látek s nábojem nebo vysokou molekulární hmotností.⁷⁷ Nedávné studie ovšem prokázaly důležitost folikulárního prostupu pro topicky podané látky.^{78, 79}

Většina látek proniká do hlubších vrstev kůže transepidermální cestou, přičemž můžeme rozlišit *transcelulární vstup* přes korneocyty a *intercelulární vstup* mezibuněčnými prostory (Obr. 7). V obou případech musí látka projít přes kontinuální lipidovou matrix SC, navíc u transcelulárního prostupu i přes velmi nepropustný zrohovatělý obal korneocytů. I přesto, že je transcelulární vstup kratší, velké množství látek preferuje klikatou cestu skrz mezibuněčné lipidy SC.^{80, 81}



Obr. 7 Cesty prostupu látek kůží⁸²

Rozhodující vliv na permeabilitu sloučenin mají tyto faktory: velikost molekuly, její lipofilita a schopnost tvořit vodíkové vazby. Vztahy mezi mírou kožního prostupu

různých sloučenin a jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi jsou již dobře popsány v literatuře.^{80, 83-85}

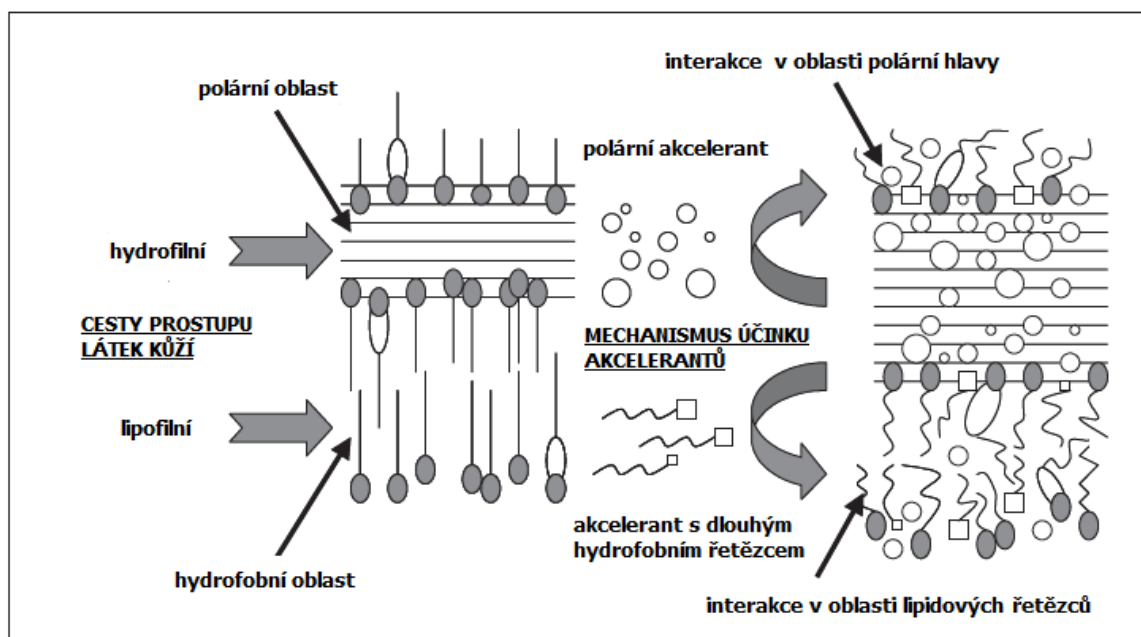
1.2 MODULÁTORY BARIÉROVÉ FUNKCE KŮŽE

1.2.1 Akceleranty transdermální permeace

Jedná se o chemické látky, které mají reverzibilně snížit kožní bariéru a usnadnit tak permeaci léčiv v terapeutických koncentracích do kůže nebo přes kůži do hlubších tkání a krevního oběhu. Na vlastnosti těchto látek jsou kladeny vysoké nároky a v ideálním případě by měly být farmakologicky inertní, netoxické, nedráždivé, nealergizující, kompatibilní s léčivem a pomocnými látkami. Mimoto jejich účinek musí být okamžitý, předvídatelný a reverzibilní, také musí být chemicky a fyzikálně stabilní.⁸⁶ I když neexistuje jediná látka, která by měla všechny uvedené vlastnosti, existuje již mnoho akceleraantů, které byly klinicky testovány a jsou běžně dostupné.

Přesný mechanismus účinku akceleraantů není doposud spolehlivě objasněn. Vzhledem k tomu, že se jedná o chemicky nejednotnou a rozmanitou skupinu látek, existuje několik možných způsobů účinku. Dle Barryho a jeho lipidově-proteinově-rozdělovací teorii mohou akceleraanty interagovat s lipidy SC, proteinovými strukturami SC nebo ovlivnit rozdělovací rovnováhy mezi léčivem a SC.⁸⁷

Většina akceleraantů interaguje s intercelulárními lipidovými doménami SC. Interakce v polární oblasti lipidových lamel je charakteristická pro malé molekuly, jako je např. voda nebo ethanol. Tyto látky mohou porušit pevné vodíkové vazby ceramidů zodpovědné za soudržnost lamel.⁸⁶ Hydrofobní jádro lipidových lamel je naopak místem účinku amfifilních akceleraantů, které nesou stejné strukturní rysy jako ceramidy. Amfifilní urychlovače se vmezeří mezi lipidové lamely tak, že polární hlava je umístěna v polární oblasti a řetězce směřují do hydrofobního jádra, což způsobí narušení těsného upořádání lipidů, fluidizaci nebo fázovou separaci a tím pádem snížení kožní bariérové funkce (Obr. 8).⁷⁷ Kromě toho některá rozpouštědla jako např. DMSO mohou způsobovat extrakci lipidů,⁸⁸ jiné látky se zase mohou kumulovat v lipidových lamelách a vytvářet póry pro vstup polárních látek.⁸⁹



Obr. 8 Hydrofilní a lipofilní cesty prostupu látek kůží a jejich ovlivnění akceleranty transdermální permeace³

Pokud akceleranty interagují s proteinovými strukturami SC, mohou denaturovat nebo měnit konformaci keratinu, především α keratinu, což způsobí bobtnání a zvýšenou hydrataci nebo mohou působit na desmozomy, které zajišťují soudržnost korneocytů.

V případě, že akcelerant mění rozpouštěcí povahu SC, může dojít k ovlivnění rozdělovacího koeficientu léčiva a usnadnění jeho prostupu do tkáně.

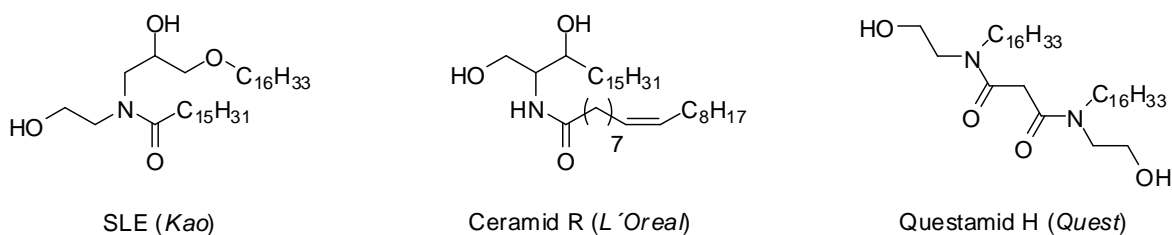
Kromě toho mohou některé akceleranty působit nepřímo na základě změny termodynamické aktivity donorového vehikula nebo zvýšení rozpustnosti léčiva v donorovém vehikulu.⁸⁶

1.2.2 Látky regenerující poškozenou kožní bariéru

Látky schopné regenerovat poškozenou kožní bariéru mohou zasahovat na některé úrovni syntézy ceramidů nebo pouze nahradit chybějící ceramidy ve SC.

Během posledních 20 let bylo prokázáno, že formulace, které obsahují lipidy identické s těmi v kůži, zejména ceramidy, mohou zmírnit poškození kožní bariéry.⁹⁰⁻⁹² Mechanismus působení těchto látek spočívá v jejich rychlém vstřebání po topické aplikaci do jaderných vrstev epidermis a inkorporaci do vznikajících lamelárních granul.⁹³ Příznivých výsledků bylo dosaženo i po topické aplikaci směsi ceramidů ve formě lipozomů, které napodobují organizovanou lamelární strukturu SC.⁹⁴⁻⁹⁶ Ačkoliv již bylo patentováno mnoho formulací obsahující ceramidy nebo pseudoceramidy (Obr. 9), jejich

klinické použití je značně limitováno. To je zapříčiněno z velké části vysokou cenou komerčně dostupných ceramidů a jejich nedostatkem ve vhodném množství a čistotě.³³

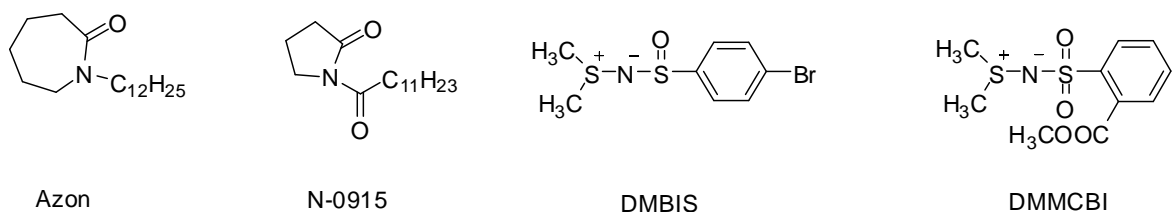


Obr. 9 Příklady pseudoceramidu

Alternativou ke zlepšení bariérové funkce kůže po topické aplikaci kožních lipidů je zvýšení přirozené schopnosti epidermis syntetizovat lipidy díky topickému dodání prekurzorů lipidů.³³ První práce v této oblasti se zabývala nedostatkem esenciálních FFA. Topická aplikace přípravků s kyselinou linolovou vedla ke zvýšení syntézy ceramidu EOS a následné normalizaci poměru linoleát/oleát, který je pozměněn u mnoha kožních onemocnění.⁹⁷

1.2.3 Retardanty

Co se týče permeačních retardantů, tyto vlastnosti byly popsány, respektive spíše náhodně objeveny, u několika chemických struktur. Permeační retardanty jsou obvykle strukturálními analogy akceleračních a předpokládá se, že zpevňují a zhušťují upořádání lipidů SC. Například publikované retardanty N-0915⁹⁸ a *S,S*-dimethyl-*N*-(2-methoxykarbonylbenzensulfonyl)iminosulfuran⁹⁹ (DMMCBI) jsou strukturálními analogy akceleračních Azonu¹⁰⁰ respektive iminosulfuranu DMBIS⁹⁹ (Obr. 10).



Obr. 10 Azon a retardanty odvozené od akceleračních

Studie Kaushika a kol. ukázala, že v závislosti na použití donorového vehikula mohou retardanty působit jako akcelerační a naopak. Pro ilustraci lze uvést Azon, který zvýšil permeaci diethyl-*m*-toluamidu při užití PG jako donorového vehikula přes

lidskou kůži, ale při použití PEG 400 působil jako retardant. Podobně retardant N-0915 působil jako akcelerant v PG, PEG 400 a ethanolu, ale ne s vodou.¹⁰¹

Předpokládá se, že rozhodující vliv na to, zdali bude sloučenina působit jako akcelerant nebo retardant, má jejich interakce s ceramidy SC, zejména ceramidem AP, a tedy schopnost tvořit vodíkové vazby.⁹⁸ Mezi další faktory pak patří tvar molekuly, polarita, chemická struktura a již zmíněné nosné vehikulum.

Nicméně i přes všechna uvedená fakta nebylo dosud dosaženo žádného přesvědčivého výsledku o účinnosti retardantů, kromě perfluorovaných polyetherů.¹⁰²

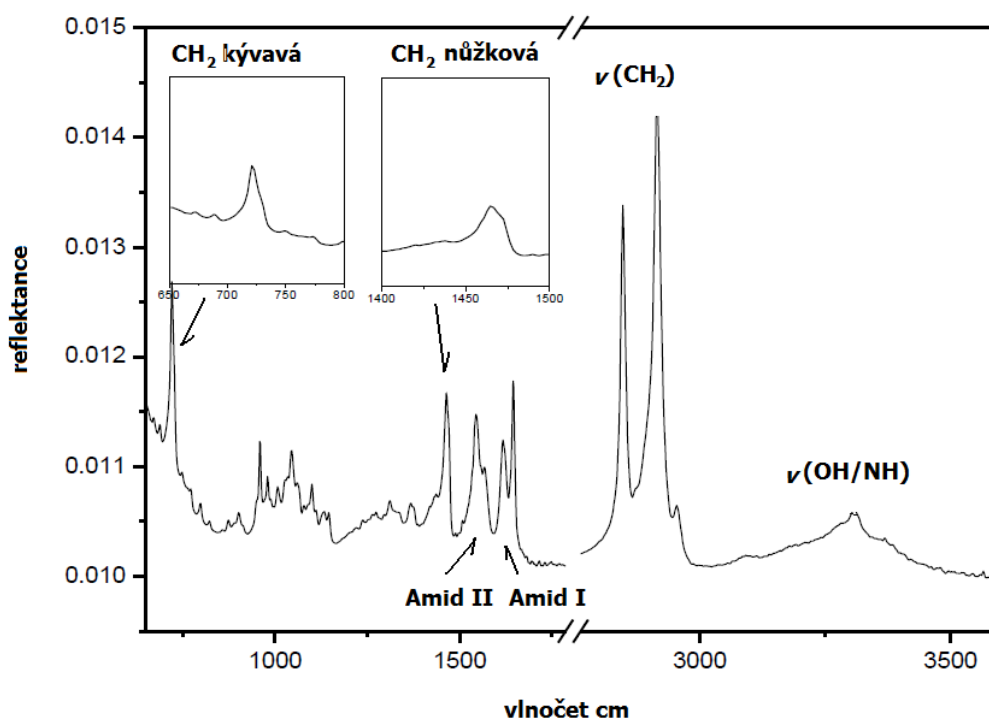
1.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE VE STUDIU SC

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je efektivní, rychlá a zároveň relativně levná analytická technika pro studium struktury a organizace lipidových dvojvrstev. Tato technika poskytuje informaci o všech částech lipidové molekuly současně bez nutnosti zavádění vnější sondy.¹⁰³ Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při němž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Obecně rozlišujeme dva typy molekulových vibrací, a to valenční, kdy se mění délka vazby, nebo deformační, kdy dochází ke změně valenčního úhlu.¹⁰⁴

1.3.1 FTIR spektroskopie ve studiu intra a inter molekulární organizace lipidů stratum corneum

FTIR spektroskopie je již po mnoho let využívána ke studiu intramolekulární a intermolekulární organizace jak izolovaného SC, tak i modelů SC *in vitro*. Modely SC mohou být jednoduché, tvořené pouze ceramidem, až složité vícesložkové směsi mastných kyselin, ceramidu, cholesterolu a esteru cholesterolu, v závislosti na tom, jaké parametry chceme hodnotit. Kromě toho FTIR spektroskopie umožňuje provést dané experimenty za různých fyzikálních podmínek, jako je teplota, hydratace, pH a osmolarita.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹

K objasnění organizace lipidů se využívá mnoho vibračních módů. Obr. 11 představuje IR spektrum nehydratovaného ceramidu NS s označenými hlavními vibračními módy používaných k charakterizaci strukturální organizace ceramidů. Přesné pozice různých módů jsou uvedeny v Tab. 1. Z daného spektra můžeme tedy odvodit organizaci uhlovodíkového řetězce stejně jako interakce v oblasti polární hlavy ceramidu.



Obr. 11 FTIR spektrum ceramidu NS s označenými hlavními vibracemi

V používaných lipidických směsích se často využívá deuterovaných lipidů, zejména mastných kyselin (DFFA), což umožňuje souběžně a odděleně sledovat dvě různé lipidové složky směsi. Důvodem pro samostatné souběžné sledování obou lipidů spočívá v deuteriem vyvolaným posunem C-H/C-D vibrací. Na základě toho můžeme získat informace o konformaci, laterálním uspořádání a mísitelnosti lipidů odlišných struktur.

Tab. 1 Přehled charakteristických vibrací funkčních skupin kožních lipidů^{110, 111}

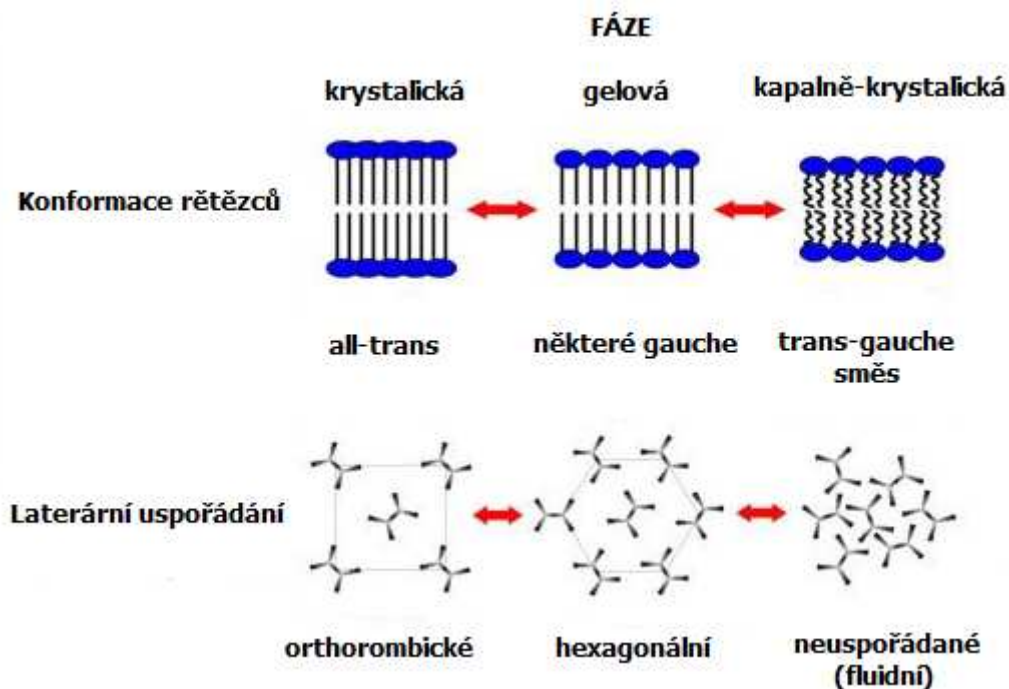
Frekvence cm^{-1}	Přiřazení vibrace	Poznámky
3300	Amid A (N-H valenční)	
Cca 3080	Amid B (N-H valenční)	
3010	=C-H valenční alkenů	
2957	Asymetrická CH_3 valenční	
2616-2924	Asymetrická CH_2 valenční	Frekvence se zvyšuje s neuspořádaností řetězce

2846-2855	Symetrická CH ₂ valenční	Frekvence se zvyšuje s neuspořádaností řetězce
2872	Symetrická CH ₃ valenční	
2180-2195	Asymetrická CD ₂ valenční	Frekvence se zvyšuje s neuspořádaností řetězce
2085-2100	Symetrická CD ₂ valenční	Frekvence se zvyšuje s neuspořádaností řetězce
1690-1740	C=O valenční ester nebo karboxyl	Pozice pásu je citlivá na tvorbu vodíkových vazeb a hydrataci, frekvence hydratovaných nebo vodíkově vázaných skupin se nachází při spodní hranici frekvenčního rozsahu
1630-1660	Amid I (80 % C=O valenční)	Pozice pásu je citlivá na tvorbu vodíkových vazeb a hydrataci; frekvence hydratovaných nebo vodíkově vázaných skupin se nachází při spodní hranici frekvenčního rozsahu
1540-1550	Amid II (60 % N-H rovinná deformační, 40 % C-N valenční)	Pozice pásu je citlivá na tvorbu vodíkových vazeb a hydrataci; frekvence hydratovaných nebo vodíkově vázaných skupin se nachází při horní hranici frekvenčního rozsahu N-H→N-D výměna vede k posunu pásu na cca 1450 cm ⁻¹
1462 a 1473	CH ₂ nůžková	Dublet orthorhombické fáze
1468	CH ₂ nůžková	Hexagonální fáze
1466	CH ₂ nůžková	Neuspořádaná fáze
Cca 1395	C=O vibrace COO ⁻	
1378	CH ₂ symetrická deformační	
1368	CH ₂ vějířová neuspořádaná	<i>gtg</i> nebo kink (<i>gtg'</i>) sekvence konformerů
1353	CH ₂ vějířová neuspořádaná	<i>gg</i> sekvence konformerů
1341	CH ₂ vějířová neuspořádaná	End <i>gauche</i> konformer
1180-1350	CH ₂ vějířová uspořádaná	All- <i>trans</i> polymethylenový řetězec, dochází k progresi a štěpení pásu
1300	Amid III (40 % C-N vibrace, 30 % rovinná deformační, 20 % methyl-C vibrace)	Pozice pásu je citlivá na tvorbu vodíkových vazeb a hydrataci
1170	Ester C-O asymetrická vibrace	
1092 a 1085	CD ₂ nůžková	Dublet orthorhombické fáze
1089	CD ₂ nůžková	Hexagonální fáze
1087	CD ₂ nůžková	Neuspořádaná fáze
728 a 720	CH ₂ kývavá	Dublet orthorhombické fáze
721	CH ₂ kývavá	Hexagonální fáze
720	CH ₂ kývavá	Neuspořádaná fáze

1.3.1.1 Vibrace řetězců

FTIR spektroskopie poskytuje přímé sledování konformace, tzv. membránovou fluiditu, a laterální uspořádání, tzv. laterální rovinné membránové domény, uhlovodíkových řetězců lipidů. Spektrální přiřazení a detailní poznatky o vzájemných vztazích mezi strukturou a vibračním spektrem lipidových řetězců jsou z velké části přeneseny ze základních studií R. G. Snydera a jeho spolupracovníků zabývajících se alkany.

Schéma intramolekulární a intermolekulární organizace lipidů ve dvojvrstvě relevantní k organizaci lipidů CS je uvedeno na Obr. 12. Na levé straně je zobrazena krystalická fáze s uhlovodíkovými řetězci po celé délce v *all-trans* konformaci se specifickými meziřetězovými interakcemi a velmi těsným orthorhombickým laterálním uspořádáním, gelová fáze s *all-trans* hexagonálně uspořádanými řetězci s mírným nárůstem počtu *gauche* konformerů, kde dochází k oslabení meziřetězových interakcí a zvýšené mobilitě řetězců je zobrazena uprostřed, vpravo je vyobrazena kapalně-krystalická fáze s neuspořádanými řetězci, tj. s vysokým podílem *gauche* konformerů, a chybějící laterální organizací, kdy se mohou řetězce pohybovat víceméně volně.¹¹²

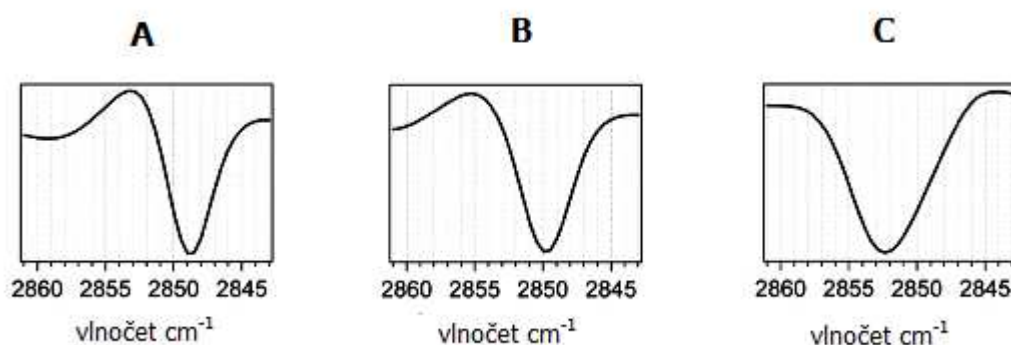


Obr. 12 Schematické znázornění intra a inter molekulární organizace lipidů v lamele SC¹¹³

CH₂ valenční vibrace

Ve spektrální oblasti mezi 2800 a 3000 cm^{-1} jsou nejintenzivnějšími pásy valenční vibrace methylenových skupin (CH_2) uhlovodíkového řetězce. Asymetrické ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$) a symetrické ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$) methylenové vibrace uhlovodíkových řetězců se nachází při vlnočtech okolo 2920 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} . Pokud jsou řetězce jedné složky lipidové směsi deuterované, příslušné vibrace pro tyto řetězce se zobrazí při vlnočtech $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$ 2190 cm^{-1} a $\nu_{\text{s}}(\text{CD}_2)$ 2095 cm^{-1} bez rušení ostatními složkami a můžeme tak zvlášť sledovat jejich organizaci.

Methylenové valenční vibrace kvalitativně monitorují konformaci a laterální uspořádání řetězců. Také jsou velmi citlivé na změny teploty a vnější podmínky, jako jsou např. lipid-proteinové interakce. Tato citlivost umožňuje hodnocení změny konformace, tj. *trans-gauche* izomerizaci v řetězci nebo změnu v laterální geometrii. Velmi těsně uspořádané uhlovodíkové řetězce po celé délce v *all-trans* konformaci vykazují $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ při nižších vlnočtech okolo 2847 cm^{-1} . Při zvýšení teploty vzrůstá množství *gauche* konformerů a neuspořádanost řetězce, která se projeví zvýšením vlnočtu $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ vibrace. Současně se změnou v pozici absorpčního maxima $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ vibrace dochází i k rozšiřování absorpčního pásu, které odráží zvyšující se rotační mobilitu podél uhlovodíkových řetězců (Obr. 13). Totéž platí pro $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ nebo odpovídající $\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$ a $\nu_{\text{s}}(\text{CD}_2)$ vibraci.^{114, 115}



Obr. 13 Pozice a vzhled absorpčního pásu $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ vibrace řetězců lipidů v krystalické (A), gelové (B) nebo kapalně-krystalické fázi (C)¹¹²

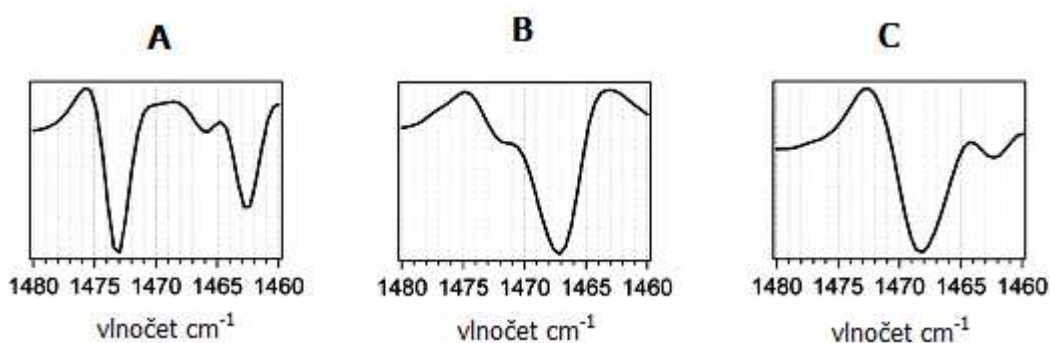
Obecně poskytují $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ a $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ rovnocenné údaje o konformaci (fluiditě), avšak $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ je více citlivá na změny v laterálním uspořádání než $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$. Dle polohy pásu $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ můžeme dále rozlišit, zdali je posun ve vlnočtu vibrace vyvolán především změnou v geometrii laterálního uspořádání řetězců nebo neuspořádaností řetězce. Jestliže je poloha pásu $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ pod 2850 cm^{-1} , posuny jsou připisovány zejména změnám v laterálním uspořádání řetězců obvykle pocházející ze solid-solid tranzice. Pokud hodnota

vlnočtu ν_s (CH_2) přesáhne 2850 cm^{-1} , změny jsou přisuzovány pouze vzniku neuspořádanosti řetězců.^{114, 115}

CH₂ nůžkové vibrace

Analýza CH_2 nůžkové vibrace (δ (CH_2)) v rozmezí $1460\text{-}1475 \text{ cm}^{-1}$ umožňuje sledování vzájemného uspořádání řetězců do krystalické mřížky a určit jednoznačně charakter přítomné fáze (domény). Pozice vibrací, stejně jako tvar absorpčního pásu, určuje, zda jsou alkylové řetězce uspořádány do orthorobické nebo hexagonální mřížky v subcele nebo naopak v neuspořádané fázi

Přítomnost orthorhombického uspořádání indikuje rozštěp δ (CH_2) do dvou pásů, který je způsoben meziřetězcovými interakcemi. U hexagonálního uspořádání je přítomen pouze jeden pík (Obr. 14).^{116, 117} Stejná závislost platí i pro deuterované řetězce o vlnočtu δ (CD_2) v rozmezí $1086\text{-}1094 \text{ cm}^{-1}$.¹¹⁴



Obr. 14 Vzhled a pozice absorpčního pásu δ (CH_2) vibrace u orthorhombického (A) a hexagonálního (B) laterárního uspořádání řetězců nebo v neuspořádané fázi (C)¹¹²

Snyder a kol. studovali rozštěp píku δ (CH_2) orthorhombické fáze podrobněji a zjistili, že interakce jsou pouze krátkého dosahu a pochází z vibračního kaplingu sousedních řetězců. Taktéž prokázali závislost mezi velikostí rozštěpu pásu a velikostí domény. Tato funkce je ovšem aplikovatelná pouze na domény o velikosti méně než 100 řetězců, což odpovídá 50 molekulám lipidů.^{118, 119}

Jako další parametr k hodnocení přítomnosti a rozsahu orthorhombické fáze lze také využít velikost šířky absorpčního pásu δ (CH_2) (plná šířka v polovině výšky píku) vypočítané z druhé derivace příslušného spektra. Tento parametr vykázal vysokou rozlišovací schopnost při určení typu laterárního uspořádání lipidů v lidské a prasečí kůži. Maximální hodnota $12,0 \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$ svědčí o přítomnosti orthorhombického upořádání,

zatímco minimální hodnota $4,0 \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$ svědčí o přítomnosti hexagonální a/nebo kapalně krystalické fáze.^{112, 120}

Kromě toho v lipidových směsích, kde má jedna složka deuterované řetězce nedochází k vibračním interakcím mezi $\delta (\text{CH}_2)$ a $\delta (\text{CD}_2)$, jestliže jsou tyto komponenty smíšeny. Tento fakt je způsoben velkým frekvenčním rozdílem mezi $\delta (\text{CH}_2)$ a $\delta (\text{CD}_2)$ vibracemi. K vibračnímu kaplingu dochází pouze mezi řetězci stejného izotopu. Pokud se tedy nachází jednotlivé složky v oddělených doménách, můžeme určit charakter každé domény ze vzhledu příslušné nůžkové vibrace, jak bylo popsáno výše. Je také možné odhadnout velikost domén.¹¹⁴

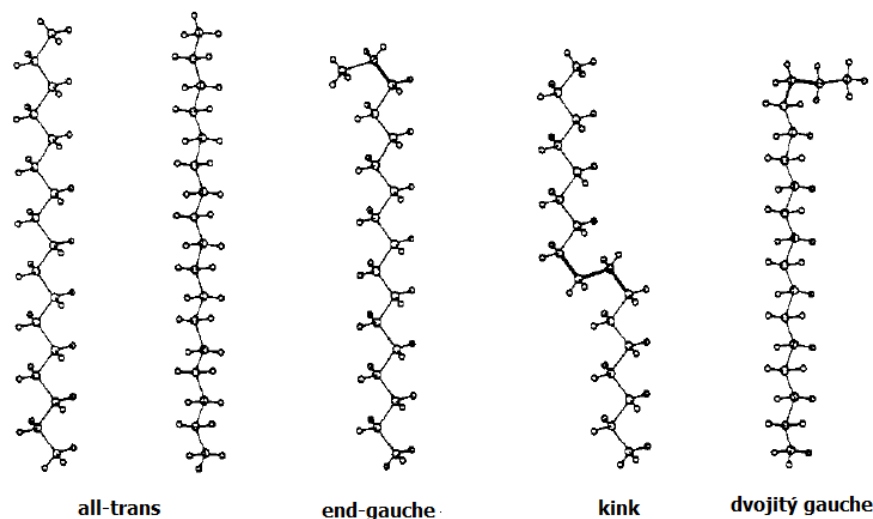
CH₂ kývavé vibrace

CH₂ kývavé vibrace ($\gamma (\text{CH}_2)$) v rozmezí vlnočtů $718\text{-}731 \text{ cm}^{-1}$, stejně jako $\delta (\text{CH}_2)$ vibrace, slouží ke sledování vzájemného uspořádání řetězců do krystalické mřížky a platí pro ně stejné závislosti, tzn. orthorhombické uspořádání je opět určeno rozštěpením pásu, zatímco u hexagonálního je absence toho rozštěpu.¹²¹

CH₂ vějířová vibrace

Další informace o konformaci řetězců mohou být odvozeny z CH₂ vějířových vibrací. V uspořádaných fázích, kde jsou řetězce po celé délce v *all-trans* konformaci, dochází kaplingem ke štěpení pásu a vzniku série (progrese) pásů mezi $1180\text{-}1350 \text{ cm}^{-1}$. Počet těchto pásů závisí na počtu methylenových skupin v *all-trans* řetězci.¹²² U nenasycených řetězců struktury $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_m\text{R}$, kde R je polární funkční skupina jako např. methylester, progrese pochází z kaplingu methylenových skupin mezi dvojnou vazbou a polární částí molekuly.¹²³

V neuspořádaných fázích s *gauche* konformery dochází k redukci délky *all-trans* polymethylenových segmentů a kapling je tak rušen nebo značně zeslaben. Progrese pásů je nahrazena lokalizací vibrací vznikajících zejména ze dvou nebo tří vazebných konformačních postavení následovně: 1341 cm^{-1} end-*gauche*, 1353 cm^{-1} dvojité *gauche*, 1368 cm^{-1} kink nebo *gtg* konformer (Obr. 15).¹²⁴



Obr. 15 Konformace uhlovodíkového řetězce alkanu o délce 17 uhlíků. Defekty v konformaci jsou znázorněny tučně¹²⁵

1.3.1.2 Vibrace polární oblasti

Kompletní popis molekulární organizace SC vyžaduje také pochopení molekulárních interakcí v oblasti polární hlavy ceramidů a mastných kyselin.

C=O valenční vibrace FFA

Pro objasnění molekulární organizace v oblasti polární hlavy mastných kyselin se využívá analýza valenční vibrace karbonylu v rozmezí 1690-1740 cm^{-1} . Zapojení karbonylové skupiny do pevných vodíkových vazeb způsobuje charakteristický pokles frekvence. Naopak oslabení interakcí vede k posunu vlnočtu k vyšším hodnotám. Deformační vibrace karbonylu ionizovaných kyselin se nachází při nižším vlnočtu okolo 1395 cm^{-1} .^{126, 127}

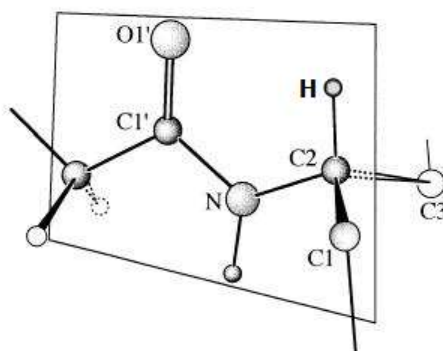
Amid I a amid II

Vibrace amidové vazby ceramidů pozorované v oblasti 1500-1700 cm^{-1} jsou velmi citlivé na polaritu okolního prostředí. Tvar pásu amidové I a II vibrace, stejně jako pozice pásu svědčí o účasti amidové skupiny na vodíkových vazbách. Dle pozice absorpčního pásu můžeme usuzovat na sílu vodíkových vazeb. Změny ve tvaru a pozici pásu jsou interpretovány z hlediska změny struktury a/nebo hydratace lipidové dvojvrstvy.

Amidový mód I okolo 1645 cm^{-1} pochází převážně z valenční C=O vibrace karbonylu a jeho zapojení do sítě velmi silných vodíkových vazeb způsobuje charakteristický pokles vlnočtu vibrace. Amidový mód II okolo 1555 cm^{-1} pochází

z N-H rovinné deformační a valenční C-N vibrace amidu a oslabení vodíkových vazeb v polární oblasti je indikována snížením vlnočtu vibrace.¹²⁶⁻¹²⁸

Při studiu termotropního chování samotných ceramidů byla zjištěna poloha amidové I vibrace fytosfingosinových ceramidů okolo vlnočtu 1610 cm^{-1} a jasně ukazuje na silné zapojení amidové skupiny do pevné sítě vodíkových vazeb. Vyšší frekvence amidové I vibrace, které se vyskytují u sfingosinových ceramidů, jsou charakteristické pro slabší vodíkové interakce mezi polárními hlavami.¹²⁹ Studium monovrstev bylo zjištěno, že plocha polární hlavy fytosfingosinových ceramidů je větší než u sfingosinových.¹³⁰ Tato otevřenější struktura umožňuje fytosfingosinovým ceramidům tvořit silnější sítě vodíkových vazeb v porovnání se sfingosinovými ceramidy. Naopak uzavřená struktura polární hlavy sfingosinových ceramidů jim umožňuje zaujmout orthorhombické laterální uspořádání řetězců. Srovnáme-li ceramidy s α -hydroxy FFA s příslušnými ceramidy s nehydroxylovanou FFA, vykazují ceramidy s α -hydroxy FFA slabší vodíkové interakce (AS < NS << AP < NP).¹²⁹ Navíc byl u ceramidu NS pozorován rozštěp jak amidové I, tak amidové II vibrace. Tento rozštěp však nebyl přítomen u ceramidu AS.¹²⁶ Rozštěp amidového I a II pásu je přítomen u proteinů se sekundární strukturou paralelního β skládaného listu.^{131, 132} Studie Paschera a kol. zabývající se ceramidy a příbuznými molekulami ukázaly, že uhlíkový atom karbonylu a vodíkový atom uhlíku C2 sfingosinu jsou uspořádány téměř syn-periplanárně, čímž je rovina amidové skupiny téměř kolmá na osu sfingosinového řetězce (Obr. 16).¹³³



Obr. 16 Planární uspořádání amidové skupiny v ceramidech s ohledem na sterické interakce mezi uhlíkem C1 polární hlavy a uhlíkem C3 sfingosinového řetězce. V této konformaci je vodíkový atom na uhlíku C2 téměř v zákrytu s uhlíkem C1 karbonylu ($C1'-N-C2-H \sim 0^\circ$)¹³³

Stejná orientace amidové skupiny se nachází ve struktuře paralelně β skládaného listu polypeptidů. Štěpení pásu je tak přisuzováno mezimolekulárním interakcím mezi amidovými skupinami ceramidu NS v různých vrstvách lamel vyplývající

z mezimolekulárního kaplingu stejných vibračních modů, které je analogické vibrační situaci izolovaného polypeptidového řetězce ve struktuře β skládaného listu.^{126, 127} Tato hypotéza byla podpořena studií monovrstev ceramidu NS, v níž nebyl rozštěp pásu amidové I vibrace pozorován.¹³⁴ Naproti tomu absence rozštěpu u ceramidu AS nasvědčuje tomu, že vodíkové vazby pocházejí z laterálních mezimolekulárních interakcí polárních skupin ceramidů v lamele. Dodatečný α -hydroxyl acylu ceramidu AS směřuje od molekuly a umožňuje tak vodíkové interakce se sousedním karbonylem a vodíkem amidové vazby. U těchto interakcí se neočekává, že by mohly způsobit rozštěp amidové I a II vibrace.¹²⁶ Interakce v polární oblasti nedávno identifikovaných 6-hydroxysfingosinových a dihydrosfingosinových ceramidů prozatím zůstává neobjasněna.

1.3.2 Další aplikace FTIR spektroskopie ve studiu stratum corneum

Kromě využití FTIR spektroskopie pro objasnění inter a intra molekulární organizace lipidů SC a interakcí v oblasti polární hlavy, může být FTIR využita také ke studiu fázového chování lipidů, kinetiky fázové separace, sledování průniku vody do SC nebo pro studium mechanismu účinku akceleračních činidel.

1.3.2.1 Studium fázového chování lipidů SC

Jak již bylo zmíněno výše, lipidy SC se mohou nacházet v jedné ze tří fází uvedených v kapitole 1.3.1.1. V závislosti na podmínkách dochází mezi těmito fázemi k přeměně – fázovým tranzicím.³³ V lidském SC byly identifikovány čtyři fázové přechody při 35, 65, 80 a 95 °C. První tři jsou přisuzovány změnám v konformaci lipidů. Tranzice při 95 °C je připisována denaturaci keratinu korneocytů, poněvadž byla zaznamenána i po extrakci lipidů ze SC a je termálně nevratná.¹³⁵ Při studiu termotropního chování jednotlivých lipidů SC nebo jejich směsí *in vitro* můžeme zaznamenat jeden nebo dva fázové přechody. Hlavním fázovým přechodem je proces tání, tedy právě přechod z uspořádané gelové fáze do neuspořádané kapalně-krytalické fáze, charakterizovaný teplotou tání T_m . Mimo tuto hlavní tranzici můžeme zaznamenat i tzv. solid-solid tranzici, která předchází tání a je většinou spojena s přechodem z orthorhombického uspořádání na hexagonální. Obecně se pro detekci, přiřazení a charakterizaci jednotlivých fázových přechodů využívají všechny vibrace uvedené v Tab. 1, zejména pak ν_s CH₂, δ CH₂ a γ CH₂

vibrace. K určení T_m můžeme využít i analýzu CH_2 vějířové vibrace, kdy při tání dochází k zániku progresse pásu.¹¹⁰

1.3.2.2 Studium kinetiky fázové separace FFA

Řada IR spektroskopických studií lipidových modelů SC prokázala přítomnost domén s uspořádanými lipidovými řetězci s orthorhombickou laterální organizací. Sledování kinetiky vzniku těchto domén má důležitý význam pro pochopení struktury kožní bariéry. Navíc kinetické studie mohou být využity při studiu obnovy funkce kožní bariéry po jejím porušení, jako je tomu například při dermatálním nebo transdermálním podání léčiv.

Metoda spočívá ve sledování vývoje tvaru absorpčních pásů deformačních CH_2 vibrací orthorhombicky upořádaných řetězců lipidů v závislosti na čase. Ternární směs složená z Cer/DFFA/Chol vykazala časový vývoj tvaru nůžkové vibrace DFFA po ochlazení z relativně vysokých teplot, při kterých nastává nahodilé míšení lipidů. Byla pozorována segregace domén bohatých na DFFA. Koncentrace DFFA ve vznikající doméně lze určit z kalibrační křivky vyjadřující závislost velikosti rozštěpu nebo šířky δ (CD_2) absorpčního pásu na koncentraci DFFA ve směsi DFFA/FFA. Doba potřebná pro segregaci domén v tomto modelu odpovídala době, která byla zaznamenána ve studiích sledující obnovu kožní bariéry *in vivo* po jejím narušení pomocí extrakce lipidů, UVB ozáření, iontoforézou nebo kyselinou olejovou, což ukazuje na význam studia kinetiky fázové separace pro studium procesů v kůži.¹³⁶

1.3.2.3 Průnik vody do SC

Pro sledování průniku vody do polárního rozhraní lipidových lamel SC se využívá hydratace D_2O namísto H_2O . Při penetraci je sledována teplotní závislost intenzit amidové II a poměru intenzity O-H/N-H valenčních vibrací ceramidů jako funkce výměny H za D. Výměna H za D v amidové vazbě ceramidu vede k posunu vlnočtu amidové II vibrace z 1545 cm^{-1} na 1450 cm^{-1} . Obecně není D_2O za fyziologické teploty schopná pronikat do polárního rozhraní.^{126, 128} To nasvědčuje vysoce organizované a uspořádané struktuře lipidů SC. Zvláště je to patrné u ceramidů NS a NP, u kterých dochází k výměně

až za relativně vysokých teplot (>65 °C). Dodatečná hydroxy skupina acylu ceramidů AS a AP má za následek výměnu pozorovanou při teplotách mnohem blíže fyziologickým.¹²⁹

1.3.2.4 *Studium mechanismu účinku akceleračních transdermálních permeací*

FTIR analýza SC poskytuje množství absorpčních pásů o různých vlnových délkách, které lze přičíst jak lipidům, tak proteinům SC. Lipidovou frakci můžeme snadno identifikovat dle methylenových valenčních vibrací, stejně jako valenční vibrací karbonylu. Amidovou I a II vibraci lze spolu se symetrickou methylovou vibrací přisoudit proteinové frakci SC. Amidová I vibrace odráží sekundární strukturu α -šroubovice keratinu korneocytů. Kromě absorpce v důsledku struktury proteinů k amidové I vibraci přispívají i vibrace amidové vazby ceramidů a dalších komponent SC. Nicméně na vzhledu pásů této vibrace má převážně podíl keratin. Kromě toho můžeme korneocytální frakci charakterizovat pomocí absorpčního pásu okolo vlnočtu 3070 cm^{-1} , který je přiřazen amidové B vibraci.^{137, 138}

Důvodem pro použití FTIR metody pro objasnění mechanismu účinku akceleračních je posun vlnočtu charakteristických vibrací nebo změna intenzity daného absorpčního pásu po interakci s akceleračním.

Jestliže akcelerační interaguje s intercelulárními lipidovými doménami, dochází k posunu vlnočtu valenčních methylenových vibrací k vyšším hodnotám svědčící o začlenění molekuly akceleračního mezi lipidy SC a jejich fluidizaci. Tato změna se navíc projeví změnou šířky a plochy absorpčních pásů methylenových vibrací.^{139, 140}

Pokud akcelerační vyvolá změnu konformace keratinu, dochází k obměnám v rozštěpu pásů vibrace amidu I. Ve spektru lze zaznamenat vznik intenzivní nízkofrekvenční složky vibrace amidu I odpovídající konformaci β skládaného listu a naopak slabé vysokofrekvenční složky amidu I odpovídající α -šroubovici.^{138, 139}

Vzhledem k tomu, že výška nebo šířka absorpčního pásu reprezentuje množství lipidů/proteinů SC, snížení intenzity charakteristických píků, může naznačovat extrakci lipidů způsobenou akceleračními s tímto mechanismem účinku.^{139, 141}

2 DERIVÁTY AMINOKYSELIN JAKO AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PERMEACE

Tato práce byla sepsána do publikace a zaslána do impaktovaného časopisu:

Janůšová, B.; Školová, B.; Tükörová, K.; Wojnarová, L.; Šimůnek, T.; Mladěnka, P.; Filipický, T.; Říha, M.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. (v recenzním řízení), Příloha I

2.1 ÚVOD

Deriváty aminokyselin jsou pravděpodobně nejperspektivnější skupinou permeačních akceleračních látek, zejména ty, které mají hydrofobní řetězec připojen k polární hlavě představované aminokyselinou biologicky odbouratelnou vazbu, např. esterovou. Tento molekulární „design“ nabízí výhody spojené s amfifilní strukturou, která je schopná začlenění mezi bariérové lipidy SC a dovede tak narušit těsné upořádání membránových lipidů a po dosažení enzymaticky aktivní epidermis může být nestabilní vazba hydrolyzována za uvolnění známých netoxických látek. Tento přístup v navrhování permeačních urychlovačů vyústil v identifikaci vysoce účinných akceleračních látek s příznivými vlastnostmi, např. derivát alaninu dodecyl-2-(dimethylamino)propanoát (DDAIP, NexAct¹⁴²), Transkarbam 12 (T12),^{143, 144} deriváty kyseliny tranexamové¹⁴⁵ a dodecyl-6-(dimethylamino)hexanoát (DDAK).¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

V této studii jsme zkoumali aminokyseliny glycin (Gly), L- a D-alanin (L-Ala a D-Ala), β -alanin (β -Ala), sarkozin (Sar) a L- a D-prolin (L-Pro a D-Pro) jako součást polární hlavy akceleračních látek. Náš zájem o α -aminokyseliny byl původně založený na L-serinu (L-Ser), výchozí aminokyselině v biosyntéze klíčových lipidů kožní bariéry – ceramidů. Předpokládali jsme nutnost určité strukturální podobnosti mezi akceleračním látkou a ceramidem k zajištění jejich molekulární interakce nezbytné pro urychlovací účinek. Proto jsme v předchozí studii připojili k této aminokyselině dva hydrofobní řetězce, aby připomínala strukturou ceramid. Zjistili jsme, že délka řetězce je klíčová. L-Ser se dvěma 12 uhlíkatými řetězci působil jako mírný akcelerační látkou,^{149, 150} zatímco jeho homolog 14S24 se stejnou délkou řetězců jako ceramidy byl schopen regenerovat poškozenou kožní bariéru.^{151, 152} Výměna L-Ser za Gly, tedy odstranění hydroxymethylové skupiny, zvýšila urychlovací aktivitu pravděpodobně díky nižší schopnosti tvořit vodíkové vazby.^{149, 150}

V této práci byla navržena série dvouřetězcových akceleračních látek na bázi glycinového homologu β -Ala, jeho izomerů L-Ala a Sar a také na konformačně omezené cyklické aminokyselině L-Pro. Poslední dvě aminokyseliny sloužily k ověření naší hypotézy, že schopnost tvorby vodíkové vazby negativně ovlivňuje akcelerační aktivitu. Kromě toho u derivátů Pro^{153, 154} a Sar¹³⁹ již byla v minulosti zaznamenána urychlovací schopnost. Za povšimnutí také stojí použití Gly, β -Ala a Pro k přípravě profarmak agonisty dopaminu 5-hydroxy-*N,N*-dipropyl-2-aminotetralinu pro transdermální iontoforézu.¹⁵⁵

Rovněž jsme připravili sérii akceleračtů s jedním řetězcem založenou na stejných aminokyselinách k potvrzení našeho předchozího předpokladu, že odstranění jednoho dlouhého hydrofobního řetězce zvyšuje akcelerační aktivitu. Účinek připravených derivátů aminokyselin byl srovnán se známými standardními akceleračty, včetně Azonu¹⁰⁰, DDAIP, DDAK a T12. Také jsme studovali reverzibilitu účinku L-Pro2, neúčinnějšího akceleračtů této skupiny, měřením elektrické impedance a jeho interakci s lipidy kožní bariéry a proteiny pomocí FTIR spektroskopie. Toxicity vybraných akceleračtů a možné zapojení apoptózy do buněčné smrti byly hodnoceny na buněčných kulturách keratinocytů a fibroblastů ve srovnání se známými akceleračty. Dále jsme porovnávali L- a D-enantiomery vybraných akceleračtů a jejich potenciální stereoselektivní vliv na aktivitu či toxicitu. Neúčinnější akceleračt L-Pro2 byl podroben také *in vivo* studiím na potkanech k potvrzení jeho akceleračního účinku a hodnocení jeho toxicity, biodegradability a vlivu na transepidermální ztrátu vody.

2.2 MATERIÁL A METODY

2.2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Silikagel 60 (hrubost částic 230-400) pro sloupcovou chromatografii, TLC desky (silikagel 60 F₂₅₄) a HPLC kolony byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Struktura a čistota připravených látek byla potvrzena ¹H a ¹³C NMR spektry (přístroj Varian Mercury-Vx BB 300, pracující při 300 MHz pro ¹H, 75 MHz pro ¹³C), infračervenou spektroskopii FTIR (spektrofotometr Nicolet Impact 400), MS (Agilent 500 Ion Trap LC/MS). Chirální sloučeniny byly charakterizovány jejich optickou otáčivostí (polarimetr ADP Bellingham and Stanley, 1,0 dm cela). Teploty tání byly měřeny bodotávkem Büchi B-545 a nejsou korigovány. Hodnoty logP byly vypočítány pomocí software ACD/Labs (Ontario, Kanada).

2.2.2 Syntéza

Příprava dodecylesterů hydrochloridů aminokyselin

Příslušná aminokyselina (24 mmol) byla rozsuspendována v nadbytku dodekanolu (72 mmol) a míchána 7 h při teplotě 120 °C na olejové lázni. Po půl hodině a dále každé 2 h byl do směsi zaváděn po dobu 15 min suchý chlorovodík.¹⁵⁶ Reakční směs byla udržována pod dusíkem. Produkt byl získán krystalizací z acetonu a promyt hexanem pro odstranění nadbytečného dodekanolu. Vzniklé krystaly byly sušeny za sníženého tlaku nad KOH. Hydrochloridy prolinů byly získány gradientovou sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 1:0 – 6:4 (v/v) k odstranění méně polárních nečistot. Produkt byl vmyt methanolem, zahuštěn a krystalizován z acetonu.

2-(dodecyloxy)-2-oxoethanamonium-chlorid (12-Gly-NH₃⁺)

C₁₄H₃₀NO₂Cl; 279,85 g/mol; výtěžek: 91 %; bílé krystaly; *t*_f = 93,5 °C (lit. 95 °C¹⁵⁶); IR (KBr): *v*_{max} 3447, 2919, 2851, 1744, 1467, 1241 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.52 (3H; s; NH₃⁺); 4.12 (2H; t; *J* = 6.6 Hz; OCH₂); 3.75 (2H; s; NCH₂); 1.65-1.50 (2H; m; CH₂); 1.40-1.15 (18H; m; 9 CH₂); 0.84 (3H; t; *J* = 6.7 Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 167.9; 65.6; 41.1; 31.5; 29.3; 29.2; 29.2; 28.9; 28.9; 28.2; 25.4; 22.7; 14.2 ppm.

(S)-1-(dodecyloxy)-1-oxopropan-2-amonium-chlorid (12-L-Ala-NH₃⁺)

C₁₅H₃₂NO₂Cl; 293,87 g/mol; výtěžek: 52 %; bílé krystaly; *t*_f = 102,5°C (lit. 105-106 °C¹⁵⁷); [α]_D^{25,9 °C} 1,5° (1; EtOH) ; IR (KBr): *v*_{max} 3423, 2919, 2850, 1751, 1465, 1239, 720 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.73 (3H; s; NH₃⁺); 4.26-4.10 (3H; m; OCH₂; NCH); 1.72-1.70 (3H; d; *J* = 7.8 Hz; CH₃CH); 1.68-1.59 (2H; m; CH₂); 1.40-1.10 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t; *J* = 6.5 Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 170.1; 66.6; 49.3; 31.9; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.3; 29.2; 28.3; 25.7; 22.7; 16.1; 14.1 ppm.

(R)-1-(dodecyloxy)-1-oxopropan-2-amonium-chlorid (12-D-Ala-NH₃⁺), výtěžek 36 %; [α]_D^{25,9°C} -1.5° (1; EtOH).

3-(dodecyloxy)-3-oxopropan-1-amonium-chlorid (12-β-Ala-NH₃⁺)

C₁₅H₃₂NO₂Cl; 293,87 g/mol; výtěžek: 27 %; bílé krystaly; *t*_f = 75 °C; IR (ATR): *v*_{max} 2915, 2848, 1734, 1722, 1467, 1209, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.27 (3H; s;

NH₃⁺); 4.09 (2H; t; $J = 6.6$ Hz; OCH₂); 3.35 (2H; t; $J = 6.3$ Hz; NCH₂); 2.90 (2H; t; $J = 6.5$ Hz; CH₂CO); 1.63-1.56 (2H; m; CH₂); 1.40-1.10 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t; $J = 6.9$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 171.3; 65.6; 35.7; 31.9; 31.2; 29.7; 29.6; 29.5; 29.3; 29.3; 28.4; 25.9; 22.7; 14.1 ppm.

(S)-2-(dodecyloxykarbonyl)pyrolidin-1-ium-chlorid (12-L-Pro-NH₂⁺)

C₁₇H₃₄NO₂Cl; 319,91 g/mol; výtěžek: 31 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{27,4\text{ }^\circ\text{C}}$ -25,9° (1,1; EtOH); $t_f = 61,1$ °C; IR (KBr): ν_{max} 3427, 2923, 2853, 1748, 1741 1466, 1248, 1057 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 10.81 (1H; s; NH₂⁺); 8.99 (1H; s; NH₂⁺); 4.56-4.37 (1H; m; CH); 4.31-4.10 (2H; m; OCH₂); 3.68-3.40 (2H; m; NCH₂); 2.52-1.92 (4H; m; NCH₂CH₂CH₂CH); 1.73-1.58 (2H; m; CH₂); 1.40-1.09 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t; $J = 6.4$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 168.9; 67.1; 59.1; 45.9; 31.9; 29.6; 29.5; 29.5; 29.3; 29.2; 28.9; 28.3; 25.7; 23.6; 22.6; 14.1 ppm.

(R)-2-(dodecyloxykarbonyl)pyrolidin-1-ium-chlorid (12-L-Pro-NH₂⁺), výtěžek 33 %; $[\alpha]_D^{27,6\text{ }^\circ\text{C}}$ 24.5° (1; EtOH).

2-(dodecyloxy)-N-methyl-2-oxoethanamonium-chlorid (12-Sar-NH₂⁺)

C₁₅H₃₂NO₂Cl; 293,87 g/mol; výtěžek: 58 %; bílé krystaly; $t_f = 87,4$ °C; IR (KBr): ν_{max} 3432, 2921, 2851, 1742, 1467, 1246, 1076; 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.44 (2H; s NH₂⁺); 4.12 (2H; t; $J = 6.6$ Hz; OCH₂); 3.91 (2H; s; NCH₂); 2.53 (3H; s; NCH₃); 1.68-1.49 (2H; m; CH₂); 1.41-1.13 (18H; m; 9 CH₂); 0.84 (3H; t; $J = 6.7$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 166.9; 65.6; 48.0; 32.6; 31.5; 29.3; 29.2; 29.2; 29.2; 28.9; 28.9; 28.2; 25.4; 22.3; 14.2 ppm.

Příprava dvouřetězových akceleraⁿtů – dodecylesterů N-dodekanoylaminokyseliny

Příslušný dodecylester hydrochloridu aminokyseliny (0,88 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (0,88 mmol) byly smíchány v 10 ml suchého chloroformu a ochlazeny na 0 °C. Poté byl ke směsi přikapán roztok N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (0,88 mmol) a kyseliny laurové (0,8 mmol) v 10 ml suchého chloroformu. Reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty pod dusíkem a monitorována pomocí TLC. Vzniklá dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a na filtru promyta ethyl-acetátem. Vzniklý filtrát byl zahuštěn, opětovně rozpuštěn v ethyl-acetátu a uchován přes noc při teplotě 4 °C. Dodatečně vzniklá dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, na filtru opět

promyta ethyl-acetátem a filtrát byl zahuštěn. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází petroleter/acetone 8:2 (v/v).

Dodecylester (S)-N-dodekanoylprolinu (L-Pro12)

C₂₉H₅₅NO₃; 465.75 g/mol; výtěžek: 82 %; žlutý olej; [α]_D^{27,9 °C} -29,6° (1; CHCl₃); IR (CHCl₃): ν_{max} 2927, 2855, 1738, 1636, 1466, 1457 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.47-4.43 (0.75H; dd; J = 8.5, 3.7 Hz; CH); 4.39-4.34 (0.25H; dd; J = 8.5, 3.7 Hz; CH); 4.17-4.05 (2H; m; OCH₂); 3.69-3.43 (2H; m; NCH₂); 2.38-1.85 (6H; m; NCH₂CH₂CH₂CH; COCH₂); 1.71-1.53 (4H; m; 2 CH₂); 1.40-1.05 (34H; m; 17 CH₂); 0.87 (6H; t; J = 6.7 Hz; 2 CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.6; 172.0; 65.2; 65.1; 59.5; 58.7; 47.0; 46.2; 34.5; 34.4; 31.9; 31.5; 29.6; 29.6; 29.5; 29.5; 29.4; 29.4; 29.3; 29.3; 29.2; 28.5; 25.8; 24.9; 24.7; 24.6; 22.7; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 466.4 [M+H]⁺. logP 12,09±0,41.

Dodecylester (R)-N-dodekanoylprolinu (D-Pro12); výtěžek: 67 % ; [α]_D^{25,6 °C} 31,0° (1; CHCl₃).

Dodecylester N-dodekanoylsarkozinu (Sar12)

C₂₇H₅₃NO₃; 439.71 g/mol; výtěžek: 64 %; bílé krystaly; t_f = 38,4 °C; IR (KBr): ν_{max} 2915, 2848, 1741, 1652, 1474, 1464, 1238, 727 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.19-4.07 (2H; m, OCH₂); 4.11(1.6H; s; NCH₂); 4.02 (0.4H; s; NCH₂); 3.06 (2.4H; s; NCH₃); 2.96 (0.6H; s; NCH₃); 2.36 (1.6H; t; J = 7.4 Hz; COCH₂); 2.21 (0.4H; t; J = 7.4 Hz; COCH₂); 1.69-1.54 (4H; m; 2 CH₂); 1.40-1.10 (34H; m; 17 CH₂); 0.87 (6H; t; J = 7.2 Hz; 2 CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 169.6; 65.6; 65.3; 53.6; 51.7; 36.5; 33.2; 31.9; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.4; 29.3; 29.2; 28.5; 25.8; 25.1; 24.9; 22.6; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 440.4 [M+H]⁺. logP 10,51±0,35.

Dodecylester (S)-N-dodekanoylalaninu (L-Ala12)

C₂₇H₅₃NO₃; 439.71 g/mol; výtěžek: 61 %; bílé krystaly; [α]_D^{25,6 °C} 1,9° (0,77; CHCl₃); t_f = 60,4 °C; IR (ATR): ν_{max} 3318, 2915, 2848, 1736, 1645, 1535, 1469, 1207, 1164, 718 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.04 (1H; d; J = 7.7 Hz; NH); 4.65-4.53 (1H; m; NCH); 4.13 (2H; t, J = 6.7 Hz, OCH₂); 2.20 (2H; t; J = 7.5 Hz; COCH₂); 1.70-1.55 (4H; m; 2 CH₂); 1.40 (3H; d; J = 6.9 Hz; CH₃); 1.37-1.09 (34H; m; 17 CH₂); 0.87 (6H; t; J = 6.4 Hz; 2 CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.4; 172.6; 65.6; 47.9; 36.6; 31.8; 29.6; 29.5;

29.5; 29.5; 29.3; 29.2; 29.2; 28.5; 25.8; 25.6; 22.6; 18.7; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 440.6 $[M+H]^+$. logP 10,56 ± 0,40.

Dodecylester *N*-dodekanoyl- β -alaninu (β -Ala12)

C₂₇H₅₃NO₃; 439.71 g/mol; výtěžek: 69 %; bílé krystaly; $t_f = 71,2$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3315, 2915, 2848, 1730, 1721, 1637, 1557, 1472, 1461, 1202, 728, 719 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.07 (1H; s; NH); 4.08 (2H; t; $J = 6.2$ Hz; OCH₂); 3.57-3.44 (2H; m; CH₂N); 2.52 (2H; t; $J = 6.5$ Hz; CH₂CO); 2.14 (2H; t; $J = 7.5$ Hz; COCH₂); 1.70-1.51 (4H; m; 2 CH₂); 1.40-1.10 (34H; m; 17 CH₂); 0.87 (6H; t; $J = 7.0$ Hz; 2 CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.1; 172.9; 64.9; 36.8; 34.7; 34.0; 31.9; 29.6; 29.5; 29.5; 29.5; 29.3; 29.2; 29.2; 28.5; 25.9; 25.9; 22.6; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 440.5 $[M+H]^+$. logP 10,38±0,34.

Dodecylester *N*-dodekanoylglycinu (Gly12)

C₂₆H₅₁NO₃; 425.68 g/mol; výtěžek: 78 %; bílé krystaly; $t_f = 81,2$ °C (lit. 81-82 °C¹⁴⁹); IR (KBr): ν_{\max} 3428, 2919, 2848, 1740, 1645, 1548, 1464, 1243, 729, 718 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.04 (1H; s; NH); 4.14 (2H; t; $J = 6.7$ Hz, OCH₂); 4.03 (2H; d; $J = 5.3$ Hz; CH₂N); 2.20 (2H; t; $J = 7.5$ Hz; COCH₂); 1.70-1.55 (4H, m; 2 CH₂); 1.40-1.09 (34H; m; 17 CH₂); 0.87 (6H; t; $J = 6.4$ Hz; 2 CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.4; 170.2; 65.6; 47.9; 36.6; 31.8; 29.6; 29.5; 29.5; 29.5; 29.3; 29.2; 29.2; 28.5; 25.8; 25.6; 22.6; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 426.6 $[M+H]^+$. logP 10,51±0,35.

Příprava jednořetězcových akcelerantů – dodecylesterů *N*-acetylaminokyselín

K příslušnému hydrochloridu dodecylesteru (1,5 mmol) v 10 ml suchého chloroformu byl přidán 4-dimethylaminopyridin (3 mmol). Po 10 min byl ke směsi přikapán čerstvě předestilovaný acetanhydrid (1,5 mmol). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 5 h a monitorována pomocí TLC. Následně byla směs vytřepána vodou, nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zahuštěna na vakuové odparce. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 6:4 (v/v).

Dodecylester (*S*)-*N*-acetylprolinu (L-Pro2)

C₁₉H₃₅NO₃; 325.49 g/mol; výtěžek: 76 %; nažloutlý olej; $[\alpha]_D^{28,8}$ °C -51,5° (1,9; CHCl₃); IR (ATR): ν_{\max} 2924, 2853, 1744, 1658, 1463, 1439, 1416, 1188, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300

MHz, CDCl₃): δ 4.52-4.33 (0.75H; dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 3.6$ Hz, CH); 4.37-4.32 (0.25H; dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 3.6$ Hz, CH); 4.20-4.01 (2H; m; OCH₂); 3.73-3.43 (2H; m; NCH₂); 2.36-1.96 (4H; m; NCH₂CH₂CH₂CH); 2.11 (2.25H; s; COCH₃); 1.97 (0.75H; s; COCH₃); 1.70-1.64 (2H; m; CH₂); 1.40-1.12 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t, $J = 6.9$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.4; 172.2; 169.3; 169.3; 65.7; 65.2; 60.2; 58.6; 47.7; 46.2; 31.9; 31.4; 29.6; 29.5; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.5; 25.8; 24.7; 22.8; 22.6; 22.3; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 326.4 [M+H]⁺. logP 6,78±0,41.

Dodecylester (R)-N-acetylprolinu (D-Pro2), výtěžek: 73 %; $[\alpha]_D^{28,2}$ °C +50,7° (1,9; CHCl₃).

Dodecylester N-acetylsarkozinu (Sar2)

C₁₇H₃₃NO₃; 299.45 g/mol; výtěžek: 86 %; bílé krystaly; $t_f = 45,8$ °C; IR (KBr): ν_{\max} 2920, 2851, 1739, 1652, 1477, 1466, 1210, 1045, 722 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.21-4.05 (2H; m; OCH₂); 4.11 (1.5H; s; NCH₂); 4.01 (0.5H; s; NCH₂); 3.07 (2.25H; s; NCH₃); 2.96 (0.75H; s; NCH₃); 2.14 (2.25H; s; COCH₃); 2.04 (0.75H; s; COCH₃); 1.69-1.56 (2H; m; CH₂); 1.40-1.10 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t, $J = 7.2$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 171.2; 169.4; 65.7; 65.3; 53.6; 52.4; 37.1; 34.7; 31.8; 29.5; 29.5; 29.4; 29.3; 29.1; 29.1; 28.4; 25.7; 22.6; 21.3; 21.2; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 300.3 [M+H]⁺. logP 5,20±0,35.

Dodecylester (S)-N-acetylalaninu (L-Ala2)

C₁₇H₃₃NO₃; 299.45 g/mol; výtěžek: 87 %; bílé krystaly; $t_f = 50,1$ °C; $[\alpha]_D^{28,2}$ °C +5,8° (1; CHCl₃); IR (KBr): ν_{\max} 3432, 3307, 2918, 2850, 1710, 1651, 1555, 1465, 1208, 1160, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.14 (1H; d; $J = 5.6$ Hz; NH); 4.62-4.53 (1H; m; NCH); 4.26 (2H; t, $J = 6.7$ Hz; OCH₂); 2.01 (3H; s; COCH₃); 1.70-1.60 (2H; m; CH₂); 1.41 (3H; d; $J = 7.1$ Hz; CH₃); 1.34-1.14 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t, $J = 6.7$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.2; 169.4; 65.6; 48.1; 31.8; 29.5; 29.5; 29.4; 29.3; 29.1; 28.4; 25.7; 23.1; 22.6; 18.6; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 300.3 [M+H]⁺. logP 5,24±0,40.

Dodecylester (R)-N-acetylalaninu (D-Ala2), výtěžek: 80 %; $[\alpha]_D^{29,2}$ °C -5.7° (1; CHCl₃).

Dodecylester N-acetyl- β -alaninu (β -Ala2)

C₁₇H₃₃NO₃; 299.45 g/mol; výtěžek: 70 %; bílé krystaly; $t_f = 49,6$ °C (lit. 50 °C¹⁵⁸); IR (KBr): ν_{\max} 3448, 3247, 2921, 2851, 1732, 1626, 1566, 1478, 1471, 1183, 720 cm⁻¹; ¹H

NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.14 (1H; s; NH); 4.07 (2H; t; $J = 6.5$ Hz; OCH₂); 3.53-3.46 (2H; m; CH₂N); 2.52 (2H; t; $J = 6.1$ Hz; CH₂COO); 1.96 (3H; s; COCH₃); 1.69-1.56 (2H; m; CH₂); 1.40-1.10 (18H; m; 9 CH₂); 0.86 (3H; t; $J = 7.3$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.9; 170.1; 64.9; 34.8; 33.9; 31.8; 29.5; 29.5; 29.5; 29.4; 29.3; 29.1; 28.5; 25.8; 23.2; 22.6; 14.1 ppm, MS: APCI (pos) m/z 300.4 [M+H]⁺. logP 5,06±0,34.

Dodecylester *N*-acetylglycinu (Gly2)

C₁₆H₃₁NO₃; 285.42 g/mol; výtěžek: 91 %; bílé krystaly; $t_f = 63,7$ °C (lit. 59-60 °C¹⁵⁸); IR (KBr): ν_{\max} IR (KBr): ν_{\max} 3270, 2918, 2850, 1746, 1643, 1567, 1474, 1468, 1199, 1035, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.07 (1H; s; NH); 4.14 (2H; t; $J = 6.8$ Hz; OCH₂); 4.03 (2H; d; $J = 5.3$ Hz; CH₂N); 2.03 (3H; s; COCH₃); 1.68-1.58 (2H; m; CH₂); 1.40-1.10 (18H; m; 9 CH₂); 0.87 (3H; t; $J = 7.0$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.2; 170.1; 65.7; 41.4; 31.9; 29.5; 29.4; 29.3; 29.1; 28.4; 25.7; 22.9; 22.6; 14.0 ppm, MS: APCI (pos) m/z 286.3 [M+H]⁺, 300.2 [M+Na]⁺. logP 4,90±0,39.

Dodecylester (*S*)-*N*-ethylprolinu (L-ProEt).

5,7 mmol triethylaminu bylo přidáno k suspenzi dodecylesteru hydrochloridu prolinu (1,9 mmol) v 10 ml suchého tetrahydrofuranu a mícháno za laboratorní teploty po dobu 1 h. Poté byl ke směsi přikapán ethylbromid (2,28 mmol). Reakce byla dále míchána za laboratorní teploty po dobu 8 h a monitorována pomocí TLC. Následně byla směs vytřepána vodou a nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zahuštěna na vakuové odparce. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethyl-acetát 6:4 (v/v).

C₁₉H₃₇NO₂; 311.50 g/mol. výtěžek: 83 %; nažloutlý olej; $[\alpha]_D^{27,6}$ °C -33,7° (1; CHCl₃); IR (CHCl₃): ν_{\max} 2927, 2855, 1733, 1466, 1273 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.11 (2H; t; $J = 6.4$ Hz; OCH₂); 3.25-3.05 (2H; m; NCH₂CH₃); 2.83-2.63 (1H; m; NCH); 2.53-2.25 (2H; m; NCH₂CH₂); 2.20-1.74 (4H; m; NCH₂CH₂CH₂CH); 1.70-1.52 (2H; m; CH₂); 1.40-1.16 (18H; m; 9 CH₂); 1.11 (3H; t; $J = 7.1$ Hz; CH₃); 0.86 (3H; t; $J = 6.5$ Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 174.1; 65.8; 64.8; 53.0; 48.7; 31.9; 29.6; 29.5; 29.5; 29.4; 29.4; 29.3; 29.2; 28.6; 25.8; 22.9; 22.7; 14.1; 13.6 ppm, MS: APCI (pos) m/z 312.4 [M+H]⁺. logP 6,66±0,30.

Dodecylester (*R*)-*N*-ethylprolinu (D-ProEt), výtěžek: 81 %; $[\alpha]_D^{27,4}$ °C +32,7° (1; CHCl₃).

2.2.3 Kůže

Jako modelová membrána sloužila prasečí kůže pro svou podobnost s lidskou kůží.¹⁵⁹ Prasečí uši byly získány z místních jatek. K zajištění integrity kožní bariéry byly odděleny od těla ještě před čištěním horkou vodní párou. Kůže plné tloušťky byla opatrně oddělena z dorzální strany uší skalpelem a chlupy byly odstraněny zastříhovačem. Poté byla kůže konzervována namočením po dobu 5 min ve fyziologickém roztoku s přídavkem 0,03 % NaN_3 . Takto ošetřená kůže byla vakuově uzavřena do polyethylenových sáčků a uchována při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Pro experimenty nebyla použita kůže starší než 2 měsíce.

2.2.4 Donorové vzorky

Kontrolní donorové vzorky byly připraveny jako 5% (w/v) suspenze theofylinu (TH) ve vodě, 60% propylenglykolu (PG, v/v) a isopropylmyristátu (IPM) nebo jako 2% (w/v) suspenze hydrokortizonu (HC) v 60% PG. TH a HC byly vybrány jako modelová léčiva díky svým rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem.

Donorové vzorky byly připraveny přidáním 1% (w/v) akcelerantu do výše uvedených suspenzí. Připravené suspenze byly míchány 5 min při teplotě $50\text{ }^\circ\text{C}$ a poté temperovány po dobu 24 h v termostatu při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ k ustanovení rovnováhy. Před aplikací na kůži byly vzorky homogenizovány.

Koncentrace akcelerantu i modelových léčiv byly zvoleny tak, aby byly všechny vzorky nasyceny příslušným modelovým léčivem a daným akcelerantem k zajištění stejné termodynamické aktivity v průběhu celého experimentu.

Pro zjištění, zda studované akceleranty mají vliv na rozpustnost modelových léčiv v příslušném vehikulu, byla u jednotlivých vzorků, jak donorových, tak kontrolních, stanovena koncentrace daného léčiva. Vzorky byly připraveny ve trojím provedení uvedeným způsobem. Po 24 h temperaci byly vzorky centrifugovány při $6700\times g$ po dobu 5 min. Vzniklý supernatant byl odebrán a naředěn příslušnou mobilní fází. Koncentrace léčiva u jednotlivých ředění byla stanovena pomocí HPLC.

Donorové vzorky L-Pro2 pro impedanční a spektroskopické experimenty byly připraveny jako 1% (w/v) L-Pro2 v 60% PG bez přídavku modelového léčiva.

Kromě toho jsme také připravili 1% suspenze příslušných akcelerantů ve vodě a 60% PG bez modelového léčiva ke stanovení jejich rozpustnosti a stability při $37\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.5 Permeační experimenty

Schopnost urychlovat prostup léčiv kůži byla hodnocena *in vitro* pomocí modifikované Franzovy difúzní cely. Prasečí kůže byla před samotným experimentem opatrně rozmrazena a zkontrolována pro jakékoliv povrchové poškození. Kůže byla rozřezána na fragmenty o velikosti zhruba 2×2 cm a upevněna do Franzových difúzních cel s difúzní plochou 1 cm². Akceptorová fáze cely byla naplněna fosfátovým pufrům o pH 7,4 (PBS, obsahující 10 mM fosfátový pufr, 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl) a 0,03% NaN₃ jako konzervačním prostředkem a byl určen její přesný objem, který byl zahrnut do výpočtů (16-18 ml). Cely byly temperovány po dobu 1 h ve vodní lázni na teplotu 32 °C. Poté byla zkontrolována integrita kůže měřením elektrické impedance. Následně bylo na kůži aplikováno 200 µl donorového vzorku a donorová část cely překryta krycím sklíčkem. Akceptorová fáze byla po celou dobu experimentu míchána a temperována na 32 °C. Po dobu experimentu, tj. 48 h pro TH, respektive 52 h pro HC, byly v daných časových intervalech odebírány z akceptorové fáze frakce o objemu 0,6 ml. Odebrané množství vzorku bylo nahrazeno stejným objemem čerstvého PBS. U jednotlivých odebraných frakcí byla stanovena koncentrace daného léčiva pomocí HPLC.

2.2.6 Dermální elektrická impedance

Integrita kůže před každým permeačním experimentem a taktéž reversibilita funkce kožní bariéry po aplikaci L-Pro2 byla studována měřením transdermální elektrické impedance za užití LCR metru 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo) s měřicím rozsahem 20 Ω-10 MΩ a chybou při kΩ hodnotách < 0,5 %, měřící při frekvenci 120 kHz, jež dává nejlepší citlivost pro malé změny v rezistenci.¹⁶⁰

Měření probíhalo ve Franzových difúzních celách připravených výše popsaným způsobem. Připravené cely byly umístěny do vodní lázně a temperovány po dobu 1 h na teplotu 32 °C. Následně bylo do donorového kompartmentu cely nanášeno 0,5 ml PBS a změřena hodnota výchozí elektrické dermální impedance (kΩ×cm²) pomocí elektrod z nerezavějící oceli, které byly opatrně umístěny jedna v donorovém a druhá v akceptorovém kompartmentu Franzovy difúzní cely. Poté byl povrch kůže opatrně vysušen a na kůži bylo nanášeno 200 µl donorového vzorku obsahujícího 1% (w/v) L-Pro2 v 60% PG. První sada kontrolních cel obdržela 200 µl donorového vzorku obsahujícího

pouze 60% PG (bez akcelerantu). Druhá sada cel obdržela 200 µl destilované vody, aby bylo možné odlišit vliv hydratace od vlivu PG a L-Pro2. Po 2 h byly donorové i kontrolní vzorky nanesené na kůži odstraněny gázovým tamponem. Povrch kůže byl dvakrát opláchnut 0,5 ml PBS a opatrně vysušen. Rezistence byla měřena po dobu 12 h v jednohodinových intervalech.

Při druhém experimentu byly nanesené donorové vzorky ponechány na kůži po dobu 48 h, tj. po dobu délky *in vitro* permeačních experimentů. Po této době byly vzorky z kůže odstraněny a byla změřena elektrická impedance.

Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako procento výchozí hodnoty, tj. impedance před ošetřením každého fragmentu kůže zvlášť.

2.2.7 Izolace SC a lipidů SC

K izolaci SC byla použita tepelná separace epidermis a inkubace s trypsinem, který má za následek srážení a digesci dermálních proteinů. Kůže byla rozřezána na kousky o velikosti cca 4 cm² a ponořena na 2 min do vody o teplotě 60 °C. Vrstva epidermis byla oddělena od dermis pomocí pinzety a umístěna na filtrační papír v petriho miskách napuštěný 0,5% roztokem trypsinu v PBS po dobu 12 h a teplotě 32 °C.¹⁶¹ V některých případech však nebylo možné izolovat epidermis od dermis po tepelné inkubaci, proto byla kůže plně tloušťky kompletně ponořena do roztoku trypsinu. Tento postup byl prováděn 2krát. Následně byly jednotlivé izolované kousky SC propláchnuty PBS a zbývající keratinocyty byly odstraněny vatovým tamponem. K odstranění povrchově kontaminujících lipidů bylo izolované SC propláchnuto acetonem. Po usušení ve vakuu byly jednotlivé kousky SC uskladněny při teplotě -20 °C.

Pro extrakci lipidů SC byla použita modifikovaná metoda dle Bligha a Dyera.¹⁶² Vysušené kousky SC byly extrahovány přes noc směsí CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v), odfiltrovány a filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce. Získané lipidy byly vysušeny pod vysokým vakuem nad P₄O₁₀ a uchovávány při teplotě -20 °C.

2.2.8 FTIR spektroskopie

Před jednotlivými měřeními bylo SC nastříháno na malé kousky o hmotnosti přibližně 1 mg. Jednotlivé kousky byly inkubovány s 50 μ l 60% PG nebo 1% L-Pro2 v 60% PG po dobu 2 h při teplotě 32 °C. Kontrolní vzorek byl inkubován s 50 μ l destilované vody. Izolované lipidy SC cca 1mg byly inkubovány s 20 μ l 60% PG, 1% L-Pro2 v 60% PG nebo destilované vody (kontrola). Po 2 h byl nadbytečný roztok odstraněn a jednotlivé vzorky byly měřeny pomocí IR spektroskopie.

IR spektra byla měřena na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) s jednoobrazovým MIRacle ATR germaniovým krystalem. Pro zajištění dostatečného kontaktu měřeného vzorku s ATR krystalem byl použit upínací mechanismus s konstantním přitlačným tlakem. Jedno měření čítalo 128 skenů s rezolucí 4 cm^{-1} . Jednotlivá spektra byla vyhodnocena pomocí Bruker OPUS software. Přesné pozice píků byly určeny z druhé derivace spekter.

2.2.9 Buněčné linie

Hodnocení cytotoxicity vybraných akceleraantů bylo prováděno na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Hodnocení bylo prováděno na buněčné linii spontánně imortalizovaných lidských keratinocytů HaCaT (Cell Line service, Eppelheim, Německo) a na buněčné linii myších embryonálních fibroblastů 3T3 (American Type Culture Collection, distributor LGC Standards, Polsko). Buněčné linie byly kultivovány v DMEM médiu (Lonza, Belgie) doplněném z 10 % plodovým telecím sérem (FBS, Lonza, Belgie), z 1 % roztokem penicilinu-streptomycinu (Lonza, Belgie) a 10 mM HEPES pufrém (Sigma, Germany) v 75 cm^2 tkáňových kultivačních nádobách (TPP, Švýcarsko) při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře 5 % CO_2 ve vzduchu. Pasážování buněk bylo prováděno každý 3.-4. den. Pro cytotoxické testy byly buňky očkované do 96 jamkových destiček (TPP, Švýcarsko) s hustotou 5000 buněk na jamku. Pro morfologii a fluorescenční stanovení byly buňky očkované do 12 jamkových destiček (TPP, Švýcarsko) s hustotou 75000 buněk na jamku. Buňky byly očkované do daných destiček 24 h před přidáním studovaného akceleraantu. Po 48 h inkubaci s daným akceleraantem bylo prováděno hodnocení toxicity.

DDAK a DDAIP (hydrochloridy) byly rozpuštěny v PBS, Azon v DMSO, pro rozpuštění T12, Sar2, L-Pro2 a D-Pro2 byl použit ethanol. Příslušné koncentrace rozpouštědel byly přítomné i v kontrolních inkubačních médiích.

2.2.10 Buněčná toxicita

Buněčná toxicita byla stanovena pomocí MTT testu, který je založen na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat žlutou sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT, Sigma, Německo) na fialový formazan. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Po 48 h inkubaci studovaných látek bylo do každé jamky přidáno 25 μ l roztoku MTT v PBS (3 mg/ml). Po 2 h inkubaci byla provedena lýza buněk 0,1 M HCl v isopropylalkoholu s 10% Tritonem X-100. Pro úplné rozpuštění krystalů barviva formazanu byly destičky 3 h protřepávány. Hodnota absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm a 690 nm pro pozadí multifunkční čtečkou Tecan Infinite 200M plate reader (Tecan, Rakousko). Hodnoty absorbance se od sebe odčítají. Viabilita hodnocených skupin je vyjádřena jako procento kontrol (100 %).

Změny v buněčné morfologii byly hodnoceny pomocí invertovaného epifluorescenčního mikroskopu Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko) s digitální kamerou (1300Q, VDS Vosskühler, Německo) a software NIS-Elements AR 2.30 (Laboratory Imaging, ČR). Jádra buněk byla obarvena dvěma interkalačními, tj. do DNA se vmezežujícími fluorescenčními činidly, tedy barvivy Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA) a propidium jodidem (PI, Molecular Probes, USA). Obě barviva jsou citlivé a dobře charakterizované sondy používané k odlišení apoptotických buněk od nekrotických. Modrý Hoechst 33342 (λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 460 nm) snadno proniká přes buněčné membrány, a tak barví jádra všech buněk, přičemž v apoptotických buňkách zřetelně zvýrazňuje kondenzovaný chromatin, zatímco červený PI (λ_{ex} = 560 nm, λ_{em} = 630 nm) není schopen procházet plazmatickou membránou živých buněk, a proto barví pouze jádra nekrotických, nebo pozdně apoptotických buněk. Po 48 h expozici testovaným akceleratorům byly buňky při pokojové teplotě 15 min barveny barvivy Hoechst 33342 (3 μ g/ml) a PI (10 μ g/ml) a následně hodnoceny uvedenou mikroskopickou sestavou.

2.2.11 Aktivita kaspáz

Pro posouzení míry zapojení apoptózy do smrti buněk byla hodnocena aktivita jak iniciačních, tak efektorových kaspáz. Kaspázy jsou cysteinové proteázy schopné rozpoznat a odštěpit specifickou aminokyselinovou sekvenci nejrůznějších substrátů, které se účastní kaskády reakcí vedoucích k apoptóze buňky. Pomocí komerčních kitů (Caspase Glo® Assay 3/7, 8 nebo 9; Promega, USA) byl kaspázám nabídnut substrát pro luciferázu blokovaný navázanou aminoskupinou (amino-luciferin). Aktivované kaspázy, které jsou schopné tuto sekvenci rozpoznat a odštěpit, substrát uvolní a ten je následně přeměněn přítomnou luciferázou za vyzáření světelné energie. Intenzita luminiscence je úměrná aktivitě konkrétní kaspázy.

Po 48 h expozici buněk akceleranty o daných koncentracích byla provedena lýza buněk přidáním 100 µl lyzačního pufru (100 mM HEPES, 10 mM CHAPS, 10 mM DTT, pH 7,4) do každé jamky. Lyzáty byly ihned zmrazeny při teplotě -80 °C. Rozmražené lyzáty byly použity pro hodnocení aktivity kaspáz komerčními kity dle návodu výrobce. Aktivita kaspáz hodnocených skupin byla upravena pro obsah proteinů v každém vzorku komerčním BCA kitem (Sigma, Německo) a jsou vyjádřeny jako procento aktivity neošetřených kontrol (100 %). Luminiscence byla změřena multifunkční čtečkou Tecan Infinite 200M plate reader.

2.2.12 In vivo hodnocení transdermální permeace, TEWL a dermální toxicity

In vivo hodnocení probíhalo na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Potkaní samice kmene Wistar:Han (Biotest s. r. o., ČR) byly aklimatizovány po dobu dvou týdnů v klimatizované místnosti s pravidelným cyklem světlo-tma. Během této doby měla zvířata volný přístup k vodě a ke standardní peletové výživě pro hlodavce. Zvířata byla ponechána na lačno přes noc před experimentem. Při každém experimentu byla zvířata anestetizována urethanem (dávka 1,05 g/kg, i.p.) a následně jim byla ze zad odstraněna srst pomocí zastříhovače.

Studie byla provedena se souhlasem Etické komise Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a podle "The Guide for the Care and Use

of Laboratory Animals” publikovaný v US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Na oholenou kůži byly potkanům aplikovány nedráždivé okluzivní náplasti s gázovými čtverečky o velikosti 4 cm² napuštěné vzorky 5% TH v 60% PG s 1% L-Pro2 nebo bez L-Pro2 v dávce 1,2 ml/kg. Krevní vzorky byly odebírány z levé arteria iliaca communis každých 30 min po dobu 8 h a centrifugovány. Po ukončení experimentu byla zvířata usmrcena intravenózním podáním 1 ml 1M KCl.

Koncentrace TH v plazmě byla stanovena pomocí HPLC. Před samotným stanovením byly jednotlivé vzorky plazmy (100 µl) smíchány s 200 µl methanolu, který obsahoval kofein jako vnitřní standard. Po precipitaci proteinů byly vzorky centrifugovány při 6700×g po dobu 5 min a vzniklý supernant byl odebrán a analyzován.

Pro stanovení TEWL a dermální toxicity byly potkanům na oholenou kůži aplikovány náplasti s gázovými čtverečky o velikosti 4 cm² bez vzorku, nebo napuštěné a) 60% PG, b) 1% L-Pro2 v 60% PG, c) 5% L-Pro2 v 60% PG v dávce 400 µl/4cm² po dobu 6 h. Po uplynutí této doby byly náplasti odstraněny, povrch kůže byl umyt ethanolem k odstranění zbytků vzorku, osušen a pečlivě zkontrolován pro jakýkoliv výskyt zarudnutí, edému nebo suché kůže. Po 30 min byl měřen TEWL za užití Tewametry® TM 300 (Courage+Khazaka, Köln, Německo). Po ukončení experimentu byla zvířata usmrcena stejným způsobem jako v předešlém experimentu a byly odebrány kožní biopsie z míst vystavených testovaným vzorkům i z míst bez vzorku.

2.2.13 Viabilita kůže

Viabilita kůže byla stanovena pomocí TTC testu, který je založen na schopnosti metabolicky aktivních buněk redukovat bezbarvý roztok 2,3,5-trifenylnitrotetrazolium-chloridu (TTC, Sigma, Německo) na fialový formazan.¹⁶³ Biopsie kůže o průměru 5 mm ($n = 6$ pro každé místo vystavené 60% PG, 1% L-Pro2 v 60% PG, 5% L-Pro2 v 60% PG a bez formulace) byly inkubovány v dusíkové atmosféře s 1 ml 1,5% TTC a 3% sukcinátu sodného v PBS o pH 7,4 a teplotě 37 °C po dobu 1 h. Po této době byly jednotlivé biopsie vytaženy z roztoku, osušeny a tmavě fialový formazan vzniklý účinkem mitochondriálních enzymů byl extrahován 1 ml Methyl Cellosolve (2-methoxyethanol) přes noc v temnu. Hodnota absorbance byla měřena při vlnové délce 490 nm a upravena pro absorbanci

kontrolních vzorků kožních biopsií devitalizovaných varem. Viabilita hodnocených skupin je vyjádřena jako procento neošetřených kontrol (100 %), tj. kůže bez vzorku.

2.2.14 Stabilitní studie

Stabilita L-Pro2 byla stanovena jak v potkaní plazmě, tak i PBS. Potkaní plazma nebo PBS o pH 7,4 (1 ml, $n = 4$) obsahující L-Pro2 v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ byly inkubovány při teplotě 37 °C. V určených časových intervalech byly odebírány z potkaní plazmy nebo PBS frakce o velikosti 10 μl , které byly následně smíchány s 90 μl methanolu. PBS vzorky byly analyzovány přímo. Vzorky obsahující plazmu byly po precipitaci proteinů centrifugovány při 6700 \times g po dobu 5 min a vzniklý supernant byl odebrán a analyzován. Úbytek koncentrace L-Pro2 byl stanoven pomocí HPLC a je vyjádřen jako procento výchozí koncentrace L-Pro2 (100 %).

2.2.15 HPLC analýza

HPLC stanovení probíhalo pomocí sestavy Shimadzu Prominence instrument (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) obsahující dvě vysokotlaká čerpadla (LC-20AD) s odplyňovačem (DGU-20A3), autosampler (SIL-20A HT), kolonový termostat (CTO-20AC), UV/VIS detektor (SPD-M20A), komunikační modul (CBM-20A) a integrační software LC solutions V1.22.

Stanovení TH a kofeinu probíhalo na reverzní fázi kolony LiChro CART 250-4 (Lichrospher 100 RP-18, 5 μm , Merck) temperované na 35 °C a UV detekce při 272 nm. Jako mobilní fáze byl použit MeOH/0,1M NaH₂PO₄ 4:6 (v/v) při průtoku 1,2 ml/min. Retenční čas TH a kofeinu byl 3 \pm 0,1 min a 4,1 \pm 0,1 min.¹⁴³

Stanovení HC probíhalo taktéž za užití kolony LiChro CART 250-4 (Lichrospher 100 RP-18, 5 μm , Merck) temperované na 40 °C a UV detekci při 252 nm. Jako mobilní fáze byl použit MeOH/H₂O/THF 60:40:1 (v/v/v) za průtoku 1,2 ml/min. Retenční čas HC byl 4,2 \pm 0,1 min.¹⁴³

L-Pro2 byl stanoven pomocí monolitické kolony Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 (Merck) při laboratorní teplotě za užití 85% MeOH jako mobilní fáze a průtoku 2 ml/min. L-Pro2 byl určen UV detekcí při 205 nm s retenčním časem $2,3 \pm 0,1$ min.

Všechny HPLC metody byly validovány dle FDA směrnic pro validaci bioanalytických metod.¹⁶⁴

2.2.16 Analýza dat

Kumulativní množství léčiva, které prošlo kůží do akceptorové fáze, bylo přepočítáno vzhledem k odběrům a doplňování akceptorové fáze a přesnému objemu Franzových cel. Hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Pro výpočet příslušných fluxů ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) byla použita oblast ustáleného toku léčiva (lineární oblast křivky) a flux byl odečten jako hodnota směrnice této přímky. Akcelerační poměr (AP) byl vypočítán jako poměr fluxu s akcelerantem a bez akcelerantu. Koeficient propustnosti (K_p) byl vypočítán jako poměr fluxu a počáteční koncentrace modelové látky v donoru.

Při zpracování dat byl použit statistický software SigmaStat pro Windows 3.5 (SPSS, USA). Pro porovnání dvou experimentálních skupin byl použit Studentův T-test. Pro porovnání několika experimentálních skupin byla použita one-way ANOVA analýza rozptylu s Bonferroniho post hoc analýzou. Hodnoty pravděpodobnosti na hladině významnosti menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Pro výpočet koncentrací akceleračních způsobujících 50% ztrátu životaschopnosti buněk oproti kontrolní skupině (IC_{50}) byl použit software CalcuSyn 2.0 (Biosoft, Cambridge, UK).

Data jsou znázorněna jako průměrné hodnoty se standardní chybou (\pm S.E.M.) daného počtu experimentů (n).

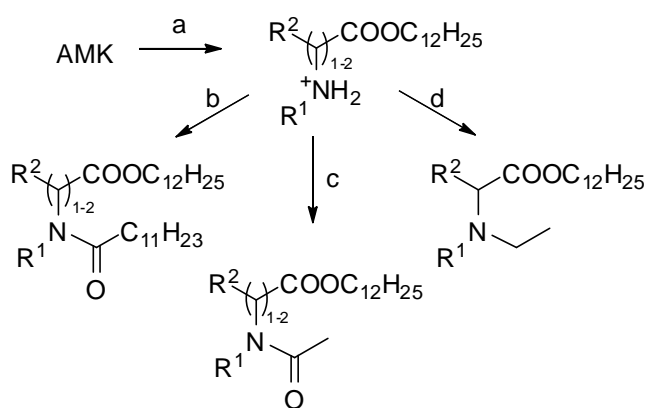
2.3 VÝSLEDKY

2.3.1 Syntéza

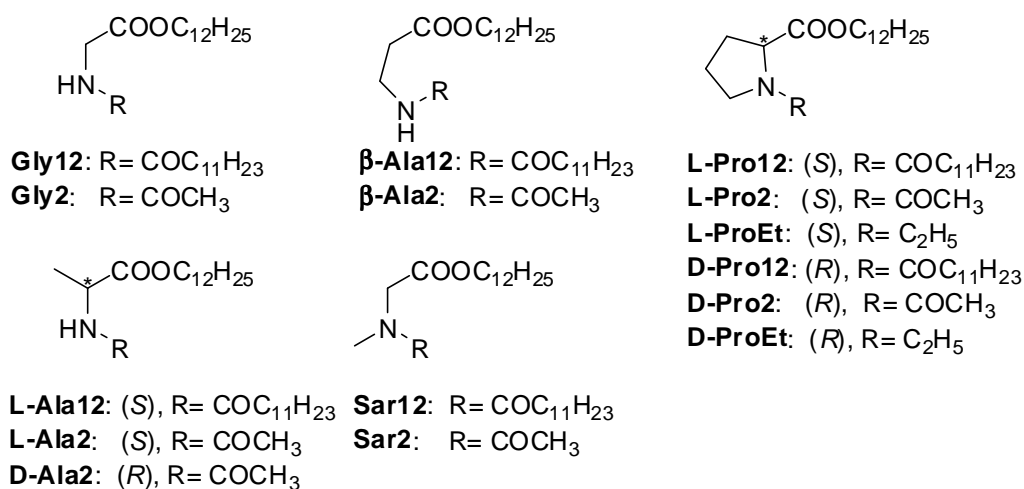
Cílové sloučeniny byly navrženy jako dodecylestery aminokyselin, které mají na aminoskupině připojen buď další 12 uhlíkatý řetězec, nebo krátký acetyl či ethyl.

Pro zjednodušení syntézy byly nejprve připraveny společné fragmenty, tedy dodecylestery, které byly dále použity pro přípravu obou sérií akceleraantů. Aminorskupina byla acylována kyselinou laurovou v přítomnosti karbodiimidu nebo pomocí acetanhydridu. Pro alkylyaci byl použit ethylbromid. Schéma přípravy jednotlivých derivátů je uvedeno na Obr. 17. Všechny produkty byly krystalické s výjimkou derivátů Pro. Přehled struktur jednotlivých akceleraantů je uveden na Obr. 18.

Hodnoty logP byly pro jednořetězcové akceleraanty v rozmezí 4,9–6,8 a pro dvouřetězcové v rozmezí 10,4–12,1. Všechny vzorky s akceleraanty byly nasyceny při koncentraci 1% (w/v) jak ve vodě, tak i 60% PG a stabilní po dobu nejméně 48 h.



Obr. 17 Schéma přípravy jednotlivých akceleraantů. Reagencie a podmínky: a) $C_{12}H_{25}OH$, HCl (g), $120\text{ }^{\circ}C$, 7 h; b) $C_{11}H_{23}COOH$, DCC, DMAP, $CHCl_3$, rt, 20 h; c) $(CH_3CO)_2O$, DMAP, $CHCl_3$, rt, 5 h; d) C_2H_5Br , Et_3N , THF, rt, 8 h; R^1 a $R^2 = H, CH_3, -(CH_2)_3-$



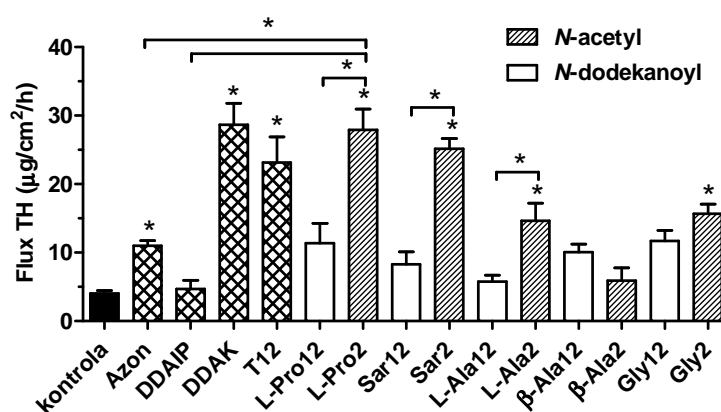
Obr. 18 Struktury připravených akceleraantů

2.3.2 Aktivita jedno a dvouřetězcových akceleračtů, vliv donorového vehikula

Graf na Obr. 19 znázorňuje schopnost studovaných látek zvýšit flux TH při použití vody jako donorového vehikula. Hodnota fluxu u kontrolního vzorku byla stanovena na $4,04 \pm 0,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Azon, který je používán jako standard pro hodnocení akcelerační aktivity¹⁰⁰, zvýšil za stejných podmínek tuto hodnotu 2,7krát. Komerčně používaný DDAIP byl neúčinný, zatímco akceleračty DDAK a T12 zvýšily flux TH až 7krát. Všechny studované dvouřetězcové akceleračty dosáhly zhruba stejné hodnoty fluxu jako Azon, avšak toto zvýšení nebylo statisticky významné. Naopak jednořetězcové akceleračty, mimo β -Ala2, byly účinnější než jejich dvouřetězcové analogy. Vůbec neaktivnější látkou byl L-Pro2 který dosáhl fluxu $27,9 \pm 3,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ s odpovídajícím akceleračním poměrem (AP) 6,9. Kromě toho byl L-Pro2 také významně aktivnější než Azon a DDAIP ale srovnatelný s DDAK a T12. Druhým nejlepším akceleračtem byl Sar2 s AP 6,2; následovaný Gly2 s AP 3,9 a L-Ala2 s AP 3,6.

Zároveň jsme také testovali některé z meziproductů, zejména dodecylestery s volnou aminoskupinou, ale u těchto látek nebyl pozorován žádný významný účinek.

Rozpustnost TH v kontrolním donorovém vzorku byla $8,6 \pm 0,2 \text{ mg}/\text{ml}$. Dvouřetězcové akceleračty zvýšily rozpustnost TH o 10 %. Mírné (nevýznamné) zvýšení fluxu TH v přítomnosti dvouřetězcových akceleračtů způsobila zvýšená rozpustnost TH v donorovém vehikulu. Jednořetězcové analogy neovlivnily rozpustnost TH v donorovém vehikulu, což svědčí o jiném mechanismu účinku.

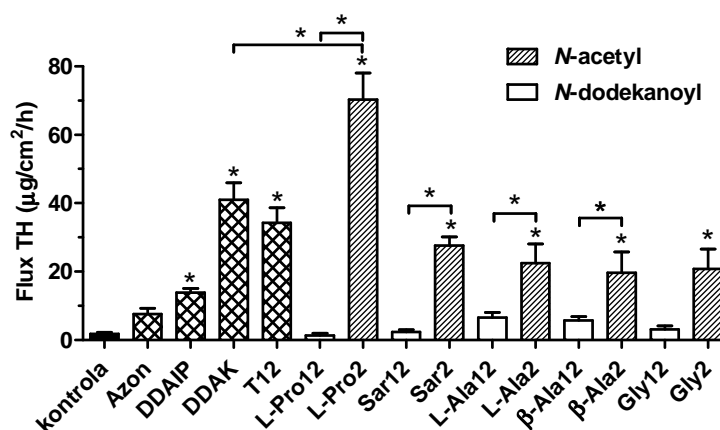


Obr. 19 Urychlovací aktivita připravených akceleračtů (1%) na flux modelového léčiva TH (5%) ve vodě. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. Kontrola vyjadřuje flux TH bez akceleračty. $n \geq 4$ pro dvouřetězcové akceleračty, $n \geq 8$ pro jednořetězcové akceleračty, * značí statistický rozdíl oproti příslušné kontrole, nebo jak je vyznačeno v grafu ($p < 0,05$).

Ve snaze zvýšit aktivitu studovaných akceleračních vehikul byl jako donorové vehikulum použit 60% PG. PG se často využívá jako kosolvent, ve směsi vykazuje synergické účinky a zlepšuje akcelerační aktivitu.¹⁶⁵

V 60% PG byl flux kontrolního vzorku pro TH $1,78 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, což bylo překvapivě poněkud méně než u vodního vehikula (Obr. 20). Pokud byl ovšem PG přidán k neaktivnějšímu akceleračnímu L-Pro2 hodnota fluxu TH vzrostla na $70,3 \pm 7,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, tedy 40krát více než pro samotný 60% PG a 2,5krát více než pro L-Pro2 ve vodě. Tato synergie nebyla pozorována u žádného z dalších studovaných akceleračních vehikul, u nichž hodnoty fluxu TH dosahovaly téměř stejných hodnot, které byly nalezeny při použití vody jako vehikula. Žádná z pozitivních kontrol, tj. standardní akcelerační DDAIP, DDAK a T12, nedosáhla aktivity L-Pro2. DDAIP, DDAK a T12 dosáhly hodnoty AP 7,8; 23 a 19 v tomto pořadí, tudíž L-Pro2 byl významně účinnější než všechny uvedené standardní akcelerační vehikula.

Rozpuštěnost TH v 60% PG byla $25 \pm 2 \text{ mg}/\text{ml}$ a žádný ze studovaných akceleračních vehikul ji významně neovlivnil. Tento výsledek nasvědčuje jejich přímému účinku ve SC.



Obr. 20 Urychlovací aktivita připravených akceleračních vehikul (1%) na flux modelového léčiva TH (5%) v 60% PG. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. Kontrola vyjadřuje flux TH bez akceleračního vehikula. $n \geq 4$ pro dvouřetězcové akcelerační vehikula, $n \geq 8$ pro jednořetězcové akcelerační vehikula, * značí statistický rozdíl oproti příslušné kontrole, nebo jak je vyznačeno v grafu ($p < 0,05$).

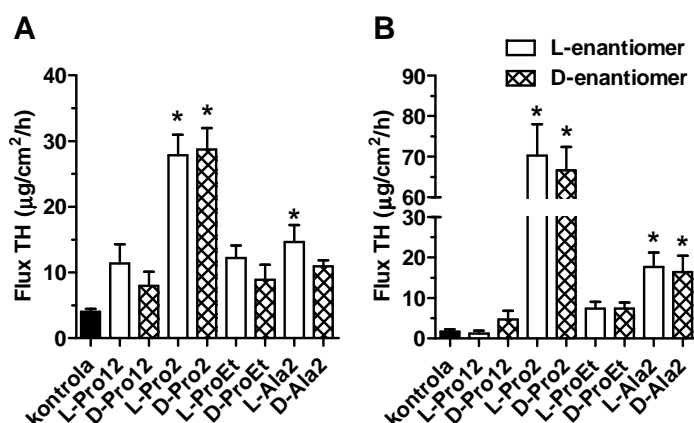
Taktéž jsme studovali vliv lipofilního IPM jako donorového vehikula. Avšak žádný z připravených akceleračních vehikul nebyl schopen významně zvýšit flux TH, který byl v IPM $2,63 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Výsledky nejsou uvedeny.

Dále jsme připravili a hodnotili Pro deriváty, u nichž byl N-acetyl nahrazen ethylem. Toto funkční uskupení je podobné terciární aminoskupině vysoce aktivních

akcelerační DDAK a DDAIP. Ovšem tato substituce vedla k významnému poklesu aktivity až téměř k hodnotám shodným s dvouřetězcovými analogy (Obr. 21).

2.3.3 Aktivita chirálních akceleračních

Protože je několik studovaných akceleračních chirálních, zkoumali jsme, zdali jejich interakce s chirálním prostředím představovaným ceramidy nebo proteiny může být mezi jednotlivými enantiomery odlišná. Proto jsme připravili neobvyklé D-enantiomery vybraných akceleračních, jmenovitě D-Pro2, D-Pro12, D-ProEt a D-Ala2. Nicméně nebyl nalezen žádný významný rozdíl mezi L a D enantiomery jak u jedno, tak u dvouřetězcových analogů (Obr. 21).



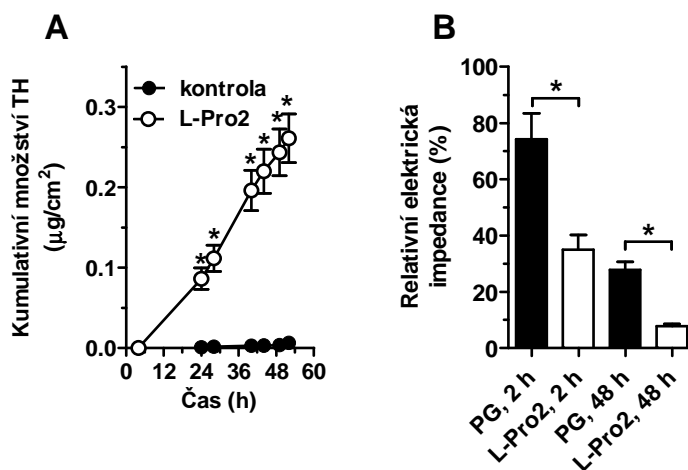
Obr. 21 Aktivita L-a D-enantiomerů Pro a Ala derivátů (1%) na transdermální flux modelového léčiva TH (5%) ve vodě (A) a 60% PG (B). Kontrola vyjadřuje flux TH bez akceleračního. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty ± S.E.M. $n \geq 4$ pro dvouřetězcové akcelerační, $n \geq 8$ pro jednořetězcové akcelerační, * značí statistický rozdíl oproti příslušné kontrole ($p < 0,05$).

2.3.4 Akcelerační aktivita pro modelové látky jiných fyzikálně-chemických vlastností

Dále jsme se zabývali možnostmi, zdali je L-Pro2 schopný zvýšit kožní propustnost pro širší škálu potenciálních léčiv. Jako modelovou látku jsme zvolili HC, který je představitelem poměrně velké lipofilní neutrální molekuly. Flux HC v 60% PG kůži byl $0,14 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. 1% L-Pro2 v 60% PG zvýšil flux HC 47krát na $6,54 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Obr. 22 A). Permeační profil HC je znázorněn na Obr. 22 A. Rozpustnost HC v donorovém vzorku byla $8,9 \pm 0,3 \text{ mg}/\text{ml}$ a L-Pro2 zvýšil tuto hodnotu 1,3krát.

To znamená, že část akcelerační aktivity L-Pro2 vůči permeaci HC byla způsobena nepřímo zvýšením rozpustnosti tohoto léčiva v donorovém vehikulu. Z hlediska koeficientů propustnosti K_p , které jsou nezávislé na koncentraci léčiva v donoru, L-Pro2 zvýšil hodnotu K_p 31krát, z $1,8 \times 10^{-5}$ cm/h na $5,65 \times 10^{-4}$ cm/h.

Za účelem zjistit, zdali je L-Pro2 schopen urychlit prostup i hydrofilních permeantů a ukázat jeho poměrně rychlý nástup účinku, jsme použili metodu elektrické impedance. Z Obr. 22 B je vidět významný pokles hodnoty impedance kůže po nanesení 1% L-Pro2 v 60% PG a jeho 2 h nebo 48 h expozici (35%, respektive 8% výchozí impedance před nanesením vzorku) vzhledem k impedanci kůže vystavené pouze 2 h nebo 48 h expozici samotnému 60% PG (75%, respektive 28% výchozí impedance před nanesením vzorku).

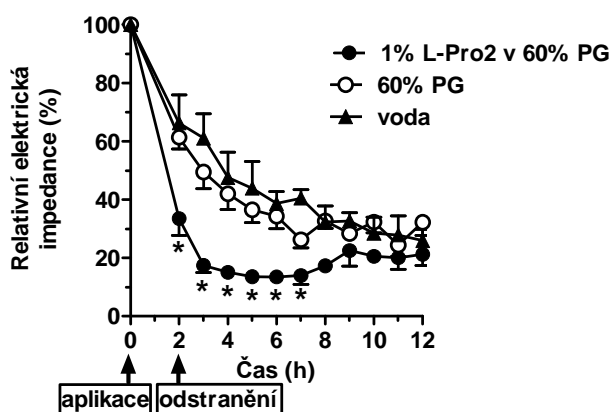


Obr. 22 Účinek L-Pro2 (1%) v 60% PG na propustnost modelového léčiva HC (2%) (A), dermální elektrické impedance po 2 h a 48 h expozici L-Pro2 (1%) v 60% PG (B). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 4$, * značí statistický rozdíl oproti kontrole, tj. bez L-Pro2 ($p < 0,05$).

2.3.5 Reverzibilita účinku L-Pro2

Metoda měření elektrické impedance byla rovněž využita ke sledování obnovy funkce kožní bariéry po aplikaci L-Pro2 se snahou objasnit, zdali je účinek tohoto akceleraantu reverzibilní. Po 2 h expozici kůže akceleraantem a po jeho šetrném odstranění byla měřena hodnota elektrické impedance kůže po dobu 12 h. Pro odlišení účinku samotného akceleraantu od účinku donorového vehikula, tj. 60% PG, byla impedance měřena i u kontrolních vzorků, které byly vystaveny 2 h expozici pouze 60% PG. K odlišení účinku 60% PG a hydratace byla další sada kontrolních cel vystavena 2 h

expozici vodou. Z grafu na Obr. 23 je patrné, že samotný PG nemá významný vliv na kožní impedanci a pozorovaný pokles lze plně přisoudit hydrataci kůže. Nicméně L-Pro2 v 60% PG významně snížil kožní impedanci. Po odstranění akcelerantu z kůže hodnota impedance nadále klesala, až dosáhla hodnot stagnace. Po 6 h od odstranění vzorku začala opět impedance stoupat až k hodnotám srovnatelným s hydratovanou kůží a kůží po aplikaci PG.



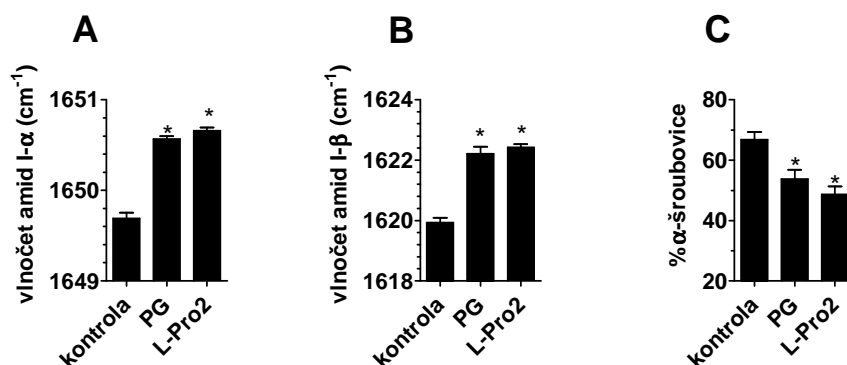
Obr. 23 Reverzibilita akceleračního účinku L-Pro2 vyjádřená dermální elektrickou impedancí. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty procent výchozí impedance v čase 0 h \pm S.E.M. $n \geq 6$, * značí statistický rozdíl oproti kontrole, tj. PG ošetřená kůže ($p < 0,05$).

2.3.6 Mechanismus účinku L-Pro2 a PG

Pro objasnění mechanismu účinku L-Pro2 a PG byla využita IR spektroskopie, pomocí níž můžeme sledovat změny jak v konformaci proteinů SC, tak změny v konformaci řetězců lipidů SC.

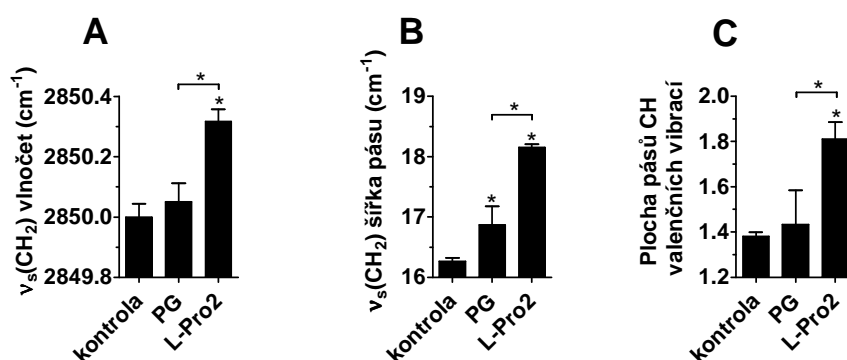
Nejprve bylo zkoumáno samotné izolované SC. Po inkubaci s akcelerantem byly zaznamenány významné změny v oblasti proteinů, především u amidové I vibrace, která pochází zejména z valenční vibrace karbonylu a je citlivá na změnu konformace. U neošetřeného SC, tj. inkubovaného pouze s destilovanou vodou, byly nalezeny silná amidová I vibrace okolo 1650 cm^{-1} a slabá okolo 1620 cm^{-1} , které jsou typické pro konformaci α -šroubovice, respektive β skládaného listu. Převažující α -šroubovice je shodná s předchozími studii bílkovin SC.¹⁶⁶ Expozice SC jak 60% PG, tak 1% L-Pro2 v 60% PG po dobu 2 h vedla k posunu obou vibrací směrem k vyšším vlnočtům (Obr. 24 A-B) a svědčí o částečné změně vodíkových vazeb kyslíku amidu. Nejvýznamnější změnou ve spektrální oblasti amidu byl pokles relativní plochy pásu

α -šroubovice z přibližně 67 % na 48 % (Obr. 24 C). Všechny tyto účinky na bílkoviny SC byly způsobeny spíše PG než L-Pro2.



Obr. 24 Vliv L-Pro2 na proteiny SC studovaný pomocí IR spektroskopie. Hodnota vlnočtu pásu amidu I okolo 1650 cm^{-1} a 1620 cm^{-1} odpovídá konformaci α -šroubovice, respektive β -skládaného listu proteinů (A-B), relativní plocha konformace α -šroubovice proteinů (C). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 6$, * značí statistický rozdíl oproti kontrole, tj. SC inkubované pouze s vodou ($p < 0,05$).

Pro přesnější určení účinku PG a L-Pro2 na bariérové lipidy kůže jsme použili izolované lipidy SC z důvodu vyloučení příspěvku C-H valenčních vibrací bočních řetězců aminokyselin. Bylo zjištěno vmezezení L-Pro2 mezi lipidy SC odrážející se ve vzrůstu plochy pásu C-H valenčních vibrací. Toto začlenění způsobilo značnou fluidizaci lipidů, která se projevila změnou v methylenových valenčních vibracích, jež jsou citlivé na konformaci lipidových řetězců. Pozorovaný posun vlnočtu jak symetrické, tak asymetrické methylenové valenční vibrace z $2850,0 \text{ cm}^{-1}$ na $2850,3 \text{ cm}^{-1}$, respektive z $2917,9 \text{ cm}^{-1}$ na $2918,6 \text{ cm}^{-1}$ a také rozšíření píku o $1,7 \text{ cm}^{-1}$, respektive $7,4 \text{ cm}^{-1}$ předpokládá nárůst množství *gauche* konformerů, tedy neuspořádanost řetězce a vyšší mobilitu řetězců.



Obr. 25 Vliv L-Pro2 na lipidy SC studovaný pomocí IR spektroskopie. Vlnočet a šířka pásu symetrické methylenové valenční vibrace (A-B), plocha pásů CH valenčních vibrací lipidů v rozmezí $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (C). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 6$, * značí statistický rozdíl oproti kontrole, tj. SC inkubované pouze s vodou, nebo jak je vyznačeno v grafu ($p < 0,05$).

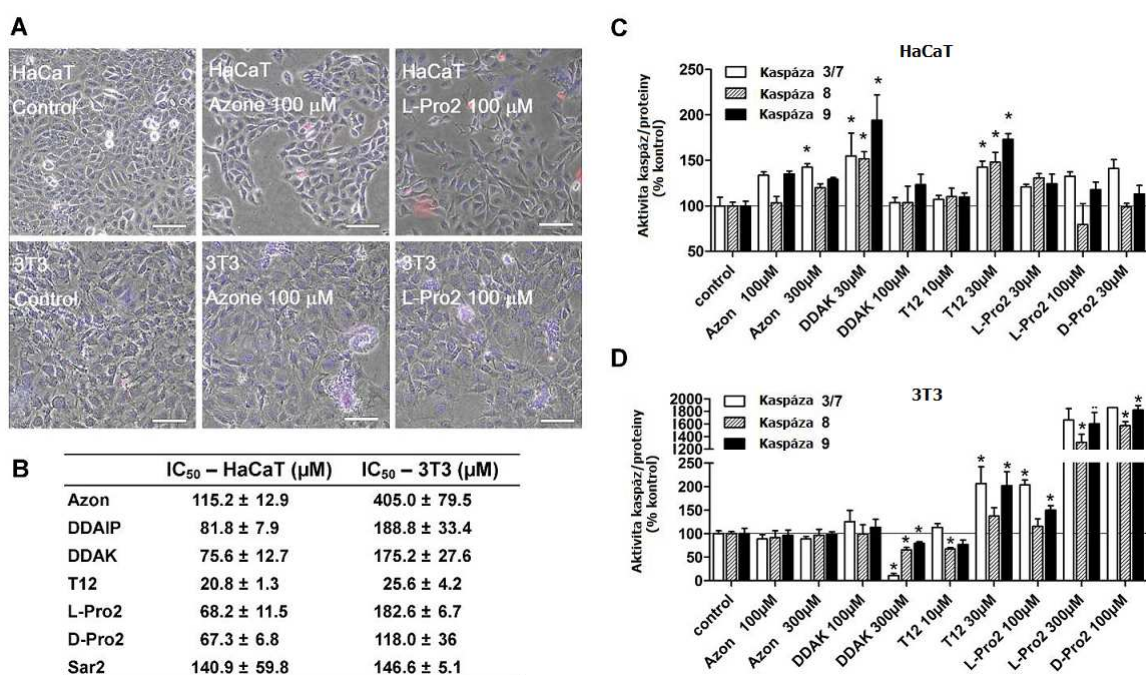
Pozorovaný posun vlnočtu methylenových vibrací vyvolaný L-Pro2 byl však překvapivě relativně malý, neboť L-Pro2 má sám o sobě poměrně neuspořádané řetězce, jak vyplývá z jeho symetrické methylenové vibrace při $2853,4\text{ cm}^{-1}$ a asymetrické při $2923,9\text{ cm}^{-1}$. Proto byla studována jeho přímá interakce s ceramidem NS jako zástupcem nejdůležitějších kožních bariérových lipidů. Analýza IR spekter skutečně prokázala fluidizaci jednoho nebo obou řetězců ceramidu NS vyvolanou L-Pro2, jak ukazuje posun methylenové symetrické vibrace z $2847,0\text{ cm}^{-1}$ na $2848,9\text{ cm}^{-1}$. Tato hodnota posunu však byla opět poněkud nízká a naznačuje tak významné uspořádání řetězců L-Pro2 způsobené ceramidem. Podobná změna byla zaznamenána také u směsi L-Pro2 s kyselinou lignocerovou, jež je dalším zástupcem kožních bariérových lipidů.

2.3.7 Buněčná toxicita

Toxicitní studie byly prováděny po dobu 48 h, protože po 24 h většina sledovaných akceleračních látek nezpůsobila 50% snížení životaschopnosti buněk. Po 48 h expozici všemi vybranými studovanými akceleranty byla zaznamenána snížená viabilita HaCaT a 3T3 buněk v závislosti na dávce. Jak je vidět z tabulky B na Obr. 26 hodnota IC_{50} , tedy koncentrace látky způsobující 50% pokles viability, byla u všech akceleračních látek nižší u HaCaT buněk a značí tak vyšší toxicitu ve srovnání s 3T3 buněčnou linií (Obr. 26 B). Nejtoxiknější látkou s IC_{50} přibližně $20\text{ }\mu\text{M}$ byl u obou buněčných linií T12. Toxicita nejaktivnějšího akceleračního činidla L-Pro2 byla přibližně dvakrát vyšší než u Azonu, ale srovnatelná s široce používaným akceleračním činidlem DDAIP, ale také i DDAK. Kromě toho jsme nezaznamenali významný rozdíl v toxicitě L a D enantiomeru.

Cytotoxicita studovaných akceleračních látek byla rovněž hodnocena pomocí morfologických změn epifluorescenční mikroskopií (Obr. 26 A). 48 h expozice buněk akceleranty vedla k výrazným morfologickým projevům toxicity. Zpuchýřkovatění plazmatické membrány bylo na dávce závislým způsobem následováno ztrátou tvaru buněk a jejich zakulacením. Dále se objevila závažná kondenzace chromatinu jádra a nakonec úplná ztráta životaschopnosti buněk, která byla následována tvorbou buněčného odpadu. Ačkoliv se morfologické změny u jednotlivých studovaných akceleračních látek objevily za různých koncentrací, nelze mezi studovanými látkami pozorovat žádné nápadné kvalitativní rozdíly.

Za účelem objasnit míru zapojení apoptózy do smrti buněk jsme hodnotili vliv vybraných akceleračních látek při koncentracích způsobující částečnou toxicitu na aktivitu kaspáz. U HaCaT buněk (Obr. 26 C) došlo k relativně mírné, ale významné aktivaci všech tří kaspáz po expozici DDAK a T12. Zvýšení aktivity kaspázy 3/7 bylo zaznamenáno po expozici Azonem. U 3T3 buněk (Obr. 26 D) byl zaznamenán významný nárůst v aktivitě kaspáz po expozici T12 a Pro2 derivátů. Zatímco T12 zvýšil aktivitu kaspáz přibližně dvojnásobně, což je srovnatelné s účinkem pozorovaným při stejné dávce T12 u HaCaT buněk, efekt L-Pro2 a D-Pro2 na aktivitu kaspáz byl značný a dosáhl 1400-1800% aktivity kontrolních buněk. Obecně lze říci, že všechny tři sledované kaspázy dosáhly stejné úrovně se všemi studovanými akceleračními látkami.



Obr. 26 Toxicita vybraných akceleračních látek na buněčných liniích keratinocytů (HaCaT) a fibroblastů (3T3). Buněčná morfologie (**A**), hodnoty IC₅₀ (**B**), účinek vybraných akceleračních látek na aktivitu kaspáz 3/7, 8 a 9 (**C-D**). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty ± S.E.M. $n \geq 4$, * značí statistický rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

2.3.8 In vivo studie

Za účelem prokázat účinnost akceleračního účinku L-Pro2 *in vivo* byly stanovovány plazmatické koncentrace TH u potkanů po transdermálním podání 5% TH v 60% PG s nebo bez 1% L-Pro2 ve formě náplasti (Obr. 28 A). Plazmatické koncentrace TH po jeho podání bez akceleračního látky byly pod 0,1 μg/ml. Při podání TH s 1% L-Pro2 začaly

plazmatické koncentrace TH stoupat po 4 h od aplikace náplasti a dosáhly hodnoty $1,27 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ po 8 h podání.

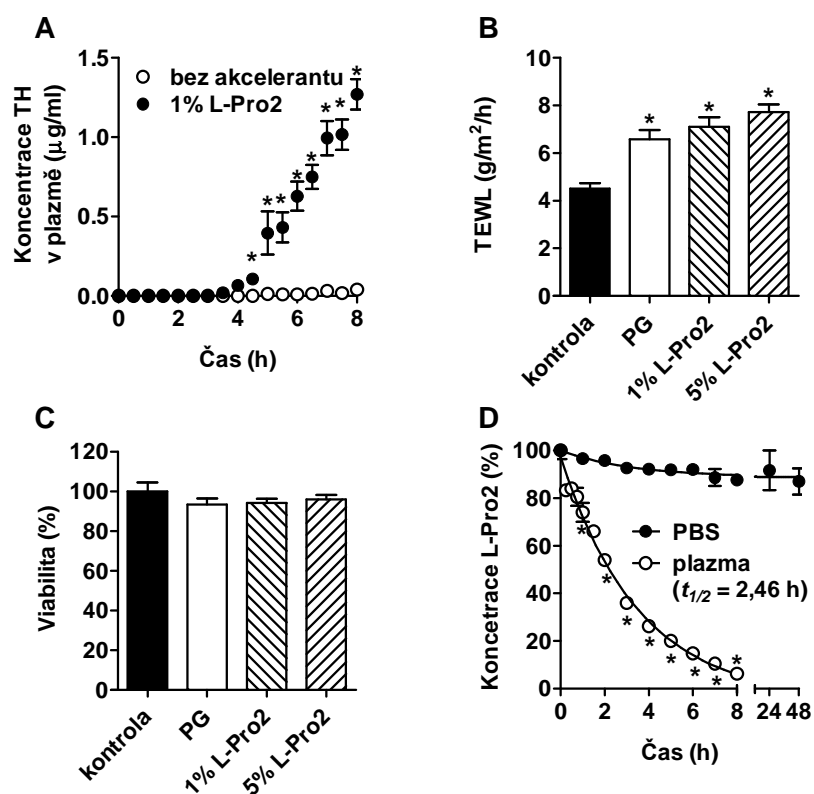
Co se týká transepidermální ztráty vody (TEWL), akcelerant by měl zvýšit flux léčiva do těla, aniž by současně zvýšil ztrátu vody a endogenních látek z těla.⁸⁶ K ověření tohoto předpokladu jsme měřili TEWL¹⁶⁷ *in vivo* na kůži potkanů vystavené 6 h expozici L-Pro2 (Obr. 27). Tedy za podmínek, které vedly k významné propustnosti TH v předešlém pokusu. Hodnoty TEWL byly zvýšené až 1,7krát po aplikaci testovaných vzorků. Nebyly ovšem zaznamenány žádné významné rozdíly mezi 60% PG a L-Pro2 v 60% PG. Dokonce ani když byl L-Pro2 aplikován v 5krát větší koncentraci, než byla nutná pro akcelerační účinek (Obr. 28 B). Zvýšenou ztrátu vody lze tedy přičíst především PG. Mimoto nebyly pozorovány žádné viditelné změny (zarudnutí, otok, suchá kůže) na kůži u potkanů po aplikaci L-Pro2 v 60% PG v koncentracích 1% nebo 5%.

Pro důkladnější hodnocení dermální toxicity byla stanovena životaschopnost buněk kožních biopsií po 6 h expozici 1% nebo 5% L-Pro2 v 60% PG. Z Obr. 28 C je patrné, že akcelerační účinek L-Pro2 nedoprovází žádné významné snížení životaschopnosti kožních buněk.

Během permeačních pokusů *in vivo* nebyl v plazmě detekován L-Pro2. To může nasvědčovat jeho nízké systémové absorpci nebo rozkladu v metabolicky aktivních vrstvách kůže či plazmě. Pro studium biologické rozložitelnosti L-Pro2 byla provedena jeho inkubace s potkaní plazmou nebo PBS o pH 7,4 jako kontroly při teplotě 37 °C. Rozklad L-Pro2 s poločasem přibližně 2,5 h byl zaznamenán v plazmě, zatímco v PBS nebyl nalezen žádný významný pokles koncentrace (Obr. 28 D).



Obr. 27 Potkan s aplikovanými náplastmi se vzorky 60% PG, 1% a 5% L-Pro2 v 60% PG. Po 6 h od počátku nanesení náplasti byla náplast se vzorky odstraněna, povrch kůže opláchnut a byla měřena transepidermální ztráta vody.



Obr. 28 Urychlovací aktivita 1% L-Pro2 po transdermálním podání modelového léčiva TH u potkanů *in vivo* (A), vliv 6 h expozice L-Pro2 (1% a 5%) a samotného vehikula (60% PG) na TEWL (B) a viabilita kožních buněk (C) potkanů *in vivo*. Metabolizace L-Pro2 v potkaní plazmě ve srovnání s jeho stabilitou v PBS o pH 7,4 při 37 °C (D). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty ± S.E.M. $n \geq 3$, * značí statistický rozdíl oproti příslušné kontrole ($p < 0,05$).

2.4 DISKUZE

V této studii jsme se zabývali sérii akceleračních transdermálních permeací obsahující aminokyselinu připojenou k hydrofobnímu řetězci skrz labilní esterovou vazbu. Dvouřetězcové sloučeniny byly navrženy tak, aby napodobovaly ceramidy, tedy neutrální sfingolipidy mezibuněčných lipidových lamel SC,^{32, 168} které jsou považovány za jedno z cílových míst účinku akceleračního. ^{86, 169} Délka hydrofobních řetězců 12 uhlíků byla zvolena na základě předchozích studií, v nichž bylo zjištěno, že tato délka je optimální pro akcelerační aktivitu.¹⁷⁰ Nicméně dvouřetězcové akcelerační nedokázaly zvýšit propustnost kůže. Naopak jejich homology s jedním z řetězců zkráceným na délku 2 uhlíků podstatně zvýšily akcelerační aktivitu. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii derivátů dikarboxylových kyselin jako akceleračních transdermálních permeací, které byly rovněž aktivnější, pokud měly pouze jeden 12 uhlíkatý řetězec.¹⁷¹ Možným vysvětlením

neúčinnosti dvouřetězcových sloučenin může být buď jejich nedostatečná permeabilita do SC, nebo jejich podobnost s ceramidy a z toho plynoucí neschopnost rozrušit pevné uspořádání lipidových lamel. Obě možnosti jsou podpořeny poznatky o ceramidech, kdy po zkrácení jejich acylového řetězce došlo k významné změně jejich chování v lipidových membránách včetně jejich schopnosti projít skrz membránu a ovlivnit její permeabilitu.^{172, 173} Ve skutečnosti je jediným vysoce aktivním akcelerantem se dvěma hydrofobními řetězci T12, který má poměrně neobvyklou strukturu polární hlavy – sůl karbamové kyseliny. Mechanismus účinku T12 zahrnuje uvolnění CO₂ za vzniku amonium chloridu, který následně působí jako jednořetězcový akcelerant.¹⁴³ Zdá se tedy, že přítomnost pouze jednoho 12 uhlíkatého řetězce je předpokladem pro účinné akceleranty.

Pokud se zaměříme na strukturu polární hlavy akceleračního činidla, výsledky potvrdily náš předpoklad negativního vlivu schopnosti tvořit vodíkové vazby na akcelerační aktivitu.^{149,150} Zatímco akcelerační aktivita derivátů Gly, Ala a β-Ala byla shodná, deriváty Sar a Pro, jež jsou disubstituovanými amidy, tedy pouze akceptory vodíkových vazeb, prokázaly zvýšenou aktivitu. Tento poznatek odpovídá předchozím studiím, v nichž byly sloučeniny na bázi Sar a Pro účinnými akceleranty.^{139,153,154} Na negativní roli vodíkových vazeb můžeme pohlížet z hlediska vyšší soudržnosti membrány v polární oblasti navíc k hydrofobním interakcím mezi řetězci. Nicméně substituce amidu terciární aminoskupinou u Pro derivátu vedla ke značnému poklesu aktivity. To je zajímavé, ale dosud nevysvětlené zjištění, neboť bazická terciární aminoskupina je důležitým strukturálním prvkem akceleračních činidel DDAIP¹⁴² a DDAK¹⁴⁶. Tento poznatek může naznačovat, že schopnost tvořit vodíkové vazby není jednoduše negativní faktor, ale pro správné vymezení akceleračního činidla mezi lipidové lamely SC je nutné určitě strukturální optimum, jak již bylo navrženo dříve.¹⁷¹

Dalším poznatkem vyplývajícím z této studie je, že účinek derivátů Pro a Ala není stereoselektivní. Důvodem, proč jsme porovnávali aktivitu několika enantiomerů, byl předpoklad interakce s chirálními složkami kožní bariéry, a to buď ceramidy, nebo proteiny, a že takové interakce by mohly být stereoselektivního charakteru. Nicméně jsme nenašli žádné rozdíly v aktivitě enantiomerů v této ani předchozích studiích s chirálním centrem v hydrofobním řetězci nebo polární hlavě akceleračního činidla.^{146, 174}

Poté, co jsme definovali základní vztahy mezi strukturou a aktivitou, jsme se zaměřili na nejúčinnější akcelerační činidlo této série – L-Pro2. Zajímalo nás, zdali je schopen umožnit prostup léčiv s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. L-Pro2 urychlil

prostup TH, což je poměrně malá molekula (molekulová hmotnost 180 g/mol) s vyváženou lipofilitou ($\log P \sim 0$), která pravděpodobně upřednostňuje prostup difúzí přes volné prostory lipidových lamel SC. Rovněž urychlil prostup HC, molekuly přibližně dvakrát větší než TH (molekulová hmotnost 362 g/mol) a také poměrně lipofilnější ($\log P \sim 1,6$). U HC se předpokládá mimo difúzi přes volné prostory i pronikání laterální difúzí.¹⁷⁵ Kromě toho jsme zaznamenali významný pokles elektrické impedance kůže po expozici L-Pro2. Elektrická impedance nebo rezistence kůže je často používána jako parametr pro rychlý screening účinku akceleraantů a odráží propustnost pro ionty a obecně pro malé hydrofilní sloučeniny prostřednictvím vodních cest nebo pórů.^{176, 177} Na základě získaných výsledků lze říci, že L-Pro2 ovlivňuje různé cesty prostupu skrz kožní bariéru, což mu dává možnost usnadnit prostup poměrně širokému spektru léčiv.

Vzhledem k tomu, že je metoda elektrické impedance jednoduchým prostředkem pro měření propustnosti kůže, použili jsme tuto metodu i pro zjištění změn v propustnosti kůže po odstranění L-Pro2 z jejího povrchu. Výsledky ukázaly počáteční pokles impedance, tedy zvýšení propustnosti kůže, během první hodiny po odstranění akceleraantu, způsobený podle všeho pronikáním a inkorporací dalších molekul akceleraantu do hlubších vrstev SC. Po 6 hodinách se začala impedance kůže zvyšovat až k hodnotám srovnatelným s kontrolními a naznačuje tak alespoň částečnou reverzibilitu účinku L-Pro2. I když rozsah této změny byl poměrně malý vzhledem k hydrataci pokožky, výsledky byly dobře reprodukovatelné. Nejpravděpodobnějším vysvětlením reverzibilního chování je rychlá eliminace akceleraantu z kožní bariéry patrně prostou difúzí do hlubších vrstev epidermis. Podobná reverzibilita byla pozorována již u akceleraantu DDAK.¹⁴⁶

Z výsledků naší práce jsme rovněž zjistili synergii účinku L-Pro2 s PG danou podle všeho jejich působením na různé struktury v kožní bariéře. PG je malá molekula rozpouštědla, která ovlivňuje konformaci proteinů SC.¹⁷⁸ Na druhou stranu amfifilní molekula L-Pro2 se zřejmě vmezeří do mezibuněčných lipidových lamel SC tak, aby byla její polární hlava ukotvena v polární oblasti membrány a hydrofobní řetězce směřovaly do hydrofobního jádra lamel. Pro potvrzení této hypotézy jsme studovali interakci L-Pro2 a PG s izolovaným SC nebo lipidy SC pomocí FTIR spektroskopie. Díky této technice jsme prokázali, že PG vyvolává změny v síti vodíkových vazeb proteinů SC a zvyšuje podíl konformace β skládaného listu patrně díky solvataci peptidových vazeb. Příspěvek L-Pro2 na změně konformace proteinů byl zanedbatelný a může být zapříčiněn jeho lipofilnějším charakterem. Naopak jsme zjistili inkorporaci L-Pro2 mezi lipidy SC, čímž vyvolá neuspořádanost lipidických řetězců, jak vyplývá z posunu k vyšším vlnovým

a rozšíření obou absorpčních pásů methylenových valenčních vibrací, a tak jsme potvrdili naši hypotézu. Přímá interakce L-Pro2 s ceramidem NS a kyselinou lignocerovou naznačuje vymezení L-Pro2 mezi dlouhé řetězce ceramidů nebo mastných kyselin způsobující uspořádání jeho kratšího 12 uhlíkatého řetězce, ale vyvolávající neuspořádanost ostatních delších řetězců lipidů. Tento mechanismus účinku L-Pro2 je v souladu s jeho reverzibilním účinkem, kdy po eliminaci akcelarantu, čímž máme na mysli jeho penetraci do hlubších vrstev kůže, může dojít k opětovnému spontánnímu uspořádání lipidů.

V naší práci jsme také studovali toxicitu vybraných akcelarantů na dvou buněčných liniích včetně keratinocytů a fibroblastů. Buněčná toxicita derivátů Pro a Sar nepřesáhla toxicitu klinicky používaného akcelarantu DDAIP jak vyplývá z hodnot IC_{50} . Navíc toxicita byla významně nižší než u T12, který již prošel pilotními *in vivo* studiemi, v nichž prokázal velmi příznivý bezpečnostní profil.¹⁴⁴ Pro ilustraci 28 denní toxicitní studie opakované denní dávky u potkanů prokázala pouze mírné reverzibilní zarudnutí kůže při koncentraci 2% T12.

Také nás zajímalo možné zapojení apoptózy do buněčné toxicity vybraných akcelarantů. Apoptóza je nejdůležitější formou programované buněčné smrti a podílí se na cytotoxickém působení řady cizorodých látek. Kaspáza 8 je klíčová signalizační molekula vnější (receptory zprostředkované) apoptotické cesty, zatímco kaspáza 9 je klíčová pro vnitřní (mitochondriální) apoptotickou dráhu. Kaspázy 3 a 7 jsou hlavními výkonnými kaspázami, které štěpí specifické aminosekvence v různých proteinových substrátech a jsou aktivovány jak vnějšími, tak vnitřními drahami apoptotického procesu. Zejména kaspáza 3 je nezbytná pro apoptotickou kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA.¹⁷⁹ Zatímco T12 vyvolal vzestup aktivity kaspáz přibližně dvojnásobně u obou buněčných linií, L-Pro2 neměl žádný vliv na aktivitu kaspáz keratinocytů, ale způsobil výrazný nárůst aktivity kaspáz fibroblastů. Nicméně všechny tři kaspázy dosáhly obecně srovnatelné úrovně aktivity a proapoptotický účinek tak nemůže být výslovně přisouzen žádné vybrané apoptotické cestě.

Všechny naše výsledky získané z *in vitro* studií podporují obraz L-Pro2 jako nadějného akcelarantu, a proto jsme se rozhodli prokázat jeho účinek i v *in vivo* studiích na potkanech. Tyto pokusy vskutku prokázaly výrazné a poměrně rychlé zvýšení transdermální absorpce modelového léčiva TH bez významné dermální toxicity po aplikaci 1% L-Pro2. Tento účinek byl doprovázen mírným nárůstem ztráty vody, ale ten byl způsoben zejména použitým vehikulem, tj. 60% PG. Kromě toho opodstatněnost návrhu

struktury této skupiny akcelerantů, čím máme na mysli biologickou odbouratelnost esterové vazby, byla potvrzena jednoduchým pokusem v potkaní plazmě jako zástupcem enzymaticky aktivního biologického prostředí. V plazmě podléhal L-Pro2 relativně rychlému rozkladu, zatímco v PBS byl stabilní, což ukazuje na enzymatický charakter této reakce. Proto očekáváme, že tento akcelerant, který je ve své podstatě esterem, by mohl být enzymaticky hydrolyzován v živé epidermis nebo plazmě za vzniku známých a bezpečných rozkladných produktů jako je dodekanol, prolin a kyselina octová.

Závěrem lze říci, že deriváty aminokyselin jako urychlovače permeace, zejména tedy L-Pro2, mají výhodnou kombinaci vysoké aktivity, reverzibilního účinku a nízké toxicity, díky čemuž jsou vhodnými kandidáty pro budoucí klinické použití. Ke stávajícím nevýhodám těchto látek patří nedostatek studií dlouhodobé kožní a systémové toxicity, jak rychle a jak hluboko se akcelerant vstřebává, zda a jak rychle je metabolizován, či jaké jsou eliminační cesty. Nalézt odpovědi na tyto otázky vyžaduje další studium.

3 Vliv délky acylového řetězce ceramidů na permeabilitu modelových membrán SC a studium jejich termotropního chování

Část práce již byla publikována:

Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.; Vavrysová, H.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1811* (3), 129-37, Příloha II

Další část výsledků je připravována k publikaci

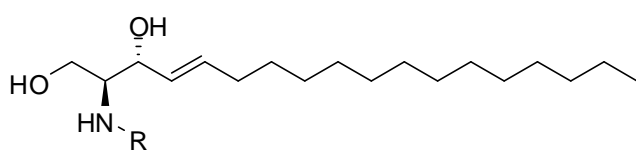
3.1 ÚVOD

Za bariérovou funkci kůže jsou zodpovědné především ceramidy, tvořící hlavní součást mezibuněčných lipidových lamel v nejsvrchnější vrstvě kůže SC. Ačkoliv jejich fyziologická a patologická role již byla do značné míry objasněna, vztah mezi jejich strukturou a účinkem na bariérovou funkci kůže dosud nebyl zcela objasněn. Jinak řečeno, které strukturální vlastnosti jsou pro udržení jejich bariérové funkce nepostradatelné. V nedávné studii jsme prokázali, že délka acylového řetězce u sfingosinového typu ceramidů (NS) je pro jejich bariérovou funkci velmi důležitá a že jeho zkrácení zvýšilo propustnost kůže s maximem u ceramidů s délkou řetězce 4-6 uhlíků.¹⁷² V této studii byly ovšem ceramidy s krátkým řetězcem aplikovány přímo na kůži, která je sice velmi robustním modelem, ale je spojena s vysokou variabilitou a hlavně zde není možnost přesně sledovat množství ceramidů, které pronikne do kůže, a měnit složení studovaných lipidů.

V současné době se hojně ke studiu bariérové funkce kůže využívají lipidové modely SC. Jedná se o ternární, kvartérní nebo více složkové lipidové směsi, které velmi úzce napodobují molekulární organizaci a orientaci lipidů lamel SC.^{48, 180-182} Navíc nanesením směsi syntetických lipidů na porézní podklad získáme modelovou membránu SC, pomocí které můžeme studovat její permeabilitu.^{183, 184} Výhodou takovéto modelové membrány SC je snadná obměna jejího složení, jež umožňuje studovat vztahy mezi složením lipidů, molekulární organizací a bariérovou funkcí v jediném modelu. Naším cílem tedy bylo vytvořit vhodný nástroj, tj. modelové membrány SC, pro rychlé hodnocení modifikovaných ceramidů, který by nám umožnil studovat jak jejich vliv na propustnost, tak základní mechanismy pomocí fyzikálně-chemických metod.

V této práci jsme studovali vliv dlouho a krátkořetězcových ceramidů na permeabilitu modelových membrán SC tvořené Cer/FFA/Chol/CholS, kde ceramid obsahoval acylový řetězec o délce 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18:1 (oleoyl) nebo 24 uhlíků (Obr. 29). Účelem bylo zjistit, zda jsme schopni dosáhnout stejných účinků těchto ceramidů v propustnosti modelových membrán, jichž bylo dosaženo v kůži, a také nalezení fyzikálně-chemických charakteristik, které by vysvětlovaly vztah mezi jejich strukturou a vlivem na propustnost. Permeabilita připravených membrán byla hodnocena fluxem TH a elektrickou impedancí.

Pro objasnění organizace lipidů v modelových membránách SC a mechanismu, jak změna ve struktuře ceramidů ovlivňuje propustnost membrán, jsme využili diferenční skenovací kalorimetrii (DSC) a ATR-FTIR spektroskopii. Zejména nás zajímala možná korelace mezi propustností kůže/membrány a fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které byly navrženy jako rozhodující pro správnou funkci kožní bariéry. Tyto parametry zahrnovaly konformaci uhlovodíkových řetězců lipidů, přítomnost orthorhombického laterárního uspořádání, methylenovou hustotu a vodíkové vazby.^{112 185}



Ceramid	R
Sfingosin	-H
Cer2	-COCH ₃
Cer4	-COC ₃ H ₇
Cer6	-COC ₅ H ₁₁
Cer8	-COC ₇ H ₁₅
Cer12	-COC ₁₁ H ₂₃
Cer18:1	-cis CO(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃
Cer24	-COC ₂₃ H ₄₇

Obr. 29 Přehled struktury studovaných ceramidů

3.2 MATERIÁL A METODY

3.2.1 Chemikálie

Ceramidy a sfingosin byly zakoupeny u firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Všechny ostatní chemikálie a rozpouštědla byly od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo).

3.2.2 Příprava modelových membrán SC

Složení lipidové směsi, kterou jsme použili pro přípravu modelových membrán, bylo vybráno na základně publikovaných dat. Podobné ekvimolární směsi kožních syntetických lipidů již byly použity pro přípravu tzv. „SC substitute“.¹⁸³ V našem případě se jednalo o kvartérní ekvimolární směs studovaného CER, Chol a kyseliny lignocerové s 5% hmotnostním přídatkem CholS. Jednotlivé lipidy byly rozpuštěny ve směsi

CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v) a smíchány v uvedeném poměru pro dosažení požadovaného složení. Rozpouštědla byla odpařena proudem dusíku a vzorky byly dosušeny přes noc pod vysokým vakuem pro úplné odstranění rozpouštědla. Poté byly lipidové směsi rozpuštěny ve směsi hexan/96% EtOH 2:1 (v/v) na koncentraci 4,5 mg/ml. Použití 96% ethanolu, nikoli absolutního, je nutné pro rozpuštění CholS. 300 µl roztoku lipidů bylo nastříkáno rychlostí 10nl/sec na polykarbonátové Nuclepore filtry (Whatman, Kent, UK) nebo teflonové Fluoropore filtry (Millipore Merck, Darmstadt, Německo) pod proudem dusíku pomocí Linomatu IV (Camag, Muttenz, Švýcarsko) vybaveným dodatečným ramenem pohybu ve směru osy y.¹⁸⁶ Tloušťka lipidové vrstvy byla přibližně 11 µm a celkové množství nanesených lipidů bylo 1,35 mg/cm². Připravené lipidové membrány byly zahřány na 90 °C, což je dostatečně vysoko nad hlavní fázový přechod, ekvilibrovány po dobu 10 min a pomalu (~ 3 h) ochlazeny na pokojovou teplotu. Poté byly inkubovány v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 32 °C. Taktéž jsme zkoumali inkubační dobu 0, 4, 7 a 14 dnů. Membrány pro IR spektroskopii byly připraveny stejným postupem. Lipidové směsi pro DSC byly připraveny uvedeným způsobem s výjimkou kroku nástřiku.

3.2.3 Permeační experimenty

Permeabilita modelových membrán SC byla hodnocena pomocí modifikované Franzovy difúzní cely s volným difúzním povrchem 0,5 cm² a akceptorovým objemem přibližně 6 ml. Membrány byly upevněny do difúzních cel lipidickým filmem otočeným směrem do donorového kompartmentu a utěsněny silikonovým tukem. Akceptorová fáze cely byla naplněna PBS o pH 7,4 (obsahující 10 mM fosfátový pufr, 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl) s 0,03% NaN₃ jako konzervačním prostředkem. Byl určen přesný objem akceptorové fáze, který byl zahrnut do výpočtu. Franzovy difúzní cely s upevněnými membránami byly umístěny do vodní lázně s konstantní teplotou 32 °C. Po ekvilibraci po dobu 1 h byla měřena elektrická impedance (viz kapitola 2.2.6). Následně bylo na membránu aplikováno 100 µl donorového vzorku a donorová část cely byla překryta krycím sklíčkem. Donorový vzorek byl připraven jako 5% suspenze TH ve vodě dle podmínek uvedených v kapitole 2.2.4. Akceptorová fáze cely byla po celou dobu experimentu míchána a temperována na 32 °C. Po dobu experimentu, tj. 8 h, byly v daných časových intervalech odebírány z akceptorové fáze frakce o objemu 0,3 ml. Odebrané

množství vzorku bylo nahrazeno stejným objemem čerstvého PBS. U jednotlivých odebraných frakcí byla stanovena koncentrace TH pomocí HPLC.

3.2.4 HPLC analýza

HPLC stanovení TH probíhalo dle podmínek uvedených v kapitole 2.2.15.

3.2.5 Diferenční skenovací kalorimetrie

DSC termogramů modelových membrán SC byl zaznamenán v rozmezí teplot 20-120 °C pomocí DSC 200PC kalorimetru (NETSCH, Selb, Německo) při skenování rychlostí 1 °C/min. Jako standard byla použita prázdná hliníková pánvička. Přechodové teploty byly určeny pomocí NETSCH Proteus Thermal Analysis software.

3.2.6 FTIR spektroskopie

FTIR spektra modelových membrán lipidů SC byla měřena na spektrometru Nicolet IMPACT 400 (Thermo Scientific, USA), vybavený jednodrazovým MIRacle ATR ZnSe krystalem (index lomu 2,4, průměr 1,8 mm, úhel dopadu 45 °, horizontálně orientovaný, PIKE technologies, Madison, USA). Pro zajištění dostatečného kontaktu měřeného vzorku s ATR krystalem byl použit upínací mechanismus s konstantním přítlačným tlakem. Jedno měření čítalo 256 skenů s rezolucí 2 cm⁻¹. Teplotní závislost IR spekter byla studována v rozmezí 28-100 °C po 2 °C teplotním intervalu (stabilita ±0,2 °C) pomocí teploty řídicího modulu (PIKE technologies, Madison, USA). Po každém přírůstku teploty byl vzorek před každým měřením stabilizován po dobu 5 min. Spektra byla analyzována pomocí software Bruker OPUS. Přesné pozice píků byly určeny z druhé derivace spekter.

3.2.7 Analýza dat

Při zpracování dat byl použit statistický software SigmaStat pro Windows 3.5 (SPSS, USA). Pro statistické zpracování byla použita one-way ANOVA analýza rozptylu

s Dunnettovým post testem nebo neparametrická one-way Kruskal-Wallisova analýza s Dunnovým post testem. Hodnoty pravděpodobnosti na hladině významnosti menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Data jsou znázorněna jako průměrné hodnoty se standardní chybou (\pm S.E.M.) daného počtu experimentů (n).

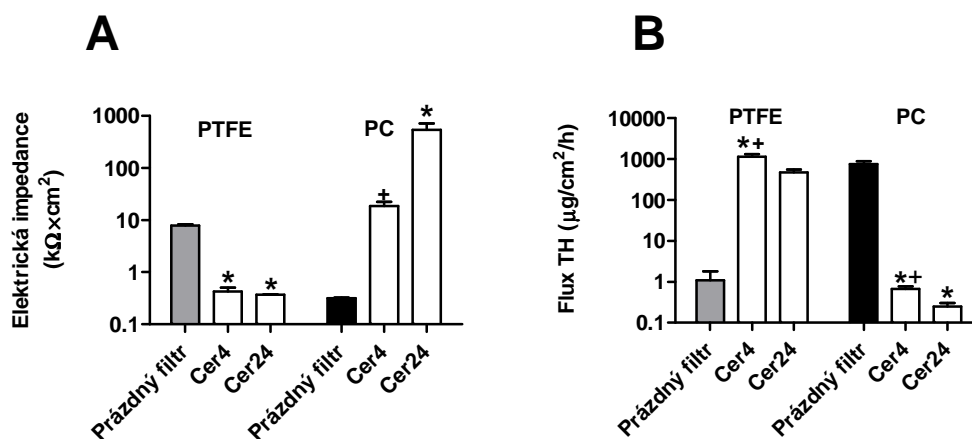
3.3 VÝSLEDKY

3.3.1 Hodnocení propustnosti různých filtrů a různé délky inkubace

Při studiu modelových membrán SC jsme se nejprve zaměřili na způsob jejich přípravy, a to různé druhy podpůrných filtrů a délku inkubační doby, abychom mohli zvolit vhodné podmínky, které budou odpovídat propustnosti kůže, a také abychom byli schopni rozlišit mezi jednotlivými studovanými membránami.

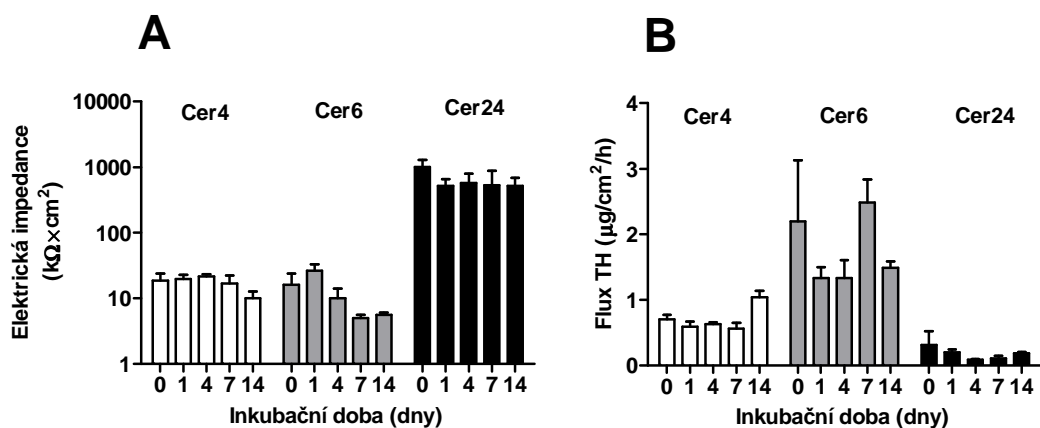
Graf na Obr. 30 ukazuje srovnání dvou filtrů, a to polykarbonátového (PC) a teflonového (PTFE) o poréznosti 50 nm a 0,2 μ m. PC a PTFE filtry byly vybrány z důvodu odolnosti vůči organickým rozpouštědlům a kolísání teplot, ke kterým dochází v průběhu přípravy modelových membrán SC (zmrazení a zahřátí na 90 °C). Prověřovali jsme propustnost samotných filtrů bez lipidů a modelových membrán SC složených z Cer/FFA/Chol/CholS. Ceramidem v těchto membránách byl přirozený ceramid Cer24 (Cer NS) s dlouhým řetězcem, který sloužil jako standard permeability, nebo Cer4 s krátkým řetězcem¹⁷², který vykázal významné změny v propustnosti kůže. Propustnost modelových membrán SC byla hodnocena pomocí fluxu TH a elektrické impedance.

Jak je vidět z grafu na Obr. 30 A, elektrická impedance pro samotný PC filtr byla řádově nižší než impedance filtrů s nanesenými lipidovými směsmi. Naopak u PTFE filtrů tomu bylo obráceně. Tento jev je patrně způsoben hydrofobním charakterem PTFE membrán. Fluxy TH pro jednotlivé membrány jsou zobrazeny v grafu na Obr. 30 B. Hodnoty fluxů TH se pro PC filtry s Cer4 a Cer24 pohybovaly do jednotky μ g/cm²/h, zatímco u PTFE dosáhly řádově stovek μ g/cm²/h. Na základě získaných výsledků jsme proto pro další studium zvolili PC filtry, a to z důvodu, že samotný filtr nijak nepřispíval k bariérovým vlastnostem studovaných membrán a že se jejich propustnost blížila více propustnosti kůže. Tyto membrány také poskytovaly lepší rozlišení mezi studovanými Cer, zejména v elektrické impedanci.



Obr. 30 Vliv různých podpůrných filtrů na elektrickou impedanci (A) a flux TH (5%) (B) modelových membrán SC složených z Cer/FFA/Chol/CholS. Srovnání včetně prázdných filtrů. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 4$, + značí statistický rozdíl oproti membráně s Cer24, * značí statistický rozdíl oproti prázdnému filtru ($p < 0,05$).

Po stanovení vhodného podpůrného filtru pro přípravu modelových membrán SC jsme se zabývali vlivem délky inkubační doby na propustnost membrán (Obr. 31 A-B). Pro toto srovnání jsme rozšířili sérii membrán o další modelovou membránu s krátkým Cer6. První série membrán byla podrobena permeačnímu experimentu ihned po jejich přípravě (označení jako den 0). Ostatní byly inkubovány při 32 ° C po dobu 1, 4, 7 a 14 dní v termostatu. Nebyly však pozorovány žádné významné rozdíly jak v permeabilitě, tak elektrické impedanci v závislosti na délce inkubace. Při zevrubné inspekci byly v některých případech zaznamenány jen nepatrně nižší nebo vyšší změny po jednodenní inkubaci. Jednodenní inkubace byla tedy dostačující pro ustálení rovnováhy připravených membrán a byla proto zvolena pro další experimenty.

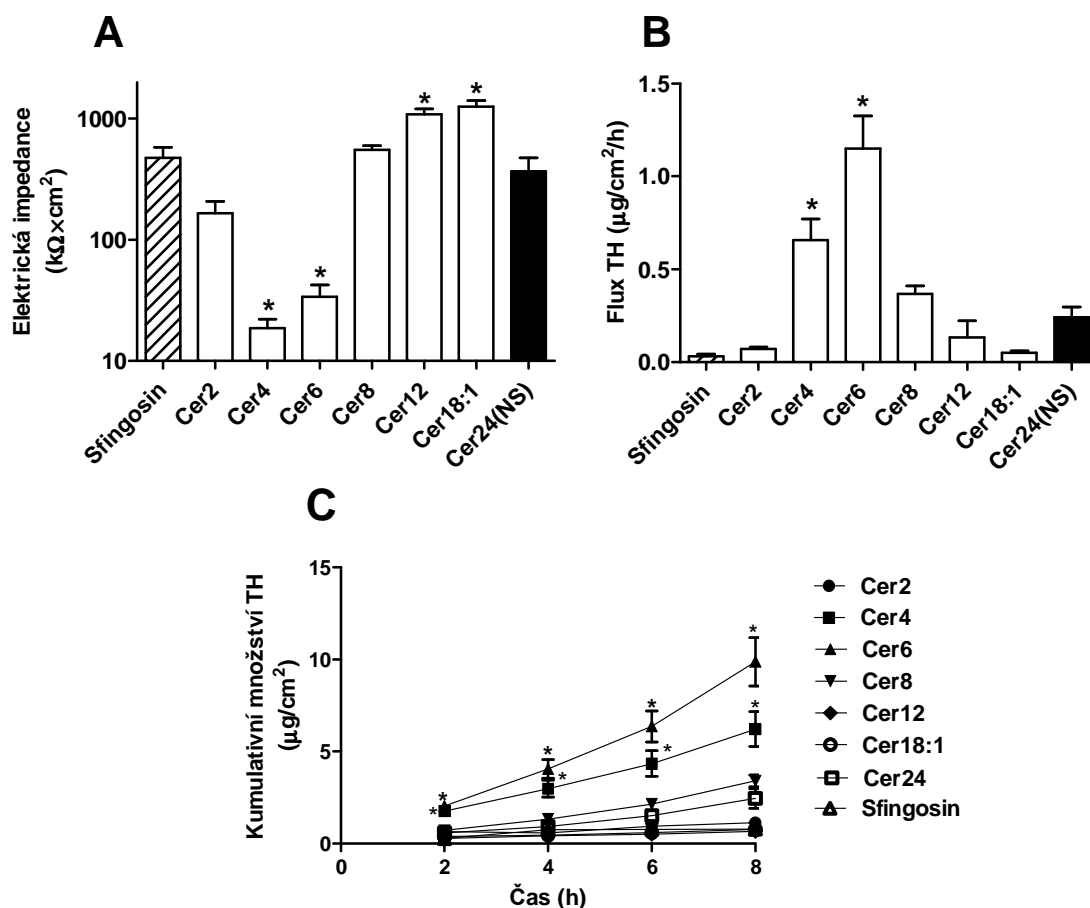


Obr. 31 Vliv délky inkubační doby (0, 1, 4, 7 a 14 dní při 32 °C) modelových membrán SC na jejich elektrickou impedanci (A) a permeabilitu TH (B). Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty ± S.E.M. $n \geq 4$.

3.3.2 Permeabilita membrán s ceramidy

Hodnoty elektrické impedance modelových membrán SC obsahující studované ceramidy a sfingosin jsou zobrazeny v grafu na Obr. 32 A. Impedance membrány s přirozeným Cer24, která soužila jako standard permeability, byla $368 \pm 109 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a značí tak podstatné snížení propustnosti pro ionty. Substituce Cer24 ekvimolárním množstvím krátkých ceramidů Cer2, Cer4 a Cer6 vedla k významnému poklesu impedance pouze u Cer4 a Cer6, a to na hodnoty $18 \pm 3,5 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, respektive $33 \pm 8 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Cer2, který má acylový řetězec o délce pouze 2 uhlíky, nezpůsobil významnou změnu elektrické impedance stejně jako samotný sfingosin. Překvapivě Cer18:1, který má cis dvojnou vazbu v acylovém řetězci, spolu s Cer12 významně zvýšily impedanci až k hodnotám $1260 \pm 163 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a $1091 \pm 113 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Zkrácení řetězce na délku 8 uhlíků u Cer8 nevyvolalo změnu v impedanci.

Jako další ukazatel propustnosti modelových membrán SC sloužil flux TH (Obr. 32 B). Flux TH přes kontrolní membránu s Cer24 byl $0,24 \pm 0,05 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Záměna Cer24 za kratší, ovšem stále poměrně dlouhé Cer18:1, Cer12 a Cer8, nebo nejkratší Cer2 či samotný sfingosin nevedla k významné změně fluxu TH. Naopak krátké Cer4 a Cer6 způsobily významný vzestup propustnosti membrány pro TH. Flux TH přes membránu s Cer6 byl 4,5krát vyšší než flux TH přes membránu s Cer24 a odpovídal hodnotě $1,14 \pm 0,17 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.



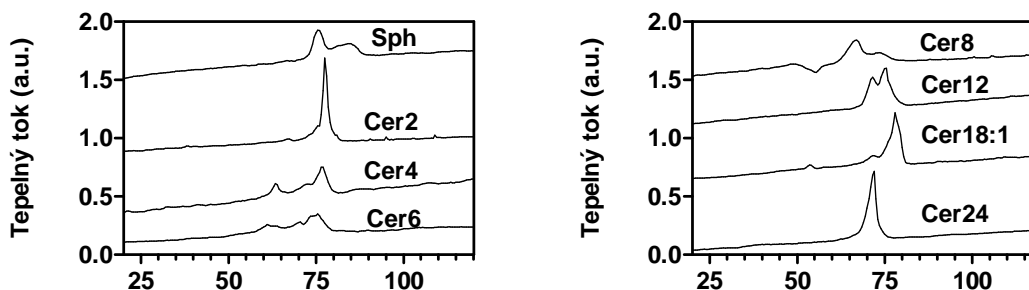
Obr. 32 Vliv sfingosinu a Cer s různou délkou acylového řetězce na elektrickou impedanci (A) a flux TH (5%) (B) modelových membrán SC složených z Cer(Sfg)/FFA/Chol/CholS. Permeační profil TH (5%) (C) pro jednotlivé membrány. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 8$, * značí statistický rozdíl oproti membráně s Cer24 ($p < 0,05$).

3.3.3 Diferenční skenovací kalorimetrie

K získání základních znalostí k porozumění pozorovaných rozdílů mezi permeabilitou modelových membrán jsme využili diferenční skenovací kalorimetrii (DSC). Tato metoda umožňuje detekovat fázové přechody, které mohou být známkou soudržných sil a míšení lipidů, a slouží jako podklad pro teplotně závislou FTIR spektroskopii.

DSC termogramy jsou znázorněny na Obr. 33. U modelových membrán s Cer24 a Cer2 byla pozorována jedna poměrně ostrá endotermní tranzice s teplotním nástupem 61 °C, respektive 63 °C a odpovídající T_m 71 °C, respektive 77 °C, svědčící o kooperativním termotropním chování lipidů membrán. Fázové přechody lipidových

směsí ostatních membrán byly širší a obsahovaly více komponent vypovídající o přítomnosti domén s určitou strukturou. Hlavním účinkem krátkých Cer4, Cer6 a Cer8 bylo nejen rozšíření, ale i snížení teploty tranzice. Vůbec nejširší fázový přechod s nejnižším teplotním nástupem při 55 °C a koncem při 79 °C s nejméně třemi překrývajícími se tranzicemi byl zaznamenán u membrány obsahující Cer6. Nutno podotknout, že tato membrána byla nejpropustnější.



Obr. 33 DSC termogramy modelových membrán SC při prvním zahřátí.

3.3.4 FTIR spektroskopie

Frekvence a uspořádání lipidových řetězců byly přiřazeny dle podmínek uvedených v kapitole 1.3.1 a jsou uváděny při 32 °C mezi fázovými přechody a po proběhnutí fázových tranzicí.

Cer 24/FFA/Chol/CholS

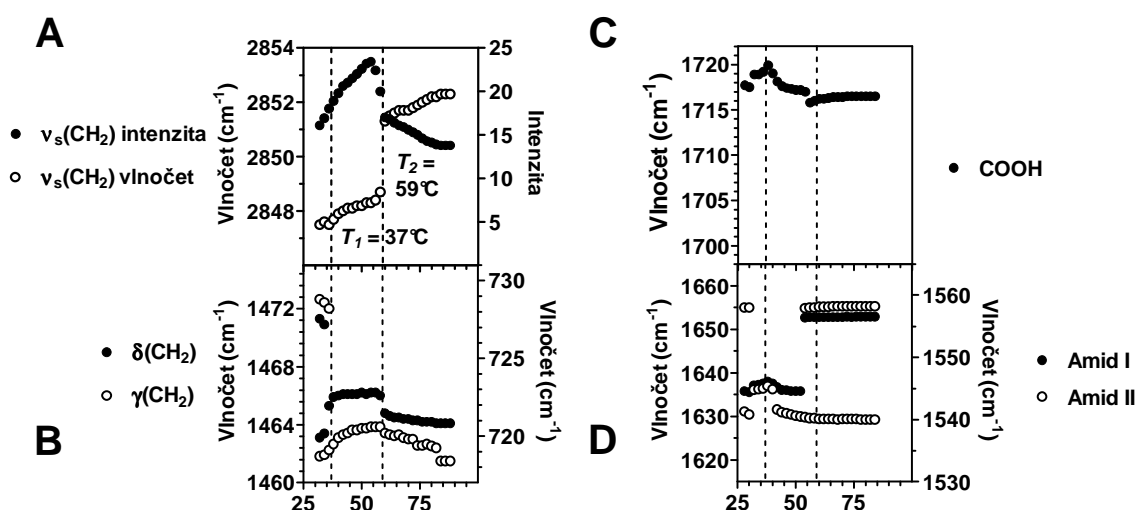
Při 32 °C, tedy za fyziologické teploty kůže, byly uhlovodíkové řetězce lipidů membrány obsahující přirozený Cer24 a FFA s odpovídající délkou acylového řetězce 24 uhlíků ve vysokém stupni uspořádanosti s převažující *trans* konformací, jak vyplývá z pozice ν_s CH₂ vibrace při 2847,5 cm⁻¹. U deformačních δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrací byl zaznamenán rozštěp absorpčních pásů do dubletů způsobený interakcemi mezi sousedními řetězci lipidů uspořádaných do orthorhombické krystalické mřížky (Obr. 34 A-B). Z velikosti tohoto rozštěpu lze usuzovat na přítomnost poměrně velkých domén orthorhombicky uspořádaných řetězců lipidů. Pozice pásu vibrace karbonylu FFA byla zaznamenána při 1718,9 cm⁻¹ a odpovídá relativně slabým vodíkovým vazbám kyslíku karbonylu FFA v této lipidové směsi (Obr. 34 C). Vibrační pásy Cer24 odpovídající valenčním vibracím amidu I a II byly široké a rozštěpeny, což svědčí o zapojení do sítě

vodíkových vazeb o různé síle. Hlavní pozice byly nalezeny pro amid I při $1635,8 \text{ cm}^{-1}$ a pro amid II při $1558,0 \text{ cm}^{-1}$ a $1541,3 \text{ cm}^{-1}$ (Obr. 34 D).

Během zahřívání jsme zaznamenali dva fázové přechody při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a $59 \text{ }^\circ\text{C}$, jak vyplývá z posunu pozice pásu konformačně citlivé $\nu_s \text{ CH}_2$ vibrace. Během první fázové tranzice došlo k posunu $\nu_s \text{ CH}_2$ o $0,4 \text{ cm}^{-1}$ a zániku rozštěpu jak $\delta(\text{CH}_2)$, tak $\gamma(\text{CH}_2)$ pásu, což svědčí o přechodu z orthorhombického do hexagonálního uspořádání. Druhá tranzice byla spojena se vznikem neuspořádanosti lipidových řetězců a přechodem do kapalně krystalické fáze, jak bylo viditelné ze vzestupu pozice $\nu_s \text{ CH}_2$ na $2852,0 \text{ cm}^{-1}$. Hlavní fázová tranzice byla také spojena s jistou změnou uspořádání v síti vodíkových vazeb polární oblasti, kdy došlo k vzestupu pozice amidu I na $1558,0 \text{ cm}^{-1}$ s rozšířením pásu amidu II se dvěma maximy a mírnému poklesu pozice vibrace karbonylu FFA.

Tato membrána s lipidy s odpovídající délkou uhlovodíkových řetězců jako jediná vykazovala ostrou tranzici s šířkou $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a značí tak kooperativní tání řetězců. Tento poznatek spolu s faktem, že hlavní tranzice byla zaznamenána při teplotě o $26 \text{ }^\circ\text{C}$ nižší než pro samotný Cer24,¹⁸⁷ svědčí o mísitelnosti jednotlivých složek tohoto membránového uspořádání.

Při inspekci intenzity $\nu_s \text{ CH}_2$ pásu jsme zaregistrovali jeho nárůst až k teplotě $54 \text{ }^\circ\text{C}$ značící zvýšenou hustotu lipidových řetězců patrně v důsledku přeskupení lipidových řetězců spojenou s nárůstem méně rigidních *gauche* konformerů (Obr. 34 A) Během hlavní fázové tranzice došlo k náhlému poklesu intenzity pásu $\nu_s \text{ CH}_2$ a dále pak pozvolnějšímu snižování.



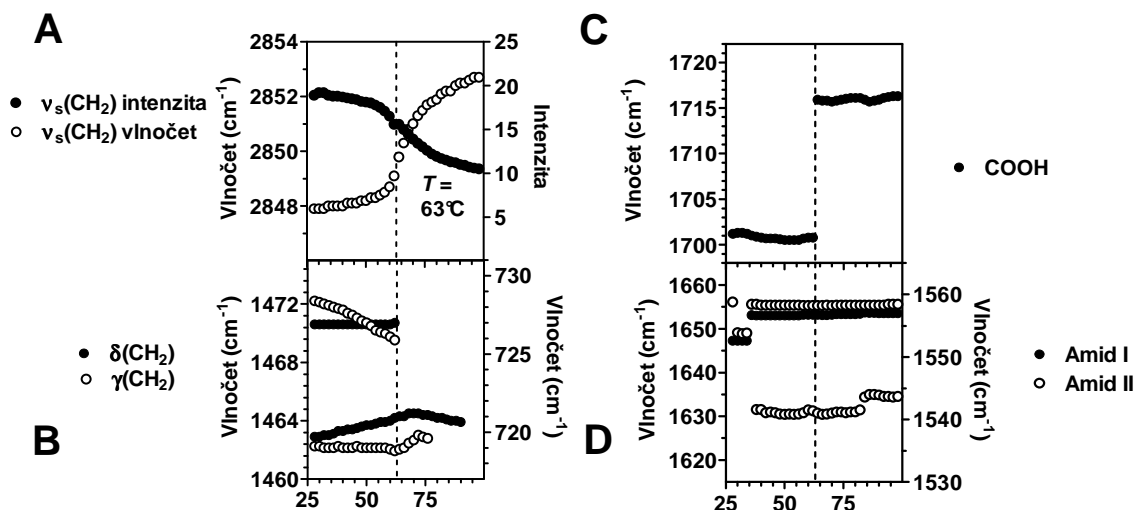
Obr. 34 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity $\nu_s \text{ CH}_2$ vibrace (A), vlnočtu $\delta(\text{CH}_2)$ a $\gamma(\text{CH}_2)$ vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer24/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic.

Cer 2/FFA/Chol/CholS

Při 32 °C modelová membrána s krátkým Cer2 vykazala stejné chování jako modelová membrána obsahující dlouhý Cer24, tj. uspořádané uhlovodíkové řetězce lipidů v orthorhombické krystalové mřížce (Obr. 35 A-B). Absorpční pásy amidových vibrací byly opět velmi široké s pozicí hlavních komponent pro amid I při 1653,1 cm⁻¹ a pro amid II při 1553,7 cm⁻¹ (Obr. 35 D). Na rozdíl od předchozí membrány obsahující pouze dlouhořetězcové lipidy vibrační pás karbonylu FFA byl zaznamenán při 1701,3 cm⁻¹ ukazující na zapojení karbonylového kyslíku FFA do silné sítě vodíkových vazeb (Obr. 35 C).

Během ohřevu byla zaznamenána pouze jedna fázová tranzice při 63 °C doprovázená postupným nárůstem neuspořádanosti řetězců daná zvyšujícím se množstvím *gauche* konformerů, jak prokázalo zvýšení ν_s CH₂ nad 2850 cm⁻¹ až k hodnotě 2852,7 cm⁻¹. Současně s touto tranzicí došlo ke splnutí dubletů δ (CH₂) a γ (CH₂) pásů udávající zánik orthorhombického laterárního uspořádání. Pozorovaný vývoj popsanych vibrací je stejný jako u samotného Cer2. Tranzice z upořádané do neuspořádané fáze byla ovšem zaznamenána u membrány při teplotě o 12 °C nižší než u samotného Cer2¹⁸⁷ a naznačuje tak míšení Cer2 s ostatními lipidy membrány. Na druhou stranu tato tranzice byla mnohem širší než pro samotný Cer2 s nástupem při 57 °C a koncem při 77 °C. Společně se zvyšující se mobilitou řetězců během tranzice pomalu klesala intenzita symetrického methylenového absorpčního pásu ukazující na postupné rozšiřování těsně uspořádané struktury lipidů (Obr. 35 A).

U pásu amidové I vibrace jsme zaznamenali při 36 °C posun pozice amidu I na 1653,0 cm⁻¹, u amidové II vibrace rozšíření pásu se dvěma maximy. Tyto změny nebyly dále ovlivněny během hlavní fázové tranzice. Drobné změny v pozici amidových pásů jsme také pozorovali okolo 85 °C. Naproti tomu došlo k ostrému vzestupu pozice vibračního pásu karbonylu FFA o 15 cm⁻¹ během tranzice z uspořádané do neuspořádané fáze, což je ve shodě s navrhovaným míšením Cer2 s FFA.



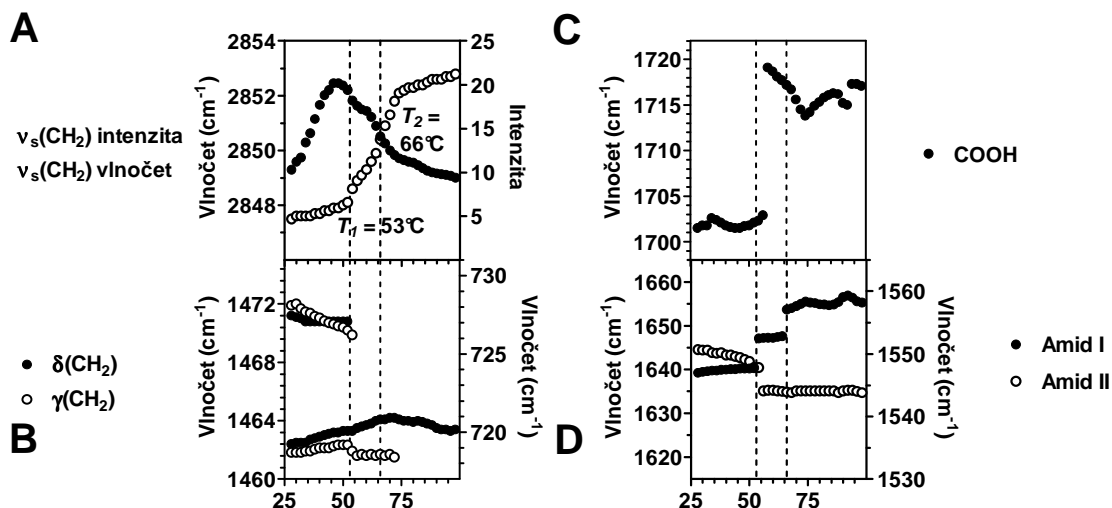
Obr. 35 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity v_s CH_2 vibrace (A), vlnočtu δ (CH_2) a γ (CH_2) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer2/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teplotu tranzice.

Cer 4/FFA/Chol/CholS

Modelová membrána SC, v níž byl dlouhý Cer24 nahrazen ekvimolárním množstvím Cer4, obsahovala rovněž uspořádané uhlovodíkové řetězce lipidů při 32 °C, jak je patrné z pozice v_s CH_2 vibrace při 2847,5 cm^{-1} a domény s orthorhombicky uspořádanými řetězci dané přítomností dubletu deformačních methylenových vibrací (Obr. 36 A-B). Nicméně tato modelová membrána vykazovala přibližně 2krát nižší intenzitu v_s CH_2 než obě předešlé membrány. Vibrace polární oblasti byly viditelné při vlnočtech 1701,8 cm^{-1} pro karbonyl FFA a dále 1639,6 cm^{-1} a 1550,6 cm^{-1} pro amid I a amid II (Obr. 36 C-D).

Fázový přechod této membrány byl široký s počátkem při 49 °C a koncem při 73 °C. Z frekvencí a intenzit v_s CH_2 vibrací a frekvencí deformačních methylenových vibrací byly odvozeny dvě překrývající se fázové tranzice. Během první tranzice při 53 °C došlo k zániku rozštěpu jak δ (CH_2), tak γ (CH_2) vibrace, který byl následován tranzicí do neuspořádané fáze charakterizované posunem v_s CH_2 z 2849,6 cm^{-1} na 2852,1 cm^{-1} se středem při 66 °C. Tato teplota je prakticky shodná s teplotou hlavní fázové tranzice samotného Cer4 ta byla 67 °C.¹⁸⁷ Během zahřívání docházelo ke zvyšování intenzity symetrického methylenového absorpčního pásu s maximem při počátku fázového přechodu a po proběhnutí tranzice došlo k postupnému snižování až k hodnotám podobným předchozím membránám (Obr. 36 A). Změny v polární oblasti lipidů během tranzic probíhaly současně se změnami v nepolární oblasti, kdy došlo k posunu pozice vibrace amidu I na 1647 cm^{-1} a amidu II na 1544 cm^{-1} . Tyto posuny odrážejí oslabení sítě

vodíkových vazeb Cer4. U pozice amidu I byl také zaznamenán posun k 1655 cm^{-1} při hlavním fázovém přechodu. Mezi tranzicemi při 57 °C jsme pozorovali prudký vzrůst pozice vlnočtu absorpčního pásu karboxylu FFA na $1719,1\text{ cm}^{-1}$ svědčící rovněž o oslabení vodíkových vazeb, po kterém následoval mírný pokles. Malé změny v polární oblasti jsme také pozorovali okolo 88 °C .



Obr. 36 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity ν_s CH₂ vibrace (A), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer4/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzicí.

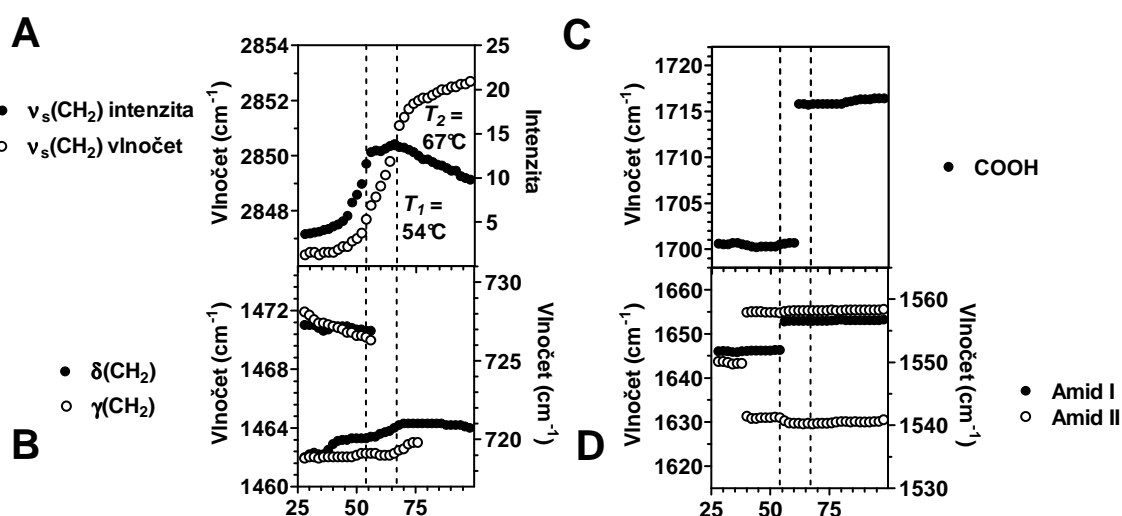
Cer 6/FFA/Chol/CholS

Modelová membrána SC, která obsahovala další krátký Cer6, byla opět při teplotě kůže charakterizována uspořádanými řetězci lipidů s převažujícími *trans* konformery a orthorhombickým uspořádáním řetězců jak je zřejmé z pozice ν_s CH₂ vibrace při $2846,5\text{ cm}^{-1}$ a dubletů deformačních methylenových vibrací (Obr. 37 A-B). Nicméně tato membrána prokázala 4krát až 5krát nižší intenzitu ν_s CH₂ pásu než membrány s Cer24, respektive Cer2, což značí nižší hustotu lipidových řetězců snímanou evanescentní vlnou na povrchu ATR krystalu. Pozice vibrací polární oblasti byly pozorovány při $1700,5\text{ cm}^{-1}$ pro karbonyl FFA a $1645,0\text{ cm}^{-1}$ pro amid I a $1550,0\text{ cm}^{-1}$ pro amid II ceramidu (Obr. 37 C-D).

Fázový přechod membrány Cer 6/FFA/Chol/CholS byl velmi široký s nástupem a koncem při 49 °C a 75 °C a probíhal stejně jako u membrány s Cer4 dvoustupňově. Na počátku fázové tranzice při 54 °C dochází k vzestupu pozice ν_s CH₂ o $0,5\text{ cm}^{-1}$ a ke splynutí jak nůžkového, tak kývavého dubletu. Poté následovala tranzice z uspořádané do neuspořádané fáze při 67 °C charakterizovaná posunem ν_s CH₂ na $2852,0\text{ cm}^{-1}$. Stejně jako u membrány s Cer4 se tato teplota blížila teplotě hlavní fázové tranzice pro samotný

Cer6 (69 °C¹⁸⁷). Během ohřevu vzrůstaly intenzity symetrických methylenových absorpčních pásů až k první tranzici, potom následovalo ustálení a po proběhnutí druhé tranzice pomalu klesaly (Obr. 37 A).

První tranzice byla také doprovázena mírným posunem pozice vibrace amidu I na 1652,6 cm⁻¹ ukazující na oslabení zapojení kyslíku karbonylu Cer6 do vodíkových vazeb. Mimo to jsme pozorovali rozštěp pásu amidu II do dvou ekvivalentních píků při 38 °C. Pozice amidu I a II nebyly po první tranzici dále ovlivněny. Totožně jako u membrány s Cer4 byl viditelný zřetelný nárůst hodnoty vlnočtu absorpčního pásu karboxylu FFA při 62 °C mezi tranzicemi detekovanými z posunu pozic ν_s CH₂.



Obr. 37 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity vs CH₂ vibrace (A), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer6/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic

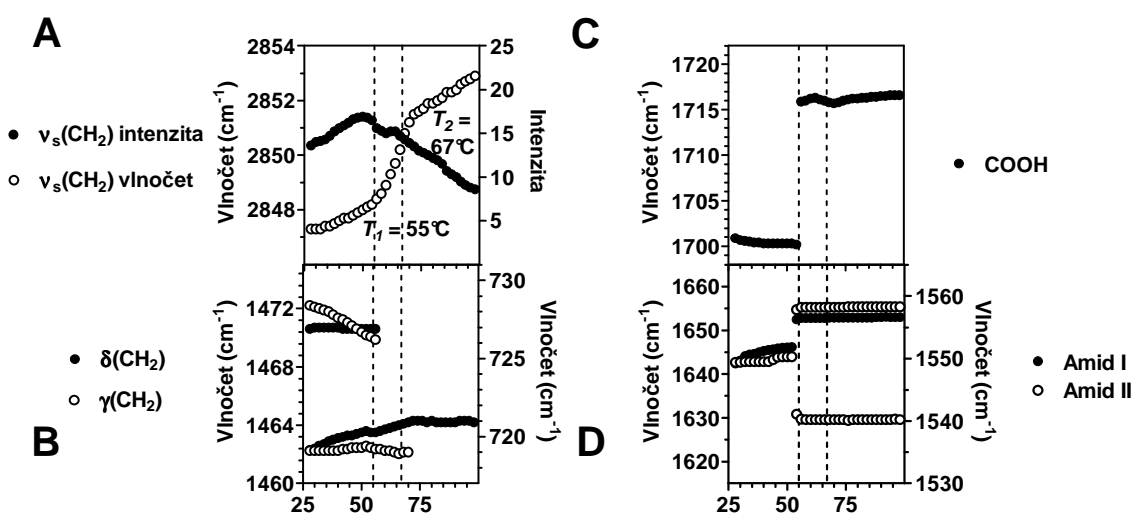
Cer 8/FFA/Chol/CholS

Modelová membrána SC ve složení Cer8/FFA/Chol/CholS vykazovala při 32 °C ν_s CH₂ vibraci při 2847,3 cm⁻¹ a dublet δ (CH₂) při 1470,7 cm⁻¹ a 1462,6 cm⁻¹ společně s dubletem γ (CH₂) při 728,3 cm⁻¹ a 719,1 cm⁻¹ (Obr. 38 A-B). Tyto hodnoty znovu ukazují na uspořádané lipidové řetězce v orthorhombické fázi. Jeden ostrý pík odpovídající vibraci karbonylu FFA byl zaznamenán při 1700,6 cm⁻¹ a vibrace karbonylu amidu ceramidu byla zaznamenána při 1644,1 cm⁻¹ a deformační N-H vibrace amidu ceramidu při 1549,5 cm⁻¹ (Obr. 38 C-D).

Stejně jako u ostatních membrán s krátkými Cer4 a Cer6 byl fázový přechod membrány s Cer8 široký s nástupem při 50 °C a koncem při 71 °C a dvoustupňový. První tranzice byla spojena s kolapsem orthorhombického uspořádaní řetězců lipidů při 55 °C následovaná druhou tranzicí s přechodem do kapalně krystalické fáze při 67 °C určené

z posunu vlnočtu ν_s CH₂ na 2851,5 cm⁻¹. Opět jako u předchozích membrán s krátkořetězcovými Cer4 a Cer6 se teplota druhé tranzice blížila teplotě samotného Cer8 (70 °C¹⁸⁷). Během ohřevu jsme zaznamenali podobný průběh vývoje intenzity symetrického methylenového absorpčního pásu jako u membrány s Cer6, ovšem počáteční intenzita methylenové vibrace byly přibližně 4krát vyšší než u Cer6, a proto vzestup intenzity nebyl tak nápadný (Obr. 38 A).

Na počátku hlavní tranzice jsme pozorovali vzestup vibrace amidu I na 1652,8 cm⁻¹ a rozšíření absorpčního pásu pro amid II se dvěma maximy. Tyto změny nebyly dále ovlivněny v průběhu dalšího ohřevu. Také došlo k vzestupu vibrace karboxylu FFA o 19 cm⁻¹.



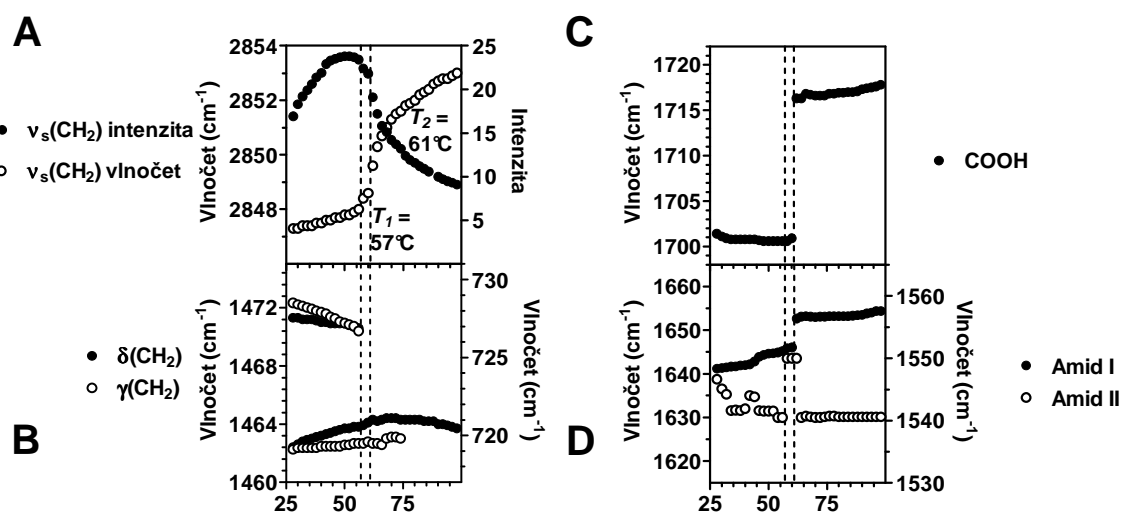
Obr. 38 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity vs CH₂ vibrace (A), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer8/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic.

Cer 12/FFA/Chol/CholS

Při teplotě 32 °C byla pozice ν_s CH₂ modelové membrány se středně dlouhým Cer12 při 2847,4 cm⁻¹, což odpovídá vysokému stupni uspořádanosti lipidů s převažujícími *trans* konformery. Deformační methylenové vibrace byly za této teploty pozorovány jako dublety orthorhombického laterárního uspořádání řetězců (Obr. 39 A-B). Intenzita symetrické methylenové vibrace byla vyšší než intenzita pozorovaná u membrán s krátkými Cer4, Cer6 a Cer8 a odpovídala hodnotám intenzit pozorovaných za této teploty u membrány s Cer2. Karboxylová vibrace karboxylu FFA byla zaznamenána při 1700,9 cm⁻¹ (Obr. 39 C). Vibrační pás karboxylu ceramidu byl přiřazen vlnočtu 1641,5 cm⁻¹ a deformační vibrace NH skupiny amidu ceramidu byla pozorována při 1544, 2 cm⁻¹ (Obr. 39 D).

Fázový přechod membrány se středně dlouhým Cer12 byl poměrně úzký v rozmezí 8 °C a mohl by tak naznačovat kooperativní tání řetězců lipidů. Z frekvencí a intenzit ν_s CH₂ vibrací a frekvencí deformačních methylenových vibrací byly odvozeny dvě překrývající se fázové tranzice. Během první tranzice při 57 °C došlo ke splnutí dubletů značící změnu z orthorhombického upořádání na hexagonální. Druhou tranzicí se středem při 61 °C prokázalo zvýšení ν_s CH₂ na 2851,3 cm⁻¹. Teplota hlavní fázové tranzice membrány byla o 26 °C nižší teplota pro samotný Cer12 podobně jako u membrány s Cer24. To opět může nasvědčovat míšení jednotlivých složek lipidů v membránovém systému. Během ohřevu vzrůstaly intenzity methylenových absorpčních pásů až k teplotě 48 °C, potom následovalo ustálení na hodnotách stejných jako u membrány s Cer24 a po proběhnutí hlavního přechodu nastal strmý pokles následovaný pozvolnějším snižováním (Obr. 39 A).

Během tranzice došlo k vzestupu pozice pro amid I na 1653,1 cm⁻¹ a rozšíření absorpčního pásu pro amid II s maximy při 1540,5 cm⁻¹ a 1558,0 cm⁻¹. Při hlavní tranzici došlo také k oslabení vodíkových vazeb karbonylu FFA detekovatelné z posunu na 1716,3 cm⁻¹.



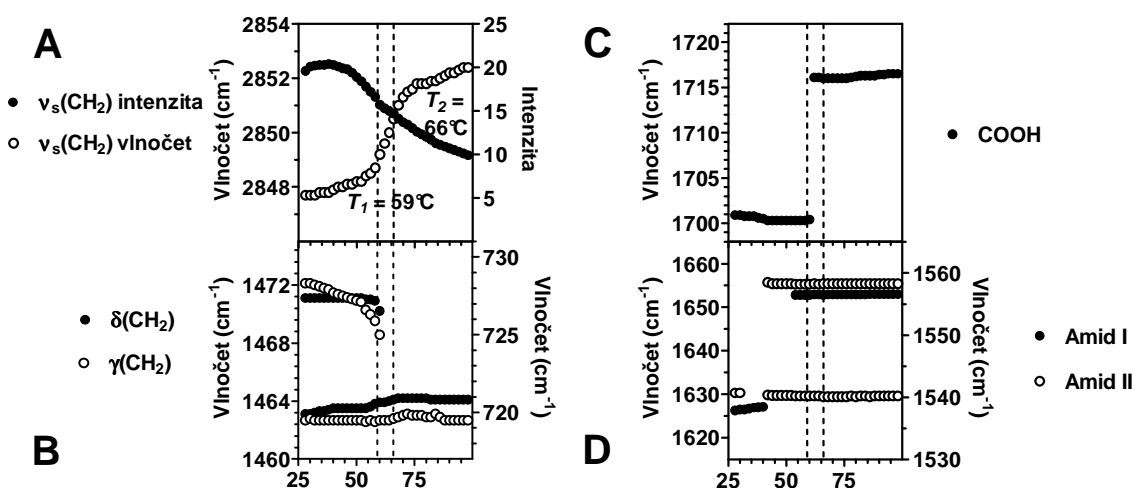
Obr. 39 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity ν_s CH₂ vibrace (A), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer12/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic.

Cer 18:1/FFA/Chol/CholS

Záměna Cer24 v membráně za poměrně dlouhý Cer 18:1 s dvojnou cis vazbou v řetězci nevyvolala změnu v uspořádání lipidových řetězců při 32 °C. Opět jsme zaznamenali nízkou pozici ν_s CH₂ při 2847,7 cm⁻¹ a dublety methylenových deformačních vibrací (Obr. 40 A-B). Řetězce lipidů této membránové směsi jsou tak vysoce upořádané v orthorhombické mřížce. Intenzita symetrické methylenové vibrace byla shodná jako u membrány s Cer12. Vibrační pás karbonylu FFA byl pozorovaný při 1700,8 cm⁻¹, pás karbonylu amidu ceramidu při 1626,5 cm⁻¹ a deformační NH vibrace při 1540,7 cm⁻¹ (Obr. 40 C-D).

Zaznamenaný fázový přechod byl širší než u membrány s Cer12. Kolaps rozštěpu značící přítomnost orthorhombického upořádání byl spojen s první tranzicí při 59 °C. Vznik kapalně krystalické fáze byl zaznamenán při 66 °C a byl spojen se vzestupem pozice ν_s CH₂ na 2851,0 cm⁻¹. Během zahřívání jsme nezaregistrovali změnu intenzity absorpčního pásu symetrické methylenové vibrace až do teploty 42 °C. Poté následovalo pozvolné snižování intenzit až k hodnotám srovnatelným s ostatními membránami, které odráží postupné rozšiřování těsně uspořádané struktury lipidů (Obr. 40 A).

Během ohřevu byl zaznamenán vzestup pozice pro amid I na 1652,9 cm⁻¹ rozšíření absorpčního pásu pro amid II s maximy při 1540,4 cm⁻¹ a 1558,3 cm⁻¹ při 42 °C. Během tranzice došlo k vzestupu pozice karbonylu FFA na 1716,1 cm⁻¹.

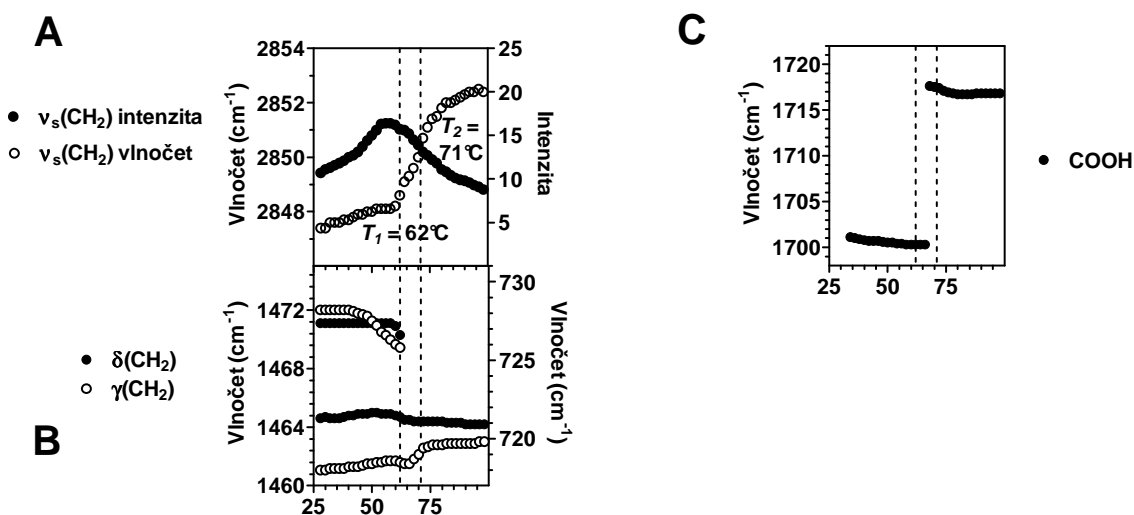


Obr. 40 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity ν_s CH₂ vibrace (A), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (B), vlnočtu COOH (C), amidu I a amidu II (D) modelové lipidové membrány tvořené Cer18:1/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic

Sfg/FFA/Chol/CholS

Membrána, která na rozdíl od ostatních obsahovala místo ceramidu samotný sfingosin, vykazala při 32 °C stejné uspořádání lipidových řetězců jako všechny předešlé modelové membrány SC, tj. řetězce s vysokým podílem *trans* konformerů a orthorhombickým uspořádáním (Obr. 41 A-B). Vibrace karbonylu FFA byla viditelná při 1700,9 cm⁻¹ (Obr. 41 C).

U tohoto lipidového systému jsme rovněž zaznamenali dvoustupňový fázový přechod, a to první tranzici při 62 °C spojenou se zánikem orthorhombického upořádání, která předcházela hlavní fázové tranzici při 71 °C z uspořádané do neupořádané fáze. Během ohřevu jsme pozorovali nárůst intenzity symetrické methylenové vibrace až k 54 °C, kdy došlo k ustálení a po proběhnutí první tranzice k postupnému snižování (Obr. 41 A). Posun pozice vibrace karbonylu FFA proběhl současně s první tranzicí a došlo k vzestupu na 1717,6 cm⁻¹.

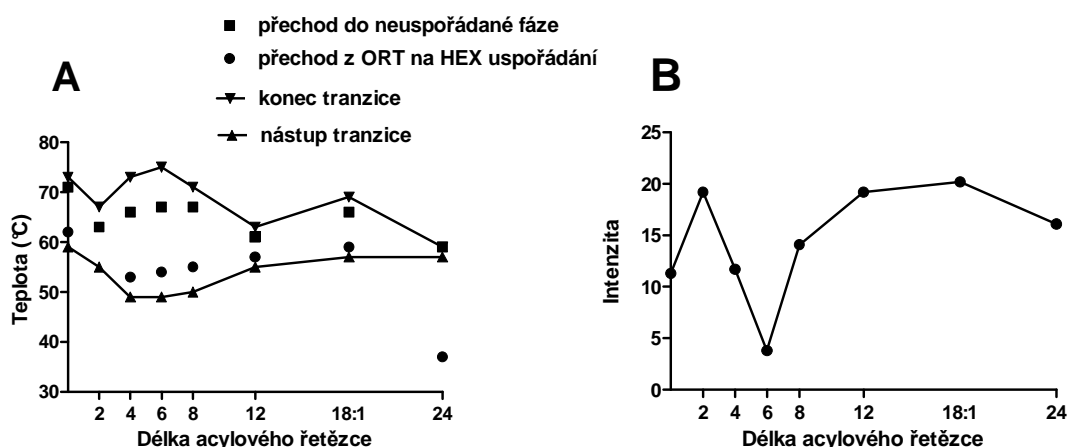


Obr. 41 Teplotní vývoj vlnočtu a intenzity ν_s CH₂ vibrace (**A**), vlnočtu δ (CH₂) a γ (CH₂) vibrace (**B**) a vlnočtu COOH (**C**) modelové lipidové membrány tvořené Sfg/FFA/Chol/CholS. Přerušované čáry zobrazují teploty jednotlivých tranzic

3.3.5 Shrnutí výsledků FTIR spektroskopie

- Všechny modelové membrány měly za fyziologické teploty kůže uspořádané řetězce s převažující *trans* konformací s velmi těsným orthorhombickým laterárním uspořádáním.
- Polární oblast membrány zastoupená amidovými vibracemi ceramidů a karboxylem FFA byla u všech membrán téměř shodná.

- Zaznamenali jsme poměrně širokou distribuci vodíkových vazeb ceramidu, kdy během tranzicí docházelo k jejich reorganizaci a zániku.
- Karboxyl FFA nebyl ionizován a byl zapojen, kromě membrány s Cer24, do velmi pevných vodíkových vazeb, kdy v průběhu fázových přechodů došlo k jejich oslabení.
- Membrána s Cer24 vykázala jako jediná ostrou fázovou tranzici. Mimoto byla také zaznamenána pretranzice při 37 °C spojená se zánikem orthorhombického uspořádání.
- Membrána s Cer2 vykázala pouze jednu tranzici spojenou se zánikem orthorhombického laterárního uspořádání a vznikem neuspořádané fáze.
- U ostatních membrán probíhal fázový přechod dvoustupňově. Na počátku přechodu jsme nejprve zaznamenali tranzici spojenou se změnami v konformaci a laterárním uspořádání směrem k větší rotační volnosti uhlovodíkových řetězců, kdy došlo k zániku orthorhombického uspořádání. Po této tranzici následoval hlavní fázový přechod z uspořádané do neuspořádané fáze.
- Membrány s krátkořetězcovými ceramidy vykázaly nejširší tranzice s nástupy při nejnižších teplotách (Obr. 42 A).
- U membrán s Cer4 a Cer6 byla detekována nižší intenzita symetrické methylenové vibrace při 32 °C než u ostatních membrán (Obr. 42 B).



Obr. 42 Teploty a šířky fázových přechodů modelových membrán SC (A) a intenzita ν_s CH₂ vibrace při 32 °C (B) vzhledem k délce acylového řetězce.

3.4 DISKUZE

V této práci jsme studovali vliv struktury ceramidů na propustnost a biofyzikální vlastnosti modelových membrán SC s možným vztahem k funkci kožní bariéry. Za použití jednoduchého čtyř složkového modelu obsahující sfingosin nebo ceramid společně s FFA, Chol a CholS jsme potvrdili, že ceramidy s krátkým řetězcem nemají schopnost udržet bariérovou funkci kůže, ačkoliv mají stejnou strukturu polární hlavy, a tím tedy i schopnost tvořit vodíkové vazby. Nejvyšší propustnost byla nalezena u membrán obsahující ceramidy s krátkým acylem o délce 4 a 6 uhlíků. Možným vysvětlením schopnosti krátkořetězcových ceramidů zvýšit permeabilitu modelových membrán může být nedostatečná délka jejich acylového řetězce, díky čemuž nejsou schopny tvořit silné hydrofobní interakce s ostatními lipidy. Hydrofobní interakce mezi řetězci lipidů jsou způsobeny indukovanými dipóly v uhlovodíkovém řetězci a jsou silně závislé na délce řetězce, čím kratší řetězec, tím slabší interakce. Dalším možným vysvětlením účinku Cer4 a Cer6 může být jejich tvar po inkorporaci do membrány. Nybond a kol. navrhli energeticky minimalizované modely studovaných ceramidů, kdy acylové řetězce ceramidů o délce 4-6 uhlíků nejsou dost dlouhé ke vzniku dostatečných hydrofobních interakcí s ostatními dlouhořetězcovými lipidy a pohybují se tak mezi hydrofobní a polární oblastí lamel.¹⁸⁸ Tato konformace má tak negativní dopad na těsné upořádání lipidů nezbytně nutného pro funkci kožní bariéry. Schopnost polární hlavy krátkořetězcových ceramidů tvořit vodíkové vazby není postačující na to, aby překonala nepříznivý tvar jejich molekuly a nedostatek meziřetězcových interakcí k udržení těsného upořádání lipidů membrány (alespoň v případě studovaných ceramidů typu NS, studie s ceramidy typu AS probíhají). Na nepříliš významnou roli vodíkových vazeb poukazuje i skutečnost, že bez ohledu na délku řetězce ceramidy typu NS tvoří síť vodíkových vazeb zahrnující primární a allylový hydroxyl, amid a dvě molekuly vody, a ne sousední ceramidy.¹⁸⁹ Mimoto hnací silou pro uspořádání molekul ceramidu NS je orthormobická laterální organizace řetězců.¹²⁹ Nízká propustnost membrány s Cer2 může být naopak způsobena odlišnou geometrií molekuly Cer2. Acetylový řetězec Cer2 pravděpodobně nevyžaduje mnohem více místa než samotný sfingosin a bude zřejmě zabudován do polární oblasti lamel, aniž by narušil jejich těsné upořádání. Hypotézu o tvaru molekul krátkořetězcových ceramidů podporují i poznatky o chování ceramidů na rozhraní voda/vzduch a v liposomech. Povrchová plocha molekul Cer2, 4, 6, 8 a 16 v monovrstvách, která byla při konstantním tlaku 20mN/m² 38, 46, 50, 46 a 38 Å² v příslušném pořadí. Největší

hodnota plochy u Cer6 tak opět značí jeho nižší schopnost se těsně uspořádat. Navíc vypočítané hodnoty agregačních parametrů (poměr průřezu hydrofobní a hydrofilní oblasti) byly pro Cer2, Cer6 a Cer16 1,38; 1,51 a 1,27 v tomto pořadí.¹⁹⁰

Dalším zajímavým výsledkem této studie je, že u membrány obsahující Cer 18:1, jehož acylový řetězec je tvořen kyselinou olejovou, nedošlo ke zvýšení permeability. Tento poznatek stál za povšimnutí, jelikož zlom v řetězci způsobený přítomností cis dvojné vazby je pravděpodobně zodpovědný za porušení těsného uspořádání lipidů SC a akceleračního účinku kyseliny olejové.^{89, 191} Navíc při nedostatku FFA dochází k náhradě linoleátu u ceramidů typu EO za oleát a ty pak působí jako endogenní akceleranty.¹⁹² Nízká permeabilita této membrány tak může souviset s přítomností sfingosinového řetězce. Nutno podotknout, že ani u modelové membrány se samotným sfingosinem nedošlo ke zvýšení propustnosti. Tyto výsledky získané ze studia permeability modelových membrán SC odpovídají předchozím výsledkům získaným při studiu těchto ceramidů na kůži a prokazují tak opodstatněnost tohoto modelu pro hodnocení vztahu mezi strukturou a aktivitou kožních ceramidů.

K nalezení možného pojítka mezi změnou struktury ceramidu a propustnosti membrány na molekulární úrovni jsme tyto membrány studovali pomocí DSC a IR spektroskopie. Pomocí těchto technik jsme prokázali, že krátkořetězcové Cer4, Cer6 a Cer8 snížily teplotu fázové tranzice. Snížení teploty tranzice tak nasvědčuje působení slabších mezimolekulárních sil mezi řetězci lipidů. Nicméně za teploty kůže, tedy při 32 °C, jsme překvapivě zaznamenali u všech membrán stejné uspořádání, tj. přítomnost upořádaných řetězců převážně s *trans* konformací a orthorhombickou laterální organizací. Tato uspořádaná struktura byla nalezena dokonce i u nejpropustnějších membrán, což jsme původně nepředpokládali. Ačkoliv je absence orthorhombického uspořádání a *all-trans* konformace řetězců známkou špatné kožní bariéry,⁵² jak je vidět, její přítomnost však dobrou bariéru nezaručuje.

Možným důvodem nedostatku korelace vztahu mezi orthorhombickým uspořádáním a permeabilitou je možná fázová separace mezi krátkým ceramidem a FFA. Tuto naši hypotézu o fázové separaci podporují výsledky termálního chování membrán s krátkořetězcovými ceramidy, které naznačuje nízkou mísitelnost s ostatními složkami membrány. Navíc karboxyl FFA nebyl ionizován. Tento poznatek může být také spojen s navrhovanou fázovou separací. Za zmínku také stojí, že k ionizaci FFA nedošlo ani u membrány obsahující volný sfingosin pravděpodobně díky navrhované fázové separaci, a tak oddělní kyselého karboxylu od bazické aminoskupiny. Předpokládáme, že by pak

membrána mohla obsahovat domény s těsným orthorhombickým uspořádáním pouze pro FFA, zatímco domény s krátkým ceramidem by mohly být méně těsně uspořádané. Takovéto uspořádání by tak bylo v souladu s doménově mozaikovým modelem charakterizovaný vznikem určitých krystalických domén zakotvených ve více fluidní fázi.⁵⁷ Díky této organizaci by tak mohl permeant, zejména hydrofilního charakteru, difundovat skrz méně těsně uspořádané domény s ceramidem, zatímco FFA domény by působily pouze zakřivení dráhy difundující látky. Přítomnost domén buď s ceramidem, nebo jen FFA může být potvrzena IR studií za užití DFFA namísto FFA. Tato záměna také umožní souběžně sledovat konformaci a laterální uspořádání případných domén.¹¹⁴ Na tomto místě si dovoluji poznamenat, že tato studie s DFFA již byla naší pracovní skupinou provedena a byla vskutku potvrzena fázová separace mezi FFA a ceramidy u všech membrán kromě membrány s Cer24. Navíc orthorhombické uspořádání bylo přítomno pouze u domén s FFA. V současné době taky probíhají studie těchto membrán pomocí atomové silové mikroskopie, Langmuirových monovrstev a práškové rentgenové difrakce.

I přes pozorované rozdíly v termotropním chování modelových membrán jsme se stále snažili nalézt parametr, který by vysvětloval možnou příčinu rozdílné propustnosti modelových membrán pozorovanou za fyziologické teploty kůže, zejména zvonovitou závislost mezi délkou acylu ceramidu a propustností. Při bližší inspekci spekter při 32 °C jsme zaznamenali nižší intenzitu symetrické methylenové vibrace (ale také ostatních methylenových vibrací) u modelových membrán s Cer4 a Cer6 než u modelových membrán s delšími ceramidy a Cer2. Tudíž methylenová hustota ceramidů snímaná evanescentní vlnou na povrchu ATR krystalu je u membrán s Cer4 a Cer6 nižší.¹⁹³ Tento poznatek je v souladu s výše předloženou hypotézou o neschopnosti těchto ceramidů s krátkým acylem tvořit silné hydrofobní interakce a tvaru jejich molekuly, který neumožňuje vytvořit těsné uspořádání lipidů. Přítomnost takových domén s nižší methylenovou hustotou tak může dobře vysvětlit vyšší propustnost modelových membrán s Cer 4 a Cer6.

V naší studii jsme prokázali, že délka acylového řetězce ceramidů typu NS je velmi důležitá pro udržení jejich bariérové funkce. Obzvláště u Cer4 a Cer6 s krátkým acylem, které měly největší vliv na propustnost. Tyto ceramidy také vykazaly rozdíly v termotropním chování, které se projevily snížením teploty fázeového přechodu, a vytvořily nejméně husté modelové membrány SC. Mimoto modelové membrány SC původně vytvořené jako náhrada SC prokázaly, že mohou být vhodným nástrojem pro studium

jak vztahů mezi strukturou ceramidu, ale také i jiných lipidů, a propustností modelových membrán, tak souvisejících mechanismů účinku na molekulární úrovni.

4 DERIVÁTY AMINOKYSELIN JAKO LÁTKY REGENERUJÍCÍ POŠKOZENOU KOŽNÍ BARIÉRU

4.1 ÚVOD

Snížené množství a změny ve složení lipidů SC, především pak ceramidů, najdeme u mnoha kožních onemocnění jako je atopická dermatitida či psoriáza, ale i u suché a stárnoucí kůže.^{26, 75} Všechna tato onemocnění jsou tak spojena se sníženou funkcí kožní bariéry. Jedním z terapeutických přístupů zlepšení porušené kožní bariéry je suplementace kožních lipidů fyziologickými ceramidy a pseudoceramidu.³³

Syntéza ceramidů a jejich analog je však velice obtížná a nákladná. Bylo ovšem zjištěno, že určité zjednodušení struktury ceramidu vede k regeneračně účinným látkám s výhodnějšími vlastnostmi.^{194, 195} Na základě našich znalostí o vztahu mezi strukturou a aktivitou ceramidů byl navržen analog ceramidu 14S24, derivát L-serinu se stejnou délkou hydrofobních řetězců jako fyziologické ceramidy a esterovou vazbou nahrazující allylový hydroxyl. Tento pseudoceramid byl schopen selektivně regenerovat permeabilitu, transepidermální ztrátu vody i hydrataci lidské kůže u různých *in vitro* a *ex vivo* modelových poškození.^{151, 152} Navíc má podobné sterické a hydrofobní parametry jako kožní ceramidy a předpokládá se, že nahrazuje chybějící ceramidy svým fyzikálně-chemickým působením. Také bylo zjištěno, že 14S24 není schopen pronikat do živé epidermis, což zvyšuje jeho celkovou bezpečnost při možné léčbě kožních onemocnění.¹⁷³

Cílem této práce byla syntéza dalších homolog pseudoceramidu 14S24 z různou délkou jak esterového, tak acylového řetězce. Byly studovány dvě metody modelového poškození kožní bariéry, a to tape stripping a extrakce kožních lipidů organickými rozpouštědly. Dále jsme hodnotili různá donorová vehikula. Schopnost regenerovat poškozenou kožní bariéru byla hodnocena pomocí prostupu modelového léčiva TH poškozenou kůží po aplikaci pseudoceramidů.

4.2 MATERIÁL A METODY

4.2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Všechny chemikálie byla zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Silikagel 60 (hrubost částic 230-400) pro sloupcovou chromatografii, TLC desky (silikagel 60 F₂₅₄) a HPLC kolony byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Glycerol, parafínový a olivový olej byly zakoupeny u firmy Dr. Kulich Pharma, s. r. o. (Hradec Králové, ČR).

Struktura a čistota připravených látek byla potvrzena ^1H a ^{13}C NMR spektry (přístroj Varian Mercury-Vx BB 300 pracující při 300 MHz pro ^1H , 75 MHz pro ^{13}C), infračervenou spektroskopií FTIR (spektrofotometr Nicolet Impact 400). Chirální sloučeniny byly charakterizovány jejich optickou otáčivostí (polarimetr ADP Bellingham and Stanley, 1,0 dm cela). Teploty tání byly měřeny bodotávkem Büchi B-545 a nejsou korigovány.

4.2.2 Syntéza

Příprava esterů hydrochloridů L-serinu

L-serin (22 mmol) a příslušný alkohol byly (66 mmol) míchány 7 h při teplotě 70 °C na olejové lázni. Po půl hodině a dále každé 2 h byl do směsi zaváděn po dobu 15 min suchý chlorovodík.¹⁵⁶ Reakční směs byla udržována pod dusíkem. Produkt byl získán krystalizací z acetonu a promyt hexanem pro odstranění nadbytečného alkoholu. Vzniklé krystaly byly sušeny za sníženého tlaku nad KOH.

(S)-2-hydroxy-1-pentadecyloxykarbonylethylamonium-chlorid (15Se)

$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_3\text{Cl}$; 351,95 g/mol; výtěžek: 83 %; bílé krystaly; $t_f = 78,5$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3353, 2915, 2848, 1746, 1470, 1247, 1029, 720 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 7.10 (3H, s, NH_3^+), 4.10 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, OCH_2), 3.87 (1H, dt, $J = 5.4, 2.6$ Hz, CHN), 3.73 (2H, d, $J = 3.8$ Hz, CH_2OH), 1.63 – 1.48 (2H, m, CH_2), 1.40 - 1.03 (24H, m, 12 CH_2), 0.84 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 169.95, 65.30, 60.95, 55.08, 31.51, 29.27, 29.22, 29.16, 28.92, 28.87, 28.23, 25.41, 22.31, 14.15.

(S)-2-hydroxy-1-hexadecyloxykarbonylethylamonium-chlorid (16Se)

$\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{NO}_3\text{Cl}$; 365.98 g/mol; výtěžek: 89 %; bílé krystaly; $t_f = 93.4$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3353, 2915, 2848, 1746, 1468, 1247, 1026, 721 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.57 (3H; s; NH_3^+); 5.61 (1H; s; OH); 4.13 (2H; t; $J = 6.5$ Hz, OCH_2); 4.05 (1H; t; $J = 5.4$ Hz, NHCH); 3.81 (2H; d; $J = 2.7$ Hz, CH_2OH); 1.64-1.50 (2H; m; CH_2); 1.40-1.11 (26H; m; 13 CH_2); 0.83 (3H; t; $J = 6.7$ Hz; CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 168.3; 67.1; 59.8; 55.6; 31.9; 29.7; 29.7; 29.6; 29.4; 29.3; 28.3; 25.8; 22.7; 14.1.

(S)-2-hydroxy-1-oktadecyloxykarbonylethylamonium chlorid (18Se)

C₂₁H₄₄NO₃Cl; 394.03 g/mol; výtěžek: 82 %; bílé krystaly; *t*_f = 95,5 °C; IR (ATR): *v*_{max} 3353, 2915, 2848, 1746, 1467, 1246, 1026, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.25 (3H; s; NH₃⁺); 5.53 (1H; s; OH); 4.12 (2H; t; *J* = 6.5 Hz, OCH₂); 4.05 (1H; t; *J* = 5.5 Hz, NHCH); 3.81 (2H; d; *J* = 3.8 Hz, CH₂OH); 1.64-1.50 (2H; m; CH₂); 1.40-1.12 (30H; m; 15CH₂); 0.83 (3H; t; *J* = 6.7 Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 168.2; 65.6; 59.6; 54.5; 31.4; 29.1; 29.1; 28.9; 28.5; 28.1; 25.3; 22.2; 14.0.

(S)-2-hydroxy-1-eikosyloxykarbonylethylamonium chloride (20Se)

C₂₃H₄₈NO₃Cl; 422.09 g/mol; výtěžek: 88 %; bílé krystaly; *t*_f = 105,6 °C; IR (ATR): *v*_{max} 3353, 2915, 2848, 1746, 1466, 1245, 1027, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.52 (3H; s; NH₃⁺); 5.53 (1H; s; OH); 4.13 (2H; t; *J* = 5.8 Hz, OCH₂); 4.08 (1H; t; *J* = 5.5 Hz, NHCH); 3.80 (2H; d; *J* = 3.8 Hz CH₂OH); 1.67-1.45 (2H; m; CH₂); 1.44-1.06 (34H; m; 17CH₂); 0.84 (3H; t; *J* = 6.7 Hz; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 168.1; 65.7; 59.6; 54.4; 31.4; 29.1; 28.8; 28.1; 25.3; 22.2; 14.0.

Příprava sukcinimidylesterů karboxylových kyselin

Příslušná karboxylová kyselina (0,5 mmol), *N*-hydroxysukcinimid (0,55 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (0,005 mmol) byly rozpuštěny v 10 ml suchého tetrahydrofuranu a ochlazeny na 0 °C. Následně byl přikapán roztok *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (0,55 mmol) v 10 ml suchého tetrahydrofuranu. Reakční směs byla míchána přes noc pod dusíkem za laboratorní teploty. Vzniklá dicyklohexylmočovina byla odfiltrována a na filtru promyta tetrahydrofuranem. Filtrát byl zahuštěn, opětovně rozpuštěn v tetrahydrofuranu a produkt byl získán krystalizací po přidání vody. Rekrystalizací z ethanolu byl získán čistý produkt.

***N*-eikosanoyloxysukcinimid (Si20)**

C₂₄H₄₃NO₄; 409,60 g/mol; výtěžek: 85 %; bílé krystaly; *t*_f = 98,7 °C (lit. 98 °C¹⁹⁶); IR (KBr): *v*_{max} 2921, 2851, 1820, 1788, 1742, 1727, 1210, 1072, 870, 723, 655 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.97 (4H, s, 2CH₂CON), 2.59 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, COCH₂), 1.86 – 1.68 (2H, m, CH₂), 1.47 – 1.12 (38H, m, 19CH₂), 0.89 (3H, t, *J* = 6.5, CH₃); ¹³C

NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.1; 168.6; 31.9; 30.9; 30.0; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.3; 29.3; 29.1; 29.0; 28.7; 25.5; 24.5; 22.6; 14.1.

***N*-tetrakosanoyloxysukcinimid (Si24)**

C₂₈H₅₁NO₄; 465,71 g/mol; výtěžek: 82 %; bílé krystaly; $t_f = 101,5$ °C (lit. 101-103 °C¹⁹⁷); IR (ATR): ν_{\max} 2917, 2847, 1819, 1787, 1740, 1732, 1206, 1069, 866, 723, 654 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (4H, s, 2CH₂CON), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, COCH₂), 1.80 – 1.68 (2H, m, CH₂), 1.40 - 1.25 (46H, m, 23CH₂), 0.93 – 0.82 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.1; 168.6; 31.9; 30.9; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.3; 29.0; 28.7; 25.5; 24.5; 22.6; 14.1.

***N*-oktakosanoyloxysukcinimid (Si28)**

C₃₂H₅₉NO₄; 521,82 g/mol; výtěžek: 82 %; bílé krystaly; $t_f = 108,7$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 2917, 2847, 1819, 1786, 1740, 1732, 1206, 1069, 868, 723, 654 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.84 (4H, s, 2CH₂CON), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, COCH₂), 1.80 – 1.68 (2H, m, CH₂), 1.42 – 1.12 (54H, m, 27CH₂), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.1; 168.6; 31.9; 30.9; 29.7; 29.6; 29.6; 29.5; 29.3; 29.0; 28.8; 25.5; 24.5; 22.6; 14.1.

***N*-triakontanoyloxysukcinimid (Si30)**

C₃₄H₆₃NO₄; 549,87 g/mol; výtěžek: 80 %; bílé krystaly; $t_f = 112,4$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 2915, 2848, 1819, 1790, 1740, 1724, 1207, 1070, 868, 721, 654 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (4H, s, 2CH₂CON), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, COCH₂), 1.80 – 1.68 (2H, m, CH₂), 1.40 – 1.25 (58H, m, 29CH₂), 0.93 – 0.82 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 169.1; 168.6; 31.9; 30.9; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.3; 29.0; 28.7; 25.5; 24.5; 22.6; 14.1.

Příprava esterů *N*-acyl L-serinu

K suspenzi esteru hydrochloridu L-serinu (0,13 mmol) v 10 ml suchého chloroformu byl přikapán triethylamin (0,14 mmol) a reakční směs byla míchána 1 h za laboratorní teploty. Následně byla směs vytřepána nasyceným roztokem NaCl, organická fáze vysušena bezvodým Na₂SO₄ a zahuštěna na vakuové odparce. Vzniklý olej byl ponechán několik hodin ve vakuu nad H₂SO₄ pro odstranění zbytkového triethylaminu. Poté byl vzniklý ester L-serinu rozpuštěn spolu s příslušným sukcinimidylesterem

(0,13 mmol) v 10 ml suchého tetrahydrofuranu a reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Směs byla zahuštěna na vakuové odparce a čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/ethyl-acetát 9:1 (v/v).

Pentadecylester (S)-N- ikosanoylserinu (15S20)

$C_{38}H_{75}NO_4$; 610,01 g/mol; výtěžek: 60 %; bílé krystaly; ; $[\alpha]_D^{29\text{ }^\circ\text{C}}$ 60,3° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 92,0\text{ }^\circ\text{C}$; IR (ATR): ν_{max} 3491, 3310, 2914, 2848, 1719, 1644, 1540, 1471, 1231, 717 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.41 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, NH), 4.66 (1H, dd, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.17 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, OCH_2), 3.94 (2H, dd, $J = 6.1, 3.8$ Hz, CH_2OH), 2.65 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.33 – 2.19 (2H, t, $COCH_2$), 1.70 – 1.56 (4H, m, $2CH_2$), 1.41 – 1.11 (56H, m, $28CH_2$), 0.87 (6H, t, $J = 6.6$ Hz, $2CH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Pentadecylester (S)-N-tetrakosanoylserinu (15S24)

$C_{42}H_{83}NO_4$; 666,11 g/mol; výtěžek: 57 %; bílé krystaly; ; $[\alpha]_D^{28,7\text{ }^\circ\text{C}}$ 17,1° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 85,5\text{ }^\circ\text{C}$; IR (ATR): ν_{max} 3492, 3312, 2915, 2849, 1721, 1644, 1539, 1471, 1233, 717 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 3.95 (2H, dd, $J = 5.9, 3.8$ Hz, CH_2OH), 2.58 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, m, $COCH_2$), 1.71 – 1.57 (4H, m, $2CH_2$), 1.25 (64H, m, $32CH_2$), 0.89 (t, $J = 6.5$ Hz, $2CH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Pentadecylester (S)-N-oktakosanoylserinu (15S28)

$C_{46}H_{91}NO_4$; 722,22 g/mol; výtěžek: 62 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,6\text{ }^\circ\text{C}}$ 12,8° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 91,2\text{ }^\circ\text{C}$; IR (ATR): ν_{max} 3493, 3309, 2915, 2849, 1721, 1644, 1537, 1471, 1228, 716 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.42 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 3.95 (2H, dd, $J = 5.8, 3.7$ Hz, CH_2OH), 2.67 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $COCH_2$), 1.78 – 1.60 (4H, m, $2CH_2$), 1.42 – 1.13 (72H, m, $36CH_2$), 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, $2CH_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.6; 25.5; 24.9; 22.6; 14.1.

Pentadecylester (S)-N-triakontanoylserinu (15S30)

$C_{48}H_{95}NO_4$; 750,27 g/mol; výtěžek: 38 %; bílé krystaly; ; $[\alpha]_D^{27,1}$ °C 1,7° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 94,6$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3491, 3314, 2916, 2849, 1721, 1644, 1537, 1471, 1233, 716 cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.38 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.8$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 3.95 (2H, dd, $J = 5.8, 3.8$ Hz, CH_2OH), 2.54 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $COCH_2$), 1.63 – 1.51 (4H, m, $2CH_2$), 1.42 – 1.10 (76H, m, $38CH_2$), 0.87 (t, $J = 6.6$ Hz, $2CH_3$), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 173.8; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.5; 29.3; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Hexadecylester (S)-N- ikosanoylserinu (16S20)

$C_{39}H_{77}NO_4$; 624,03 g/mol; výtěžek: 33 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,4}$ °C 5,1° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 92,7$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3514, 3311, 2914, 2847, 1723, 1648, 1546, 1471, 1462, 1234, 729, 719 cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.42 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.66 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.17 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 3.95 (2H, d, $J = 2.9$ Hz, CH_2OH), 2.67 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $COCH_2$), 1.72 – 1.50 (4H, m, $2CH_2$), 1.35 – 1.07 (58H, m, $29CH_2$), 0.87 (t, $J = m 6.6$ Hz, $2CH_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 173.8; 170.5; 137.3; 66.1; 63.9; 54.8; 36.5; 31.9; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Hexadecylester (S)-N-tetrakosanoylserinu (16S24)

$C_{43}H_{85}NO_4$; 680,14 g/mol; výtěžek: 69 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,3}$ °C 6,2° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 88,0$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3492, 3308, 2915, 2848, 1720, 1644, 1537, 1471, 1233, 716 cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.3, 3.8$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 3.95 (2H, dd, $J = 5.7, 3.8$ Hz, CH_2OH), 2.58 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $COCH_2$), 1.76 – 1.51 (4H, m, $2CH_2$), 1.43 – 1.12 (66H, m, $33CH_2$), 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, $2CH_3$). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Hexadecylester (S)-N-oktakosanoylserinu (16S28)

$C_{47}H_{93}NO_4$; 736,25 g/mol; výtěžek: 63 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,7}$ °C 12,8° (0,6; $CHCl_3$); $t_f = 94,3$ °C; IR (ATR): ν_{max} 3493, 3307, 2914, 2848, 1720, 1643, 1536, 1471, 1227, 716 cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.6, 3.9$ Hz,

CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, t, $J = 4.9$ Hz, CH₂OH), 2.55 (1H, t, $J = 6.2$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, COCH₂), 1.74 – 1.54 (4H, m, 2CH₂), 1.47 – 0.94 (74H, m, 37CH₂), 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 169.6; 66.1; 66.1; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 22.6; 14.1.

Hexadecylester (S)-N-triakontanoylserinu (16S30)

C₄₉H₉₇NO₄; 764,30 g/mol; výtěžek: 60 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{27,8}$ °C 18,8° (0,6; CHCl₃); $t_f = 95,4$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3491, 3315, 2914, 2848, 1720, 1644, 1537, 1471, 1232, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.39 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.8$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, dd, $J = 5.9, 3.7$ Hz, CH₂OH), 2.53 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.26 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, COCH₂), 1.85 – 1.47 (4H, m, 2CH₂), 1.46 – 1.08 (78H, m, 39CH₂), 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 177.1; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 33.9; 31.9; 29.7; 29.3; 25.6; 24.9; 22.6; 14.1.

Oktadecylester (S)-N- ikosanoylserinu (18S20)

C₄₁H₈₁NO₄; 652,09 g/mol; výtěžek: 47 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,9}$ °C 17,2° (0,6; CHCl₃); $t_f = 97,1$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3503, 3308, 2915, 2848, 1723, 1647, 1545, 1472, 1462, 1235, 729, 719 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.42 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.1, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, d, $J = 3.7$ Hz, CH₂OH), 2.27 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, COCH₂), 2.06 (1H, s, OH), 1.79 – 1.50 (4H, m, 2CH₂), 1.49 – 1.08 (62H, m, 31CH₂), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 2CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.4; 29.3; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.56; 22.6; 14.1.

Oktadecylester (S)-N-tetrakosanoylserinu (18S24)

C₄₅H₈₉NO₄; 708,19 g/mol; výtěžek: 77 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,1}$ °C 0,8° (0,6; CHCl₃); $t_f = 88,1$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3492, 3307, 2914, 2848, 1720, 1645, 1539, 1471, 1234, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.39 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, t, $J = 4.5$ Hz, CH₂OH), 2.55 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.27 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, COCH₂), 1.75 – 1.53 (4H, m, 2CH₂), 1.51 – 1.06 (70H, m, 35CH₂), 0.96 – 0.82 (t, $J = 6.5$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Oktadecylester (S)-N-oktakosanoylserinu (18S28)

C₄₉H₉₇NO₄; 764,30 g/mol; výtěžek: 71 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,8}$ °C 34,3° (0,6; CHCl₃); t_f = 94,1 °C; IR (ATR): ν_{\max} 3491, 3307, 2915, 2848, 1720, 1644, 1540, 1471, 1227, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.39 (1H, d, J = 6.9 Hz, NH), 4.71 – 4.59 (1H, dt, J = 7.3, 3.8 Hz, CHN), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, OCH₂), 3.95 (2H, t, J = 4.5 Hz, CH₂OH), 2.57 (1H, s, OH), 2.26 (2H, t, J = 7.6 Hz, COCH₂), 1.72 – 1.51 (4H, m, 2CH₂), 1.48 – 1.03 (78H, m, 39CH₂), 0.88 (t, J = 6.5 Hz, 2CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 169.3; 66.1; 64.1; 54.9; 36.5; 33.9; 31.9; 29.7; 29.6; 29.3; 28.4; 25.7; 25.6; 24.9; 22.6; 14.1.

Oktadecylester (S)-N-triakontanoylserinu (18S30)

C₅₁H₁₀₁NO₄; 792,35 g/mol; výtěžek: 70 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,6}$ °C 8,7° (0,6; CHCl₃); t_f = 92,2 °C; IR (ATR): ν_{\max} 3503, 3308, 2914, 2848, 1721, 1646, 1545, 1472, 1235, 719; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.41 (1H, d, J = 7.0 Hz, NH), 4.66 (1H, dt, J = 7.3, 3.8 Hz, CHN), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, OCH₂), 3.95 (2H, d, J = 3.8 Hz, CH₂OH), 3.65 (1H, s, OH), 2.26 (2H, t, J = 7.7 Hz, COCH₂), 1.64 - 1.50 (4H, m, 2CH₂), 1.47 – 1.02 (82H, m, 41CH₂), 0.87 (t, J = 6.5 Hz, 2CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Eikosylester (S)-N- ikosanoylserinu (20S20)

C₄₃H₈₅NO₄; 680,14 g/mol; výtěžek: 50 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{29}$ °C 36,8° (0,6; CHCl₃); t_f = 97,2 °C; IR (ATR): ν_{\max} 3510, 3310, 2916, 2849, 1724, 1649, 1548, 1472, 1463, 1235, 729, 719 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.38 (1H, d, J = 6.9 Hz, NH), 4.67 (1H, dt, J = 7.1, 3.8 Hz, CHN), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, OCH₂), 3.95 (2H, d, J = 3.8 Hz, CH₂OH), 2.47 (1H, s, OH), 2.26 (2H, t, J = 7.6 Hz, COCH₂), 1.74 – 1.45 (4H, m, 2CH₂), 1.43 – 1.02 (66H, m, 33CH₂), 0.88 (t, J = 6.5 Hz, 2CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 170.5; 66.1; 63.9; 54.9; 36.5; 31.9; 29.6; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.4; 29.3; 29.3; 29.2; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Eikosylester (S)-N-tetrakosanoylserinu (20S24)

C₄₇H₉₃NO₄; 736,25 g/mol; výtěžek: 70 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,2}$ °C 6,0° (0,6; CHCl₃); t_f = 91,0 °C; IR (ATR): ν_{\max} 3514, 3315, 2915, 2848, 1724, 1648, 1546, 1471, 1462, 1236, 729, 718 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.38 (1H, d, J = 7.0 Hz, NH), 4.67 (1H, dt, J = 7.2, 3.8 Hz, CHN), 4.18 (2H, t, J = 6.7 Hz, OCH₂), 3.95 (2H, d, J = 3.8 Hz, CH₂OH), 2.54 (1H, s, OH), 2.26 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂), 1.78 – 1.45 (4H, m, 2CH₂), 1.47 – 1.04

(74H, m, 37CH₂), 0.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 2CH₃).; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.8; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.7; 29.7; 29.6; 29.5; 29.5; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Eikosylester (S)-N-oktakosanoylserinu (20S28)

C₅₁H₁₀₁NO₄; 792,35 g/mol; výtěžek: 71 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,5}$ °C 9,3° (0,6; CHCl₃); $t_f = 99,4$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3491, 3306, 2914, 2847, 1719, 1647, 1544, 1470, 1235, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.37 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.67 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, dd, $J = 5.8, 3.7$ Hz, CH₂OH), 2.50 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, OH), 2.27 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, COCH₂), 1.77 – 1.52 (4H, m, 2CH₂), 1.43 – 1.09 (82H, m, 41CH₂), 0.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 2CH₃).; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 173.7; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 36.5; 31.9; 29.6; 29.6; 29.5; 29.4; 29.3; 29.2; 29.1; 28.4; 25.7; 25.5; 22.6; 14.1.

Eikosylester (S)-N-triakontanoylserinu (20S30)

C₅₃H₁₀₅NO₄; 820,41 g/mol; výtěžek: 70 %; bílé krystaly; $[\alpha]_D^{28,5}$ °C 3,4° (0,6; CHCl₃); $t_f = 96,5$ °C; IR (ATR): ν_{\max} 3491, 3306, 2915, 2848, 1720, 1644, 1541, 1471, 1233, 716 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH), 4.74 – 4.54 (1H, dt, $J = 7.2, 3.7$ Hz, CHN), 4.18 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, OCH₂), 3.95 (2H, d, $J = 3.8$ Hz, CH₂OH), 2.26 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, OH), 1.77 – 1.49 (4H, m, 2CH₂), 1.43 - 1.12 (86H, m, 43CH₂), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 2CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 177.1; 170.5; 66.1; 64.0; 54.9; 33.9; 31.9; 29.7; 29.3; 25.6; 24.9; 22.6; 14.1.

4.2.3 Kůže a modelové poškození kožní bariéry

Kůže pro *in vitro* experimenty byla zpracována podle podmínek uvedených v kapitole 2.2.3.

Před samotným experimentem byla kůže pomalu rozmrazena a z různých částí byly vyřezány kousky o velikosti 2×2 cm, které sloužily jako kontrola normální kožní bariéry. Zbytek kůže byl podroben experimentálně navozenému poškození kožní bariéry pomocí dvou metod, a to tape stripping pomocí adhesivní lepicí pásky a opakovanou extrakcí rozpouštědly.

Extrakce kožních lipidů byla prováděna směsí CHCl₃/MeOH 2:1 (v/v). Směs byla aplikována na kůži jemným třením pomocí chomáčku vaty napuštěného rozpouštědly

(5 ml na cca 100 cm²) po dobu 1 min. Tento postup byl opakován celkem 5krát. Množství extrahovaných lipidů nebylo stanovováno.

Při poškození pomocí adhesivní lepicí pásky (Tesa, šířka 46 mm, materiál polypropylen, lepidlo hotmelt) byl zbytek kůže připevněn na korkovou podložku pomocí malých připínáčků. Celá kůže byla pokryta pruhy lepicí pásky a rovnoměrně zatížena závažím o váze 5 kg po dobu 20 sekund. Následně byla lepicí páska rychle odstraněna. Kůže byla poškozena 20 nebo 50 stripy. Množství odstraněného SC nebylo stanovováno.

4.2.4 Donorové vzorky

Pro permeační studie byl opět vybrán TH jako modelové léčivo díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem (viz kapitola 2.4) a navíc byl použit ve studiu hodnocení bariérových vlastností kůže pacientů s atopickou dermatitidou.¹⁹⁸

Donorové vzorky byly připraveny jako 1% (w/v) suspenze studované látky ve vodě, 85% glycerolu (GLC), olivovém oleji (OO) a parafínovém oleji (PO). Kontrolní vzorky obsahovaly jen samotné vehikulum. Donorový vzorek s modelovým léčivem byl připraven jako 5% (w/v) suspenze TH ve vodě. Připravené suspenze byly míchány 5 min při teplotě 50 °C a poté temperovány po dobu 24 h v termostatu při teplotě 37 °C k ustanovení rovnováhy. Před aplikací na kůži byly vzorky homogenizovány.

Koncentrace studované látky i modelového léčiva byly zvoleny tak, aby byly všechny vzorky nasyceny příslušným modelovým léčivem a danou studovanou látkou k zajištění stejné termodynamické aktivity v průběhu celého experimentu.

4.2.5 Permeační experimenty

Aktivita připravených látek byla hodnocena *in vitro* pomocí modifikované Franzovy difúzní cely s volným difúzním povrchem 0,5 cm² a akceptorovým objemem přibližně 6 ml a prostupu modelového léčiva TH přes poškozenou a nepoškozenou prasečí kůži plné tloušťky. Franzovy difúzní cely byly sestaveny způsobem uvedeným v kapitole 2.2.5. Cely byly temperovány po dobu 1 h ve vodní lázni na teplotu 32 °C. Potom byla změřena elektrická impedance poškozené kůže a nepoškozené kůže. Při pretreatment experimentech bylo na poškozenou kůži nejprve aplikováno 100 µl donorového vzorku studované látky v daném vehikulu a 100 µl odpovídajícího vehikula jako kontrola, abychom mohli odlišit účinek samotné studované látky od donorového vehikula.

Na poškozenou a na nepoškozenou kůži sloužící jako kontrola nebyly během pretreatmentu aplikovány žádné donorové vzorky. Po 4 h byly donorové i kontrolní vzorky nanesené na poškozenou kůži odstraněny gázovým tamponem. Povrch kůže byl opláchnut 0,5 ml 60% ethanolem, 0,5 ml PBS a opatrně vysušen. Byla změřena elektrická impedance kůže. Následně bylo na kůži aplikováno 150 μ l suspenze TH ve vodě a donorová část cely byla překryta krycím sklíčkem. Akceptorová fáze byla po celou dobu experimentu míchána a temperována na 32 °C. Po dobu experimentu, tj. 48 h pro TH byly v daných časových intervalech odebírány z akceptorové fáze frakce o objemu 0,3 ml. Odebrané množství vzorku bylo nahrazeno stejným objemem čerstvého PBS. U jednotlivých odebraných frakcí byla stanovena koncentrace TH pomocí HPLC.

4.2.6 Dermální elektrická impedance

Měření dermální elektrické impedance probíhalo dle podmínek uvedených v kapitole 2.2.6.

4.2.7 HPLC analýza

HPLC stanovení TH probíhalo dle podmínek uvedených v kapitole 2.2.15

4.2.8 Analýza dat

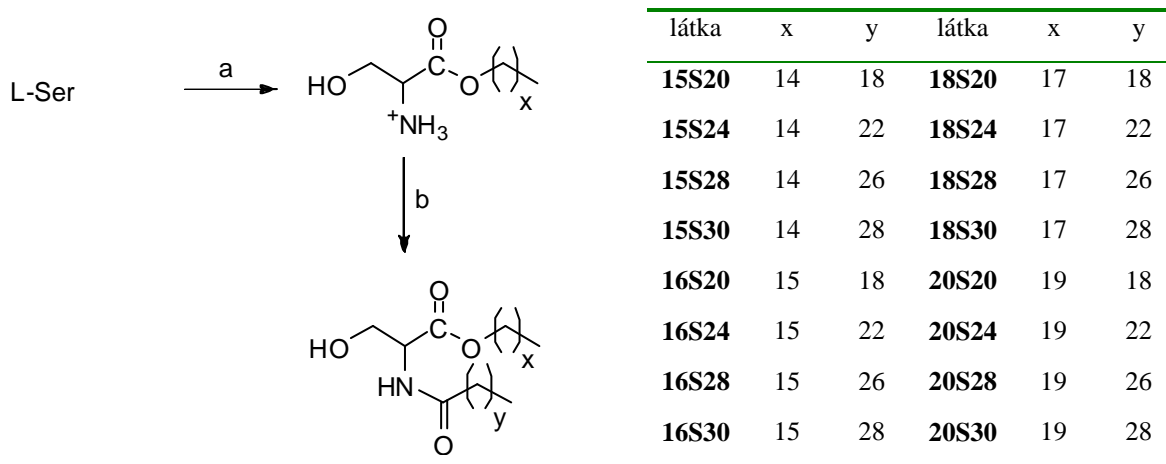
Analýza získaných výsledků probíhala dle podmínek uvedených v kapitole 2.2.16.

4.3 VÝSLEDKY

4.3.1 Syntéza

Cílové sloučeniny (Obr. 43) byly navrženy jako estery L-serinu, které mají aminoskupinu acylovou dalším dlouhým hydrofobním řetězcem. Hydrochloridy esterů L-serinu, které mají napodobovat sfingosinovou kostru ceramidů, byly připraveny dle Limanova.¹⁵⁶

Následně byly vzniklé hydrochloridy esterů převedeny na volnou bázi a acylovány kondenzací s příslušným sukcinimidylesterem. Schéma přípravy je uvedeno na Obr. 43. Všechny produkty byly krystalické.

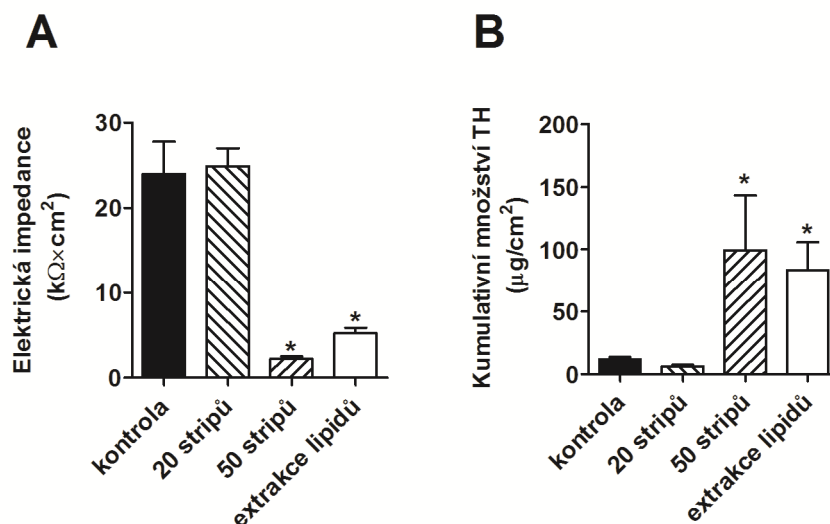


Obr. 43 Schéma syntézy a přehled připravených látek. Reagencie a podmínky: a) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{OH}$, HCl (g), 70 °C, 7 h, b) 1) TEA, CHCl_3 , rt, 1 h; 2) sukcinimidylester, THF, rt, 24 h

4.3.2 Experimentální poškození kůže

Nejprve jsme se zaměřili na výběr a standardizaci způsobu modelového poškození kožní bariéry. Tyto metody zahrnovaly tape stripping, kdy se jedná o rozsáhlejší poškození funkce kožní bariéry s částečným odstraněním jak lipidů, tak korneocytů, a dále na extrakci lipidů, která představuje mírné poškození kožní bariéry.

Hodnota elektrické impedance nepoškozené kůže byla $24,01 \pm 3,81 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a množství permeovaného TH za 12 h $14,03 \pm 2,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Jak je vidět z grafu na Obr. 44 poškození kůže 20 stripy nebylo dostatečné. Po aplikaci 50 stripů došlo k významnému poklesu elektrické impedance až na hodnoty $2,21 \pm 0,31 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a významnému zvýšení permeace TH. Kumulativní množství prošlého TH za 12 h bylo $99,5 \pm 43,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Extrakce lipidů směsí $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ rovněž vyvolala významný pokles elektrické impedance a zvýšení propustnosti pro TH. Elektrická impedance u kůže poškozené extrakcí klesla na hodnoty $5,22 \pm 0,62 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a kumulativní množství TH prošlého za 12 h bylo $83,5 \pm 22,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.



Obr. 44 Elektrická impedance kůže (**A**) a kumulativní množství prošlého TH kůží za 12 h (**B**) po poškození kožní bariéry metodou tape stripping (20, 50 stripů) a extrakcí kožních lipidů. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 10$, * značí statistický rozdíl oproti nepoškozené kůži ($p < 0,05$).

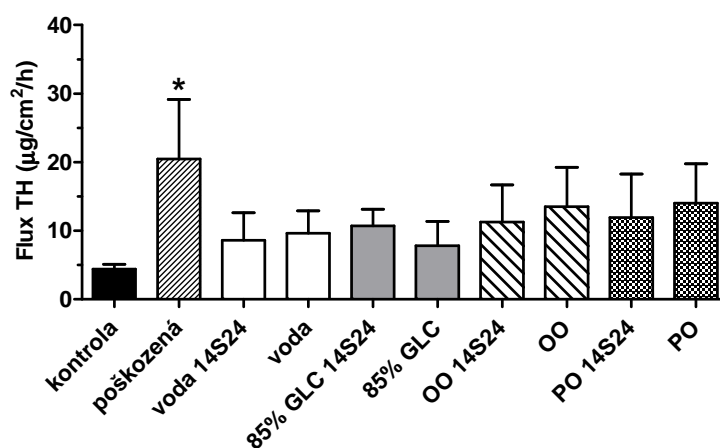
4.3.3 Donorové vehikulum

Poté, co jsme zvolili vyhovující metody poškození kožní bariéry, jsme se zaměřili na výběr donorového vehikula. Jako donorové vehikulum byly vybrány voda, 85% GLC, PO a OO. Pro srovnání různých vehikul byla aplikována na poškozenou kůži 1% suspenze pseudoceramidu 14S24 v příslušném vehikulu, a to z důvodu prokázaného regeneračního účinku této látky. Experimenty byly prováděny formou pretreatmentu, kdy u tohoto způsobu aplikace můžeme vyloučit možnou adsorpci TH na analog ceramidu a tím snížit jeho permeaci. Na poškozenou kůži byly také aplikovány po dobu pretreatmentu i samotná vehikula pro rozlišení účinku vehikula od samotného účinku 14S24 na permeabilitu poškozené kůže.

První permeační pokusy byly prováděny na kůži poškozené metodou tape stripping. Po změření rezistence mezi poškozenou a nepoškozenou kůží pro hodnocení míry poškození jsme zaznamenali významný rozdíl v rezistenci. Ovšem rozdíl fluxu TH mezi poškozenou a nepoškozenou kůží nebyl statisticky významný a dosahoval téměř shodných hodnot. Navíc u fluxů TH kůží po aplikaci jednotlivých vehikul s/bez 14S24 byla zaznamenána značná variabilita. Tento fakt neumožnil srovnat účinek jednotlivých vehikul ani rozlišit, zdali je účinek způsoben samotným pseudoceramidem nebo vehikulem. Při bližším hodnocení rezistencí kůží u jednotlivých hodnocených skupin vzorků byla

zaznamenána mezi kůžemi značná variabilita v míře poškození. V některých případech se rezistence poškozené kůže blížila hodnotám rezistence u nepoškozené kůže. Proto jsme v dalších experimentech po změření hodnot rezistencí provedli selekci kůží. Poškozená kůže, jejíž hodnota rezistence přesáhla nebo se blížila nejnižší hodnotě rezistence kontrolní nepoškozené kůže, byly z experimentu vyloučeny. Ostatní kůže byly rozděleny do 4 skupin podle rozsahu naměřených rezistencí, a to 0-30, 31-60, 61-100 % daného rozsahu rezistencí pro poškozenou kůži. Hodnocení pro jednotlivé vzorky vehikul s/bez 14S24 pak bylo prováděno na kůžích, které obsahovaly z každé skupiny rozsahu rezistencí stejný počet kůží. Předpokladem bylo, že takové rozložení rezistencí může zajistit podmínky, za kterých bude možno provést srovnání jednotlivých vehikul a účinku 14S24. Tento výběr poškozených kůží byl prováděn před každým následujícím experimentem.

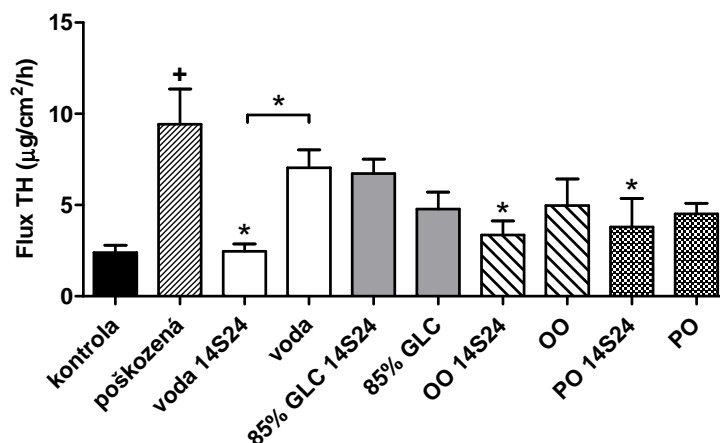
Na grafu Obr. 45 jsou zobrazeny fluxy TH kůží poškozené metodou tape stripping po 4 h pretreatmentu jednotlivým vzorkům s/bez 14S24 v různých vehikulech. Jak je vidět z grafu, došlo k poklesu permeability poškozené kůže oproti kontrolní poškozené kůži po 4 h aplikaci všech donorových vzorků s/bez 14S24. Nicméně tento trend nebyl významný. Navíc pokles permeability poškozené kůže u kontrolních vzorků samotných vehikul odpovídal poklesu permeability poškozené kůže po aplikaci 14S24 v daných vehikulech. Lepších výsledků nebylo dosaženo ani po srovnání fluxu TH mezi jednotlivými vzorky s ohledem na permeabilitu kůže z různých zvířat.



Obr. 45 Účinek 14S24 na permeabilitu kůže poškozené metodou tape stripping. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 6$, * značí statistický rozdíl oproti nepoškozené kůži ($p < 0,05$).

Stejný experiment jako předchozí byl proveden na kůži poškozené extrakcí lipidů. Zde byl zaznamenán významný pokles permeability kůže po aplikaci 14S24 ve vodě, PO a OO (Obr. 46). Permeabilita poškozené kůže po aplikaci 14S24 ve vodě se téměř

blížila permeabilitě nepoškozené kůže, jak bylo pozorováno i v předchozí studii 14S24. Ovšem významný rozdíl mezi permeabilitou kůže po aplikaci vzorku s/bez 14S24 byl pouze u vehikula vody. To znamená, že pokles v permeabilitě poškozené kůže může být jednoznačně přisouzen 14S24. Rozdíl mezi permeabilitou kůže po aplikaci PO a OO s/bez 14S24 nebyl významný. Pozorovaný pokles je tedy patrně způsoben samotným vehikulem.



Obr. 46 Účinek 14S24 na permeabilitu kůže poškozené extrakcí lipidů. Data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty \pm S.E.M. $n \geq 6$, * značí statistický rozdíl oproti poškozené kůži, nebo jak je naznačeno úsečkou, + značí statistický rozdíl oproti nepoškozené kůži ($p < 0,05$).

4.3.4 Permeační studie

Pro samotné hodnocení připravených pseudoceramidů bylo na základě předchozích výsledků zvoleno poškození kůže extrakcí lipidů a aplikace v donorovém vehikulu vodě. Pro první sadu permeačních pokusů jsme zvolili sérii látek 15S a 20S, kde byla délka acylového řetězce 20, 24, 28 a 30 uhlíků, a to z důvodu největšího rozdílu délky esterového řetězce maskující sfingosin. Předpokládali jsme, že díky velké podobnosti studovaných látek budou pozorované rozdíly v regeneračních účincích mezi jednotlivými látkami malé. U těchto dvou sérií by tak mohly být rozdíly díky délce esterového řetězce nejzřetelnější. Nicméně po provedení permeačních experimentů na kůži poškozené extrakcí lipidů a aplikaci látek v 1% vodné suspenzi jsme nezaznamenali významný pokles v permeabilitě poškozené kůže po aplikaci pseudoceramidů ani rozdíly mezi jednotlivými studovanými látkami. Navíc byla zaznamenána široká variabilita v permeabilitě TH. Stejných výsledků bylo dosaženo i při opakování. Proto jsme se rozhodli v této fázi studia od dalších pokusů upustit.

4.4 DISKUZE

V této studii byla připravena série ceramidových analogů s potenciálními regeneračními účinky, které byly založeny na aminokyselině L-serinu. K této aminokyselině byly připojeny dva dlouhé hydrofobní řetězce o délkách 15-20 uhlíků pro esterový řetězec a 20-30 uhlíků pro acyl. Tyto neobvykle dlouhé řetězce napodobují svou délkou hydrofobní řetězce přirozených ceramidů SC. Tato struktura již byla navržena v předchozí studii, kdy byl připraven pseudoceramid 14S24 nahrazením allylové hydroxy skupiny v přirozeném ceramidu NS za ester. Tato výměna ve struktuře vedla k dvoustupňové syntéze, která je velmi levná a navíc esterová vazba může být snadno enzymaticky odbouratelná v živé epidermis za vzniku netoxických metabolitů.¹⁵¹ Připravili jsme tak 4 série pseudoceramidu o různých délkách hydrofobních řetězců se záměrem objasnit vliv délky hydrofobních řetězců na jejich možné regenerační účinky.

Součástí práce bylo vybrat vhodné metody poškození kožní bariéry. Bariéru pro prostup většiny látek kůží představuje SC a odstranění této zrohovatělé vrstvy má za následek zvýšení propustnosti. Tento efekt může být monitorován pomocí změny dermální elektrické impedance a TEWL.¹⁹⁹ Z tohoto důvodu byl jako modelové poškození zvolen tape stripping, tedy částečné odstranění SC včetně korneocytů a lipidů adhesivní lepicí páskou, jež se běžně používá v dermatologii. Pro simulaci sníženého obsahu kožních lipidů, ke kterému dochází u mnoha kožních onemocnění byla zvolena extrakce organickými rozpouštědly. Obvykle se při *in vivo* studiích používá k extrakci kožních lipidů aceton, ovšem toto rozpouštědlo vyvolává pouze malou změnu ve funkci kožní bariéry.²⁰⁰ Jelikož se jedná o *in vitro* studii, použili jsme mnohem účinnější extrakci lipidů SC pomocí směsi chloroformu a methanolu. Tato směs vykazovala v předešlých studiích větší vzestup TEWL a větší množství extrahovaných lipidů SC než aceton.²⁰¹ Změny ve funkci kožní bariéry byly hodnoceny elektrickou impedancí a permeací TH. Významné změny v elektrické impedanci a propustnosti TH jsme zaznamenali u kůže poškozené stripováním 50 stripů a po extrakci rozpouštědly, ačkoliv variabilita v permeaci TH byla relativně vysoká.

Dále jsme také hodnotili vehikula různé polarity, a to vodu, 85% GLC, PO a OO. Voda již byla použita jako donorové vehikulum v předchozí studii pseudoceramidu 14S24.¹⁵¹ GLC prokázal zlepšení bariérových vlastností kůže u pacientů s atopickou dermatitidou po topické aplikaci formulací s jeho obsahem.²⁰² PO a OO jsou častou součástí kosmetických přípravků. U kůže poškozené stripováním jsme nezaznamenali

významný pokles permeability TH po aplikaci 14S24 ani u jednoho vehikula. U kůže poškozené extrakcí lipidů jsme zaznamenali významný pokles permeability kůže pouze po aplikaci 14S24 ve vodě, PO a OO. Nicméně snížená permeabilita poškozené kůže po aplikaci 14S24 v PO a OO je patrně způsobena samotným vehikulem.

Po výběru vhodné metody kožního poškození a vehikula byly provedeny permeační pokusy s připravenými látkami. Nicméně nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl v permeabilitě kůže poškozené extrakcí lipidů po 4 h aplikaci 1% vodné suspenze pseudoceramidů. Tento jev by mohl být dán zaznamenanou variabilitou v absorpci TH. Navíc připravené látky jsou si velice podobné a rozdíly v jejich účincích budou pravděpodobně velmi malé. K tomu, abychom dosáhli významných rozdílů, by tak bylo třeba mnoha opakování. V této fázi studia jsme se tedy rozhodli od dalších experimentů upustit.

Dermální nebo transdermální absorpce je multifaktoriální více krokový proces, který je ovlivněn činiteli, jako jsou typ kůže, fyzikálně-chemické vlastnosti permeované látky, způsob podání léčiva nebo poškození bariéry a vlastnostmi prostředí.

Nejvhodnější membránou pro hodnocení dermální absorpce látek je lidská kůže. Její dostupnost je však omezená, a proto se využívá k experimentům kůže zvířat, nejčastěji kůže prasete. Ta je histologicky a biochemicky shodná s lidskou kůží a snadněji dosažitelná. Obecně je kůže velmi robustní membrána, ale také čítá velkou variabilitu. Pokud srovnáme transdermální permeaci látky z různých anatomických částí kůže jednoho zvířete nebo různých druhů zvířat, jsou zde značné odchylky způsobené rozdíly v tloušťce kůže a SC, ve složení mezibuněčných lipidů SC a v počtu kožních adnex. Mezi další faktory patří například sezónní a klimatické změny nebo interindividuální rozdíly.²⁰³⁻²⁰⁵ Všechny tyto faktory jsou nepředvídatelné a mohou ovlivnit absorpci látek kůží.

Dalšími činiteli, kteří mohou zapříčinit variabilitu v absorpci, patří metody kožního poškození. Tape stripping je metoda často aplikovaná při studiu SC. Získané výsledky touto metodou ovšem závisí na použitém postupu a stavu stripovaného SC. Mezi faktory, které mohou ovlivnit množství odstraněného SC, patří tvar, povrch, složení a lepící vlastnosti pásky, tlak a doba po jakou je páska na kůži aplikována a také rychlost odstranění. Mezi další parametry se řadí rozdíl v anatomických oblastech, na které je páska aplikována. Zde můžeme nalézt rozdíly v tloušťce a soudržnosti SC nebo také biomechanických vlastnostech kůže.^{206, 207} Mezi faktory, které zase ovlivňují extrakci lipidů patří použitá rozpouštědla, jejich poměr a množství, nebo délka extrakce.²⁰¹

Jestliže chceme získat reprodukovatelné výsledky, postupy metod by měly být standardizovány a ostatní faktory alespoň dobře definovány.

I přes naši snahu o standardizaci jednotlivých metod jsme pozorovali značnou variabilitu jak v permeabilitě, tak poškození kůže, která nám neumožnila provést srovnání mezi našimi látkami. Tato variabilita byla dána součtem variabilit kožní permeability, poškozením kožní bariéry a ostatních faktorů. Možností, jak obejít tuto komplikaci, by mohlo být studium pseudoceramidů pomocí modelových membrán SC navržených v předchozí studii. Složení těchto membrán lze dobře definovat a navíc postup jejich přípravy je standardizován a umožňuje získat reprodukovatelné výsledky. Navíc tak můžeme studovat i mechanismus účinku, termotropní fázové chování a organizaci pseudoceramidu v membráně. Také předpokládáme, že pozorované rozdíly mezi jednotlivými látkami by mohly být více zřetelné. Po provedení tohoto základního screeningu by pak mohly být neaktivnější látky hodnoceny pomocí permeačních studií *in vitro* na lidské kůži s modelově poškozenou kožní bariérou, která je mnohem lepším modelem než kůže prasečí. Množství a druh extrahovaných lipidů u modelového poškození extrakcí lze stanovit pomocí HPTLC.²⁰⁸ U metody tape stripping může být stanoveno množství odstraněného SC pomocí infračervené densitometrie, která spočívá v lámání světla způsobené korneocyty ulpívající na pásce.²⁰⁹ V současné době naše pracovní skupina disponuje přístroji, pomocí nichž můžeme obě metody provádět.

Předpokládáme, že ve studiu derivátu aminokyselin jako látek regenerující poškozenou bariéru se bude pokračovat. Metody a postupy uvedené v této části by tak měly usnadnit další práci v této problematice.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo získat nové poznatky o vztahu mezi strukturou a aktivitou ceramidů a derivátů aminokyselin jako modulátorů bariérové funkce kůže. Především šlo ověření naší hypotézy, že délka hydrofobního řetězce rozhoduje o tom, jak bude daná látka modulovat bariérovou funkci kůže, tzn. zda bude působit jako akcelerant nebo bude regenerovat poškozenou kožní bariéru. Také jsme se zabývali chováním jednotlivých látek v kůži, a to jak z hlediska mechanismu účinku, tak jejich metabolizace.

První část disertační práce zahrnovala syntézu akceleračních transdermálních permeací a studium jejich účinků *in vitro* na prasečí kůži plné tloušťky a *in vivo* na potkanech. Byly připraveny jedno nebo dvouřetězcové akcelerační aminokyselin prolinu, sarkozinu, alaninu, β -alaninu a glycinu včetně jednotlivých enantiomerů spojených s hydrofobním řetězcem pomocí biologicky rozložitelné esterové vazby. Hodnotili jsme vliv přítomnosti jednoho nebo dvou hydrofobních řetězců a také struktury a absolutní konfigurace v místě polární hlavy na akcelerační účinek. U neaktivnějšího derivátu celé série, derivátu prolinu L-Pro2, jsme studovali jeho mechanismus účinku, reverzibilitu, toxicitu a stabilitu v plazmě, potvrdili jsme také jeho vysoký účinek v *in vivo* studii na potkanech.

L-Pro2 se zdá být velice slibným akceleračním, proto by bylo dobré jej dále studovat a pokusit se připravit ještě účinnější analogy. V budoucích studiích by bylo vhodné rozšířit sérii těchto akceleračních o další deriváty prolinu s hydroxy nebo oxo skupinou v místě polární hlavy nebo rozšířit cyklický kruh, a tak detailněji studovat vliv struktury polární hlavy akceleračního na jeho účinek. Předpokládáme, že polární hlava akceleračního pouze umožňuje jeho vstup na místo účinku a nemá vliv na fluidizaci lipidových lamel. Na fluidizaci lamel má pravděpodobně vliv délka hydrofobních řetězců, proto by bylo dále vhodné připravit sérii látek s různou délkou acylového řetězce a sledovat jejich vliv na permeabilitu kůže. Pro potvrzení předkládaných hypotéz by bylo vhodné studovat vliv připravených derivátů na fázové chování nebo mísitelnost s lipidy SC pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie, IR spektroskopie a rentgenové difrakce.

Závěrem lze tedy říci, že deriváty aminokyselin se jeví jako velice perspektivní akcelerační transdermální permeace, zejména L-Pro2, díky kombinaci vysoké aktivity, reverzibilního účinku a nízké toxicity. Díky těmto vlastnostem jsou vhodnými kandidáty pro budoucí klinické použití. Kromě toho nalezené vztahy mezi strukturou a účinkem

by mohly být využity při navrhování struktur nových akcelerantů k získání aktivnějších látek s minimální toxicitou a dermální dráždivostí.

V druhé části této práce byly připraveny modelové membrány lipidů SC složené z ceramidu, kyseliny lignocerové, cholesterolu a cholesterolu sulfátu. Účelem bylo studium vlivu délky řetězce acylu ceramidů typu NS na propustnost a termotropní fázové chování těchto membrán s ohledem na jejich účinky na kožní bariérovou funkci. Ceramidy s krátkým řetězcem snížily elektrickou impedanci membrán a zvýšily propustnost theofylinu modelovými membránami, stejně jako bylo pozorováno v kůži. Tyto ceramidy s největšími účinky na propustnost rozšířily a snížily teplotu fázového přechodu modelových membrán SC. Z termálního chování membrán ovšem vyplývá, že krátkořetězcové ceramidy se zřejmě nemísí s ostatními složkami membrán, především s kyselinou lignocerovou, a tvoří samostatné domény. Také jsme zaznamenali slabší relativní intenzitu CH_2 vibrací při 32 °C u nejpropustnějších membrán, což naznačuje přítomnost domén (zřejmě bohatých na ceramidy) s nižší hustotou lipidů.

V současné době také probíhají studie těchto membrán pomocí atomové silové mikroskopie, Langmuirových monovrstev a práškové rentgenové difrakce se záměrem detailněji studovat strukturu a uspořádání lipidů membrán. Po získání těchto základních parametrů pak můžeme studovat krátké ceramidy pomocí vícesložkových lipidových směsí, které realističtěji napodobují SC, čímž máme na mysli širší distribuci délek hydrofobních řetězců FFA, či inkorporaci přirozených ceramidů do lipidové směsi v různém poměru.

Nicméně výsledky této práce potvrdily, že dlouhé hydrofobní řetězce v ceramidech typu NS jsou nezbytně nutné pro udržení bariérové funkce kůže a měly by být respektovány při navrhování struktur analogů ceramidů pro možnou léčbu kožních onemocnění. Kromě toho modelové membrány lipidů SC nanesené na porézní poklad ukázaly, že jsou vhodným zjednodušením pro studium bariérové funkce, zejména vztahů mezi strukturou ceramidu a propustností, stejně jako souvisejících mechanismů účinku na molekulární úrovni. Tyto membrány tak mohou být využity pro studium široké škály modulátorů bariérové funkce.

V poslední části disertační práce byla připravena řada nových homologů pseudoceramidu 14S24 se záměrem studia jejich potenciálních regeneračních účinků a objasnění vlivu délky hydrofobních řetězců na jejich aktivitu. Tato část práce zahrnovala jak studium různých metod poškození bariérové funkce kůže, tak studium různých vehikul. Nicméně v této části práce jsme nebyli schopni zhodnotit aktivitu připravených látek,

neboť jsme zaznamenali značnou variabilitu v propustnosti kůže. Možností jak obejít tuto komplikaci se jeví studium těchto látek za použití modelových membrán SC, které byly připraveny v druhé části práce a potvrdit tak jejich opodstatněnost ve studiu modulátorů bariérové funkce kůže. Metody a výsledky uvedené v této části však mohou být nápomocny při dalším studiu této problematiky.

6 SEZNAMY

6.1 SEZNAM ZKRATEK

14S24	tetradecylester (<i>S</i>)- <i>N</i> -tetrakosanoylserinu
3T3	myší embryonální fibroblasty
AD	atopická dermatitida
AMK	aminokyselina
AP	akcelerační poměr
ATR	zeslabená totální reflektance
Cer	ceramid
D-Ala	D-alanin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DDAIP	dodecylester <i>N,N</i> -dimethylalaninu
DDAK	dodecylester kyseliny <i>N,N</i> -dimethyl-6-aminohexanové
DFFA	deuterovaná volná mastná kyselina
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMBIS	<i>S,S</i> -dimethyl- <i>N</i> -(4-brombenzoyl)iminosulfuran
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium – kultivační médium
DMMCBI	<i>S,S</i> -dimethyl- <i>N</i> -(2-methoxykarbonylbenzensulfonyl)iminosulfuran
DMSO	dimethylsulfoxid
D-Pro	D-prolin
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
EtOH	ethanol
FFA	volná mastná kyselina
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GLC	glycerol
Gly	glycin
HaCaT	imortalizované lidské keratinocyty
HC	hydrokortizon
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá kapalinová chromatografie

Chol	cholesterol
CholS	cholesterol sulfát
IC ₅₀	koncentrací způsobujících 50% ztrátu životaschopnosti buněk
IPM	isopropyl-myristát
K _p	koeficient propustnosti
L-Ala	L-alanin
LPP	fáze s dlouhou periodicitou
L-Pro	L-prolin
L-Ser	L-serin
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid
<i>n</i>	počet experimentů
N-0915	3-dodekanoyloxazolid-2-on
NMR	nukleární magnetická rezonance
OO	olivový olej
PBS	fosfátový pufr
PC	polykarbonátový filtr
PEG 40	polyethylenglykol 400
PG	propylenglykol
PI	propidium jodid
PO	parafínový olej
PTFE	teflonový filtr
rt	pokojová teplota
S.E.M.	standardní chyba průměru
Sar	sarkozin
SC	stratum corneum
Sfg	sfingosin
SPP	fáze s krátkou periodicitou
T12	Transkarbam 12
TEA	triethylamin
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEWL	transepidermální ztráta vody
TH	theofylin

THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
t_f	teplota tání
TTC	2,3,5-trifenyltetrazolium-chlorid
UV	ultrafialový
VIS	viditelné světlo
β -Ala	β -alanin
γ (CH ₂)	CH ₂ kývavá deformační vibrace
δ (CH ₂)	CH ₂ nůžková deformační vibrace
ν_{as} (CH ₂)	CH ₂ asymetrická valenční vibrace
ν_s (CH ₂)	CH ₂ symetrická valenční vibrace

6.2 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Moore, L.; Chien, Y. W., Transdermal drug delivery: a review of pharmaceuticals, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1988**, *4* (4), 285-349.
2. Feingold, K. R., Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* **2007**, *48* (12), 2531-46.
3. Trommer, H.; Neubert, R. H., Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* **2006**, *19* (2), 106-21.
4. Prausnitz, M. R.; Mitragotri, S.; Langer, R., Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (2), 115-24.
5. Benson, H. A., Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv* **2005**, *2* (1), 23-33.
6. Chilcott, R. P.; Dalton, C. H.; Hill, I.; Davison, C. M.; Blohm, K. L.; Clarkson, E. D.; Hamilton, M. G., Evaluation of a barrier cream against the chemical warfare agent VX using the domestic white pig. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2005**, *97* (1), 35-8.
7. Chilcott, R. P.; Dalton, C. H.; Ashley, Z.; Allen, C. E.; Bradley, S. T.; Maidment, M. P.; Jenner, J.; Brown, R. F.; Gwyther, R. J.; Rice, P., Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) In vivo and in vitro studies using the domestic white pig. *Cutan Ocul Toxicol* **2007**, *26* (3), 235-47.
8. Ogawa, H.; Yoshiike, T., A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *J Dermatol Sci* **1993**, *5* (3), 197-204.
9. Eckert, R. L., Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* **1989**, *69* (4), 1316-46.
10. Menon, G. K., New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54* Suppl 1, S3-17.
11. Odland, G. F., In *Biochemistry and physiology of the skin*, Goldsmith, L. A., Ed. Oxford University Press: New York, 1983; pp 3-63.
12. Bouwstra, J. A.; de Graaff, A.; Gooris, G. S.; Nijssse, J.; Wiechers, J. W.; van Aelst, A. C., Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol* **2003**, *120* (5), 750-8.
13. Elias, P. M., Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* **1983**, *80* (1 Suppl), 44s-9s.
14. Fartasch, M.; Bassukas, I. D.; Diepgen, T. L., Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br J Dermatol* **1993**, *128* (1), 1-9.
15. Lundström, A.; Egelrud, T., Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta Derm Venereol* **1991**, *71* (6), 471-4.
16. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G., The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6* (4), 328-40.
17. Steven, A. C.; Steinert, P. M., Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* **1994**, *107* (Pt 2), 693-700.
18. Hirao, T., Involvement of transglutaminase in ex vivo maturation of cornified envelopes in the stratum corneum. *Int J Cosmet Sci* **2003**, *25* (5), 245-57.
19. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *917* (1), 108-11.

20. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* **1987**, *88* (6), 709-13.
21. Odland, G. F., A submicroscopic granular component in human epidermis. *J Invest Dermatol* **1960**, *34*, 11-5.
22. Landmann, L., Lamellar granules in mammalian, avian, and reptilian epidermis. *J Ultrastruct Res* **1980**, *72* (3), 245-63.
23. Freinkel, R. K.; Traczyk, T. N., Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol* **1985**, *85* (4), 295-8.
24. Landmann, L., The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol (Berl)* **1988**, *178* (1), 1-13.
25. Landmann, L., Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J Invest Dermatol* **1986**, *87* (2), 202-9.
26. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **2006**, *580* (23), 5456-66.
27. Madison, K. C., Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *121* (2), 231-41.
28. Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T., 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* **1994**, *35* (11), 2060-8.
29. Stewart, M. E.; Downing, D. T., A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* **1999**, *40* (8), 1434-9.
30. Ponc, M.; Weerheim, A.; Lankhorst, P.; Wertz, P., New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *120* (4), 581-8.
31. Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K., Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* **2008**, *49* (7), 1466-76.
32. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res* **2011**, *52* (6), 1211-21.
33. Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L., Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* **2003**, *4* (2), 107-29.
34. Norlén, L., Skin barrier formation: the membrane folding model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (4), 823-9.
35. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* **1983**, *24* (6), 759-65.
36. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182* (2), 147-51.
37. Wertz, P. W., Epidermal lipids. *Semin Dermatol* **1992**, *11* (2), 106-13.
38. Wertz, P. W., Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **2000**, *208*, 7-11.
39. Wertz, P. W., The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* **1996**, *18* (3), 283-294.
40. Breathnach, A. S.; Goodman, T.; Stolinski, C.; Gross, M., Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. *J Anat* **1973**, *114* (Pt 1), 65-81.

41. Swartzendruber, D. C.; Burnett, I. H.; Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Squier, C. A., Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide are complementary reagents for the preparation of epidermal samples for transmission electron microscopy. *J Invest Dermatol* **1995**, *104* (3), 417-20.
42. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* **1987**, *88* (6), 714-8.
43. Hou, S. Y.; Mitra, A. K.; White, S. H.; Menon, G. K.; Ghadially, R.; Elias, P. M., Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction. *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (2), 215-23.
44. White, S. H.; Mirejovsky, D.; King, G. I., Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. *Biochemistry* **1988**, *27* (10), 3725-32.
45. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W., Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol* **1991**, *97* (6), 1005-12.
46. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Lavrijsen, S.; Bras, W., The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study. *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1212* (2), 183-92.
47. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Downing, D. T., Lipid organization in pig stratum corneum. *J Lipid Res* **1995**, *36* (4), 685-95.
48. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Weerheim, A. M.; Ijzerman, A. P.; Ponc, M., Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res* **1998**, *39* (1), 186-96.
49. Garson, J. C.; Doucet, J.; Lévêque, J. L.; Tsoucaris, G., Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (1), 43-9.
50. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Salomonsdevries, M. A.; Vanderspek, J. A.; Bras, W., Structure of human stratum-corneum as a function of temperature and hydration - a wide-angle x-ray-diffraction study. *Intl J Pharm* **1992**, *84* (3), 205-216.
51. Pilgram, G. S.; Engelsma-van Pelt, A. M.; Bouwstra, J. A.; Koerten, H. K., Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J Invest Dermatol* **1999**, *113* (3), 403-9.
52. Bouwstra, J.; Gooris, G.; Ponc, M., The lipid organisation of the skin barrier: Liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. *J Biol Phys* **2002**, *28* (2), 211-223.
53. Hatta, I.; Ohta, N.; Inoue, K.; Yagi, N., Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758* (11), 1830-6.
54. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1808* (6), 1529-37.
55. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* **1989**, *92* (2), 251-7.
56. Forslind, B., A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* **1994**, *74* (1), 1-6.

57. Norlén, L., Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (4), 830-6.
58. Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E.; Gooris, G. S.; Ponec, M., The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **2000**, *208*, 23-30.
59. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Ponec, M., Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramide 1. *J Invest Dermatol* **2002**, *118* (4), 606-17.
60. Kiselev, M. A.; Ryabova, N. Y.; Balagurov, A. M.; Dante, S.; Hauss, T.; Zbytovska, J.; Wartewig, S.; Neubert, R. H., New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J* **2005**, *34* (8), 1030-40.
61. Jungersted, J. M.; Hellgren, L. I.; Jemec, G. B.; Agner, T., Lipids and skin barrier function--a clinical perspective. *Contact Dermatitis* **2008**, *58* (5), 255-62.
62. Larsen, F. S.; Hanifin, J. M., Epidemiology of atopic dermatitis. *Immun Allergy Clin* **2002**, *22* (1), 1-+.
63. Macheleidt, O.; Kaiser, H. W.; Sandhoff, K., Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **2002**, *119* (1), 166-73.
64. Hara, J.; Higuchi, K.; Okamoto, R.; Kawashima, M.; Imokawa, G., High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **2000**, *115* (3), 406-13.
65. Okamoto, R.; Arikawa, J.; Ishibashi, M.; Kawashima, M.; Takagi, Y.; Imokawa, G., Sphingosylphosphorylcholine is upregulated in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis. *J Lipid Res* **2003**, *44* (1), 93-102.
66. Arikawa, J.; Ishibashi, M.; Kawashima, M.; Takagi, Y.; Ichikawa, Y.; Imokawa, G., Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol* **2002**, *119* (2), 433-9.
67. Ohnishi, Y.; Okino, N.; Ito, M.; Imayama, S., Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol* **1999**, *6* (1), 101-4.
68. Jensen, J. M.; Fölster-Holst, R.; Baranowsky, A.; Schunck, M.; Winoto-Morbach, S.; Neumann, C.; Schütze, S.; Proksch, E., Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **2004**, *122* (6), 1423-31.
69. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Mellesi, L.; Ghidoni, R.; Caputo, R., Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch Dermatol* **1994**, *130* (4), 452-6.
70. Hong, K. K.; Cho, H. R.; Ju, W. C.; Cho, Y.; Kim, N. I., A study on altered expression of serine palmitoyltransferase and ceramidase in psoriatic skin lesion. *J Korean Med Sci* **2007**, *22* (5), 862-7.
71. Alessandrini, F.; Pfister, S.; Kremmer, E.; Gerber, J. K.; Ring, J.; Behrendt, H., Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* **2004**, *123* (6), 1030-6.
72. Alessandrini, F.; Stachowitz, S.; Ring, J.; Behrendt, H., The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* **2001**, *116* (3), 394-400.

73. Oji, V.; Tadini, G.; Akiyama, M.; Blanchet Bardon, C.; Bodemer, C.; Bourrat, E.; Coudiere, P.; DiGiovanna, J. J.; Elias, P.; Fischer, J.; Fleckman, P.; Gina, M.; Harper, J.; Hashimoto, T.; Hausser, I.; Hennies, H. C.; Hohl, D.; Hovnanian, A.; Ishida-Yamamoto, A.; Jacyk, W. K.; Leachman, S.; Leigh, I.; Mazereeuw-Hautier, J.; Milstone, L.; Morice-Picard, F.; Paller, A. S.; Richard, G.; Schmuth, M.; Shimizu, H.; Sprecher, E.; Van Steensel, M.; Taïeb, A.; Toro, J. R.; Vabres, P.; Vahlquist, A.; Williams, M.; Traupe, H., Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J Am Acad Dermatol* **2010**, *63* (4), 607-41.
74. Elias, P. M.; Williams, M. L.; Holleran, W. M.; Jiang, Y. J.; Schmuth, M., Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J Lipid Res* **2008**, *49* (4), 697-714.
75. Rogers, J.; Harding, C.; Mayo, A.; Banks, J.; Rawlings, A., Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res* **1996**, *288* (12), 765-70.
76. Fulmer, A. W.; Kramer, G. J., Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin. *J Invest Dermatol* **1986**, *86* (5), 598-602.
77. Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H., Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* **2001**, *52* (2), 103-12.
78. Lademann, J.; Otberg, N.; Richter, H.; Weigmann, H. J.; Lindemann, U.; Schaefer, H.; Sterry, W., Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2001**, *14 Suppl 1*, 17-22.
79. Lademann, J.; Otberg, N.; Richter, H.; Jacobi, U.; Schaefer, H.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W., [Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances]. *Hautarzt* **2003**, *54* (4), 321-3.
80. Potts, R. O.; Guy, R. H., Predicting skin permeability. *Pharm Res* **1992**, *9* (5), 663-9.
81. Williams, M. L.; Elias, P. M., The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1987**, *3* (2), 95-122.
82. Bolzinger, M. A.; Briancon, S.; Pelletier, J.; Chevalier, Y., Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid In* **2012**, *17* (3), 156-165.
83. Potts, R. O.; Guy, R. H., A predictive algorithm for skin permeability: the effects of molecular size and hydrogen bond activity. *Pharm Res* **1995**, *12* (11), 1628-33.
84. Guy, R. H.; Hadgraft, J., Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharm Res* **1988**, *5* (12), 753-8.
85. Pugh, W. J.; Roberts, M. S.; Hadgraft, J., Epidermal permeability - Penetrant structure relationships .3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum. *Int J Pharm* **1996**, *138* (2), 149-165.
86. Williams, A. C.; Barry, B. W., Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56* (5), 603-18.
87. Barry, B. W., Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J Controlled Release* **1991**, *15* (3), 237-248.
88. Menczel, E., Assessment of delipidization as an enhancing factor in percutaneous penetration. *Curr Probl Dermatol* **1995**, *22*, 189-94.

89. Ongpipattanakul, B.; Burnette, R. R.; Potts, R. O.; Francoeur, M. L., Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm Res* **1991**, *8* (3), 350-4.
90. Man, M. Q.; Brown, B. E.; Wupong, S.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Exogenous nonphysiologic vs physiological lipids - divergent mechanisms for correction of permeability barrier dysfunction. *Arch Dermatol* **1995**, *131* (7), 809-816.
91. Yang, L.; Mao-Qiang, M.; Taljebini, M.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br J Dermatol* **1995**, *133* (5), 679-85.
92. López, O.; Cócera, M.; Walther, P.; Wehrli, E.; Coderch, L.; Parra, J. L.; de la Maza, A., Liposomes as protective agents of stratum corneum against octyl glucoside: a study based on high-resolution, low-temperature scanning electron microscopy. *Micron* **2001**, *32* (2), 201-5.
93. Man MQ, M.; Feingold, K. R.; Thornfeldt, C. R.; Elias, P. M., Optimization of physiological lipid mixtures for barrier repair. *J Invest Dermatol* **1996**, *106* (5), 1096-101.
94. Coderch, L.; De Pera, M.; Fonollosa, J.; De La Maza, A.; Parra, J., Efficacy of stratum corneum lipid supplementation on human skin. *Contact Dermatitis* **2002**, *47* (3), 139-46.
95. de Pera, M.; Coderch, L.; Fonollosa, J.; de la Maza, A.; Parra, J. L., Effect of internal wool lipid liposomes on skin repair. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2000**, *13* (3-4), 188-95.
96. Hatziantoniou, S.; Rallis, M.; Demetzos, C.; Papaioannou, G. T., Pharmacological activity of natural lipids on a skin barrier disruption model. *Pharmacol Res* **2000**, *42* (1), 55-9.
97. Prottey, C.; Hartop, P. J.; Press, M., Correction of the cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiency in man by application of sunflower-seed oil to the skin. *J Invest Dermatol* **1975**, *64* (4), 228-34.
98. Hadgraft, J.; Peck, J.; Williams, D. G.; Pugh, W. J.; Allan, G., Mechanisms of action of skin penetration enhancers retarders: Azone and analogues. *Int J Pharm* **1996**, *141* (1-2), 17-25.
99. Kim, N.; El-Khalili, M.; Henary, M. M.; Strekowski, L.; Michniak, B. B., Percutaneous penetration enhancement activity of aromatic S, S-dimethyliminiosulfuranes. *Int J Pharm* **1999**, *187* (2), 219-29.
100. Stoughton, R. B., Enhanced percutaneous penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one. *Arch Dermatol* **1982**, *118* (7), 474-7.
101. Kaushik, D.; Costache, A.; Michniak-Kohn, B., Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. *Int J Pharm* **2010**, *386* (1-2), 42-51.
102. Malinverno, G.; Pantini, G.; Bootman, J., Safety evaluation of perfluoropolyethers, liquid polymers used in barrier creams and other skin-care products. *Food Chem Toxicol* **1996**, *34* (7), 639-50.
103. Lewis, R.; McElhaney, R. N., The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1-2), 9-21.
104. Garidel, P.; Boese, M., Non-Invasive Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and Imaging Techniques: Basic Principles and Applications. In *Modern Research and Educational Topics in Microscopy.*, 7 ed.; Méndez-Vilas, A.; Días, J., Eds. Formatex: 2007; pp 132-143.

- 105 Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., Fourier transform infrared spectroscopy studies of model stratum corneum lipids. *Biophys J* **1997**, 72 (2), TH335-TH335
106. Chen, H.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Effect of cholesterol on miscibility and phase behavior in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies. *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1512 (2), 345-56.
107. Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. *Biophys J* **2007**, 92 (8), 2785-95.
108. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Investigating the barrier function of skin lipid models with varying compositions. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, 79 (2), 334-42.
109. Caussin, J.; Gooris, G. S.; Janssens, M.; Bouwstra, J. A., Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1778 (6), 1472-82.
110. Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N., Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Study of Lipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes: Practical consideration. In *Methods in Membrane Lipids*, Walker, J. M., Ed. Humana Press: New Jersey, 2007; pp 207-226.
111. Garidel, P.; Fölting, B.; Schaller, I.; Kerth, A., The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem* **2010**, 150 (1-3), 144-56.
112. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1778 (5), 1344-55.
113. Gorcea, M.; Hadgraft, J.; Moore, D. J.; Lane, M. E., Fourier transform infrared spectroscopy studies of lipid domain formation in normal and ceramide deficient stratum corneum lipid models. *Int J Pharm* **2012**, 435 (1), 63-8.
114. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem Phys Lipids* **1998**, 96 (1-2), 141-57.
115. Macphail, R. A.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G.; Elliger, C. A., C-H stretching modes and the structure of normal-alkyl chains .2. Long, all-trans chains. *J Phys Chem* **1984**, 88 (3), 334-341.
116. Snyder, R. G., Vibrational spectra of crystalline n-paraffins.1. Methylene rocking and wagging modes. *J Mol Spectrosc* **1960**, 4 (5), 411-434.
117. Snyder, R. G., Vibrational spectra of crystalline n-paraffins.2. Intermolecular effects. *J Mol Spectrosc* **1961**, 7 (2), 116-&.
118. Snyder, R. G.; Conti, G.; Strauss, H. L.; Dorset, D. L., Thermally-induced mixing in partially microphase segregated binary n-alkane crystals. *J Phys Chem* **1993**, 97 (28), 7342-7350.
119. Snyder, R. G.; Liang, G. L.; Strauss, H. L.; Mendelsohn, R., IR spectroscopic study of the structure and phase behavior of long-chain diacylphosphatidylcholines in the gel state. *Biophys J* **1996**, 71 (6), 3186-3198.
120. Damien, F.; Boncheva, M., The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **2010**, 130 (2), 611-4.

121. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from Fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *231* (3), 797-801.
122. Senak, L.; Moore, D.; Mendelsohn, R., CH₂ wagging progressions as ir probes of slightly disordered phospholipid acyl chain states. *J Phys Chem* **1992**, *96* (6), 2749-2754.
123. Chia, N. C.; Mendelsohn, R., CH₂ wagging modes of unsaturated acyl chains as ir probes of conformational order in methyl alkenoates and phospholipid-bilayers. *J Phys Chem* **1992**, *96* (25), 10543-10547.
124. Snyder, R. G., Vibrational study of chain conformation of liquid n-paraffins and molten polyethylene. *J Chem Phys* **1967**, *47* (4), 1316-&.
125. Maroncelli, M.; Qi, S. P.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G., Nonplanar conformers and the phase-behavior of solid normal-alkanes. *J Am Chem Soc* **1982**, *104* (23), 6237-6247.
126. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behavior of ceramides. *J Phys Chem B* **1997**, *101* (44), 8933-8940.
126. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from Fourier transform infrared spectroscopy studies. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *231* (3), 797-801.
127. Moore, D. J.; Rerek, M. E., Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **2000**, *208*, 16-22.
128. Garidel, P., Calorimetric and spectroscopic investigations of phytosphingosine ceramide membrane organisation. *Phys Chem Chem Phys* **2002**, *4* (10), 1934-1942.
129. Rerek, M. E.; Chen, H. C.; Markovic, B.; Van Wyck, D.; Garidel, P.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Phytosphingosine and sphingosine ceramide headgroup hydrogen bonding: Structural insights through thermotropic hydrogen/deuterium exchange. *J Phys Chem B* **2001**, *105* (38), 9355-9362.
130. Dahlen, B.; Pascher, I., Molecular arrangements in sphingolipids - thermotropic phase-behavior of tetracosanoylphytosphingosine. *Chem Phys Lipids* **1979**, *24* (2), 119-133.
131. Miyazawa, T., Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations. *J Chem Phys* **1960**, *32* (6), 1647-1652.
132. Miyazawa, T.; Blout, E. R., Infrared spectra of polypeptides in various conformations - amide I and II bands. *J Am Chem Soc* **1961**, *83* (3), 712-&.
133. Pascher, I., Molecular arrangements in sphingolipids conformation and hydrogen-bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *455* (2), 433-451.
134. Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *J Phys Chem B* **2000**, *104* (9), 2159-2165.
135. Golden, G. M.; Guzek, D. B.; Harris, R. R.; McKie, J. E.; Potts, R. O., Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum. *J Invest Dermatol* **1986**, *86* (3), 255-9.
136. Moore, D. J.; Snyder, R. G.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., Kinetics of membrane raft formation: fatty acid domains in stratum corneum lipid models. *J Phys Chem B* **2006**, *110* (5), 2378-86.

137. Garidel, P., Mid-FTIR-Microspectroscopy of stratum corneum single cells and stratum corneum tissue. *Phys Chem Chem Phys* **2002**, *4* (22), 5671-5677.
138. Zhang, G.; Moore, D. J.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R., Vibrational microscopy and imaging of skin: from single cells to intact tissue. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387* (5), 1591-9.
139. Kim, Y. C.; Park, J. H.; Ludovice, P. J.; Prausnitz, M. R., Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol. *Int J Pharm* **2008**, *352* (1-2), 129-38.
140. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758* (7), 923-33.
141. Kaushik, D.; Michniak-Kohn, B., Percutaneous penetration modifiers and formulation effects: thermal and spectral analyses. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11* (3), 1068-83.
142. Büyüktimkin, S.; Büyüktimkin, N.; Rytting, J. H., Synthesis and enhancing effect of dodecyl 2-(N,N-dimethylamino)propionate on the transepidermal delivery of indomethacin, clonidine, and hydrocortisone. *Pharm Res* **1993**, *10* (11), 1632-7.
143. Novotný, M.; Klimentová, J.; Janůšová, B.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *J Control Release* **2011**, *150* (2), 164-70.
144. Hrabálek, A.; Dolezal, P.; Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J.; Novotný, J., Synthesis and enhancing effect of transkarbam 12 on the transdermal delivery of theophylline, clotrimazole, flobufen, and griseofulvin. *Pharm Res* **2006**, *23* (5), 912-9.
145. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Dolezal, P.; Holas, T.; Klimentová, J., Biodegradable derivatives of tranexamic acid as transdermal permeation enhancers. *J Control Release* **2005**, *104* (1), 41-9.
146. Novotný, J.; Kovářková, P.; Novotný, M.; Janůšová, B.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharm Res* **2009**, *26* (4), 811-21.
147. Vávrová, K.; Lorencová, K.; Novotný, J.; Holý, A.; Hrabálek, A., Permeation enhancer dodecyl 6-(dimethylamino)hexanoate increases transdermal and topical delivery of adefovir: influence of pH, ion-pairing and skin species. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**, *70* (3), 901-7.
148. Vávrová, K.; Kovářková, P.; Skolová, B.; Líbalová, M.; Roh, J.; Cáp, R.; Holý, A.; Hrabálek, A., Enhanced topical and transdermal delivery of antineoplastic and antiviral acyclic nucleoside phosphonate cPr-PMEDAP. *Pharm Res* **2011**, *28* (12), 3105-15.
149. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Dolezal, P.; Holas, T.; Zbytovská, J., L-Serine and glycine based ceramide analogues as transdermal permeation enhancers: polar head size and hydrogen bonding. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13* (14), 2351-3.
150. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Dolezal, P.; Sámalová, L.; Palát, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J., Synthetic ceramide analogues as skin permeation enhancers: structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* **2003**, *11* (24), 5381-90.
151. Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Palát, K.; Holas, T.; Klimentová, J.; Hrabálek, A.; Dolezal, P., Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro. *Eur J Pharm Sci* **2004**, *21* (5), 581-7.

152. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Mac-Mary, S.; Humbert, P.; Muret, P., Ceramide analogue 14S24 selectively recovers perturbed human skin barrier. *Br J Dermatol* **2007**, *157* (4), 704-12.
153. Harris, W. T.; Tenjarla, S. N.; Holbrook, J. M.; Smith, J.; Mead, C.; Entrekin, J., n-pentyl N-acetylprolinate. A new skin penetration enhancer. *J Pharm Sci* **1995**, *84* (5), 640-2.
154. Tenjarla, S. N.; Kasina, R.; Puranajoti, P.; Omar, M. S.; Harris, W. T., Synthesis and evaluation of N-acetylprolinate esters - novel skin penetration enhancers. *Int J Pharm* **1999**, *192* (2), 147-58.
155. Ackaert, O. W.; De Graan, J.; Capancioni, R.; Della Pasqua, O. E.; Dijkstra, D.; Westerink, B. H.; Danhof, M.; Bouwstra, J. A., The in vitro and in vivo evaluation of new synthesized prodrugs of 5-OH-DPAT for iontophoretic delivery. *J Control Release* **2010**, *144* (3), 296-305.
156. Limanov, V. E.; Svitova, I. R.; Kruchenok, T. B.; Tsvirova, I. M.; Yaroslavskaya, L. A., Synthesis and bactericidal activity of hydrochlorides of amino-acid higher esters. *Khim Farm Zh* **1984**, *18* (10), 1214-1217.
157. Yamada, N.; Okuyama, K.; Serizawa, T.; Kawasaki, M.; Oshima, S., Periodic change in absorption maxima due to different chain packing between the bilayers of amphiphiles possessing even and odd numbers of carbons in the hydrophobic chain. *J Chem Soc Perkin 2* **1996**, (12), 2707-2713.
158. Thomae, K. Hautschutzmittel. 1974.
159. Herkenne, C.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Hadgraft, J.; Guy, R. H., Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm Res* **2006**, *23* (8), 1850-6.
160. Fasano, W. J.; Hinderliter, P. M., The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol In Vitro* **2004**, *18* (5), 725-9.
161. Kligman, A. M.; Christophers, E., Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch Dermatol* **1963**, *88*, 702-5.
162. Bligh, E. G.; Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37* (8), 911-7.
163. Bravo, D.; Rigley, T. H.; Gibran, N.; Strong, D. M.; Newman-Gage, H., Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* **2000**, *26* (4), 367-78.
164. FDA Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2001.
165. Karande, P.; Mitragotri, S., Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788* (11), 2362-73.
166. Bernard, G.; Auger, M.; Soucy, J.; Pouliot, R., Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1770* (9), 1317-23.
167. Pinnagoda, J.; Tupker, R. A.; Agner, T.; Serup, J., Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* **1990**, *22* (3), 164-78.
168. Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides. *Curr Med Chem* **2010**, *17* (21), 2301-24.
169. Barry, B. W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* **2001**, *14* (2), 101-14.
170. Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Hrabálek, A., Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr Med Chem* **2005**, *12* (19), 2273-91.

171. Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůsová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K., Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (2), 344-7.
172. Novotný, J.; Janůsová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol* **2009**, *22* (1), 22-30.
173. Novotný, J.; Pospeschová, K.; Hrabálek, A.; Cáp, R.; Vávrová, K., Synthesis of fluorescent C24-ceramide: evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (24), 6975-7.
174. Vávrová, K.; Hrabálek, A.; Dolezal, P., Enhancement effects of (R) and (S) enantiomers and the racemate of a model enhancer on permeation of theophylline through human skin. *Arch Dermatol Res* **2002**, *294* (8), 383-5.
175. Mitragotri, S., Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release* **2003**, *86* (1), 69-92.
176. Seto, J. E.; Polat, B. E.; VanVeller, B.; Lopez, R. F.; Langer, R.; Blankschtein, D., Fluorescent penetration enhancers for transdermal applications. *J Control Release* **2012**, *158* (1), 85-92.
177. Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S., Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *J Control Release* **2006**, *110* (2), 307-13.
178. Lin, S. Y.; Duan, K. J.; Lin, T. C., Microscopic FT-IR/DSC system used to simultaneously investigate the conversion process of protein structure in porcine stratum corneum after pretreatment with skin penetration enhancers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **1996**, *18* (3), 175-81.
179. Boatright, K. M.; Renatus, M.; Scott, F. L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I. M.; Ricci, J. E.; Edris, W. A.; Sutherland, D. P.; Green, D. R.; Salvesen, G. S., A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **2003**, *11* (2), 529-41.
180. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A., Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* **2005**, *46* (12), 2649-56.
181. Kessner, D.; Ruettinger, A.; Kiselev, M. A.; Wartewig, S.; Neubert, R. H., Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems. *Skin Pharmacol Physiol* **2008**, *21* (2), 58-74.
182. Brief, E.; Kwak, S.; Cheng, J. T.; Kitson, N.; Thewalt, J.; Lafleur, M., Phase behavior of an equimolar mixture of N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine, cholesterol, and palmitic acid, a mixture with optimized hydrophobic matching. *Langmuir* **2009**, *25* (13), 7523-32.
183. de Jager, M.; Groenink, W.; Bielsa i Guivernau, R.; Andersson, E.; Angelova, N.; Ponec, M.; Bouwstra, J., A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives. *Pharm Res* **2006**, *23* (5), 951-60.
184. Matsuzaki, K.; Imaoka, T.; Asano, M.; Miyajima, K., Development of a model membrane system using stratum corneum lipids for estimation of drug skin permeability. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1993**, *41* (3), 575-9.
185. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Ponec, M. H., Ceramide containing mixtures: Crystalline and liquid domains coexist in a single lamellar phase. *Biophys J* **2002**, *82* (1), 520A-520A.

186. Groen, D.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A., Two new methods for preparing a unique stratum corneum substitute. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778* (10), 2421-9.
187. Vavrysova, H. Studium termotropního chování krátkořetězcových analogů ceramidů. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.
188. Nybond, S.; Björkqvist, Y. J.; Ramstedt, B.; Slotte, J. P., Acyl chain length affects ceramide action on sterol/sphingomyelin-rich domains. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1718* (1-2), 61-6.
189. Li, L.; Tang, X.; Taylor, K. G.; DuPré, D. B.; Yappert, M. C., Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J* **2002**, *82* (4), 2067-80.
190. Khazanov, E.; Prieu, A.; Shillemans, J. P.; Barenholz, Y., Physicochemical and biological characterization of ceramide-containing liposomes: paving the way to ceramide therapeutic application. *Langmuir* **2008**, *24* (13), 6965-80.
191. Tanojo, H.; Boelsma, E.; Junginger, H. E.; Ponec, M.; Boddé, H. E., In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: a laser Doppler velocimetry study. *J Control Release* **1999**, *58* (1), 97-104.
192. Wertz, P. W.; Cho, E. S.; Downing, D. T., Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1983**, *753* (3), 350-5.
193. Le Bihan, T.; Pezolet, M., Study of the structure and phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition. *Chem Phys Lipids* **1998**, *94* (1), 13-33.
194. Imokawa, G.; Yada, Y.; Higuchi, K.; Okuda, M.; Ohashi, Y.; Kawamata, A., Pseudo-acylceramide with linoleic acid produces selective recovery of diminished cutaneous barrier function in essential fatty acid-deficient rats and has an inhibitory effect on epidermal hyperplasia. *J Clin Invest* **1994**, *94* (1), 89-96.
195. Fukunaga, K.; Yoshida, M.; Nakajima, F.; Uematsu, R.; Hara, M.; Inoue, S.; Kondo, H.; Nishimura, S., Design, synthesis, and evaluation of beta-galactosylceramide mimics promoting beta-glucocerebrosidase activity in keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13* (5), 813-5.
196. Ong, D. E.; Brady, R. N., synthesis of ceramides using n-hydroxysuccinimide esters. *J Lipid Res* **1972**, *13* (6), 819-&.
197. Paquet, A., succinimidyl esters of fatty-acids for amino-acid acylations. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1976**, *54* (5), 733-737.
198. Yoshiike, T.; Aikawa, Y.; Sindhvananda, J.; Suto, H.; Nishimura, K.; Kawamoto, T.; Ogawa, H., Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline. *J Dermatol Sci* **1993**, *5* (2), 92-6.
199. Kalia, Y. N.; Pirot, F.; Guy, R. H., Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum in vivo. *Biophys J* **1996**, *71* (5), 2692-700.
200. Zhai, H.; Leow, Y. H.; Maibach, H. I., Human barrier recovery after acute acetone perturbation: an irritant dermatitis model. *Clin Exp Dermatol* **1998**, *23* (1), 11-3.
201. Abrams, K.; Harvell, J. D.; Shriner, D.; Wertz, P.; Maibach, H.; Maibach, H. I.; Rehfeld, S. J., Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J Invest Dermatol* **1993**, *101* (4), 609-13.

202. Lodén, M.; Andersson, A. C.; Anderson, C.; Bergbrant, I. M.; Frödin, T.; Ohman, H.; Sandström, M. H.; Särnhult, T.; Voog, E.; Stenberg, B.; Pawlik, E.; Preisler-Häggqvist, A.; Svensson, A.; Lindberg, M., A double-blind study comparing the effect of glycerin and urea on dry, eczematous skin in atopic patients. *Acta Derm Venereol* **2002**, *82* (1), 45-7.
203. Godin, B.; Touitou, E., Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59* (11), 1152-61.
204. Jacobi, U.; Kaiser, M.; Toll, R.; Mangelsdorf, S.; Audring, H.; Otberg, N.; Sterry, W.; Lademann, J., Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res Technol* **2007**, *13* (1), 19-24.
205. Dick, I. P.; Scott, R. C., Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol* **1992**, *44* (8), 640-5.
206. Löffler, H.; Dreher, F.; Maibach, H. I., Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol* **2004**, *151* (4), 746-52.
207. Bashir, S. J.; Chew, A. L.; Anigbogu, A.; Dreher, F.; Maibach, H. I., Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol* **2001**, *7* (1), 40-8.
208. Gildenast, T.; Lasch, J., Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1346* (1), 69-74.
209. Voegeli, R.; Heiland, J.; Doppler, S.; Rawlings, A. V.; Schreier, T., Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry. *Skin Res Technol* **2007**, *13* (3), 242-51.

6.3 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

6.3.1 Publikace jako první autor

Janůšová, B.; Školová, B.; Tükörová, K.; Wojnarová, L.; Šimůnek, T.; Mladěnka, P.; Filipický, T.; Říha, M.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers (v recenzním řízení), Příloha I

Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.; Vavrysová, H.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1811* (3), 129-37, Příloha II

6.3.2 Publikace jako spoluautor

Novotný, M.; Klimentová, J.; Janůšová, B.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Ammonium carbamates as highly active transdermal permeation enhancers with a dual mechanism of action. *J Control Release* **2011**, *150* (2), 164-70.

Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůšová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K., Transkarbams as transdermal permeation enhancers: effects of ester position and ammonium carbamate formation. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (9), 2726-8.

Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol* **2009**, *22* (1), 22-30.

Novotný, J.; Kovaríková, P.; Novotný, M.; Janůšová, B.; Hrabálek, A.; Vávrová, K., Dimethylamino acid esters as biodegradable and reversible transdermal permeation enhancers: effects of linking chain length, chirality and polyfluorination. *Pharm Res* **2009**, *26* (4), 811-21.

Novotný, M.; Hrabálek, A.; Janůšová, B.; Novotný, J.; Vávrová, K., Dicarboxylic acid esters as transdermal permeation enhancers: effects of chain number and geometric isomers. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (2), 344-7.

6.3.3 Abstrakta z konferencí

Janůšová, B.; Lorenc, P.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Vliv krátkých analogů ceramidů na molekulární organizaci lipidů kožní bariéry. *Sborník* **2009**, 92 (38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, 2009).

Janůšová, B.; Lorenc, P.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Krátké analogy ceramidů a jejich vliv na organizaci lipidů kožní bariéry. *Chemzi* **2009**, 5, 182–183 (Konference 61. zjazd chemikov, Tatranské Matliare, 2009).

Janůšová, B.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Amino acid based ceramide analogues as skin permeation enhancers. *PPP* **2008**, *11*, 88 (11. konference Perspectives in percutaneous penetration, La Grande Motte, Francie, 2008).

Janůšová, B.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Amino acids derivatives as skin permeation enhancers; synthesis and evaluation, *Conference book* p39 (konference a workshop 7. Cell course, Saarbrucken, Německo, 2008).

Janůšová, B.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Pseudoceramidy modulující bariérovou funkci kůže. *Chem listy S* **2008**, *102*, s223 (37. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, 2008).

Janůšová, B.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Syntéza a hodnocení derivátů aminokyselin jako akcelerantů transdermální permeace. *Chem listy* **2007**, *101*, 944 (42. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 2007).

Janůšová, B.; Vávrová, K.; Hrabálek, A., Deriváty aminokyselin jako akceleranty transdermální permeace. *Zborník* **2007**, 76 (36. konference Syntéza a analýza léčiv, Bratislava, Slovensko, 2007).

7 PŘÍLOHY