

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

HODNOCENÍ PŘÍPRAVY MONOVRSTEVNÝCH
LIPIDOVÝCH MODELŮ KOŽNÍ BARIÉRY

Evaluation of preparation of monolayer lipid skin barrier models

Vedoucí práce: PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

Hradec Králové 2019

Karolína Růžičková

Prohlášení

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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové
Květen 2019

Karolína Růžičková

Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Barboře Švecové, Ph.D. a Mgr. Anně Nováčkové za jejich rady, ochotu a trpělivost při vedení této diplomové práce.

Děkuji Prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a ostatním členům Skin Barrier Research Group za příjemné pracovní prostředí.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (SVV 260 401) a Grantové agentuře ČR (13-23891S).

Za podporu, povzbuzení a rady děkuji své rodině, přátelům a spolužákům.

Obsah

1	Úvod a cíl práce.....	8
2	Seznam zkratk.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Lidská kůže, její funkce a stavba.....	10
3.1.1	Funkce kůže.....	10
3.1.2	Stavba kůže.....	11
3.1.2.1	Epidermis.....	12
3.1.2.2	Stratum corneum.....	13
3.2	Typy ceramidů v lidské kůži a jejich uspořádání.....	14
3.2.1	Strukturní rozdíly ceramidů.....	14
3.2.2	Uspořádání lipidů ve stratum corneum.....	16
3.2.2.1	Prostorové uspořádání (= konformace) ceramidů.....	16
3.2.2.2	Lamelární uspořádání lipidů stratum corneum.....	17
3.2.2.3	Laterální uspořádání lipidů stratum corneum.....	18
3.3	Studium modelů uspořádání lipidů stratum corneum.....	19
3.3.1	Monovrstevné modely uspořádání lipidů stratum corneum.....	19
3.3.1.1	Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch – kapalina.....	19
3.3.2	Izotermy a fázové přechody.....	20
3.3.3	Brewsterova úhlová mikroskopie.....	21
3.4	Vliv podmínek na Langmuirovy monovrstvy.....	22
3.4.1	pH a pufry.....	22
3.4.2	Vliv pH subfáze na Langmuirovy monovrstvy.....	22
4	Experimentální část.....	23
4.1	Chemikálie a rozpouštědla.....	23
4.2	Přístrojové vybavení.....	23
4.3	Příprava vzorků.....	24
4.3.1	Izolace lipidů ze stratum corneum a příprava vzorků.....	24
4.3.2	Příprava lipidových směsí.....	25
4.3.3	Příprava směsi kyselin.....	25

4.4 Příprava subfází.....	26
4.4.1 Příprava fosfátového pufru pH 7,4	26
4.4.2 Příprava vody pH 7,0	26
4.4.3 Příprava acetátového pufru pH 5,5 a pH 4,0.....	27
4.5 Příprava monovrstevných modelů na rozhraní vzduch-kapalina.....	28
4.5.1 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina	28
4.5.2 Příprava monovrstev při použití Brewsterovy úhlové mikroskopie	29
5 Výsledky a diskuze.....	30
5.1 Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie.....	30
5.2 Langmuirovy monovrstvy	31
5.3 Modul kompresibility	36
5.4 Hodnocení lipidových monovrstev Brewsterovým mikroskopem.....	37
6 Závěr	44
7 Literatura	45

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: Karolína Růžičková

Školitel: PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

Název diplomové práce: Hodnocení přípravy monovrstevných lipidových modelů kožní bariéry

Kůže, ochranná bariéra lidského těla, je tvořena několika vrstvami. Nejsvrchnější z nich je stratum corneum, součást epidermis, jehož mezibuněčný prostor je složen zejména z ceramidů, cholesterolu a vyšších mastných kyselin. Právě jejich složení a uspořádání jsou zásadní pro bariérovou funkci kůže. Pro studium těchto kožních lipidů na molekulární úrovni jsou využívány různé multivrstevné a monovrstevné modely. Jednou z hodnotících metod jsou Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina.

V této práci jsem se zabývala chováním monovrstevných lipidových modelů při čtyřech různých hodnotách pH kapalně subfáze. Srovnávány byly lipidové směsi izolované z lidské kůže, lipidové směsi připravené z jednotlivých složek a pro rozšíření také směs mastných kyselin. K hodnocení byly použity Langmuirovy izotermy a zobrazovací metoda Brewsterova úhlová mikroskopie při různých rychlostech komprese.

Z hodnocení vyplynulo, že pH subfáze nemá na chování lipidů zásadní vliv. Lipidy projevovaly největší ochotu k uspořádání do monovrstvy při neutrálním pH 7,0, při vyšším pH (7,4) molekuly zaujímaly větší plochu. Fyziologická hodnota pH lidské kůže se pohybuje okolo 5,5, ovšem při této hodnotě lipidy nebyly nejtěsněji uspořádány. Důležitý vliv na uspořádání lipidů mají pravděpodobně mastné kyseliny, které byly součástí obou vzorků. Vliv pH na průběh izoterm mastných kyselin vykazuje stejný trend jako směsi s ostatními lipidy.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Karolína Růžičková

Supervisor: PharmDr. Barbora Švecová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Anna Nováčková

Title of thesis: Evaluation of preparation of monolayer lipid skin barrier models

Skin, the protective barrier of human body, consists of several layers. The uppermost one is the stratum corneum, part of epidermis, whose extracellular matrix is composed mainly of ceramides, cholesterol and free fatty acids. The composition and arrangement of skin lipids are essential for the proper skin barrier function. Various multilayer and monolayer models are used to study skin lipids at the molecular level. Some of the evaluation methods are Langmuir monolayers at the air interface.

In this work I dealt with the behavior of monolayer lipid models at four different pH values of the liquid subphase. Lipids isolated from human skin, lipid mixture prepared from the individual components, and a mixture of fatty acids were compared as well. Langmuir isotherms and the Brewster angle microscopy at different compression rates were used for this purpose.

The results showed that pH of the subphase has no major effect on lipids arrangement. Lipids were most likely to form a tight monolayer at neutral pH 7,0, at a higher pH (7,4), the molecules occupied a larger area. The physiological pH of the human skin is about 5.5, but at this value the lipids are not the most tightly arranged.

Free fatty acids, which were part of both samples, probably have an important effect on lipid organization and their behavior in the mixture. The influence of pH on the shape of fatty acid isotherms shows the same trend comparing isotherms of lipid mixtures.

1 Úvod a cíl práce

Složení a uspořádání lipidů stratum corneum (SC) určuje bariérovou vlastnost kůže. Pestrost lipidového složení a širší možnosti organizace lipidových molekul komplikuje hledání principů, kterými je tato funkce dána.

Na molekulové úrovni jsou lipidy SC studovány pomocí multivrstevných i monovrstevných modelů (např. Langmuirovy monovrstvy). K jejich hodnocení jsou využívány různé fyzikální metody.

Cílem mé práce bylo studium vlivu změny pH kapalně subfáze na uspořádání lipidů do Langmuirových monovrstev (LM) na rozhraní vzduch-kapalina. Použity byly pufry o pH 4,0; 5,5; 7,0 a 7,4. Dále bylo srovnáváno použití lipidových směsí připravených z jednotlivých složek a lipidových směsí, které obsahovaly ceramidy (Cer) izolované za tímto účelem z lidské kůže. Pro rozšíření získaných poznatků byla do měření zahrnuta i směs mastných kyselin. Lipidové monovrstevné modely byly hodnoceny pomocí Langmuirových izoterm. Pro doplnění byly monovrstvy vizualizovány pomocí Brewsterovy úhlové mikroskopie (BAM) při různých rychlostech komprese.

2 Seznam zkratek

A _{1,5}	Teoretická plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku 1,5 mN/m
A ₂₀	Teoretická plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku 20 mN/m
BAM	Brewsterova úhlová mikroskopie
Cer	Ceramidy
C _{max}	Modul kompresibility
C _s	Kompresibilita
FFA	Vyšší mastné kyseliny
FFA-mix	Vzorek směsi mastných kyselin
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
Chol	Cholesterol
CholS	Cholesterol sulfát
LM	Langmuirovy monovrstvy
Mix	Vzorek lipidových směsí
Mma	Teoretická plocha jedné molekuly
SC	Stratum corneum
SC-mix	Vzorek lipidů izolovaných ze stratum corneum
SP	Povrchový tlak

3 Teoretická část

3.1 Lidská kůže, její funkce a stavba

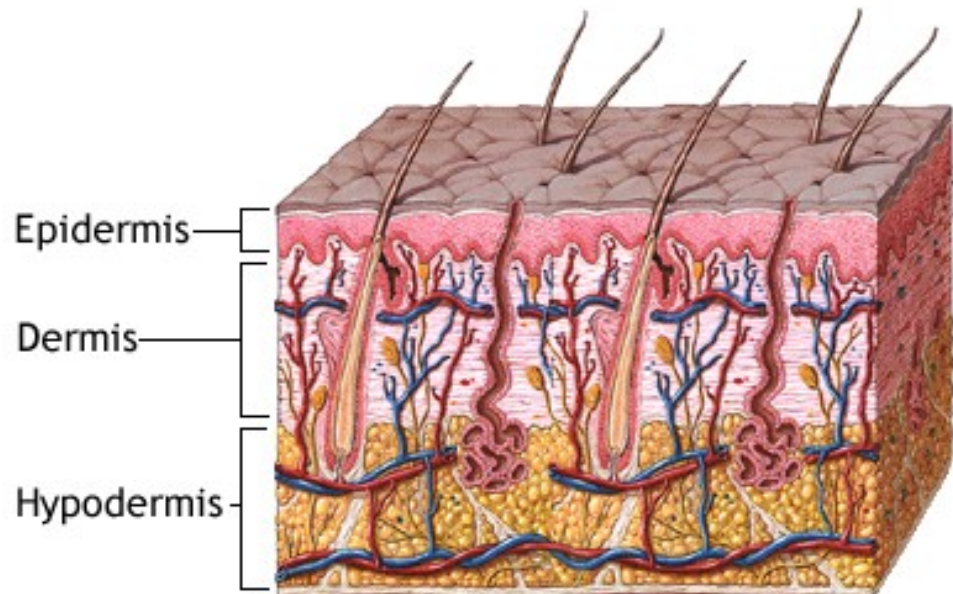
Kůže (cutis, derma) tvoří komplexní vnější povrch lidského těla. U dospělého člověka zaujímá plochu 1,6–2 m², její tloušťka činí 1,5–4 mm v závislosti na výživě a lokalizaci. Váží asi 3 kg, s tukovou tkání až 20 kg, a obsahuje okolo 72 % vody. V místech tělních otvorů plynule přechází ve sliznici. Kůže je anatomicky i fyziologicky specializovaná tkáň plnící několik funkcí.¹

3.1.1 Funkce kůže

Kůže tvoří vnější ochrannou bariéru lidského těla nezbytnou pro udržení jeho homeostázy, zabraňuje úniku vody, a tím umožňuje život člověka na souši. Kůže chrání vnitřní prostředí organismu před škodlivými mikroorganismy, současně ale vytváří vhodné životní prostředí pro symbiotickou kožní mikroflóru (např. udržováním kyselého pH kožního pokryvu). Také nás chrání před nepříznivými vlivy okolního prostředí – poškozením ať už mechanickým, tepelným nebo chemickým. Podstata chemické ochrany vyplývá z malé propustnosti kůže pro vodu a v ní rozpuštěné látky. Imunologickou ochranu zajišťují Langerhansovy a Gransteinovy buňky, které prezentací antigenu spouští imunitní reakci organismu. Vlivem UV záření probíhá v kůži syntéza vitamínu D₃ z příslušných prekurzorů, zároveň však přítomnost melaninu v keratinocytech chrání lidské tělo před škodlivými účinky nadměrného slunění. Dále se kůže podílí na termoregulaci změnou průtoku krve v dermis, obsahem tuku v hypodermis, který slouží i jako energetická zásoba, a také vylučováním potu. Pomocí potních a mazových žláz se organismus zbavuje toxických a dalších látek, např. solí. Obsahem volných nervových zakončení a receptorů umožňuje komunikaci s vnějším prostředím, vnímání bolesti, tepla a chladu. Díky mimice, případně pachovým signálům může být kůže součástí projevů emocí a non-verbální komunikace mezi lidmi.^{1, 2, 3}

3.1.2 Stavba kůže

Kůže se skládá z několika strukturálně odlišných vrstev, které jsou zachyceny na obrázku 1 (převzato z medlineplus.gov⁴).



Obrázek 1. Vrstvy kůže – epidermis, dermis, hypodermis.

Hypodermis je spodní, podkožní vrstva, která upevňuje kožní tkáň ke kostře nebo svalům. Je tvořena vazivem a obsahuje buňky tukové tkáně.

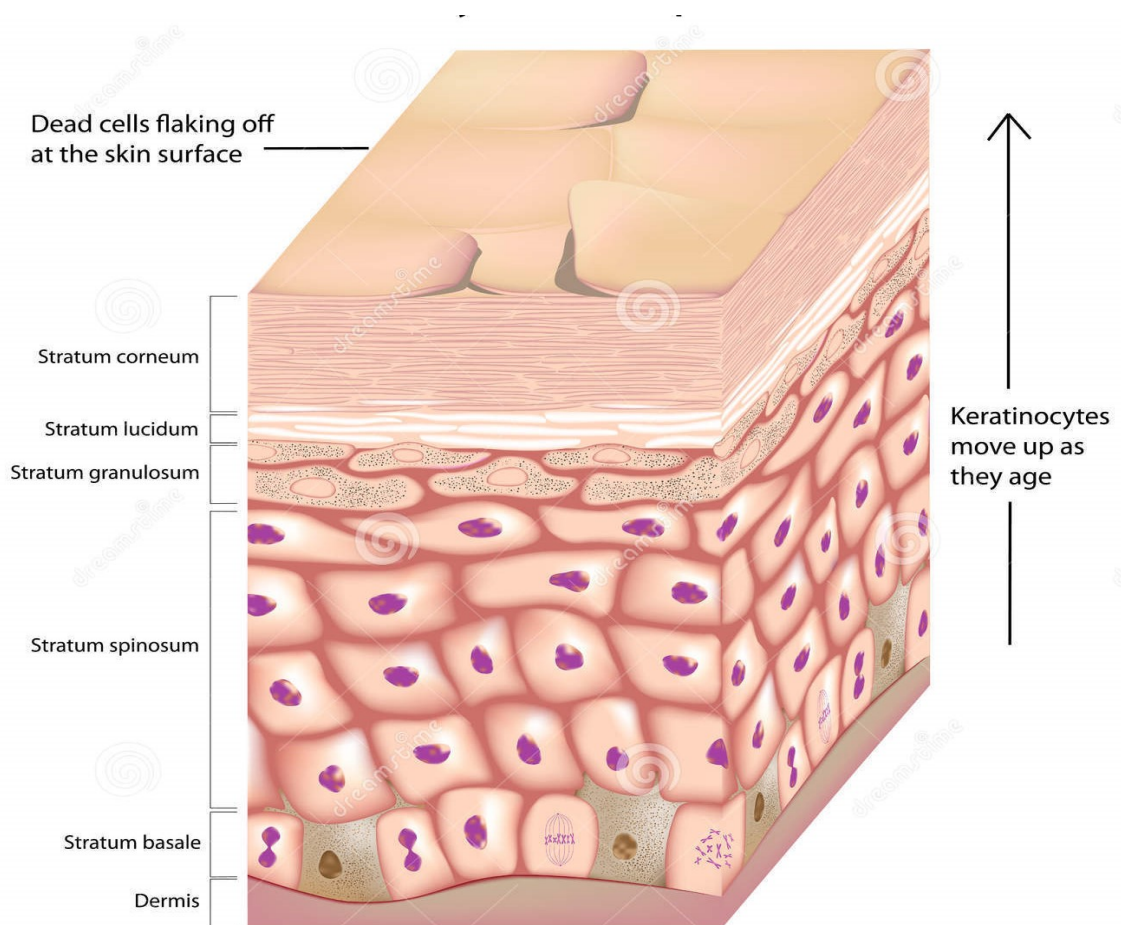
Dermis tvoří síť propletených elastických a kolagenních vláken, která zajišťují pevnost a pružnost kůže. Součástí dermis jsou nervová zakončení – mechanoreceptory, např. Vater-Paciniho nebo Merkelova tělíska a také cévy krevního a lymfatického systému.

Epidermis je vrchní vrstva kůže, kterou tvoří několik typů buněk. Nejčtenější z nich jsou keratinocyty, které jsou také základem vlasů, chlupů a nehtů, dále melanocyty obsahující kožní barvivo melanin a buňky imunitního systému (Langerhansenovy a Gransteinovy buňky).²

Součástí epidermis jsou i tzv. rohové deriváty – chlupy, nehty a kožní žlázy, které však mají ve srovnání s kůží zcela jinou anatomii.^{2,3}

3.1.2.1 Epidermis

Na hranici *dermis* a *epidermis*, kde se v bazální vrstvě nacházejí kmenové buňky, vznikají keratinocyty. Tyto buňky mají schopnost se neomezeně dělit, probíhá v nich intenzivní mitóza a dceřiné buňky migrují kolmo vzhůru. Během putování se buňky oplošťují, pozbývají jádra a organel, a dochází k akumulaci keratinu uvnitř buněk a okolních lipidů. Tento proces se nazývá keratinizace, jeho výsledkem jsou ploché buňky, obsahující prakticky pouze keratin, stlačené a hustě uspořádané. Tyto “šupiny” tvoří kožní bariéru, povrchovou vrstvu epidermis, z níž se opět odírají a olupují. Obnova celé epidermis trvá přibližně 30 dní.^{2, 5} Podle stádia diferenciaci keratinocytů můžeme epidermis rozdělit do čtyř vrstev – *stratum basale*, *spinosum*, *granulosum* a *corneum*. Na určitých částech těla se silnější kůži můžeme rozlišit také pás bezjaderných buněk – *stratum lucidum*.^{6, 7} Jednotlivé vrstvy epidermis znázorňuje obrázek 2 (převzato z www.dreamstime.com⁸).

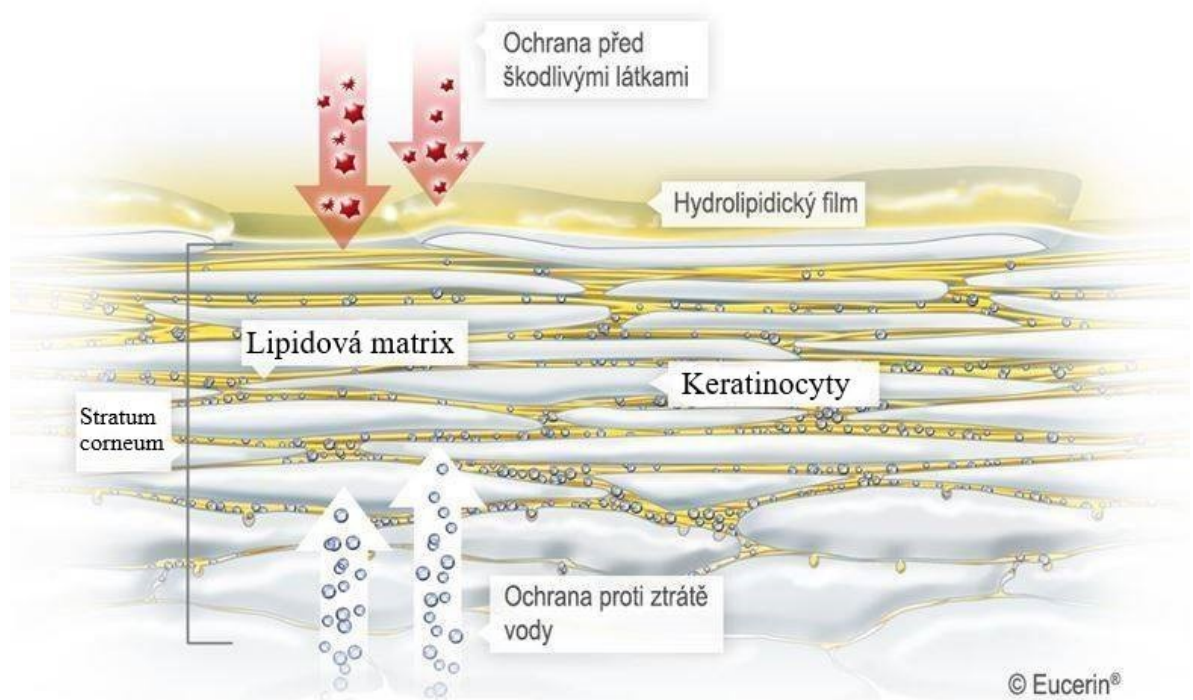


Obrázek 2. Vrstvy epidermis. Na obrázku jsou dále znázorněny zplošťující se keratinocyty, které se na povrchu odlupují.

3.1.2.2 Stratum corneum

Tato nejsvrchnější vrstva kůže je 10-20 μm silná a je tvořena 18-21 vrstvami buněk. Přestože se tloušťka SC zdá zanedbatelná, přítomnost této vrstvy a zejména její složení a vnitřní uspořádání je zásadní pro bariérovou funkci kůže.^{6, 9-11}

SC je složena z keratinocytů – plochých, vzájemně do sebe zapadajících buněk s proteinovou nepropustnou obálkou vyplněnou keratinem. Keratinocyty jsou vzájemně spojeny desmozomy, které zajišťují jejich soudržnost, a obklopeny lipidovou extracelulární matrix, kovalentně vázanou na buněčnou membránu (viz obrázek 3, převzato z www.eucerin.cz¹²).^{5, 9, 13}



Obrázek 3. SC s keratinocyty a lipidovou matrix.

Lipidová extracelulární matrix zaujímá asi 20 % objemu SC. Hlavními složkami jsou Cer, cholesterol (Chol) a vyšší mastné kyseliny (FFA) – behenová s délkou řetězce 22 C, lignocerová s délkou řetězce 24 C, palmitová s délkou řetězce 16 C, stearová s délkou řetězce 18 C, atd. V menší míře jsou přítomny estery Chol s organickými kyselinami, cholesterol-sulfát (CholS) (2-5 %)¹³ a další látky.⁵

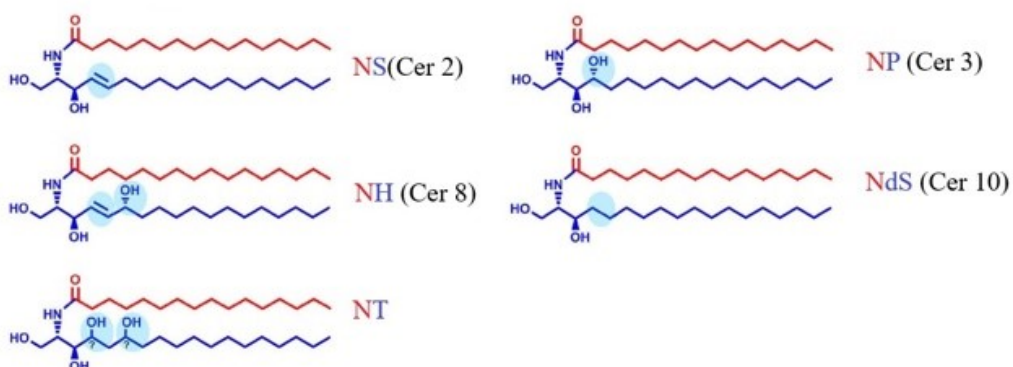
3.2 Typy ceramidů v lidské kůži a jejich uspořádání

Molekuly Cer vznikají spojením sfingosinové baze a acylu FFA pomocí amidové vazby. Výsledné molekuly se tak odlišují nejen jejich kombinacemi, ale také počtem, polohou a stereochemií dvojných vazeb, počtem hydroxylových skupin sfingosinové baze a délkou řetězců.¹⁴⁻¹⁶ V lidském SC bylo doposud popsáno 15 podtříd Cer s rozdílnými vlastnostmi i funkcemi.¹⁷

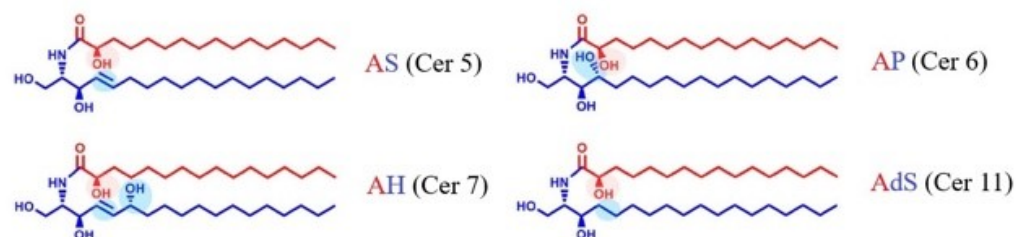
3.2.1 Strukturní rozdíly ceramidů

Ceramidové baze můžeme rozdělit na sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) a nejnověji dihydroxysfinganin (T) se čtyřmi hydroxyly. Řetězec FFA může být nasycený (N), α -hydroxy (A) nebo ω -hydroxy (O), který může být esterifikován kyselinou linolovou (EO). Novější výzkumy popisují také esterifikaci hydroxyly v poloze 1 (1-O-acylované).^{14, 18, 19} Strukturní typy Cer jsou znázorněny na obrázku 4 (převzato z Rabionet a kol.¹⁸).

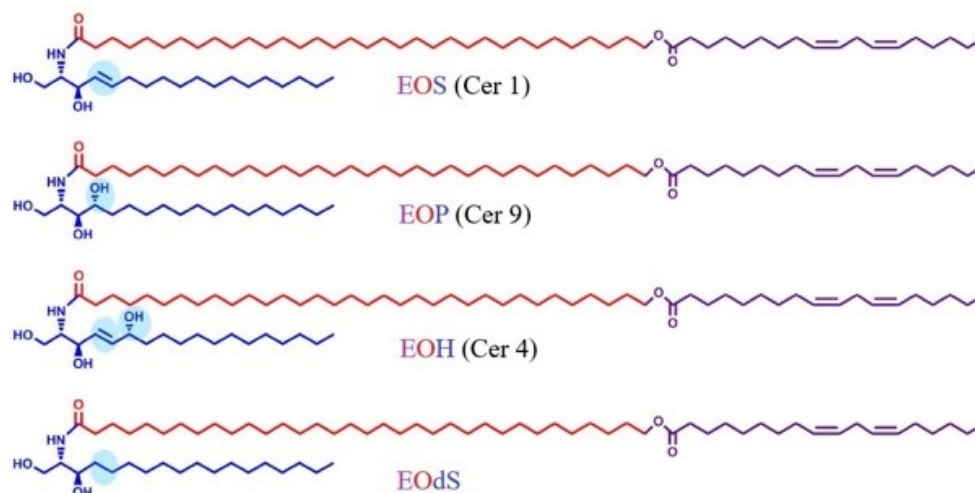
Nehydroxylované ceramidy



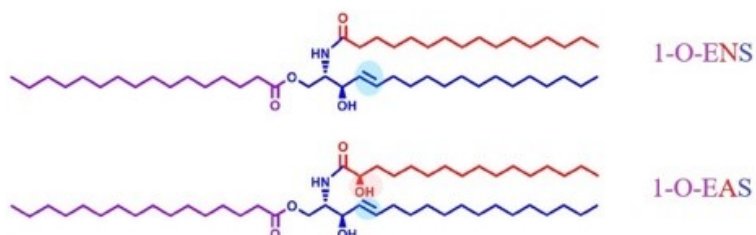
α -hydroxylované ceramidy



ω -esterifikované ceramidy



1-O-acylované ceramidy

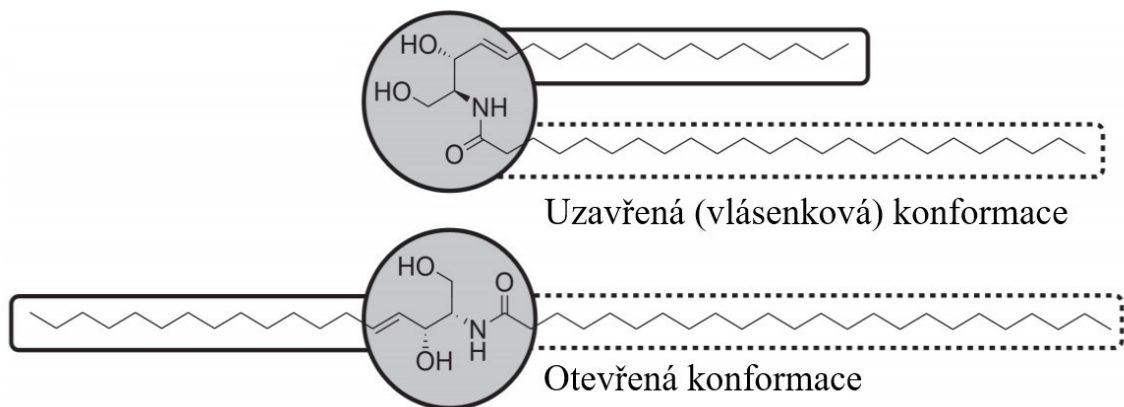


Obrázek 4. Strukturní typy Cer.

3.2.2 Uspořádání lipidů ve stratum corneum

3.2.2.1 Prostorové uspořádání (= konformace) ceramidů

Všechny typy Cer obsahují polární hlavu a dva lipidové řetězce, teoreticky se tak kromě různých přechodových konformací nachází ve dvou základních – uzavřené (vlásečkové) a otevřené konformaci. V otevřené konformaci jsou lipidové řetězce postaveny naproti sobě v jedné rovině. V uzavřené konformaci jsou oba lipidové řetězce orientovány paralelně vedle sebe.^{14, 20} Konformace znázorňuje obrázek 5 (převzato z Vávrová a kol.²¹).

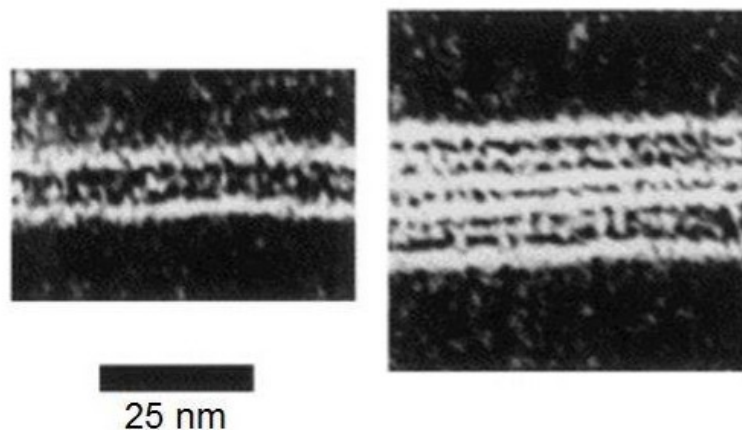


Obrázek 5. Konformace Cer – uzavřená a otevřená.

3.2.2.2 Lamelární uspořádání lipidů stratum corneum

Lipidy mezibuněčné hmoty SC jsou uspořádané do tzv. lamel, kterými jsou myšleny lipidové dvojvrstvy. Tyto dvojvrstvy vznikají vzájemným uspořádáním lipidových řetězců Cer (příp. FFA) a polárních částí Cer na základě slabých fyzikálních interakcí – van der Waalsových sil a vodíkových můstků. Předpokládá se otevřená konformace Cer, tudíž lamela má ve svém středu polární část molekuly a od ní se pak v rovině rozkládají dva lipidové řetězce (proto dvojvrstva). Do těchto lipidových konců mohou pronikat další Cer (příp. FFA), které se orientují podobným způsobem – vsunutím jejich lipidového řetězce se tak lamela rozšíří o další vrstvu.

Lamelární uspořádání mezibuněčných lipidů SC je možné zachytit elektronovou mikrofografií. Na principu elektronové hustoty se pak lipidová dvojvrstva jeví jako bílé pásy s vnitřní černou linií v jejím středu.^{14, 22, 23} (viz obrázek 6, převzato z Hill a kol.²⁴).

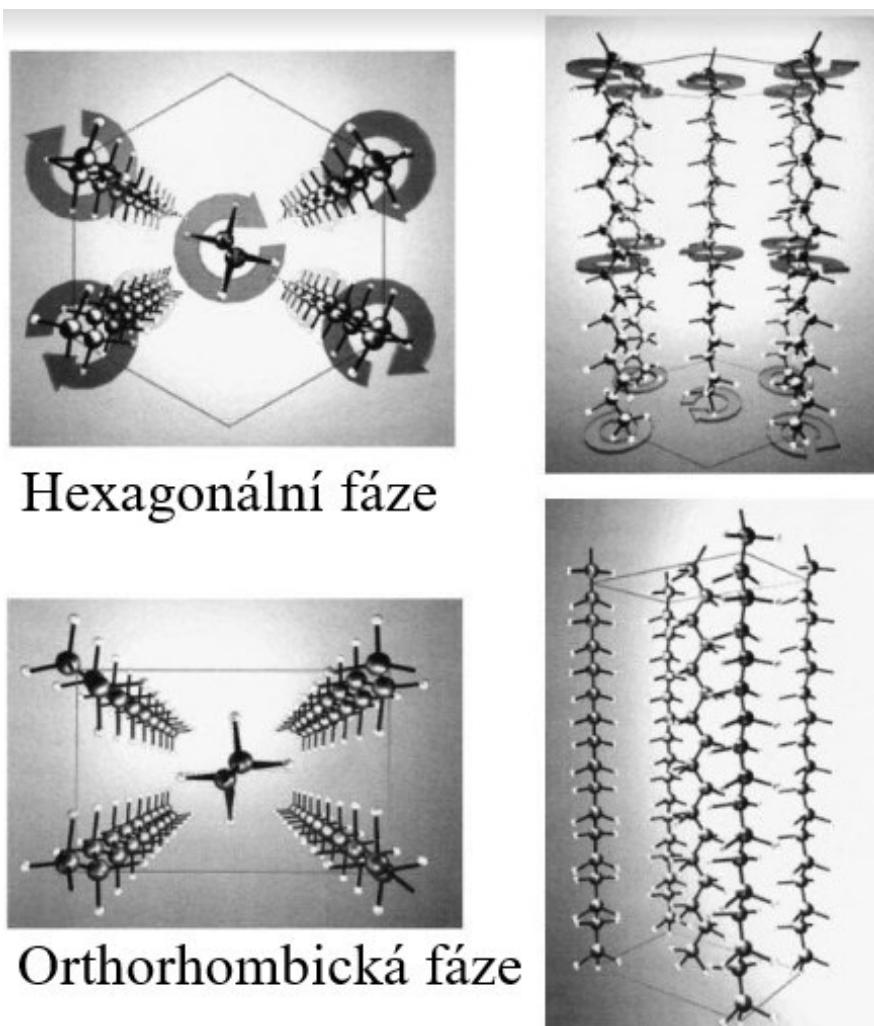


Obrázek 6. Lamelární uspořádání SC – 3 a 6 lamel mezi korneocyty zachycených pomocí metody elektronové mikroskopie.

Lipidové lamely jsou s korneocytem spojeny prostřednictvím lipidové obálky korneocyty. Ta je tvořena ω -hydroxylovanými Cer, které se přes svoji koncovou hydroxylovou skupinu kovalentně vážou na bílkoviny korneocyty. Předpokládá se, že tyto Cer pak vytváří vzor pro uspořádání do lamel pro další lipidy.^{14, 24}

3.2.2.3 Laterální uspořádání lipidů stratum corneum

Laterální uspořádání lipidů představuje těsnost lipidových řetězců uvnitř lamely. Tato organizace se může měnit vlivem vnějších podmínek, např. při zahřívání dochází k rozvolnění řetězců.²⁵ Velmi těsné laterální upořádání lipidů se nazývá orthorhombická fáze, pro kterou je charakteristické, že řetězce zaujímají tzv. cik-cak konformaci a jsou uspořádány do obdélníkové krystalické mřížky. Řetězce tak nemají možnost volné rotace. Částečná rotace řetězců je možná v šestiúhelníkové mřížce, která je typická pro volnější hexagonální fázi.^{14, 26} Obě fáze zachycuje obrázek 7 (převzato z Norlén, L.²⁶).



Obrázek 7. Laterální uspořádání lipidů – hexagonální a orthorhombická fáze.

3.3 Studium modelů uspořádání lipidů stratum corneum

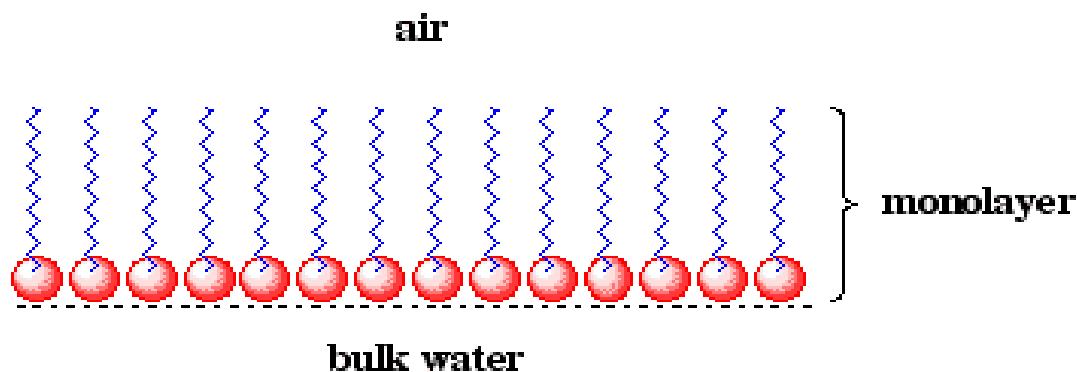
Uspořádání lipidů na molekulové úrovni je hodnoceno pomocí multivrstevných i monovrstevných modelů s využitím různých fyzikálních metod – infračervená spektroskopie, rentgenová difrakce apod.^{14, 27} Ke studiu se používají komerčně dostupné látky, lipidy syntetizované *de novo* nebo izolované z tkáňových štěpů lidských dárců, z kožní tkáně prasat či myší. Cer se izolují také z mozku hovězího dobytka a prasat a některé prekurzory Cer se získávají i z vajec.^{14, 28, 29}

3.3.1 Monovrstevné modely uspořádání lipidů stratum corneum

K hodnocení monovrstevného modelu lipidového uspořádání SC se používá technika Langmuirových monovrstev (LM) na rozhraní vzduch-kapalina a technika Langmuir-Blodgettové na rozhraní pevná fáze-vzduch. K detailnější charakterizaci monovrstevného filmu se používají vizualizační metody – Brewsterova úhlová mikroskopie (BAM), fluorescenční mikroskopie a další techniky (rentgenová difrakce, infračervená spektroskopie) popisující laterální uspořádání lipidových řetězců a interakce v oblasti polárních hlav Cer.^{14, 30-32}

3.3.1.1 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch – kapalina

Tato metoda je založena na schopnosti amfifilních molekul nerozpustných ve vodě vytvořit tenký film na rozhraní vzduch-kapalina. Tento film, zvaný Langmuirova monovrstva (LM, Viz obrázek 8, převzato z ilpi.com³³), bývá jen jednu molekulu tenký, hydrofilní část molekuly je obrácena směrem k polární fázi (neboli subfázi), hydrofobní část se orientuje směrem ven. Polární část molekuly musí být dostatečně hydrofilní, aby “ukotvila” molekuly k subfázi a nedošlo ke hromadění molekul.^{34, 35}



Obrázek 8. Langmuirova monovrstva (monolayer) z molekul, jejichž polární hlavičky směřují do subfáze (bulk water) a nepolární konce směrem do vzduchu (air).

3.3.2 Izotermy a fázové přechody

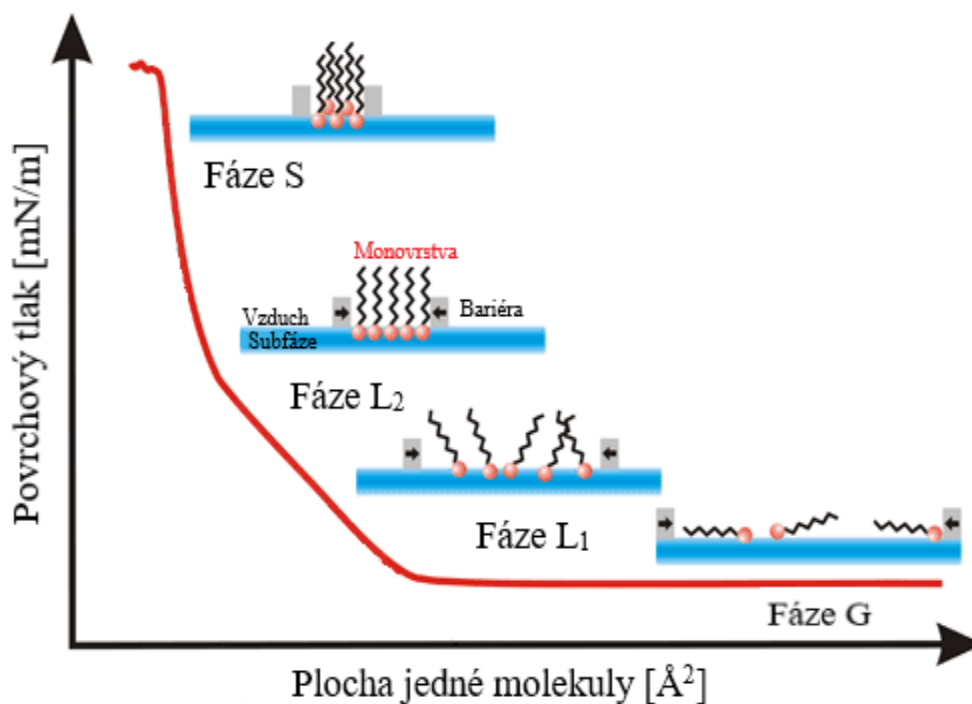
Výsledkem experimentální komprese monovrstev je π -A izoterma – graf závislosti povrchového tlaku (SP) na teoretické ploše jedné molekuly (Mma).¹⁷ Při kompresi procházejí monovrstvy fázovými změnami, které se na grafu projeví změnou sklonu a průběhu křivky. V každé fázi má monovrstva jiný stupeň kompresibility, rozlišujeme nejčastěji čtyři fáze.

G (gaseous) fáze není většinou pozorovatelná, vyskytuje se při velké ploše a malém SP, kdy molekuly jsou nezávislé a daleko od sebe podobně jako u plynných látek.

LE neboli L₁ (liquid-expanded) fáze nastává ve chvíli kdy SP začne růst, molekuly jsou nuceny dotýkat se jedna druhé a utvoří monovrstvu.

LC neboli L₂ (liquid-condensed) nastává po fázi plateau, jedná se o hlavní fázový přechod. Molekuly jsou v těsném uspořádání s malou možností pohybu.

S (solid) fáze je charakterizována strmou lineární křivkou, malou plochou a nízkou kompresibilitou, zvýšením SP může dojít ke kolapsu monovrstvy.^{14, 34, 35} Jednotlivé fáze zachycuje obrázek 9 (převzato z www.groups.ichf.edu.pl³⁶).



Obrázek 9. Graf závislosti povrchového tlaku na teoretické ploše jedné molekuly se znázorněnými fázemi G, L₁, L₂, S.

3.3.3 Brewsterova úhlová mikroskopie

BAM je metoda reflexní spektroskopie (viz obrázek 10, převzato z www.biolinscientific.com³⁷), jejímž principem je odraz polarizovaného světla. Pokud na povrch kapaliny dopadá paprsek polarizovaného světla pod určitým úhlem (cca 53°- Brewsterův úhel), neodráží se, prochází do kapaliny a obraz se jeví černý. V případě, že se na rozhraní vzduch-kapalina nachází monovrstva, paprsek se odrazí a je detekován jako světlé místo obrazu.^{31, 37}



Obrázek 10. Lom paprsku na rozhraní dvou prostředí (vzduch/kapalina) a jeho odraz od monovrstvy.

Díky BAM můžeme neinvazivně pozorovat monovrstvy v reálném čase během experimentu, zaznamenat a později hodnotit.³⁸

3.4 Vliv podmínek na Langmuirovy monovrstvy

Průběh izotermy významně ovlivňují vnější faktory, např. teplota či složení subfáze.

3.4.1 pH a pufry

Acidobazické reakce jsou založeny na disociaci (rozkladu) látek, které za určitých okolností uvolňují ionty H^+ a OH^- . Podle Brønsted–Lowryho teorie se látka, která poskytuje proton H^+ , nazývá kyselinou, a látka, která proton přijímá, zásadou (bází). Ještě jednodušší je teorie Lewisova, podle které je kyselinou látka, jež má volný elektronový orbital, báží pak látka s volným elektronovým párem. Reakce kyselin a zásad se nazývá neutralizace, vzniká při ní sůl reagující kyseliny a voda. Podle ochoty uvolnit proton do reakce rozlišujeme různé síly kyselin a zásad.³⁹⁻⁴¹

Abychom mohli kyselost roztoků měřit, byla zavedena stupnice pH. Jedná se o záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku. Hodnoty 0-7 odpovídají kyselému pH, 7-14 zásaditému.⁴²

K udržení konstantního pH používáme tzv. pufry. Jejich přítomnost v roztoku zvyšuje množství kyseliny či zásady, které je nutno dodat ke změně pH.⁴³

3.4.2 Vliv pH subfáze na Langmuirovy monovrstvy

Dle již dříve provedených studií bylo zjištěno, že určitý vliv pH na monovrstvy pravděpodobně má. Již začátkem minulého století se problematikou zabýval Schulman a Rideal⁴⁴. Později byly zkoumány molekuly sfingomyelinu⁴⁵, fosfatidylcholinu⁴⁶, dipalmitoylfosfatidylcholinu/cholesterolu⁴⁷. V prvních dvou případech byl proveden teoretický výpočet, který byl experimentálně potvrzen. Dále byly zkoumány karboxylové kyseliny, jejichž disociace by mohla mít vliv na tvorbu monovrstev. Například stearová kyselina (na rozdíl od oktadekanolu) se se zvyšujícím se pH stává rozpustnější a z rozhraní „uniká“ do subfáze.^{48, 49}

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a rozpouštědla

CerNS 24 (N-lignoceroylsfinosin) byl zakoupen od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Tenkovrstevné chromatografie byly prováděny na TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄, výrobce Merck. Další chemikálie a rozpouštědla v HPLC čistotě byly pořízeny od Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo). Ultračistá voda byla deionizována, destilována a filtrována systémem Millipore Q.

4.2 Přístrojové vybavení

Pro přípravu LM byla použita vana KN 2001 (small) KSV NIMA a software KSV NIMA (Kibron, Helsinky, Finsko).

Pro pozorování monovrstev Brewsterovým úhlovým mikroskopem byla použita vana KN 1003 (medium) KSV NIMA, mikroskop KSV NIMA MicroBAM a software KSV NIMA.

Pro kvantitativní analýzu lipidů SC byl použit Linomat V, horizontální vyvíjecí komora, Scanner 3 a software WinCats (vše Camag, Švýcarsko).

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Izolace lipidů ze stratum corneum a příprava vzorků

K izolaci byla použita lidská kůže z břicha pacientek, které podstoupily plastickou operaci v centru Sanus Hradec Králové. Použití lidské kůže bylo schváleno souhlasem Etické komise centra Sanus (No. 200609 S09P) a bylo s ní zacházeno v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Podkožní tuk byl opatrně odstraněn skalpelem, kůže byla opatrně otřena ubrouskem namočeným v acetonu, aby se odstranil kožní maz. Kůže byla omyta fosfátovým pufrem s gentamicinem a skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁰

Izolace SC byla provedena podle již dříve popsané metody.⁵¹ Zmrazená kůže byla před izolací volně rozmrazena, poté ponořena do vodní lázně o teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pomocí pinzet oddělena epidermis. Epidermis byla položena na hladinu roztoku trypsinu a inkubována 24 hodin při $32\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byly vatovou tyčinkou odstraněny trypsinem degradované zbytky epidermis a získané SC bylo krátce opláchnuto acetonem a ultračistou vodou, a nakonec vysušeno působením vakua v exsikátoru, jako sušidlo byl vždy použit parafín a oxid fosforečný.

Ze získaného SC byly extrahovány kožní lipidy sérií směsí chloroform:methanol v poměru 2:1, 1:1, 1:2 (v/v) vždy po dobu dvou hodin. Směs byla zfiltrována, rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a následně v exsikátoru.⁵²

Pomocí sloupcové chromatografie byly od směsi lipidů odděleny nečistoty. Podobný proces separace byl již dříve popsán.⁵³ Byly použity tři chromatografické kolony, jako mobilní fáze (MF) byly v následujícím pořadí použity směsi: chloroform:kyselina octová 99:1 (v/v), chloroform:methanol v poměru 100:1, 50:1, 10:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 (v/v), čistý methanol; chloroform:methanol v poměru 100:1, 50:1, 10:1, 3:1 (v/v) a hexan:ethylacetát 9:1 (v/v). Detekce byla provedena pomocí tenkovrstvé chromatografie za použití 4 standardů (kyseliny stearové 18C, CerNS 24, Chol a CholS) a derivatizací roztokem 1 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 2 g $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, 5 ml konc. H_2SO_4 , 100 ml H_2O . Po vyčištění bylo odpařeno rozpouštědlo pomocí rotační vakuové odparky, proudem dusíku a v exsikátoru.

Lipidy byly dále kvantitativně hodnoceny pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC), podle již validovaného postupu.⁵⁴

Pro přípravu vzorků k tvorbě LM byly lipidy rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) a přesná množství vzorku byla do vialek přenesena

za použití mikropipety, rozpouštědlo bylo odstraněno proudem dusíku, a jeho zbytky působením vakua v exsikátoru. Izolované lipidy byly skladovány při -20 °C.

4.3.2 Příprava lipidových směsí

V experimentech byla použita ekvimolární směs CerNS 24 (M_r 650,13 g/mol), Chol (M_r = 386,67 g/mol), lignocerové kyseliny (M_r = 368,64 g/mol) a CholS (M_r = 488,70 g/mol). Jednotlivé látky byly naváženy a naředěny v koncentraci 1 mg/ml a přesně vypočítané množství bylo přeneseno do vialek mikropipetou. Rozpouštědlo bylo odstraněno proudem dusíku, a jeho zbytky působením vakua v exsikátoru. Vzorky byly skladovány při -20 °C a před každým měřením rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) na koncentraci 1 mg/ml.

4.3.3 Příprava směsi kyselin

Byla použita směs FFA o délce acylového řetězce 16, 18, 20, 22, 24 C v poměru běžně se vyskytujícím v lidském SC⁵⁵, *tabulka 1*. Do každé vialky byl navážen 1 mg této směsi kyselin. Vzorky byly skladovány v lednici a před každým měřením rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) na koncentraci 1 mg/ml.

Tab. 1 Složení směsi kyselin

Délka acylového řetězce	Molární poměr [%]	Relativní molekulová hmotnost [g/mol]	Hmotnost [mg]
C 16	1,80	256,42	4,62
C 18	4,00	284,48	11,38
C 20	7,60	312,54	23,75
C 22	47,80	340,58	162,80
C 24	38,80	368,63	143,03

4.4 Příprava subfází

4.4.1 Příprava fosfátového pufru pH 7,4

Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním látek uvedených v *tabulce 2* v 1 litru ultračisté vody. Hodnota pH pufru byla zkontrolována pomocí pH metru se skleněnou elektrodou a případné odchylky cílového pH byly upraveny kyselinou fosforečnou nebo hydroxidem sodným. Před použitím byl pufr přefiltrován a mezi měřeními skladován v lednici.

Tab. 2 Složení fosfátového pufru

	mmol/l	g/l
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (156,0 g/mol)	2,0	0,312
NaHPO ₄ ·12H ₂ O (358,1 g/mol)	8,0	2,865
NaCl (58,4 g/mol)	137,0	8,000
KCl (74,6 g/mol)	2,7	0,201

4.4.2 Příprava vody pH 7,0

Byla použita ultračistá voda upravená systémem Millipore Q. Hodnota pH byla zkontrolována pomocí pH metru se skleněnou elektrodou a případné odchylky cílového pH byly upraveny přidavkem hydroxidu amonného. Před použitím byla voda přefiltrována a mezi měřeními skladována v lednici.

4.4.3 Příprava acetátového pufru pH 5,5 a pH 4,0

Oba acetátové pufrы byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny octové a chloridu sodného v ultračisté vodě. Složení jsou uvedena v *tabulce 3*, množství složek je uvedeno na 1 litr pufru. Hodnota pH byla zkontrolována pomocí pH metru se skleněnou elektrodou a případné odchylky cílového pH byly upraveny kyselinou octovou nebo roztokem amoniaku. Před použitím byl pufr přefiltrován a mezi měřeními skladován v lednici.

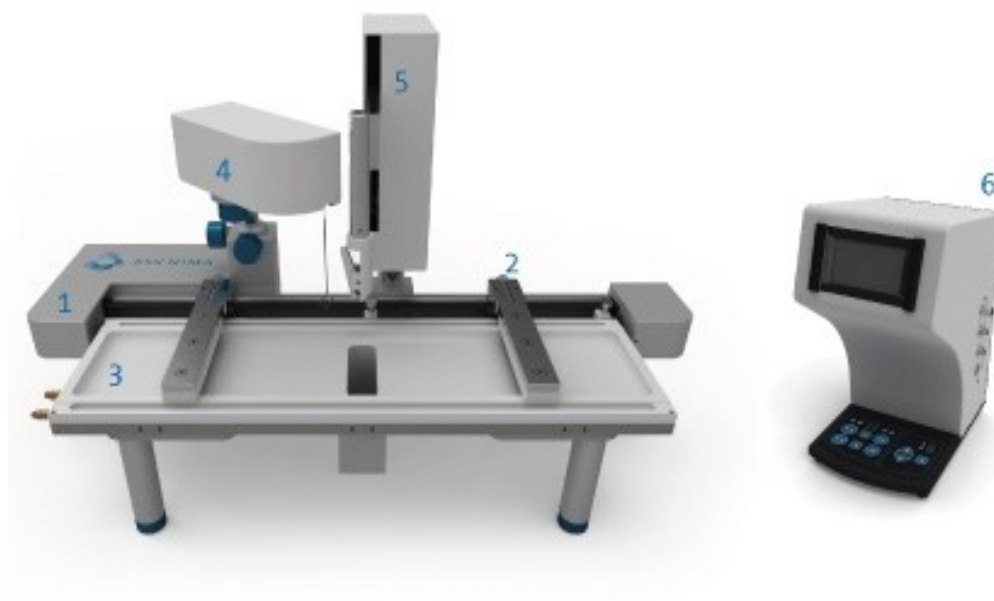
Tab. 3 Složení acetátových pufrů

	pH 5,5	pH 4,0
CH ₃ COOH	0,6 g	0,6 g
NaCl	8,5 g	8,9 g

4.5 Příprava monovrstevných modelů na rozhraní vzduch-kapalina

4.5.1 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina

K vytvoření monovrstev v laboratoři lze použít přístroj (viz obrázek 11, převzato z www.biolinscientific.com⁵⁶) sestávající se z mělké vany vyrobené z hydrofobního materiálu. Vana se naplní subfází, na kterou se mikrostříkačkou nanáší malé množství substance rozpuštěné v kapalině nemísitelné se subfází. Na okrajích vany jsou umístěny hydrofobní bariéry, jejichž posunem (ovládáno softwarem KSV Nima) dochází ke stlačení monovrstvy. Změny SP jsou měřeny platinovým plíškem částečně ponořeným do subfáze. V případě potřeby lze do kapaliny ponořit teplotní čidlo a temperovat ji na požadovanou teplotu.^{34, 35}



Obrázek 11. Přístroj k přípravě monovrstev.

1 - rám přístroje, 2 - bariéry, 3 - vanička, 4 - senzor SP, 5 - ponorný mechanismus pro nanášení vzorků na pevný podklad, 6 - spojovník se softwarem

Konkrétní subfáze byla nalita do čisté osušené vany (KN 2001; small), platinový plíšek měřící SP byl zavěšen tak, aby byl z poloviny ponořen. Bariéry byly umístěny do koncových poloh a do lázně bylo ponořeno čidlo termostatu.

Opakovaným přibližováním a oddalováním bariér bylo pipetou provedeno odsátí nečistot ulpívajících na hranách bariér. Tento postup byl opakován minimálně třikrát.

Kapalná subfáze byla vytemperována na 32 °C a na její povrch bylo pomocí mikrostříkačky rovnoměrně nanášeno 10 µl vzorku rozpuštěného ve směsi chloroform:methanol (3:1, v/v) o koncentraci 1 mg/ml.

Samotné měření proběhlo po odpaření rozpouštědla (přibližně 15-20 min) a vynulování SP. Byla nastavena konstantní rychlost bariér 20 mm/min a maximální hodnota SP 50 mN/m, popřípadě bylo měření ukončeno manuálně.

Mezi měřeními byly bariéry opláchnuty methanolem, čidlo, platinový plíšek a vana směsí chloroform:methanol (3:1, v/v) a osušeny.

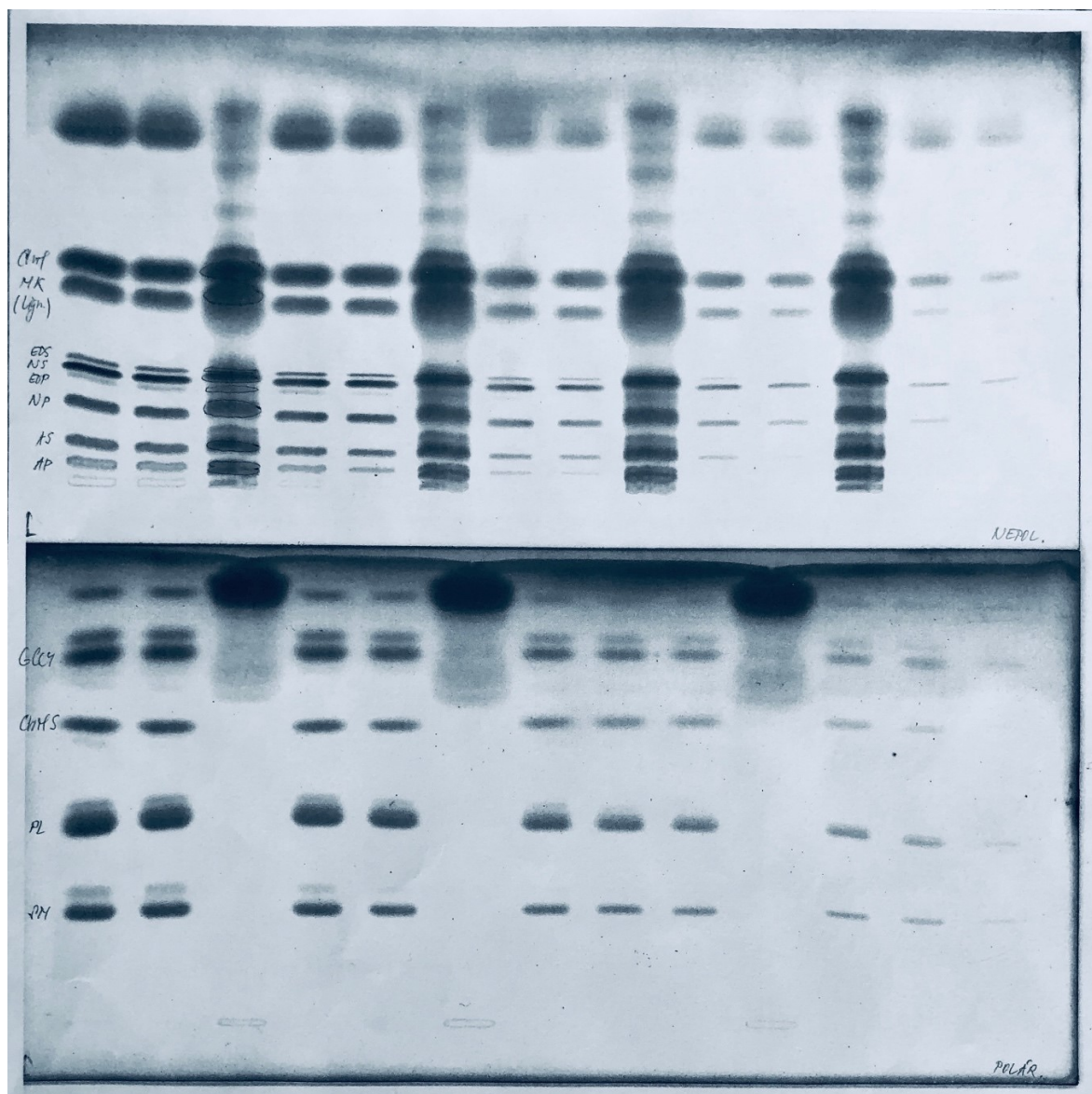
Přístroj byl umístěn v uzavřeném boxu na protiotřesovém stole a měření každé směsi proběhlo nejméně šestkrát.

4.5.2 Příprava monovrstev při použití Brewsterovy úhlové mikroskopie

Oproti výše uvedenému postupu byla použita větší vana (KN 1003; medium) a nanášeno větší množství vzorku (30 µl) stejné koncentrace. Před nalitím pufru byla ve prostřed vany umístěna odrazová destička a nad její zkosenou plochu laserový zdroj Brewsterova úhlového mikroskopu. Experiment probíhal při třech různých rychlostech bariér, a to 10; 2,5; 0,5 mm/min, za použití pufrů fosfátového o pH 7,4 a acetátového o pH 5,5.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie

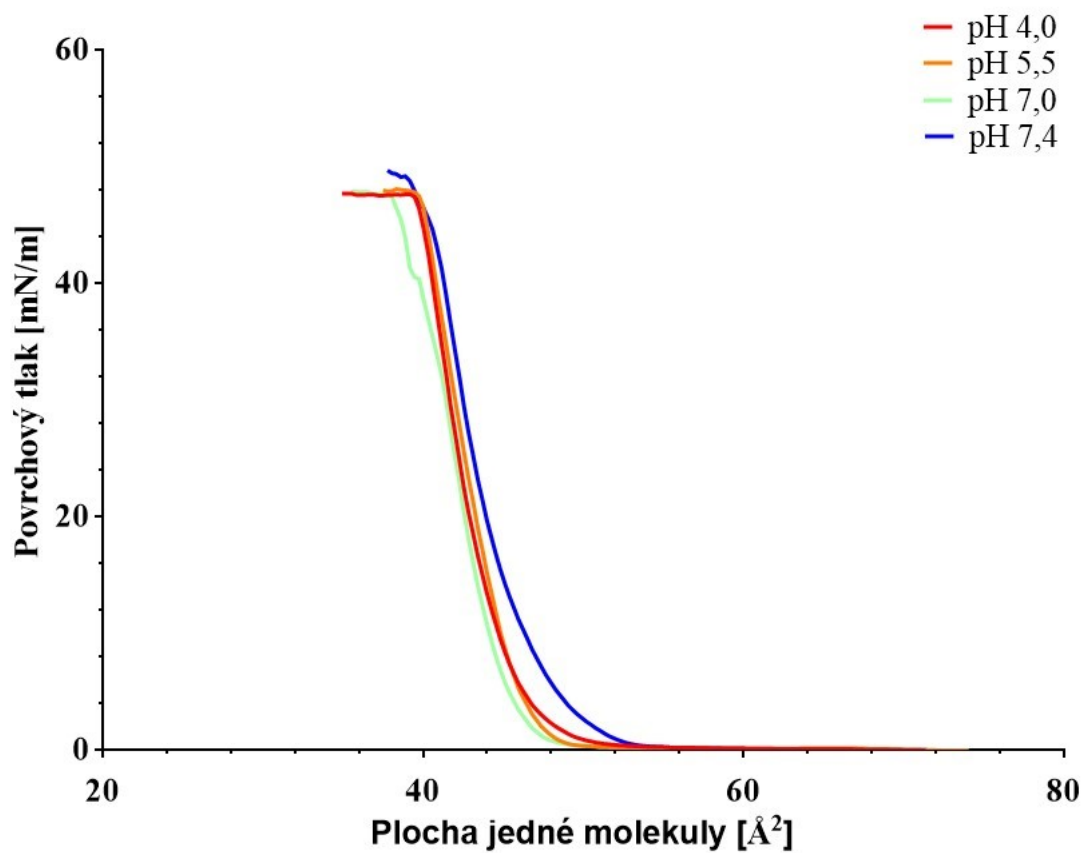


Obrázek 12. HPTLC analýza lipidů izolovaných ze SC.

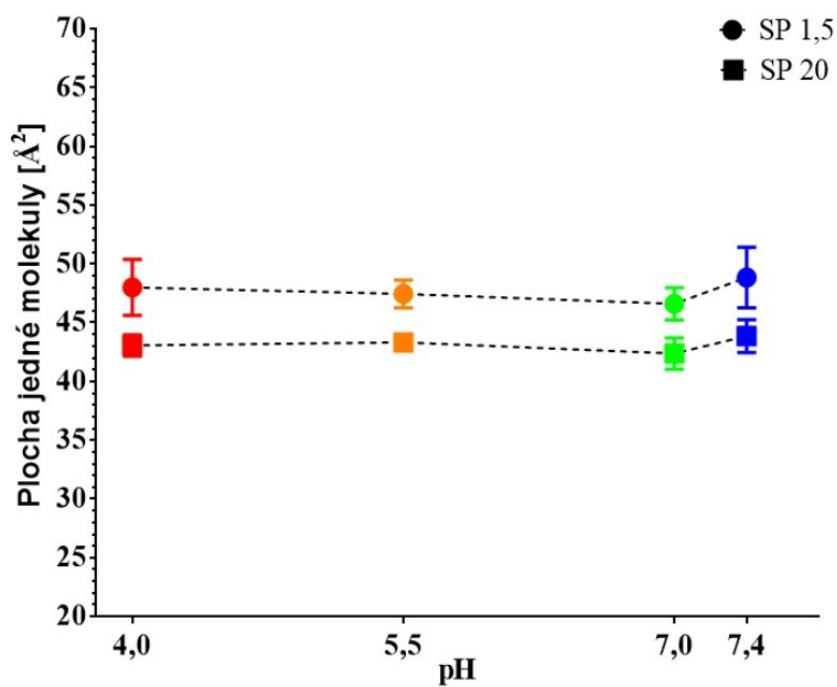
Na obrázku 12 můžeme vidět chromatogram analyzovaného vzorku lipidů SC (nejintenzivnější sloupečky skvrn) a standardů. Horní část obrázku zobrazuje chromatogram za použití nepolární mobilní fáze, kde byly jako standardy použity Chol, kyselina lignocerová a různé strukturní typy Cer (viz kapitola 3.2.1), ručně je dopsána jejich identifikace. Ve spodní části obrázku vidíme chromatogram s použitím polárnější mobilní fáze, jako standardy byly použity CholS, fosfolipidy (PL) a prekurzory Cer (GCer – glukosylovaný Cer, SM – sfingomyelin). Vzorky byly nastříkány se snižující se koncentrací, jak můžeme vidět se zmenšujícími se skvrnami zleva doprava.

5.2 Langmuirovy monovrstvy

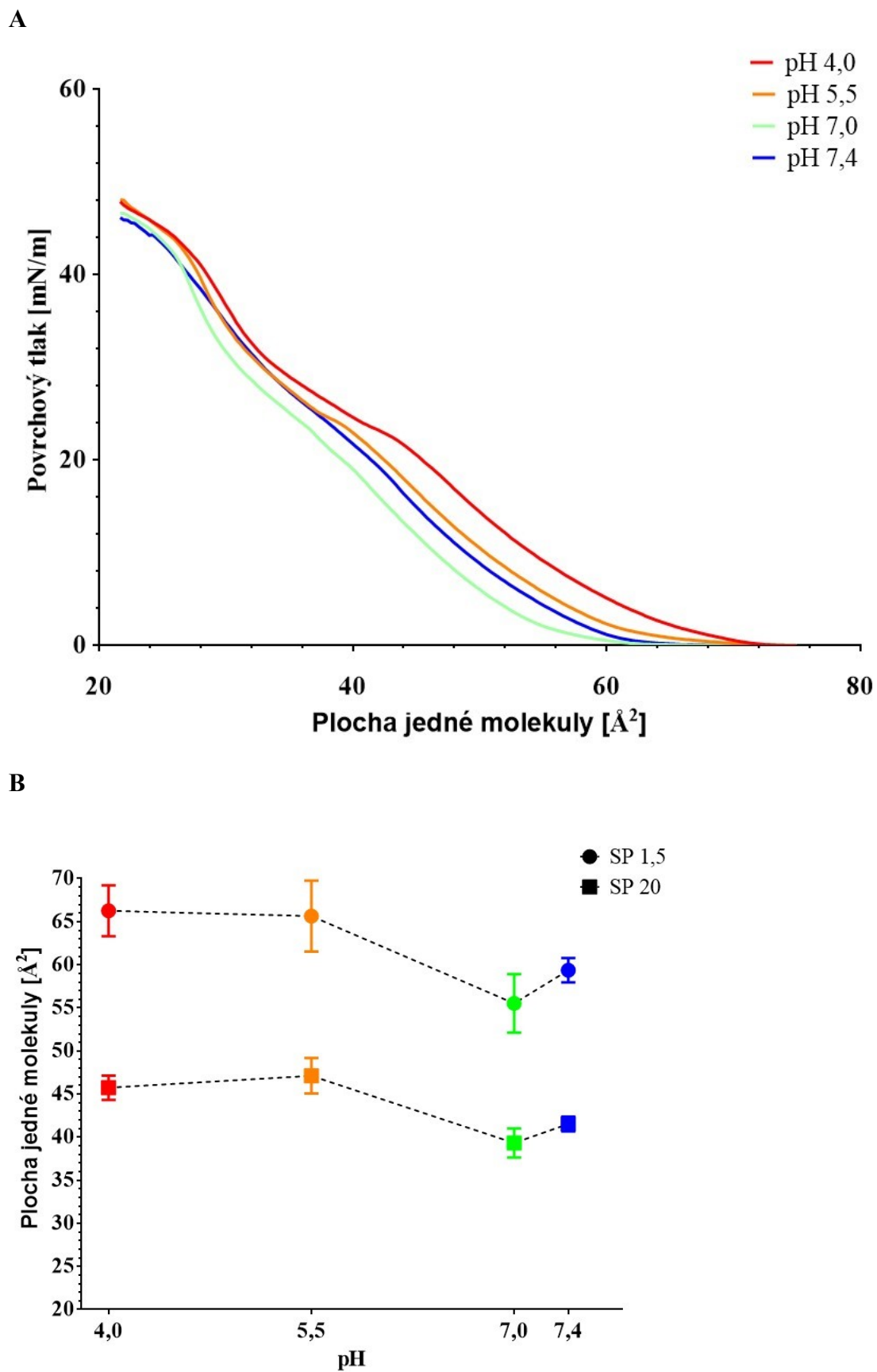
A



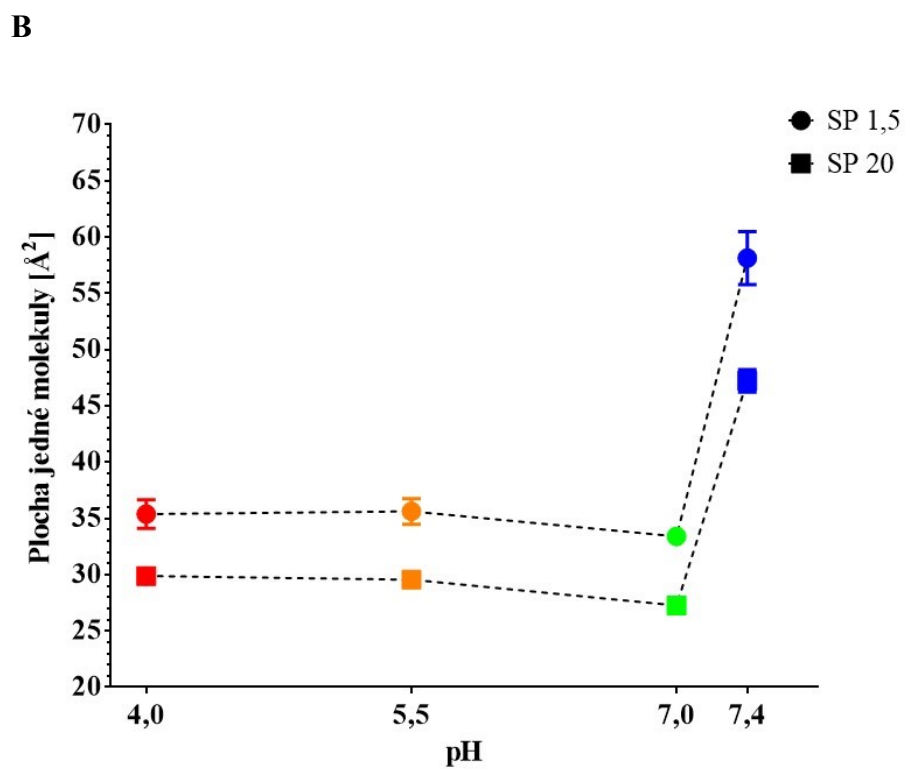
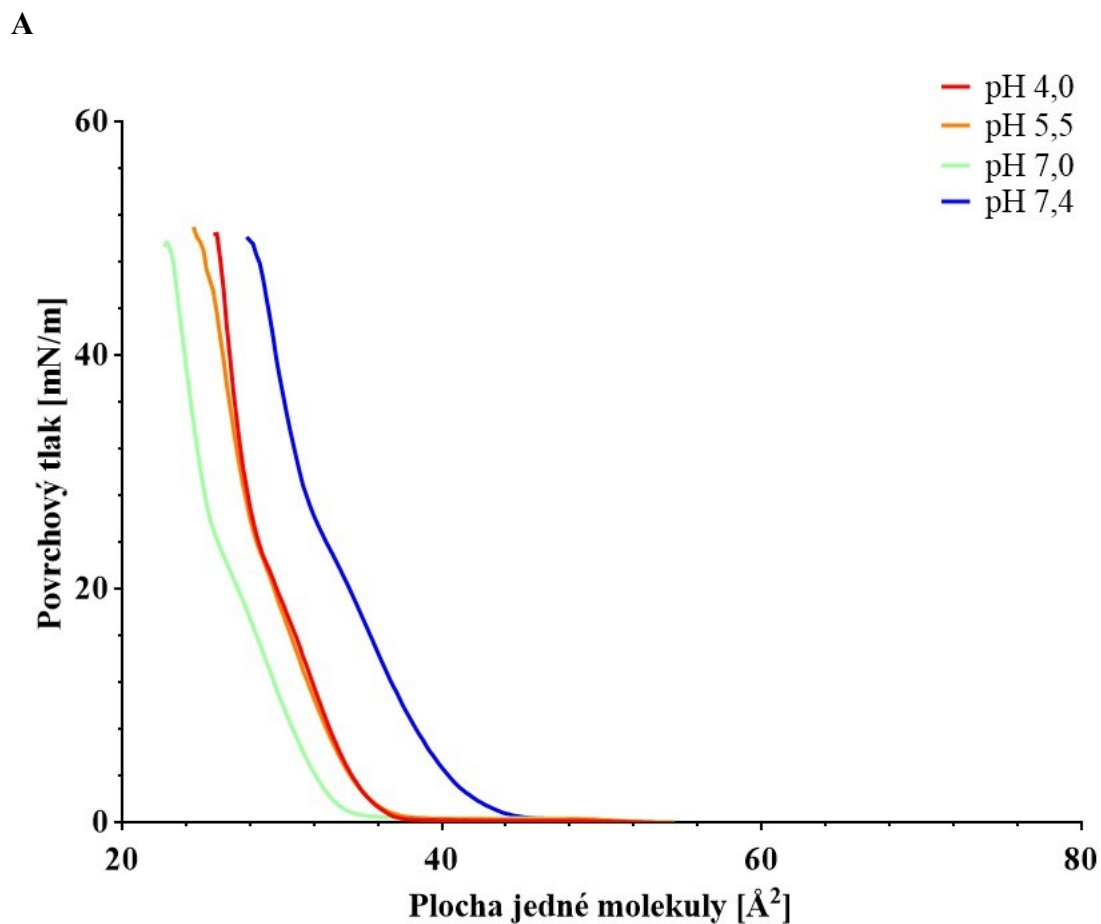
B



Obrázek 13. Lipidové směsi (mix) – panel A zobrazuje izotermy lipidových směsí, panel B hodnoty M_{ma} při SP 1,5 a 20 mN/m ($A_{1,5}$, A_{20}).



Obrázek 14. Lipidy SC (SC-mix) – panel A zobrazuje izotermy lipidů SC, panel B hodnoty $A_{1,5}$ a A_{20} .



Obrázek 15. Směs mastných kyselin (FFA-mix) – panel A zobrazuje izotermy směsi FFA, panel B hodnoty $A_{1,5}$ a A_{20} .

Panely A obrázků 13-15 zobrazují podle pH barevně odlišené izotermy lipidových směsí (mix), lipidů SC (SC-mix) a směsi FFA (FFA-mix).

Izotermy mix mají velmi podobný, stejně strmý průběh, který značí ochotu lipidů uspořádat se do monovrstvy. Fázové přechody nejsou přítomny, což je pravděpodobně způsobeno interakcí mezi molekulami.⁵⁷ Menší výchytku doprava vidíme u izotermy pH 7,4, podobně jako u FFA-mix, což může značit ionizaci kyselin, a jejich neschopnost se mísit s Chol (např. kyselina lignocerová).⁵⁸

Izotermy SC-mix stoupají velmi pozvolna, což naznačuje, že se uspořádávají do monovrstev méně ochotně než směsi připravené z jednotlivých složek. To se dá vysvětlit tím, že skladba lipidů izolovaných ze SC je mnohem komplexnější než složení laboratorně připravených vzorků. Nejpozvolnější je křivka při pH 4,0. Vidíme i náznak fázových přechodů. V literatuře byly nalezeny izotermy N-(9-*cis*-octadecanoyl)sphingosinu s podobným průběhem, ale posunuté na grafu doprava, takže s větší Mma.⁵⁹

U izoterm FFA-mix můžeme vidět posun v závislosti na pH. Nejvýraznější posun je u pH 7,4, což může být způsobeno disociací kyselin a jejich unikáním do subfáze, zvyšováním pH by byl únik ještě výraznější. Naproti tomu izoterma neutrálního pH je na grafu nejvíce posunutá vlevo, což značí těsnější uspořádání molekul. Zajímavé je, že izotermy při pH 4,0 a 5,5 jsou téměř identické.

Na panelech B obrázků 12-14 jsou zobrazeny Mma při SP 1,5 a 20 mN/m. Jak je z grafů patrné, při stejném SP zaujímají průměrně největší plochu molekuly lipidů SC. Na obrázku 14B směsi FFA-mix je dobře patrná větší Mma ($A_{1,5} = 58,1 \text{ \AA}^2$; $A_{20} = 47,2 \text{ \AA}^2$) při pH 7,4. Je zajímavostí, že tento trend se v menší míře vyskytuje u všech třech vzorků, nejmenší plochu vždy zabírají molekuly při neutrálním pH 7,0, největší při 7,4.

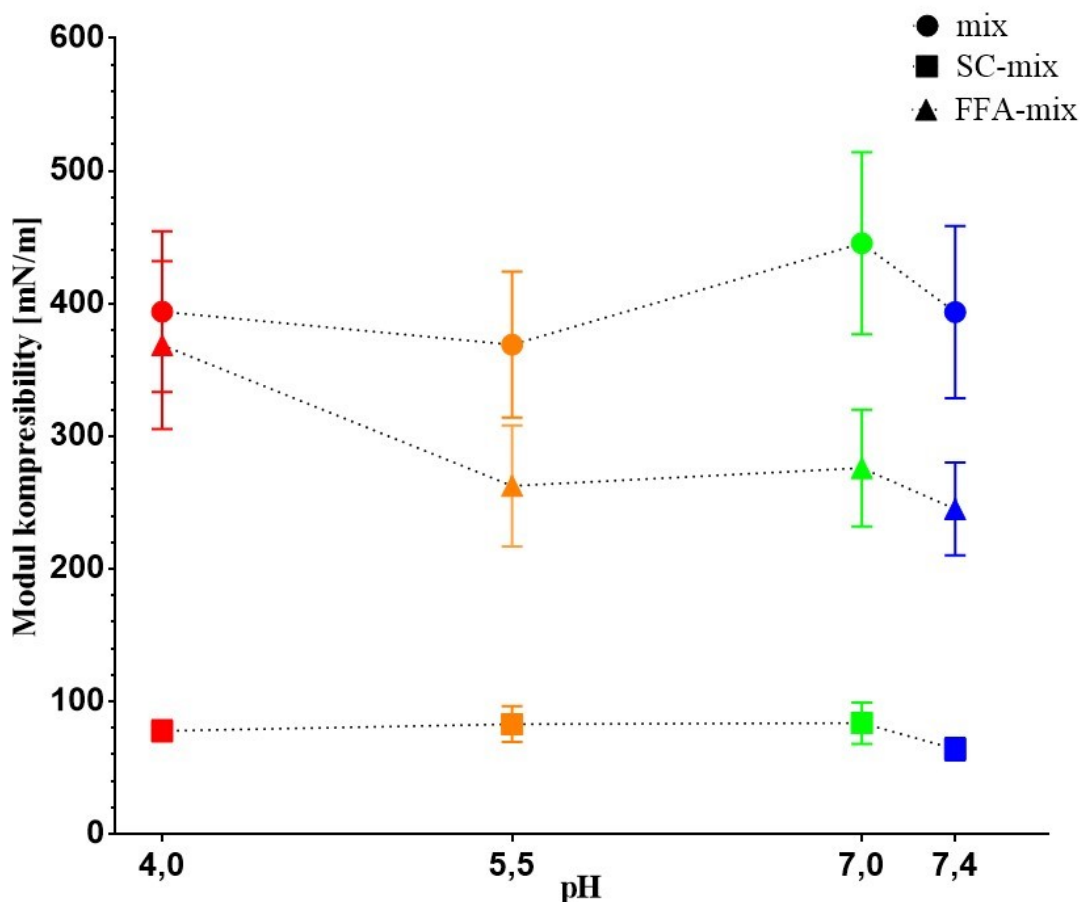
V předchozí studii⁶⁰ stejné lipidové směsi jako mix byla naměřena při SP 1,5 mN/m hodnota Mma $A_{1,5} = 36 \pm 2 \text{ \AA}^2$. To je hodnota vcelku rozdílná od $A_{1,5} = 46,6 \text{ \AA}^2$ (pH 7,0), která vyplývá z měření v této práci. Tento rozdíl může být způsoben právě odchylkou pH, kterou ve zmíněné studii udržovali v rozmezí 6,2-7,3, kvůli ionizaci FFA.⁶⁰

Předpokládali jsme, že pH kapalně subfáze bude mít vliv hlavně na tvorbu monovrstev FFA. Z výsledků ovšem vyplývá, že určitá závislost způsobená interakcemi se subfází se vyskytuje ve všech vzorcích.

Je překvapivé, že nejtěsnější uspořádání molekul nebylo zjištěno při pH kůže, tedy 5,5. Kyselé pH kožního povrchu je mj. dáváno do souvislosti s přirozeně se vyskytující

symbiotickou mikroflórou, pro kterou vytváří optimální podmínky. Kromě FFA se na pH nejsvrchnější vrstvy kůže podílejí také výměšky potních a mazových žláz, zejména kyselina mléčná a různé aminokyseliny.^{65,66}

5.3 Modul kompresibility



Obrázek 16. Moduly kompresibility (C_{\max}) všech tří vzorků – mix, SC-mix a FFA-mix.

C_{\max} je definován jako převrácená hodnota kompresibility (C_s), kterou získáme z π -A izotermy její derivací. Vypočítá se ze vztahu $C_s = (-1/A)/(dA/d\pi)$, ve kterém A je teoretická plocha jedné molekuly, π povrchový tlak, a dále platí, že $C_{\max} = C_s^{-1}$.

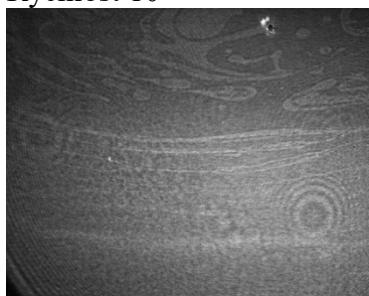
Čím těsněji jsou molekuly v monovrstvě uspořádány, tím vyšší hodnotu modulu kompresibility má, udává tedy míru stlačitelnosti, nebo naopak elasticity monovrstvy.^{61,62}

Nejvyšších hodnot C_{\max} dosahuje mix při pH 7,0, a to 445 mN/m. V literatuře⁶⁰ byla nalezena hodnota maximálního modulu kompresibility směsi stejného složení 508 mN/m při pH 6,2-7,3. Při neutrálním pH by nemělo docházet k ionizaci složek lipidového modelu. Eliminace molekulových interakcí tak může umožnit těsnější uspořádání složek modelu.

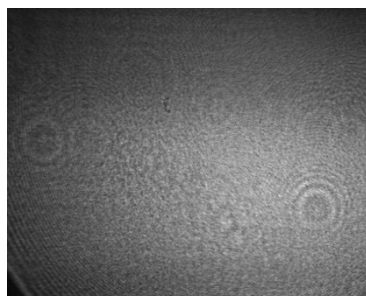
5.4 Hodnocení lipidových monovrstev Brewsterovým mikroskopem

A

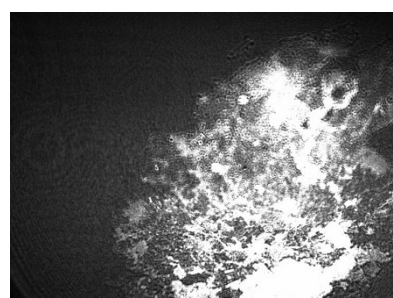
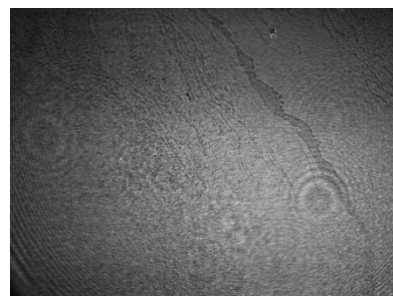
Rychlost 10



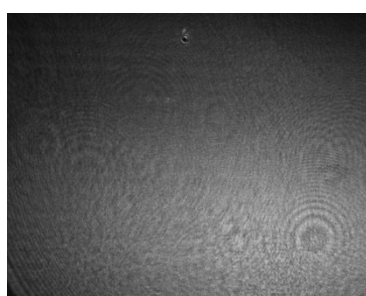
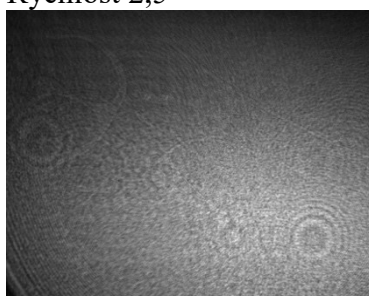
B



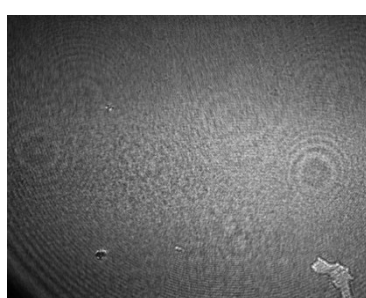
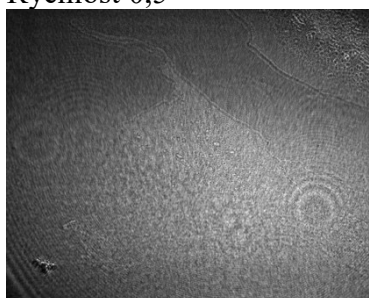
C



Rychlost 2,5

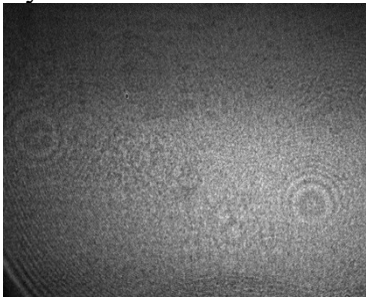


Rychlost 0,5

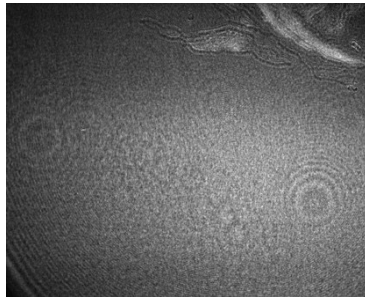


Obrázek 17. mix pH 5,5.

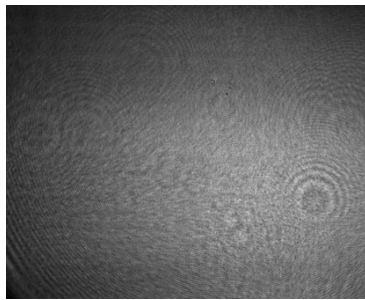
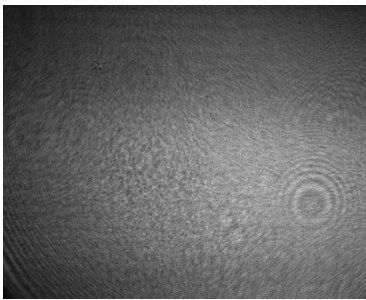
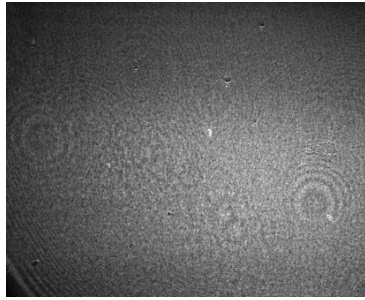
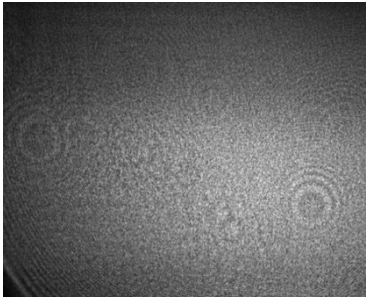
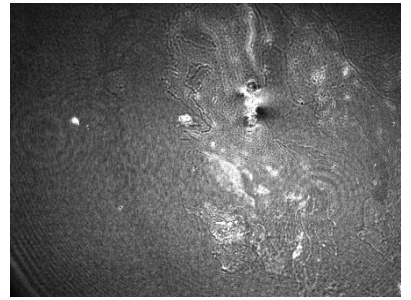
A
Rychlost 10



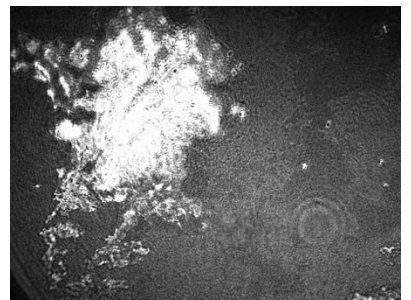
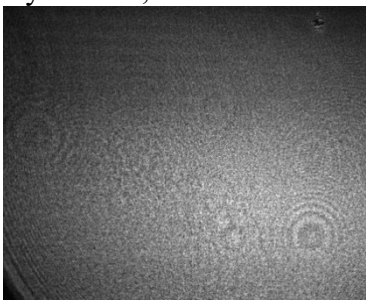
B



C



Rychlost 2,5

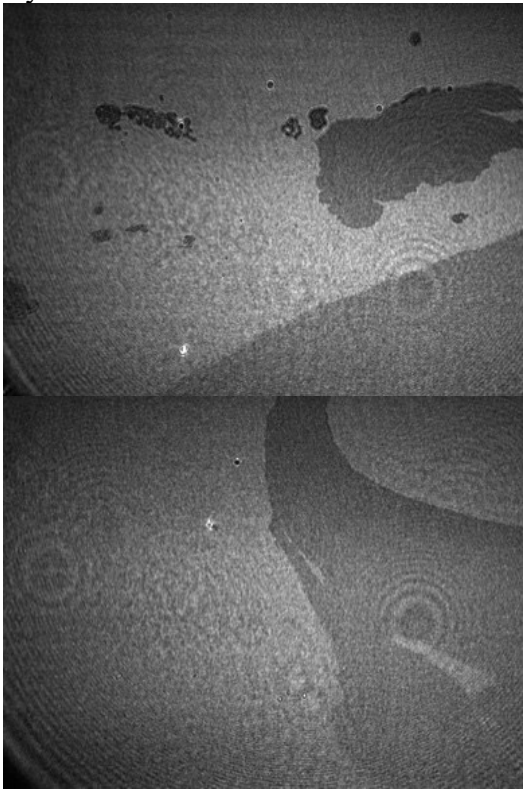


Rychlost 0,5

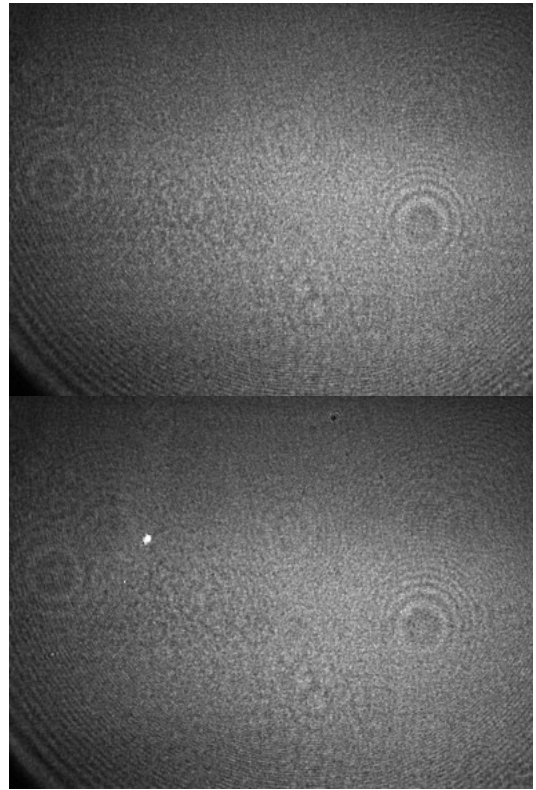


**Obrázek 18. SC-mix
pH 5,5.**

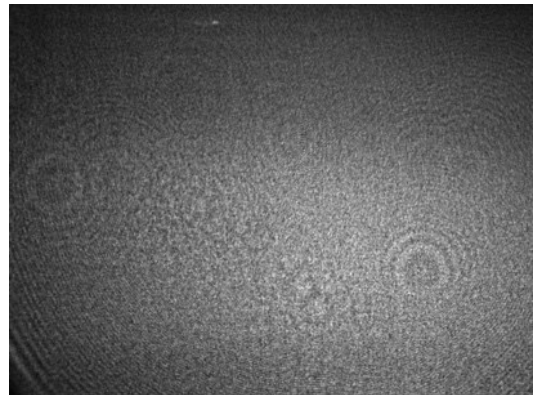
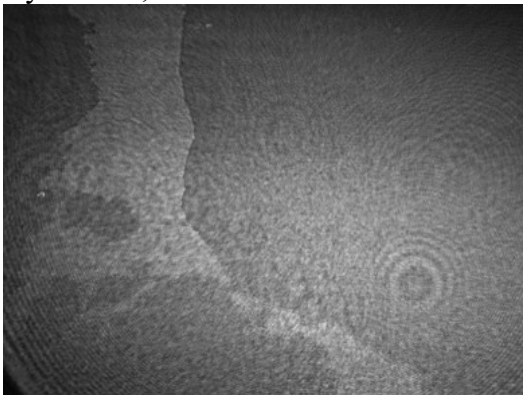
A
Rychlost 10



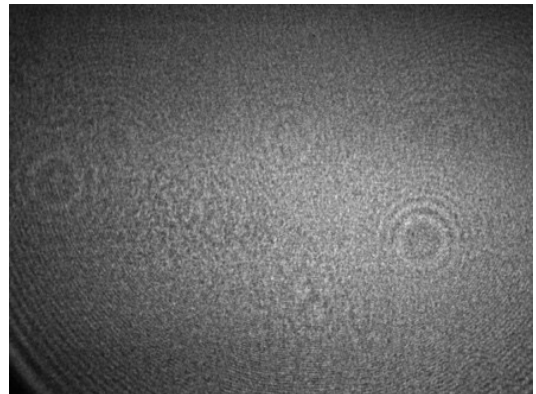
B



Rychlost 2,5

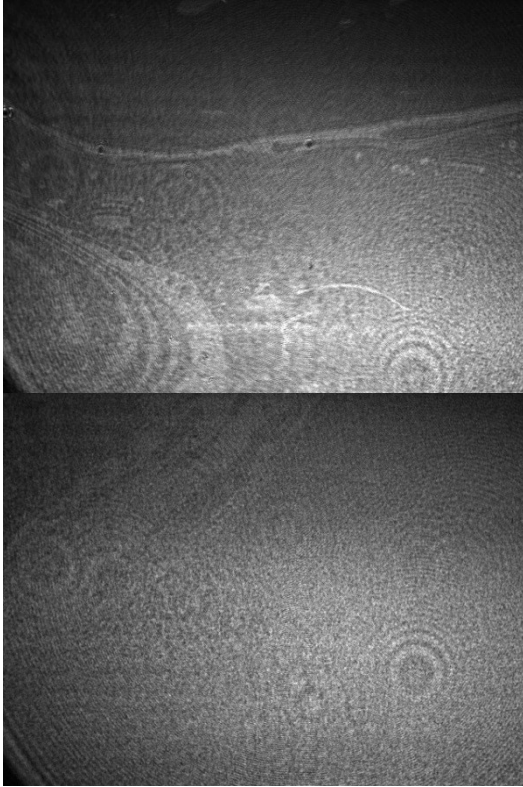


Rychlost 0,5

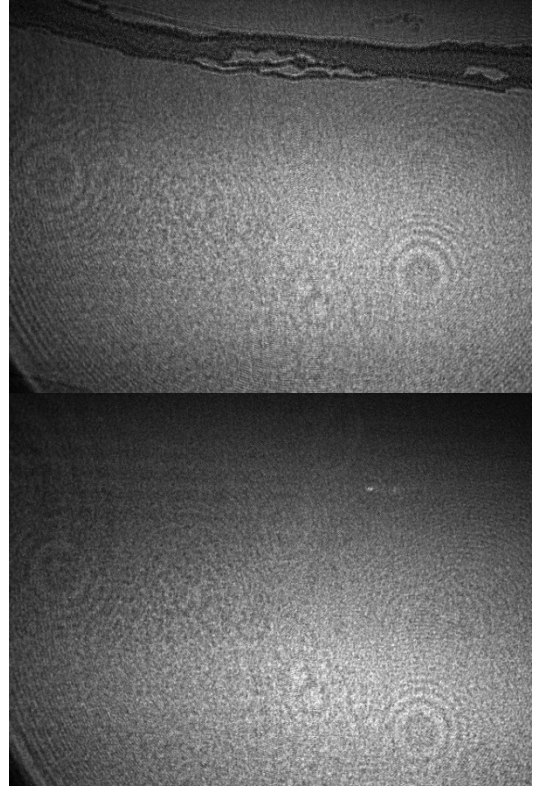


Obrázek 19. FFA-mix pH 5,5.

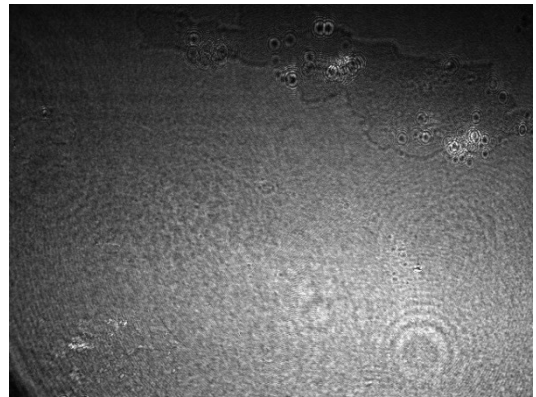
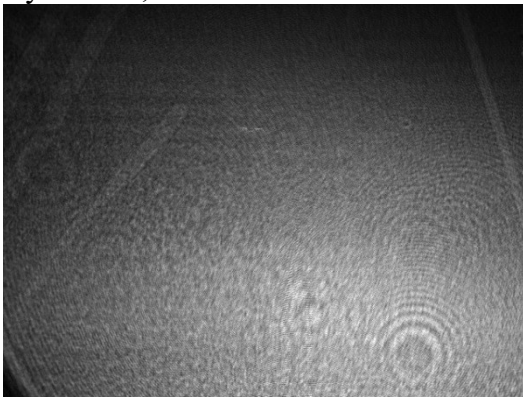
A
Rychlost 10



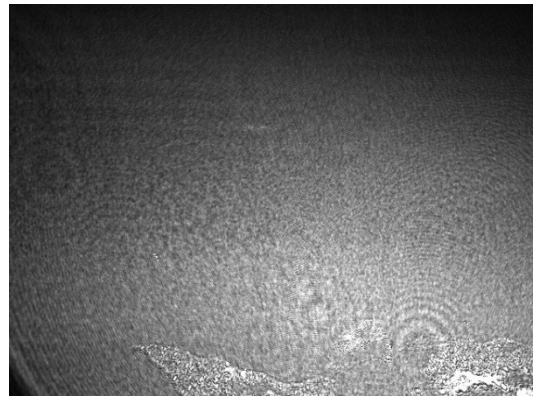
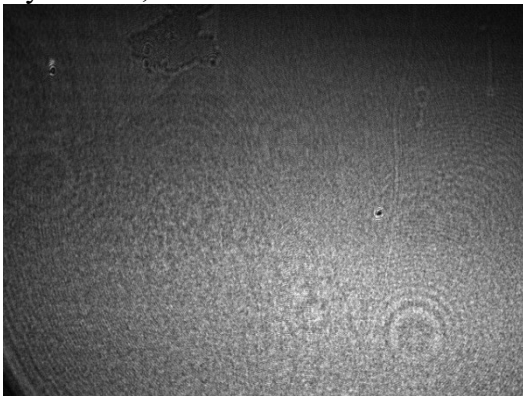
B



Rychlost 2,5

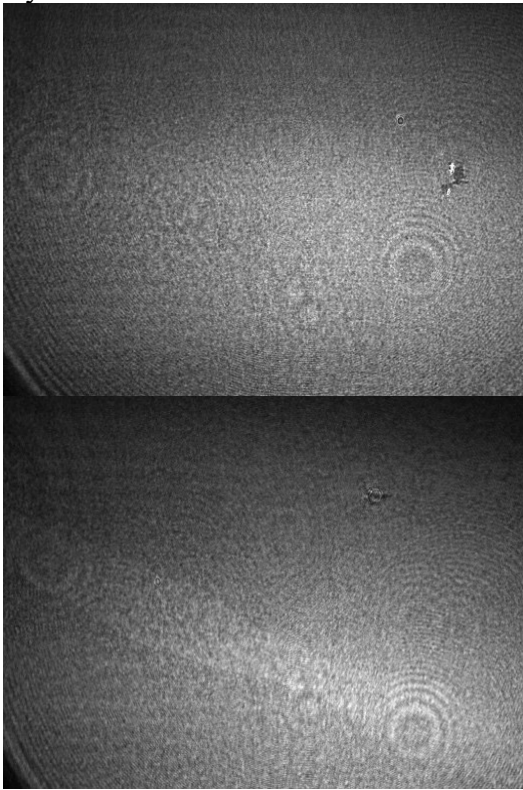


Rychlost 0,5

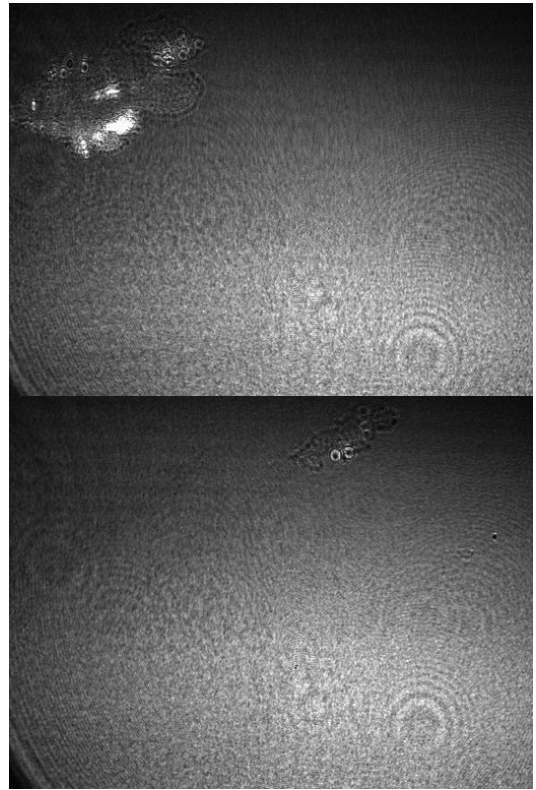


Obrázek 20. mix pH 7,4.

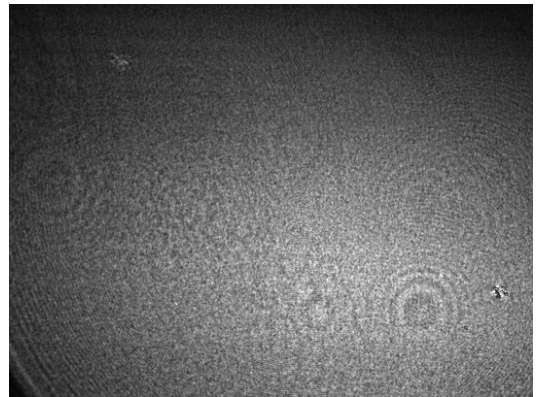
A
Rychlost 10



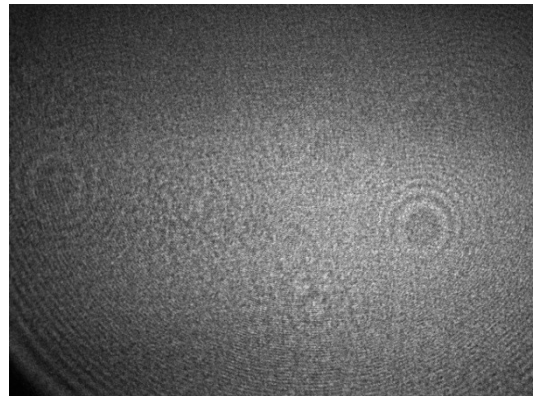
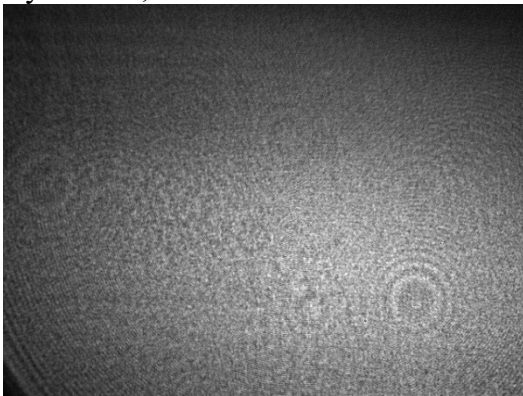
B



Rychlost 2,5

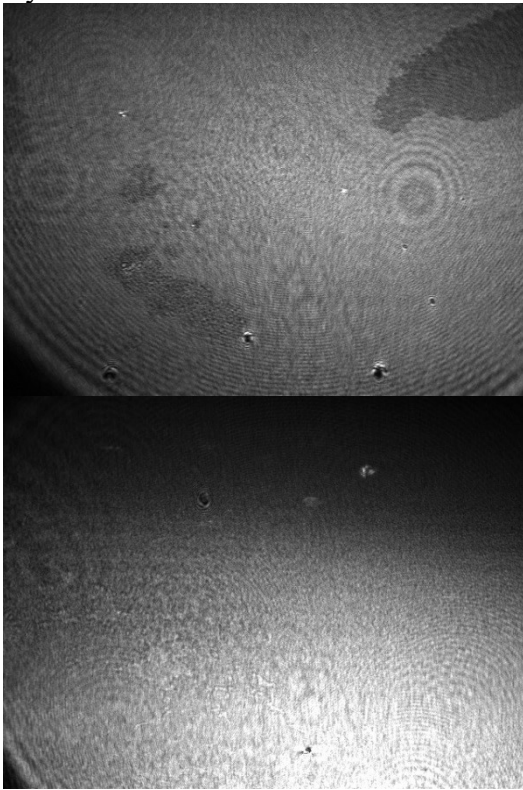


Rychlost 0,5

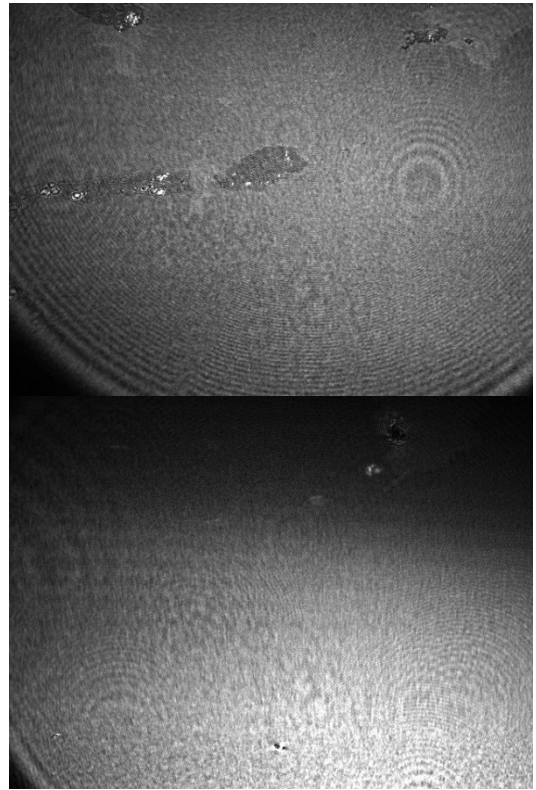


Obrázek 21. SC-mix pH 7,4.

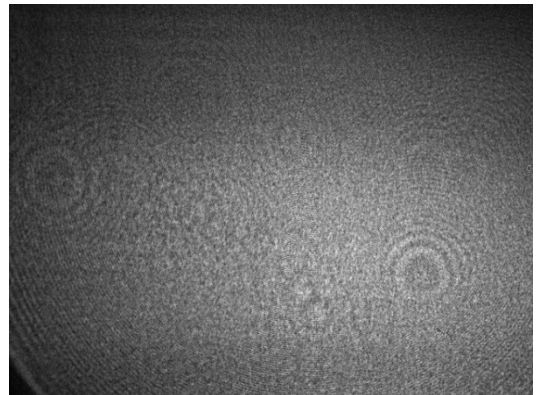
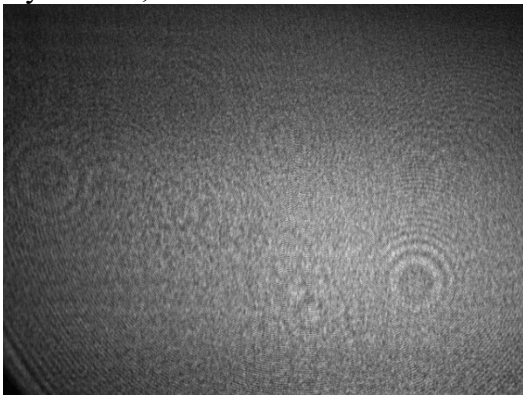
A
Rychlost 10



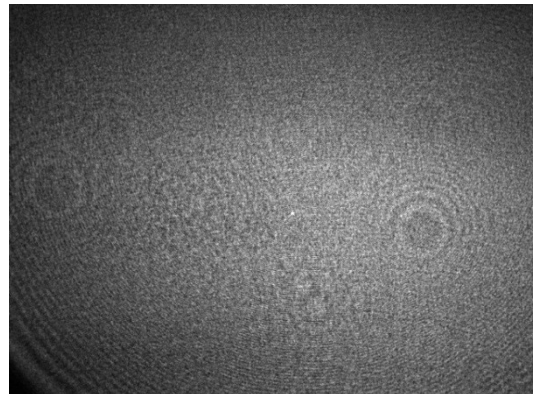
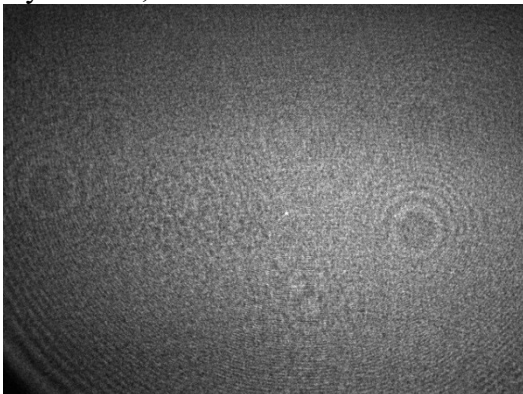
B



Rychlost 2,5



Rychlost 0,5



Obrázek 22. FFA-mix pH 7,4.

Na obrázcích 17-22 jsou zobrazeny snímky pořízené pomocí BAM. Při nízkém SP (1,5 mN/m – panely A) můžeme pozorovat rozvolněné světlé monovrstevné domény. Velmi dobře jsou viditelné u směsi FFA, a to při všech rychlostech komprese, ovšem pouze při pH subfáze 5,5. Při vyšším pH domény nejsou téměř viditelné, což je pravděpodobně způsobeno jejich disociací a tyto výsledky korelují s hodnotou M_{ma} , která je při tomto pH mnohem vyšší. Při SP 20 mN/m (panely B) se monovrstvy nacházejí ve velmi těsném uspořádání, tudíž na snímcích je rozdíl patrný jen málo. Pro zajímavost uvádím některé snímky i při vysokém SP 30 mN/m (panely C) kdy již došlo ke kolapsu a překlopení monovrstvy do vícevrstevných útvarů, které na snímcích můžeme pozorovat jako velmi světlé chaotické shluky molekul.^{63,64}

Metoda BAM měla, jako součást této práce, zejména metodický význam. Výsledky z měření byly použity pro doplnění.

6 Závěr

Uspořádání lipidů v nejsvrchnější vrstvě kůže je považováno za zásadní pro její bariérové vlastnosti. Ke studiu organizace kožních lipidů jsou používány různé modely. Na molekulární úrovni můžeme uspořádání lipidů hodnotit např. Langmuirovými monovrstvami na rozhraní vzduch-kapalina. Jedná se o velmi zjednodušený model, který nám však může pomoci blíže poznat mezimolekulární interakce lipidů zejména v oblasti polární hlavy Cer. Obměnou vlastností polární subfáze (kapaliny) můžeme také sledovat, do jaké míry budou mít tyto změny vliv na organizaci lipidů.

V této práci byl studován především vliv hodnoty pH kapalné subfáze na uspořádání monovrstvy lipidů SC. Použity byly směsi lipidů připravené z jednotlivých složek lipidů (mix) a také směs izolovaná z lidské kůže (SC-mix). Izolace lipidů byla taktéž součástí této práce.

Bylo zjištěno, že pH kapalné subfáze uspořádání lipidů do monovrstvy zásadním způsobem neovlivňuje. Přestože pH lidské kůže se pohybuje okolo hodnoty 5,5, lipidy v obou monovrstevných modelech (mix i SC-mix) nebyly za těchto podmínek nejtěsněji uspořádané. Největší ochotu k uspořádání do monovrstvy projevovaly lipidy při neutrálním pH 7,0, naopak při vyšším pH (7,4) molekuly zaujímaly větší plochu.

Důležitý vliv na uspořádání lipidů budou mít pravděpodobně mastné kyseliny, které byly součástí obou vzorků, a jejich chování ve vlastní směsi (FFA-mix) bylo pro srovnání také sledováno. Vliv pH na průběh izoterm FFA-mix vykazuje stejný trend jako směsi s ostatními lipidy. Příčinou tohoto chování mohou být mezimolekulární síly, které se uplatňují zejména v oblasti polárních hlav Cer a karboxylových konců MK. Dá se předpokládat, že s rostoucí hodnotou pH by uspořádanost lipidů klesala (hodnota pK_A MK se udává okolo 9-10).

7 Literatura

¹ TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.

² KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011, 800 s. ISBN 978-80-247-3068-4.

³ PETROVICKÝ, P. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi: III. Svazek*. Martin: Osveta, c2001, 542 s. ISBN 80-8063-045-3.

⁴ MEDLINE PLUS: *Skin layers* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/8912.htm>.

⁵ VÁVROVÁ, K.; HRABÁLEK, A. Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství*. 2006, **2**(2), 55-58. ISSN 1801-2434.

⁶ HRABÁLEK, A.; VÁVROVÁ, K. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství*. 2005, **1**(1), 8-11. ISSN 1801-2434.

⁷ ZHANG, S. *An atlas of histology*. New York: Springer, c1999. ISBN 0-387-94954-2.

⁸ DREAMSTIME: *Anatomy of the epidermis* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://www.dreamstime.com/stock-image-3d-anatomy-epidermis-image2872111>.

⁹ FLACH, C. R.; MENDELSON, R.; REREK, M. E.; MOORE, D. J. Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *Journal of physical chemistry*. 2000, **104**(9), 2159-2165. ISSN 0022-3654.

¹⁰ MIZUTANI, Y.; MITSUTAKE, S.; TSUJI, K.; KIHARA, A.; IGARASHI, Y. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. 2009, **91**(6), 784–790. ISSN 0300-9084.

- ¹¹ VAN SMEDEN, J.; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 295-313. ISSN 1388-1981.
- ¹² EUCERIN. *Jak kůže funguje*. [online]. [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>.
- ¹³ ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K. R. *Skin barrier*. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0-8247-5815-8.
- ¹⁴ ŠKOLOVÁ, B. *Syntéza a studium analogů ceramidů*. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.
- ¹⁵ BONCHEVA, M. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int J Cosmetic Sci* 2014, **36** (6), 505-515.
- ¹⁶ T'KINDT, R.; JORGE, L.; DUMONT, E.; COUTURON, P.; DAVID, F.; SANDRA, P.; SANDRA, K. Profiling and Characterizing Skin Ceramides Using Reversed-Phase Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2011, **84**(1), 403-411. ISSN 0003-2700.
- ¹⁷ UCHIDA, Y. Ceramide signaling in mammalian epidermis. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 453-462. ISSN 1388-1981.
- ¹⁸ RABIONET, M.; GORGAS, K.; SANDHOFF, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 422-434. ISSN 13881981.
- ¹⁹ WERTZ, P. W.; MIETHKE, M. C.; LONG, S. A.; STRAUSS, J. S.; DOWNING, D. T. The Composition of the Ceramides from Human Stratum-Corneum and from Comedones. *J Invest Dermatol*. 1985, **84** (5), 410-412. ISSN 0022 - 202X.

- ²⁰ CORKERY, R. W. The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloid Surface B*. 2002, **26** (1-2), 3-20.
- ²¹ VÁVROVÁ, K.; KOVÁČIK, A.; OPÁLKA, L. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, **64**(2), 28-35. ISSN 2453-6725.
- ²² 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), 714-718. ISSN 0022 - 202X.
- ²³ 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), 251-257. ISSN 0022 - 202X.
- ²⁴ HILL, J. R.; WERTZ, P. W. Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Bba-Biomembranes*. 2003, **1616** (2), 121-126. ISSN 0005-2736.
- ²⁵ ŠKOLOVÁ, B.; JANUŠOVÁ, B.; ZBYTOVSKÁ, J.; GOORIS, G.; BOUWSTRA, J.; SLEPIČKA, P.; BERKA, P.; ROH, J.; PALAT, K.; HRABÁLEK, A.; VÁVROVÁ, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir*. 2013, **29**(50), 15624-15633. ISSN 0743-7463.
- ²⁶ NORLÉN, L. Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J Invest Dermatol*. 2001, **117** (4), 830-836. ISSN 0022 - 202X.
- ²⁷ MCINTOSH, T. J.; STEWART, M. E.; DOWNING, D. T. X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: Reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry-Us*. 1996, **35** (12), 3649-3653.
- ²⁸ KOVÁČIK, A.; ROH, J.; VÁVROVÁ, K. The Chemistry and Biology of 6 - Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *Chembiochem* 2014, **15** (11), 1555-1562. ISSN 1439-4227.

²⁹ KLIGMAN, A. M.; CHRISTOPHEL, E. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch Dermatol.* 1963, **88** (6), 702-&. ISSN 0003-987 X.

³⁰ VOLLHARDT, D. Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Curr Opin Colloid In* 2014, **19** (3), 183-197.

³¹ MEUNIER, J. Why a Brewster angle microscope? *Colloid Surface A* 2000, **171** (1-3), 33-40.

³² BLODGETT, K. B. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of the American Chemical Society.* 1935, **57**, 1007-1022. ISSN 0002-7863.

³³ INTERACTIVE LEARNING PARADIGMS INCORPORATED:

SurfaceTension [online]. [cit.2019-04-15]. Dostupné z:

<http://www.ilpi.com/genchem/demo/tension/>.

³⁴ BARNES, G.; GENTLE, I. Interfacial science: an introduction. 2nd ed. New York: Oxford University Press, c2011. ISBN 978-0-19-957118-5.

³⁵ CRUZ, A.; PÉREZ-GIL, J. Langmuir Films to Determine Lateral Surface Pressure on Lipid Segregation. DOPICO, Alex M., ed. *Methods in Membrane Lipids*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, 439-457. *Methods in Molecular Biology*TM. ISBN 978-1-58829-662-7.

³⁶ *INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ: Kutner Group* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z:

<Http://groups.ichf.edu.pl/kutner/research/view?id=25&name=Organized+ultrathin+film+of+organic+and+organic-inorganic+hybrid+materials+for+chemical+sensors>.

³⁷ *BIOLIN SCIENTIFIC: Brewster Angle Microscopy* [online]. [cit. 2019-04-15].

Dostupné z: <https://www.biolinscientific.com/measurements/brewster-angle-microscopy>.

- ³⁸ NOVÁČKOVÁ, A. *Studium poruch kožní bariéry pomocí lipidových monovrstev*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.
- ³⁹ UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI: *Katedra fyzikální chemie* [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: fch.upol.cz/wpcontent/uploads/2015/07/chemicke_reakce.pdf.
- ⁴⁰ SEDMIDUBSKÝ, D. *Základy chemie pro bakaláře*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011. 125 s. ISBN 978-80-7080-790-3.
- ⁴¹ INFORMAČNÍ SYSTÉM MASARYKOVY UNIVERZITY. *Teorie kyselin a zásad*. [online]. [cit.2019-04-29]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/C8720/um/TEORIE_KYSELIN_A_ZASAD.pdf.
- ⁴² KHANACADEMY [online]. [cit.2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/water-acids-and-bases/acids-bases-and-ph/a/acids-bases-ph-and-buffers>.
- ⁴³ SIGMA-ALDRICH [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/bioultra-reagents/biological-buffers.html>.
- ⁴⁴ SCHULMAN, J. H.; RIDEAL, E. K. On the Surface Potentials of Unimolecular Films of Long Chain Fatty Acids. Part III. The Potentials of Solid, Liquid Condensed and Double Layer Films. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1931, **130**(813), 284-294. ISSN 1364-5021.
- ⁴⁵ PETELSKA, A. D.; NAUMOWICZ, M.; FIGASZEWSKI, Z. A. Influence of pH on Sphingomyelin Monolayer at Air/Aqueous Solution Interface. *Langmuir*. 2012, **28**(37), 13331-13335. ISSN 0743-7463.

- ⁴⁶ BRZOZOWSKA, I.; FIGASZEWSKI, Z. A. The influence of pH on phosphatidylcholine monolayer at the air/aqueous solution interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003, **27**(4), 303-309. ISSN 09277765.
- ⁴⁷ GONG, K.; FENG, S. S.; GO, M. L.; SOEW, P. H. Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air–water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2002, **207**(1-3), 113-125. ISSN 09277757.
- ⁴⁸ MCNAMEE, C. E.; KAPPL, M.; BUTT, H. J.; NGUYEN, H.; SATO, S.; GRAF, K.; HEALY, T.W. Effect of the Degree of Dissociation of Molecules in a Monolayer at an Air/Water Interface on the Force Between the Monolayer and a Like-Charged Particle in the Subphase. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, **116**(46), 13731-13738. ISSN 1520-6106.
- ⁴⁹ SHAH, D. O. The effect of buffer ions on stearic acid monolayers in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1970, **32**(4), 570-576. ISSN 00219797.
- ⁵⁰ PULLMANNOVÁ, P.; STAŇKOVÁ, K.; POSPÍŠILOVÁ, M.; ŠKOLOVÁ, B.; ZBYTOVSKÁ, J.; VÁVROVÁ, K. Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2014, **1838**(8), 2115-2126. ISSN 00052736.
- ⁵¹ KLIGMAN, A. M. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of Dermatology*. 1963, **88**(6). ISSN 0003 - 987X.
- ⁵² BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction AND purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959, **37**(8). ISSN 0576-5544.
- ⁵³ BOUWSTRA, J.A.; GOORIS, G.S.; CHENG, K.; WEERHEIM, A.; BRAS, W.; PONEC, M. Phase behavior of isolated skin lipids, *J. Lipid Res.*, **37** (1996), 999-1011. ISSN 0022-2275.

- ⁵⁴ VÁVROVÁ, K.; HENKES, D.; STRÜVER, K. et al. Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014, **134**(3), 746-753. ISSN 0022202X.
- ⁵⁵ GROEN, D.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir*. 2010, **26**(6), 4168-4175. ISSN 0743-7463.
- ⁵⁶ *BIOLIN SCIENTIFIC: Langmuir & Langmuir blodgett* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: <https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett>.
- ⁵⁷ DOLÁKOVÁ, A. *Štúdium monovrstevných lipidových modelov ochorení kožnej bariéry*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.
- ⁵⁸ SPARR, E.; EKELUND, K.; ENGBLOM, J.; ENGSTRÖM, S.; WENNERSTRÖM, H. An AFM Study of Lipid Monolayers. 2. Effect of Cholesterol on Fatty Acids. *Langmuir*. 1999, **15**(20), 6950-6955. ISSN 0743-7463.
- ⁵⁹ LÖFGREN, H.; PASCHER, I. Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1977, **20**(4), 273-284. ISSN 00093084.
- ⁶⁰ PULLMANNOVÁ, P.; PAVLÍKOVÁ, L.; KOVÁČIK, A. et al. Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophysical Chemistry*. 2017, **224**, 20-31. ISSN 03014622.

⁶¹ MIHALOVÁ, V. *Studium kožních onemocnění pomocí monovrstevných lipidových modelů*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

⁶² MCINTOSH, T. J. *Lipid Rafts*. Totowa, New Jersey: *Humana Press Inc.*, 2010, 41-58.

⁶³ PATTERSON, M.; VOGEL, H. J.; PRENNER, E. J. Biophysical characterization of monofilm model systems composed of selected tear film phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016, **1858**(2), 403-414. ISSN 00052736.

⁶⁴ CATAPANO, E.R.; ARRIAGA, L.R.; ESPINOSA, G.; MONROY, F.; LANGEVIN, D.; LÓPEZ-MONTERO, I. Solid Character of Membrane Ceramides: A Surface Rheology Study of Their Mixtures with Sphingomyelin. *Biophysical Journal*. 2011, **101**(11), 2721-2730. ISSN 00063495.

⁶⁵ LAMBERS, H.; PIESENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, H.; FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006, **28**(5), 359-370. ISSN 0142-5463.

⁶⁶ SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006, **19**(6). ISSN 1660-5527.