

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Skin Barrier Research Group



**STUDIUM VOLNÝCH
SFINGOIDNÍCH BÁZÍ V KOŽNÍ
BARIÉŘE**

Diplomová práce

Zuzana Jarešová

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

Konzultant: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za jeho vedení, odborný a zároveň přátelský přístup, pomoc a cenné rady při experimentální činnosti a následném zpracování diplomové práce. Poděkování patří také mému konzultantovi PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D., a pak dalším členům výzkumné skupiny *Skin Barrier Research Group*. Dále děkuji ostatním pracovníkům Katedry organické a bioorganické chemie nebo Katedry farmaceutické technologie, kteří mi v průběhu práce vždy poskytli pomocnou ruku.

Tato studie proběhla za podpory Grantové agentury ČR (GAČR 19-09135J) a Univerzity Karlovy (SVV 260 547).

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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2021

Zuzana Jarešová

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: *Zuzana Jarešová*

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

Konzultant: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Název diplomové práce: **STUDIUM VOLNÝCH SFINGOIDNÍCH BÁZÍ V KOŽNÍ BARIÉŘE**

Kožní bariéra, lokalizována ve *stratum corneum* (SC), se skládá z korneocytů a intercelulární matrix tvořené třemi základními typy lipidových molekul – ceramidy, volnými mastnými kyselinami a cholesterolem, zastoupenými v ekvimolárním poměru. Celkové uspořádání lipidů je organizované a velmi specifické.

Ceramidy jsou strukturně tvořeny acylem mastné kyseliny, připojeným na sfingoidní bázi. V malém, ale nezanedbatelném množství lze však v kožní bariéře nalézt i volné sfingoidní báze. Některé studie ukazují, že u poruch kožní bariéry, jako je například atopická dermatitida, dochází k zvýšení jejich obsahu. Ačkoliv se předpokládá, že se volné sfingoidní báze podílejí na vlastnostech kožní bariéry, dodnes není přesně objasněn způsob jejich participace. Nedostatek studií, případně jejich různorodé výsledky, nás přivádí k hlavnímu cíli této práce – objasnit, jakým způsobem volné sfingoidní báze působí na kožní bariéru.

V této práci byly připraveny modelové membrány izolací lidského SC *ex vivo*. Na SC byly aplikováni zástupci volných sfingoidních bází: sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS) a fytosfingosin (P). Pro komplexnější posouzení byly použity nejen báze samotné, ale i některé jejich směsi v poměrech napodobujících stav fyziologického a patologického SC. Sfingoidní báze, stejně jako jejich směsi, byly aplikovány jako 1% suspenze v směsi propylenglykolu a ethanolu v poměru 7:3 (v/v). Experiment hodnotí permeační parametry – ztrátu vody (TEWL), elektrickou impedanci (EI) a propustnost membrán pro modelový permeant theofylin (TH). Pro každou skupinu vzorků byly změřeny permeační parametry před a po aplikaci suspenzí nebo směsi rozpouštědel u kontrolních membrán. Na základě vyhodnocení výsledků

permeačních experimentů v této práci lze potvrdit předpoklad, že volné sfingoidní báze mají vliv na všechny tři testované parametry. U modelových membrán s přidanými suspenzemi S, dS i P bylo pozorováno zvýšení TEWL, snížení EI a zvýšený flux TH. Současně lze dospět k závěru, že jednotlivé sfingoidní báze v tomto působení nejsou rovnocenné, každá změnila permeační parametry jinou měrou.

Tato práce nastiňuje problematiku vlivu volných sfingoidních bází na permeabilitní vlastnosti kožní bariéry, čímž se stává součástí komplexnějšího poznání, které by dále mohlo zahrnovat například vliv volných sfingoidních bází na strukturální uspořádání SC či objasnění některých patologických procesů v kožní bariéře.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: *Zuzana Jarešová*

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

Consultant: *PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.*

Title of diploma thesis: **STUDY OF FREE SPHINGOID BASES IN SKIN BARRIER**

The skin barrier, localized in the *stratum corneum* (SC), consists of corneocytes and an intercellular matrix formed from three types of lipids – ceramides, free fatty acids, and cholesterol, represented in an equimolar ratio. The overall arrangement of lipids is organized and highly specialized.

Ceramides are structurally formed from the fatty acid acyl attached to a sphingoid base. In minor but not insignificant amounts, free sphingoid bases can also be found in the skin barrier. Several studies show that there is an increased concentration of free sphingoid bases in skin barrier disorders, such as atopic dermatitis. Although it is assumed that the presence of free sphingoid bases affects the skin barrier, it is not elucidated the way of their participation till today. The lack of studies or their diverse results leads us to the main goal of this thesis – to clarify how free sphingoid bases influence the skin barrier.

In this work, the model membranes were prepared by the isolation of human SC *ex vivo*. Sphingosine (S), dihydrosphingosine (dS), and phytosphingosine (P) were applied onto the SC. For more comprehensive assessment there were used both bases themselves and some of their mixtures in defined ratios, which mimic the condition of physiological and pathological SC. Sphingoid bases were applied as 1% suspensions in the mixture of propylene glycol and ethanol in a ratio of 7:3 (v/v), as same as their mixtures. The experiment investigated the permeation parameters – transepidermal water loss (TEWL), electrical impedance (EI), and membrane permeability for the model permeant theophylline (TH). Permeation parameters were measured for each

group of samples in two phases – before and after application of suspensions of sample or mixture of solvents on the control membranes. Based on the evaluation of results of permeation experiments in this thesis, it is possible to confirm the assumption that free sphingoid bases influence all three tested parameters. In model membranes with added suspensions of S, dS and P, there were observed increased TEWL, decreased EI, and increased flux of TH. It can be concluded that the individual sphingoid bases are not equivalent. Each of them influenced the permeation parameters in a varying manner.

This thesis outlines the issue of the influence of free sphingoid bases on the permeability properties of the skin barrier. It becomes a part of more complex knowledge which could further include, for example, the influence of free sphingoid bases on the structural arrangement of SC or pathological processes in the skin barrier.

Obsah

1	Úvod a cíle práce.....	1
2	Teoretická část.....	3
2.1	Lidská kůže	3
2.2	Funkce kůže	3
2.3	Stavba (anatomie) lidské kůže	5
2.3.1	Hypodermis (podkožní vazivo)	5
2.3.2	Dermis (škára).....	6
2.3.3	Epidermis (pokožka).....	7
2.3.3.1	Složení a vlastnosti jednotlivých vrstev epidermis	9
2.4	Stratum corneum.....	10
2.4.1	Korneocyty a korneocytární lipidová obálka.....	11
2.4.2	Lipidová matrix.....	13
2.4.2.1	Volné mastné kyseliny	13
2.4.2.2	Cholesterol.....	13
2.4.2.3	Ceramidy	13
2.5	Sfingoidní báze.....	17
2.5.1	Význam sfingoidníchází v kožní bariéře	19
2.6	Poruchy kožní bariéry	21
2.6.1	Atopická dermatitida.....	21
2.6.2	Psoriáza (lupénka).....	22
2.6.3	Ichtyosis vulgaris.....	22
2.7	SC <i>ex vivo</i> a další modely kožní bariéry	22
3	Metodická část.....	24
3.1	Přístroje a metodika.....	24
3.1.1	Příprava lidské kůže a izolace SC.....	24

3.1.2	Franzovy difuzní cely	24
3.1.3	Ztráta vody přes membránu	25
3.1.4	Elektrická impedance.....	26
3.1.5	Permeabilita pro modelový permeant TH.....	27
4	Experimentální část	28
4.1	Použité chemikálie a rozpouštědla	28
4.1.1	Komerčně dostupné chemikálie a materiál	28
4.1.2	Chemikálie připravené pro experiment.....	28
4.2	Průběh experimentu	29
4.2.1	Příprava modelového SC	29
4.2.2	Instalace SC do Franzových cel.....	30
4.2.3	Měření permeačních parametrů	31
4.2.3.1	Měření ztráty vody přes membránu.....	32
4.2.3.2	Měření elektrické impedance	33
4.2.3.3	Měření permeability pomocí modelového permeantu TH	33
4.2.3.4	Zpracování výsledků	34
5	Výsledky.....	35
5.1.1	Výsledky měření ztráty vody přes membránu	35
5.1.2	Výsledky měření elektrické impedance.....	37
5.1.3	Výsledky měření permeability pro modelový permeant TH	39
6	Diskuze	41
7	Závěr.....	45
8	Použité zkratky	47
9	Literatura	48

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Lidská kůže se v průběhu svého vývoje dostala na vysokou úroveň druhové specifity. Především díky svým povrchovým strukturám epidermis, jako je *stratum corneum* (SC), jsou lidé schopni přežít v suchozemském prostředí.[1] Na základě uspořádání a vlastností SC se tato nejsvrchnější vrstva pokožky označuje jako kožní bariéra. Základní kostru SC tvoří korneocyty a lipidová mezibuněčná hmota. Tato lipidová matrix se skládá ze tří základních složek – ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin v molárním poměru 1:1:1. Ceramidy jsou tvořeny sfingoidní bází a mastnou kyselinou. V menší míře ve SC nalezneme i další látky, jako jsou například volné sfingoidní báze. Celá skupina těchto kožních lipidů je velmi rozmanitá, jenom ceramidů je, co do počtu, několik set.[2]

Z toho všeho vyplývá, že kožní bariéra je tématem velmi širokým a poskytuje rozsáhlé portfolio oblastí, kterými je možné se zabývat. To nás přivádí k tomu, že stejně tak, jako toho o kožní bariéře už mnoho víme, tak jsou zde témata, která nebyla zatím objasněna. Jedním z nich jsou právě volné sfingoidní báze. Jimi, respektive jejich vlivem na kožní bariéru, se bude zabývat tato diplomová práce. Nejprve se zaměříme na teoretický podklad, který shrnuje informace o kůži, kožní bariéře, sfingoidních bázích a krátce i o některých poruchách kožní bariéry a modelech, které se pro její výzkum využívají. Poté následuje metodická část, a nakonec stěžejní část, část experimentální spolu s výsledky, zakončená diskuzí a závěrem.

Výchozím cílem experimentální práce bylo připravit si modelové membrány, respektive izolovat SC z lidské kůže, které posloužilo jako modelová membrána. Dalším cílem bylo proměření permeačních parametrů, tedy transepidermální ztráty vody (TEWL), elektrické impedance (EI) a propustnosti pro modelový permeant theofylin (TH), přičemž výsledné hodnoty měly posloužit jako prostředek pro hlavní cíl diplomové práce. Tímto cílem bylo na základě permeačních parametrů jednotlivých vzorků vyhodnotit vliv volných sfingoidních bází na vlastnosti kožní bariéry. Mimo samostatných volných sfingoidních bází byl studován i vliv některých jejich směsí v určitých poměrech. V rámci komplexnosti této studie se dalším cílem stalo porovnání výsledků tohoto experimentu s publikovanými výsledky doposud

provedených studií, které se vlivem volných sfingoidních bází na kožní bariéru také zabývaly.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lidská kůže

Kůže (lat. *cutis*, řec. *derma*) je orgán, který, spolu se sliznicemi, patří mezi povrchové tkáně. Jedná se o část, která se dostává jako první přímo do kontaktu s prostředím a spolu dalšími mechanismy se podílí na homeostáze, tedy udržování rovnováhy vnitřního prostředí lidského těla.[3, 4]

Plochou zaujímá lidská kůže až 2 m², u dospělého jedince to bývá v průměru 1,6 – 1,8 m². Tloušťka kůže je různá, záleží, o jakou část těla se jedná. Rámcově se pohybuje od 0,5 mm (oblast očních víček nebo penisu) až do 4 mm (kůže zad). Ve všeobecnosti je kůže trupu slabší vepředu a silnější vzadu. Průměrná hmotnost celé kůže činí cca 3 kg, tato hodnota se opět mění v závislosti na jedinci. Pokud se vezme v potaz i tuková vrstva, tak se hmotnost pohybuje až kolem 20 kg.[5] Z většinové části (72 %) je kůže tvořena vodou.[4]

Pro kůži je typické kyselé pH (5,6 – 6,4) a to hned z několika důvodů. Zaprvé hraje klíčovou roli v obraně proti mikroorganismům; například novorozenci, jejichž pH kůže je po narození neutrální, mají z tohoto důvodu vyšší riziko nasednutí bakteriální nebo kvasinkové infekce. Dále je kyselé prostředí důležité pro obnovu kožní bariéry, například při nějakém poškození.[6, 7] V neposlední řadě je kyselé pH optimální pro činnost enzymů, jako je například β -glukocerebrosidasa nebo sfingomyelinasa, které metabolizují prekurzory kožních lipidů. Činností těchto enzymů pak vznikají ceramidy, které jsou významnou součástí kožní bariéry. Na tvorbě tohoto tzv. kyselého pláště kůže se podílí volné mastné kyseliny, které vznikají z kožního mazu činností mikroorganismů, poté kyselina mléčná díky činnosti ekrinních žláz, kyselina urokanová, která vzniká v keratinocytech z filaggrinu, nebo volné mastné kyseliny vznikající hydrolýzou z fosfolipidů.[6-8]

2.2 Funkce kůže

Lidská kůže tvoří na těle bariéru, jejíž stěžejní funkcí je **funkce ochranná**. V tomto ohledu je působení kůže komplexní, chrání tělo jak před různými fyzikálními

(mechanické, tepelné a světelné poškození) a chemickými, tak i mikrobiologickými vlivy. Lidská kůže, respektive Langerhansovy buňky, které se nachází ve *stratum spinosum*, jsou součástí imunitního systému. Jedná se o buňky podobné makrofágům; jsou schopné rozpoznat, zpracovat a prezentovat antigen. Nutno podotknout, že ochrana probíhá pouze v určitých mezích, kůži tedy nelze označit jako dokonale nepropustnou bariéru.[4, 5]

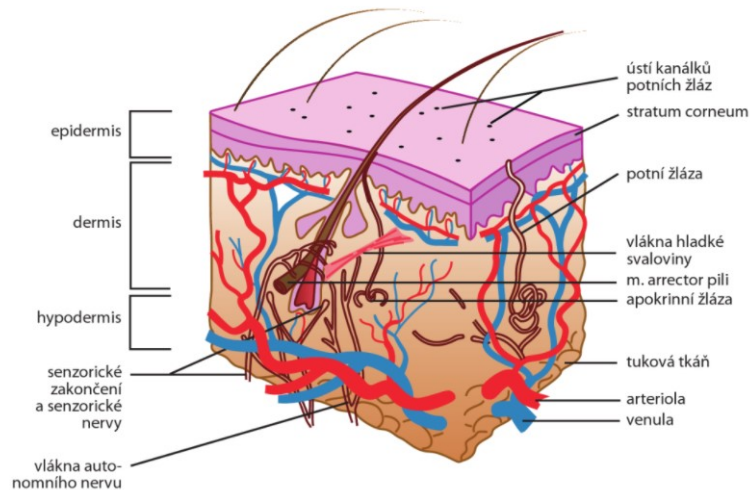
Kůže se dále podílí na **termoregulaci**, jednak pomocí změn průsvitu cév (změny aktivovány vlivem okolní teploty a vnitřní teploty těla), a poté skrz sekreci potu neboli odpařováním.[4, 5]

Další významnou funkcí je **funkce exkreční a resorpční**. Schopnost resorpce souvisí například s dobrou vstřebatelností látek rozpustných v tucích (význam pro transdermální podávání léčiv). Na exkreci kůže se podílí potní žlázy a pak žlázy mazové. Sekrece mazu skrz mazové žlázy je důležitým faktorem pro ochranu lidské kůže před dehydratací případně před vlivem vlhka. Na povrchu pomáhají vytvářet tukový film, který má mimo jiné i baktericidní účinky. Bakterie, které kůži osídlují, jsou schopné pomocí esterů štěpit triacylglyceroly přítomných lipidů na volné mastné kyseliny a ty se spolu s dalšími faktory podílejí na kyselém pH kůže.[4, 5]

Další nedílnou součástí pochodů v kůži je **dýchání**. Ačkoliv u člověka jakožto savce je kožní dýchání zastoupeno v malé míře, tvoří nezastupitelný podíl. Kromě jiného je v lidské kůži čteně zastoupen také **receptorový systém**, který se podílí na somato-senzorickém vnímání. Jedná se o receptory dotyku a tlaku, receptory pro bolest a termoreceptory. Nelze opomenout i určitý podíl kůže na **sociální komunikaci** a v neposlední řadě je třeba zmínit účast kůže na **tvorbě vitamínu D** s pomocí slunečního záření. Nachází se zde (konkrétně ve *stratum granulosum*) 7-dehydrocholesterol, prekurzor cholekalciferolu neboli vitamínu D₃. Zajímavé je, že kůže není pouze místem, kde dochází k jeho tvorbě. Vitamín D je i důležitým faktorem pro některé pochody v kůži, jako je například proliferace, diferenciacie nebo apoptóza keratinocytů.[4, 5, 9]

2.3 Stavba (anatomie) lidské kůže

Z hlediska anatomie se kůže dá rozdělit do třech základních vrstev – hypodermis, dermis a epidermis (Obrázek 1).



Obrázek 1 – Stavba (anatomie) lidské kůže; vyobrazení jednotlivých vrstev (epidermis, dermis, hypodermis) včetně jejich charakteristických částí. [3]

2.3.1 Hypodermis (podkožní vazivo)

Podkožní vazivo (lat. *tela subcutanea*) neboli hypodermis (lat. *subcutis*) tvoří vrstvu nejspodnější a obsahuje především vazivo, které upíná kůži v některých místech ke svalům a v některých ke kostem. Dále zde najdeme i tukové buňky, které z této vrstvy činí zásobárnu energie a zároveň slouží k izolaci a mechanické ochraně. Rozložení tohoto podkožního tuku je různé v závislosti na pohlaví, také se může měnit například hormonálními změnami nebo věkem.[5, 10] Přibližně 80 % veškerého tělesného tuku je právě v podkoží. U starších lidí je typické nižší množství tuku v kůži, protože zatímco množství viscerálního tuku roste, podkožní zásoby klesají.[11] Obecně lze nalézt nejvíce podkožního tuku na břiše, hýždích nebo na vnitřní straně stehen. Oproti tomu jsou místa, kde tato vrstva není přítomna téměř vůbec, například ušní boltce, oční víčka, hřbet nosu nebo penis a klitoris.[5, 10]

2.3.2 Dermis (škára)

Druhou, střední vrstvou, je dermis (lat. *corium*), která má obvykle 0,5 – 2,5 mm. Základem jsou kolagenní a elastická vlákna spolu s vazivem. Skládá se ze dvou dílčích částí. První část představuje *stratum papillare* (povrchová vrstva), kterou tvoří především pojivová tkáň, a v které se nachází více vazivových buněk a bohatá síť cév. Druhá část, *stratum reticulare* (hlubší část), obsahuje buněk méně, ale zato je zde velké množství fibril kolagenu, který tvoří silnou a hustou vrstvu. Škáru tvoří tři druhy buněk – fibroblasty, histiocyty a mastocyty. **Fibroblasty** (tzv. aktivní forma fibrocytů) se nachází mezi vazivovými vlákny a probíhá zde syntéza vaziva. Z krve do dermis pronikají monocyty, které pak označujeme jako **histiocyty** a jejich aktivní formou jsou makrofágy. Pak jsou to **mastocyty** (žírné buňky), které obsahují látky, jejichž uvolnění je typické při projevech zánětu nebo alergie.[5, 10]

Činnostmi výše zmíněných fibroblastů vznikají čtyři druhy vláken. První z nich jsou **kolagenní vlákna**, která dávají kůži pevnost. Ve stejné míře se v dermis nachází i **elastická vlákna**, která zodpovídají jak za pevnost, tak i elasticitu kůže. Ve stáří je typický jejich úbytek, což se projeví na charakteristice kůže. Dále zde nalezneme **vlákna retikulínová**, která jsou velmi jemná a nachází se například kolem cév nebo potních žláz. Poslední jsou tzv. **kotvící fibrily**, které jsou velmi podobné těm kolagenním, ale chemicky se liší, a jak z názvu vyplývá, tak v podstatě upevňují dermis k epidermis.[5, 10]

Dermis je vrstvou kůže, jež je protkána **sítí cév** (na rozdíl od epidermis). Také se zde nachází **nervy**, a to buď vegetativní nebo cerebrospinální senzitivní.[5, 10]

Mezi přídatné orgány dermis spadá a je zde umístěna většina kožních adnex, ale na základě některých jejich charakteristik je lze řadit i do spojitosti s ostatními vrstvami kůže. Podle vlastností se dělí na adnexa žlázová a keratinizovaná. Do první skupiny se řadí mazové a potní žlázy.[5, 10]

Mazové žlázy (lat. *glandulae sebaceae*) jsou holokrinní, to znamená, že celé žlázové buňky se přeměňují na produkt – kožní maz (lat. *sebum*). Kožní maz je, jak již bylo zmíněno, důležitým ochranným faktorem kůže. Jednak ji chrání před smáčením, ale na druhou stranou je důležitým faktorem hydratace.[5, 10]

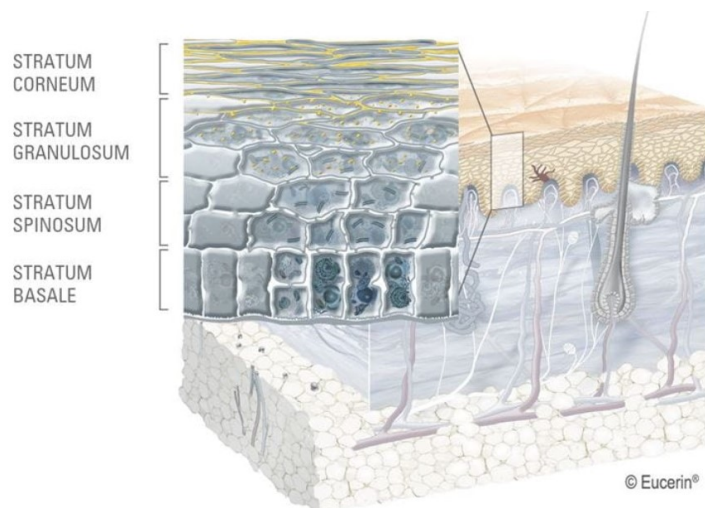
Potní žlázy (lat. *glandulae sudoriferae*) jsou oproti mazovým merokrinní. V tomto případě nedochází k zániku buněk, ale sekret je pomocí buněk pouze produkován. Mohou být apokrinní, někdy ne úplně správně označované jako velké potní žlázy, jejich vývod se nachází na vyústění mazové žlázy. Najdeme je v oblasti axil, prsních dvorců, análního otvoru nebo genitálií. Ty neprodukují pot v pravém slova smyslu, jedná se spíše o tekutinu, která obsahuje látky jako jsou například lipidy spolu s oddělenými částmi buněk. Druhým typem potních žláz jsou žlázy ekrinní, které se nachází na takřka celém povrchu těla. Ty se označují jako malé potní žlázy a již produkují opravdu pot, což je tekutina složená z vody a iontů.[5, 10] Směs potu a mazu je součástí povrchového ochranného filmu pokožky, omezuje ztráty vody odpařováním a také podporuje přirozenou kožní mikroflóru.[12]

Keratinizované kožní adnexy jsou nehty a poté vlasy (chlupy). **Vlasy (chlupy)** vyrůstají z vlasových folikul (vchlípeniny epidermis do dermis). **Nehty** jsou tvořeny zrohovatěným keratinem. Rohová vrstva epidermis se odlupuje, u nehtu to však neplatí. Nehtové lůžko je charakteristické nedokonale zrohovatělou epidermis a není zde přítomné *stratum granulosum* a melanocyty.[5, 10]

2.3.3 Epidermis (pokožka)

Epidermis je nejsvrchnější vrstvou lidské kůže, zároveň se jedná o nejtenčí část, tloušťkou se pohybuje od 0,3 do 1,5 mm. Je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který směrem k povrchu rohovatí. Základ pokožky tvoří keratinocyty a poté další typy buněk – melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky.[10]

Anatomicky můžeme epidermis dále dělit na charakteristické vrstvy, od hlubších vrstev *stratum basale*, *stratum spinosum*, přes *stratum granulosum* a přechodné *stratum lucidum*, až po vrstvu povrchovou, *stratum corneum* (Obrázek 2).[10]



Obrázek 2 – Epidermis (pokožka); vyobrazení jednotlivých vrstev.[13]

Keratinocyty jsou buňky, které se v průběhu jednotlivých vrstev epidermis vyvíjejí. Dá se říct, že v podstatě „cestují“ ze spodních vrstev až na povrch, kde se mění na tzv. korneocyty (neživá forma keratinocytů). Tento proces trvá cca 28 dní, to je doba od mitózy buněk v *stratum basale* až po jejich odloučení se ze SC. Keratinocyt je klasická buňka, která se vyznačuje typickým rysem v podobě keratinových tonofilament. Ta se s postupem ve vyšších vrstvách mění (zpevňují) a tvoří tzv. Odlandova tělíska (lamelární tělíska). Odlandova tělíska uvolňují do mezibuněčných prostor hmotu. Až do vrstvy *stratum granulosum* je mezibuněčná hmota (s vysokým obsahem proteoglykanů) prostupná, poté v SC je tato hmota tvořená lipidy uvolněnými z Odlandových tělísek a je nepropustná.[5, 10]

Přítomnost **melanocytů** je typická pro vrstvu bazální a okolí vlasových folikulů, jejich dendritické výběžky však zasahují i do vrstev vyšších, až do *stratum spinosum*. Obsahují melanosomy produkující melanin, putují skrz výběžky do horních vrstev, dozrávají a původní bezbarvý melanin se mění na barevný pigment. Takto se melanocyty dostávají až do okolních keratinocytů, které pigmentem zásobují. Většinou je to cca 30 keratinocytů, se kterými tvoří tzv. epidermální melanocytové jednotky.[5, 10]

Langerhansovy buňky tvoří kožní část imunitního systému, jsou umístěny ve *stratum spinosum*. Jedná se o buňky, které z krve přechází do kůže a fungují zde jako makrofágy. Jsou tedy schopné rozpoznat, zpracovat a prezentovat antigen lymfocytům.[5, 10]

Posledním typem buněk v epidermis jsou **Merkelovy buňky**. Jsou umístěny v bazální vrstvě a mají funkci mechanoreceptorů. Tvoří spojení s volnými nervovými zakončeními a zároveň se skrz desmosomy připojují k sousedním keratinocytům.[5, 10]

2.3.3.1 Složení a vlastnosti jednotlivých vrstev epidermis

První vrstvou směrem od dermis je **stratum basale (cylindricum)** – vrstva základní. Tu tvoří cylindrické keratinocyty v jedné vrstvě, charakteristické svými velkými jádry v poměru k malému procentu cytoplazmy. Je to část pokožky, kde dochází k vzniku nových buněk buněčným dělením. Kromě keratinocytů se zde vyskytují buňky Merkelovy a melanocyty. Sousední buňky spojují tzv. desmosomy (pevné spoje), které však zanikají a pak opět nově vznikají, aby byl umožněn charakteristický posun buněk epidermis směrem nahoru. Dále tu jsou tzv. hemidesmosomy, které připojují tyto buňky k bazální membráně. Bazální membrána je na pomezí epidermis a dermis, kde jsou přítomny kotvící fibrily.[5, 10]

Nad **stratum basale** se nachází **stratum spinosum** – vrstva špičatá. Zde jsou buňky už v 2 až 5 vrstvách. Mění se jejich tvar, postupem k povrchu se oplošťují, tvar je ostnitý, kopinatý (odtud název špičatá vrstva). Kromě keratinocytů se zde nachází Langerhansovy buňky. Také zde vznikají oválná Odlandova tělíska, která obsahují lipidy (glykolipidy, steroly). V této vrstvě v menší míře přetrvává schopnost buněk dělit se, proto se někdy vrstva **stratum basale** spolu se **stratum spinosum** označují jako **stratum germinativum** – vrstva zárodečná. Ve svrchní části už lze pozorovat proces diferenciací.[5, 10]

Třetí vrstvou je **stratum granulosum** – vrstva zrnitá, která obsahuje 1 až 3 řady buněk, opět oploštělých, které obsahují granula keratohyalinu (odtud vrstva zrnitá). Keratohyalin je prekurzorem keratinu. Granula keratohyalinu mají uvnitř profilaggrin – protein, který se dále přemění a v rohové vrstvě se již nachází filaggrin. Filaggrin se váže na keratinová vlákna a spojuje je. Po nějaké době se filaggrin rozkládá (již v rohové vrstvě) a vzniká z něj kyselina urokanová, zodpovědná za ochranu kůže proti UV záření, a kyselina pyrrolidonkarboxylová, která je součástí kyselého pláště kůže a je důležitým faktorem pro hydrataci. Odlandova tělíska splývou s buněčnou membránou a uvolňují lipidy, které pak tvoří nepropustnou hmotu. Na

vnitřní straně plazmatické membrány vzniká pruh keratinocytů, který předchází úplnému zrohovatění. Kompletní zrohovatění nastává činností enzymů, které zničí organely keratinocytů.[5, 10]

Stratum lucidum – vrstva světlá, je přechodem mezi nezrohovatělou částí epidermis a SC. Tato světlolomná vrstva je velmi tenká, více zratelná může být v oblasti dlaní nebo plosek chodidel. Keratinocyty zde ztrácí organely včetně jádra a již se tvoří keratin z tonofibril a keratohyalinových granul.[5, 10]

Poslední a zároveň nejsvrchnější vrstvou je SC – vrstva rohová, jedná se o kožní bariéru jako takovou.

2.4 Stratum corneum

Tato povrchová vrstva epidermis, rohová vrstva, je pro člověka velmi specifická a díky své struktuře a vlastnostem se často označuje právě jako tzv. kožní bariéra nebo epidermální bariéra. Na samotné bariérové funkci se podílí celá tato vrstva, ačkoliv z morfologického hlediska se za kožní bariéru považuje především jedna z jejích částí, a to *stratum conjunctum*. Jedná se o vrstvu hlubší, kompaktnější, kde k sobě buňky velice těsně přiléhají. Zde hovoříme již o korneocytech, tedy odumřelých keratinocytech. Úplně na povrchu pak najdeme *stratum disjunctum*, kde se buňky nachází již ve fázi, kdy se postupně odlupují a oddělují od těla; dochází k tzv. deskvamaci.[1, 10] Jednotlivé buňky jsou spojeny skrz intercelulární spoje zvané korneodesmosomy. Jelikož je zde rovnováha mezi proliferací keratinocytů a jejich ztrátou, dochází k degradaci korneodesmosomů pomocí proteas, čímž je deskvamace umožněna.[14]

SC zabraňuje ztrátě vody z těla a průniku potenciálně škodlivých látek a mikroorganismů z okolí. Zároveň je pro ni charakteristický nízký stupeň hydratace. Na rozdíl od ostatních tkání, kde se to pohybuje okolo 70 %, tak zde je to přibližně jen 10–20 %.[15-17] I přesto je množství vázané vody stěžejní pro udržení bariérové funkce. Kožní bariéra reguluje průnik vody v obou směrech, zabraňuje tedy nejen ztrátě vody, ale i nadměrné hydrataci.[1]

Udržení této optimální hydratace kožní bariéry je složitý proces, na kterém se podílí hned několik mechanismů. Za prvé je to ochranný film na povrchu, který vytváří emulzní směs z mazu, potu a olupujících se buněk. Poté jsou to lipidy, a to jak ty obsažené v korneocytech (ω -hydroxy-alkylceramidy, které vytváří těsné spojení esterovou vazbou s proteiny kožních buněk), tak i intercelulární lipidy (ceramidy, volné mastné kyseliny a cholesterol) tvořící multilamelární struktury. Nalezneme zde i hyaluronan sodný, produkovaný v horní části *stratum granulosum*, který se na hydrataci též podílí. Posledním velmi významným faktorem, respektive souborem faktorů jsou tzv. NMF (angl. Natural Moisturizing Factors).[1] NMF je soubor látek, které vznikají kompletní proteolýzou filaggrinu a fungují zde jako humektanty. Z největší části ho tvoří různé aminokyseliny a jejich deriváty, jako je kyselina pyrrolidonkarboxylová nebo urokanová, poté sem spadá kyselina mléčná, sacharidy, urea, chloridy, sodík, draslík a další.[18]

2.4.1 Korneocyty a korneocytární lipidová obálka

To, co má u SC naprosto stěžejní význam pro jeho fyzikálně-chemické a funkční vlastnosti, je jeho stavba a složení. Zjednodušeně se uspořádání někdy přirovnává k cihlové zdi, tzv. model „bricks and mortar“. Korneocyty se připodobňují k cihlám a mezibuněčná hmota tvoří něco jako maltu, tmel.[19, 20]

Základ SC (tzv. „bricks“) tvoří **korneocyty**, což jsou vlastně keratinocyty v konečném stádiu diferenciaci. Jedná se již o neživé buňky bez jádra, naskládané do několika vrstev. Průměrně je to cca 20, ale obecně se to pohybuje v rozmezí od 4 do 122 vrstev, nejvíce je to například v oblasti plosek nohou.[5, 15] Korneocyty mají charakteristický protáhlý a zploštělý tvar, mohou být až 50 μm dlouhé, ale jen asi 1,5 μm tlusté. Jejich hlavním složkou je keratin, který tvoří 70–80 % těchto buněk.[15]

Zatímco v hlubších částech epidermis je kolem keratinocytů přítomna fosfolipidová membrána, při přechodu ze *stratum granulosum* do SC je tato vrstva nahrazena a fosfolipidy zde nenalezneme.[6] Kolem korneocytů se vyskytuje tzv. **zrohovatělá obálka** (angl. cornified envelope; CE). Jedná se o vrstvu přítomnou přímo pod cytoplazmatickou membránou buňky, která je tvořena sítí proteinů – involucrin, lorikrin, malé proteiny bohaté na prolin, cystatin A, elafin,

desmosomální proteiny a v neposlední řadě i keratinová vlákna. Jednotlivé proteiny jsou spojeny skrz disulfidické můstky[21] nebo skrz *N*-(γ -glutamyl) lysinové vazby, jejichž vznik katalyzuje Ca^{2+} -dependentní enzym, transglutaminasa.[21, 22] Jednotlivá keratinová vlákna jsou spojena pomocí filaggrinu, který vzniká z profilaggrinu v granulózní vrstvě. Tím se tedy sám o sobě také podílí na strukturální a mechanické integritě obálky. Degradční produkty filaggrinu, NMF, jsou zodpovědné za udržování optimálního stupně hydratace SC a zároveň za vytváření kyselého pH. Správné pH a hydratace jsou významné pro homeostázu kožní bariéry a pro přítomné enzymy, které pak regulují deskvamaci, syntézu lipidů nebo třeba zánětlivý proces.[23]

Proteinová složka SC je propojena s lipidovou složkou zvanou **korneocytární lipidová obálka** (angl. corneocyte lipid envelope; CLE). CLE je tvořena monovrstvou ω -hydroxy-ceramidů a v menší míře i ω -hydroxy-mastných kyselin, které jsou pomocí kovalentních vazeb připojeny na glutamátové zbytky proteinů.[24] Z počátku je tato CLE obohacena o ω -hydroxyglukosyl-ceramidy. Ty jsou následně zbaveny cukerné složky pomocí β -glukocerebrosidasy a vznikají ω -hydroxy-ceramidy, které jsou stále kovalentně vázány k proteinům CE. Většina těchto ω -hydroxy-ceramidů zůstává již dále nedotčena, ale v malém procentu zde dochází činností kyselých ceramidasy k další degradaci a vznikají ω -hydroxy-mastné kyseliny a sfingoidní báze.[24, 25] Různé studie uvádí, že ve zdravém SC jsou charakteristické nízké hladiny volných sfingoidních bází, což potvrzuje předpoklad, že ω -hydroxy-ceramidy zůstávají bez další přeměny.[24, 26]

Tato korneocytární lipidová obálka v podstatě vytváří přechodnou hranici, semipermeabilní membránu, mezi buňkami (korneocyty) a mezibuněčnou hmotou (lipidová matrix). CLE sama o sobě neslouží jako bariéra proti ztrátám vody,[27] spíše se předpokládá, že je důležitá pro vzájemnou kohezi korneocytů [28] a zároveň slouží jako jakási matrice pro utváření lamelární organizace volných bariérových lipidů.[29] Zajímavé je například to, že zatímco CLE je odolná vůči působení organických rozpouštědel, tak lipidy uspořádané do extracelulárních lamel jsou jejich působením snadno poškozeny.[30]

2.4.2 Lipidová matrix

Kolem korneocytů se v mezibuněčných prostorech nachází lipidová matrix (tzv. „mortar“). Jedná se o směs lipidů, jejíž složení je velmi specifické a rozmanité. Nalezneme zde tři hlavní skupiny lipidů. Jedná se o **ceramidy**, **volné mastné kyseliny** a **cholesterol**, všechny v přibližně ekvimolárním množství, tedy 1:1:1. Minoritně se zde nachází i další sloučeniny jako je cholesterol-sulfát, volné sfingoidní báze a další. Jak již bylo zmíněno, tak charakter lipidických látek SC, to znamená jejich samotná přítomnost, jejich množství, vzájemný poměr nebo třeba jejich strukturální změny, může vést k narušení funkce kožní bariéry. Ačkoliv není kožní bariéra kompletně prozkoumaná a některé náležitosti nejsou úplně objasněné, ví se, že všechny složky SC mají určitý význam. Obecně je tento význam hlavně ochrana před ztrátami vody a před průnikem různých látek z vnějšího prostředí.[2]

2.4.2.1 Volné mastné kyseliny

Volné mastné kyseliny kožní bariéry obsahují dlouhý uhlovodíkový řetězec o 14–34 jednotkách. Asi 50 % z nich tvoří dvě nejčetnější mastné kyseliny – kyselina lignocerová C24 (tetrakosanová) a kyselina cerotová C26 (hexakosanová). V menší míře zde najdeme široké spektrum dalších mastných kyselin, přičemž, až na výjimky, všechny mají společné to, že jsou nasycené a nerozvětvené. Co se týče kratších a nenasyčených mastných kyselin, nalezneme je někdy v kožní bariéře také, ale v těchto případech se často jedná o patologické SC.[2]

2.4.2.2 Cholesterol

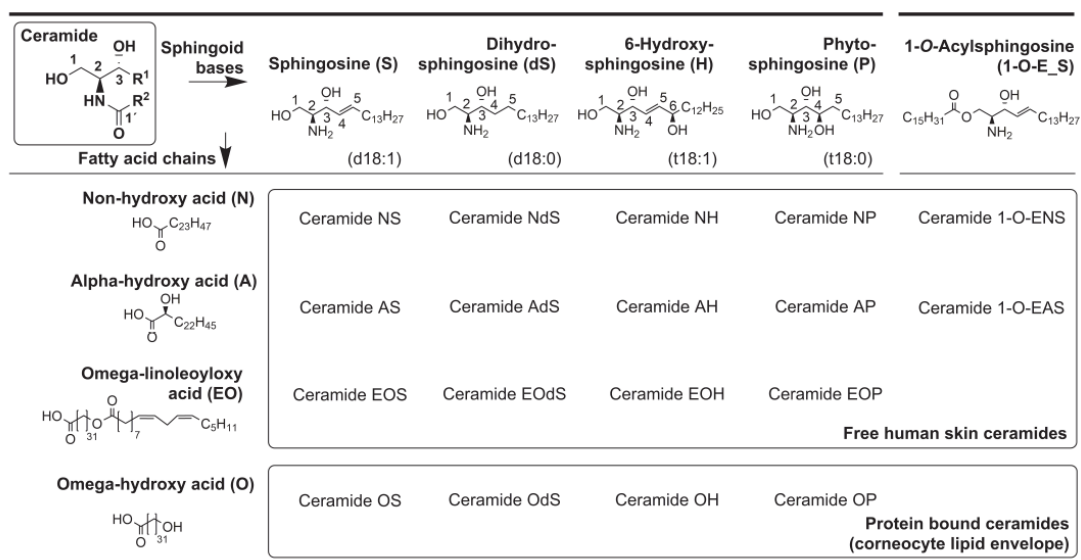
Další nejčetnější lipidovou složku SC tvoří cholesterol. Cholesterol zde přispívá k fluiditě („tekutosti“) membrány a také k správnému strukturálnímu uskupení, jelikož je součástí lamelárního uspořádání. Ve SC byl nalezen i volný cholesterol (nezabudován do lamel), jehož funkce není zatím úplně objasněna.[2]

2.4.2.3 Ceramidy

Třetí skupinou jsou ceramidy. Pokrývají asi jednu třetinu z veškerých lipidů v SC. Chemicky se jedná o *N*-acylsfingosiny, které spadají do rodiny sfingolipidů.[2] Metabolismus sfingolipidů obecně začíná v endoplazmatickém retikulu a postupně dochází k syntéze ceramidů, a následně i dalších dvou skupin, sfingomyelinů a

Mastné kyseliny jsou navázané na sfingoidní báze jako acyl. Sfingoidní báze obsahují dlouhý uhlovodíkový řetězec, většinou C18. Spadá sem sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS), fytosfingosin (P) a 6-hydroxysfingosin (H). Vzhledem k tomu, že náplní experimentu této diplomové práce jsou právě volné sfingoidní báze, je o nich podrobněji pojednáno v kapitole 2.5 Sfingoidní báze.[2]

Sfingoidní báze jsou acylované mastnými kyselinami. Ty jsou běžně nasycené, nerozvětvené a mají dlouhý uhlovodíkový řetězec. Na základě toho dělíme ceramidy na ty s dlouhými (cca C24) a na ty s ultradlouhými mastnými kyselinami (C30 – C32). Tyto mastné kyseliny mohou být bez substituce (Non-hydroxy acid, N), α -hydroxylované (Alpha-hydroxy acid, A), ω -hydroxylované (Omega-hydroxy acid, O) nebo je na ω -hydroxyl ještě navázána esterově kyselina linoleová (Omega-linoleoyloxy acid, EO). Nově objevená skupina ceramidů pak může obsahovat navázaný i třetí nepolární řetězec, a to esterově na uhlík číslo jedna sfingoidní báze (1-O-E). Na základě písmenných zkratk a čísel byla zavedena nomenklatura pro jednotlivé ceramidy. K písmenné zkratce se pak ještě přidává číslo, které vyjadřuje délku uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny. Nomenklatura ceramidů je znázorněna na Obrázku 4.[2]

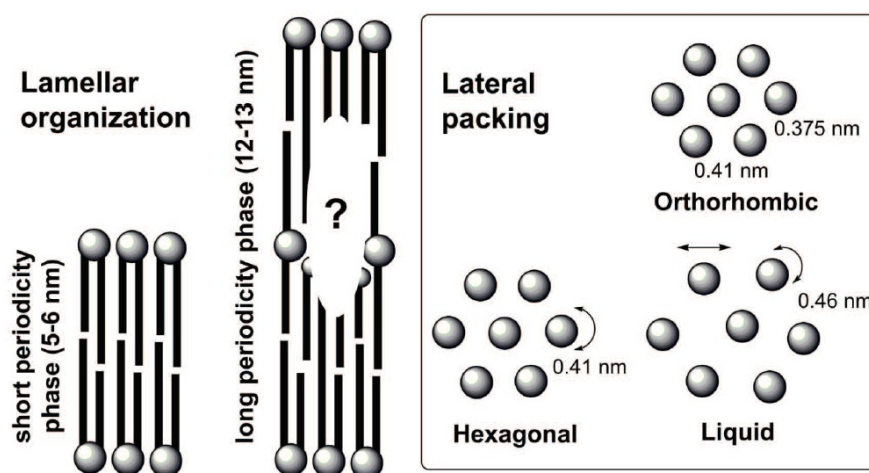


Obrázek 4 – Obecný vzorec ceramidů; názvosloví jednotlivých typů ceramidů pomocí písmenných označení a chemických vzorců.[2]

V mezibuněčných prostorech jsou bariérové lipidy velmi specificky uspořádány. Na rozdíl od ostatních membrán, kde je charakteristická přítomnost

fosfolipidové dvojvrstvy, tak zde nalezneme multilamelární uspořádání. První vrstva je připojena k povrchu korneocytů, skrz CLE, konkrétně zde vzniká kovalentní vazba. Fosfolipidy obsahují velkou polární hlavu, kterou u bariérových lipidů SC nenajdeme. Polární část ceramidů je malá v kontrastu s velmi dlouhým a zároveň i nasyceným hydrofobním uhlovodíkovým řetězcem. Pro tento řetězec je typická dominující konformace *all-trans*. Převládající laterální uspořádání (tzn. pohled na multilamelární uspořádání z boku) je orthorhombické, jedná se o velmi těsné spojení s omezenou rotací. Dále lze nalézt i hexagonální uspořádání, kde už je možnost rotace o něco větší, a vůbec nejméně omezený pohyb a rotace je u takzvaného kapalného uspořádání (Obrázek 5).[2]

Ceramidy se mohou v kožní bariéře nacházet ve dvou konformacích, a to je uzavřená (vláseňková), kdy oba hydrofobní konce směřují na stejnou stranu, a poté otevřená, kdy každý konec směřuje jinam. Podle délky dělíme lamelární fáze na dlouhou periodickou fázi (angl. long periodicity phase; LPP) s opakující se vzdáleností 11,9 – 13,1 nm. Přítomnost těchto útvarů byla objevena nejdříve pomocí elektronového mikroskopu a později potvrzena rentgenovou difrakcí. Mimo to je popisována i krátká periodická fáze (angl. short periodicity phase; SPP) s délkou od 5,3 do 6,4 nm a také fáze separovaného cholesterolu (Obrázek 5).[2]



Obrázek 5 – Lamelární uspořádání ceramidů v kožní bariéře – krátká periodická fáze a dlouhá periodická fáze; laterální uspořádání (z boku) – orthorhombické, hexagonální a kapalné.[2]

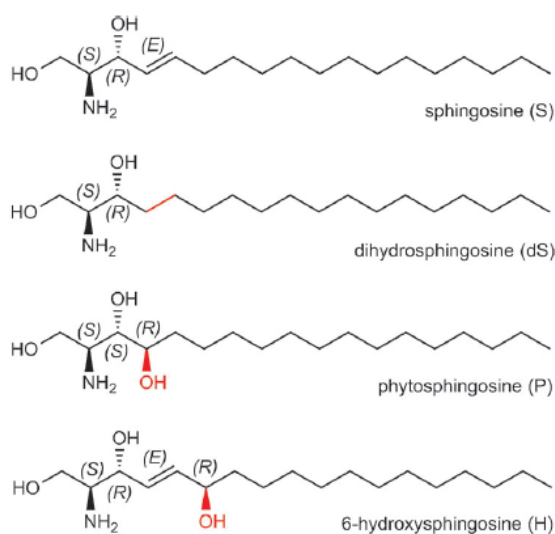
2.5 Sfingoidní báze

Sfingoidní báze se v kožní bariéře nachází především jako součást ceramidů, menší část však tvoří volné sfingoidní báze. Byť dle některých studií najdeme v kožní bariéře sfingoidní báze volně jen minoritně[34, 35], tak existují i práce, které tvrdí, že toto zastoupení je signifikantní.[36-39] Obecně se předpokládá, že pokud je procento výskytu volných sfingoidních bází zvýšené, pravděpodobně se jedná o nějakou poruchu kožní bariéry.[26, 40-43]

Sfingoidní báze se někdy obecně nazývají jako sfingosiny, jelikož tento zástupce byl objeven a popsán jako první. Bylo to v roce 1884, kdy ho J. L. E. Thudichum objevil a pojmenoval, a jeho strukturu o pár let později, v roce 1947, objasnil Herb Carter. (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooctadec-4-en-1,3-diol byl původně pojmenován triviálně jako sfingosin podle egyptské sfingy, která, stejně jako tato sloučenina, také skrývala určité tajemství. Do jisté míry bychom toto pojmenování zvolili i dnes, jelikož o sfingoidních bázích stále ještě nevíme vše.[44, 45]

Jak již bylo řečeno, sfingoidní báze se chemicky považují za aminoalkoholy, zahrnující široké spektrum látek, které se liší v délce uhlovodíkového řetězce, dvojných vazbách (počtu, pozici a stereochemii) nebo připojených hydroxylech. Nejen kožní bariéra obsahuje ve svých strukturách sfingoidní báze. Nachází se i v jiných eukaryotických buňkách a některé strukturně podobné látky tvoří třeba i houby. Například fumonisin je mykotoxin, který je odvozen od hub rodu *Fusarium*, a může způsobit některé nemoci, jelikož narušuje metabolismus sfingolipidů. Na druhou stranu je třeba zmínit potenciál těchto látek v léčbě, jelikož některé sfingoidní báze jsou schopné ničit nádorové buňky nebo mikroorganismy a spadají mezi tzv. pharmaceutical leads.[33]

V kožní bariéře najdeme čtyři základní sfingoidní báze – sfingosin, dihydrosfinosin, fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin. Všechny mají stejnou základní kostru, ale liší se přítomností dvojných vazeb a hydroxylů (Obrázek 6). Sfingosin a dihydrosfingosin jsou typickými bázemi pro všechny eukaryotické buňky, fytosfingosin pouze pro určité druhy tkání a nejnověji popsán 6-hydroxysfingosin se vyskytuje výhradně v epidermis.[2]



Obrázek 6 – Chemická struktura jednotlivých sfingoidních bází.[46]

Sfingosin, jak již bylo řečeno, byl první objevenou sfingoidní bází. Chemicky se jedná o (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol.[45] Vzniká deacylací ceramidů pomocí ceramidás, které jsou závislé na pH. Pomocí kinas pak dochází k jeho přeměně na sfingosin-1-fosfát,[47] který funguje jako signální molekula v rámci procesů, které vedou často k opačným dějům, než těm, které jsou vyvolány působením sfingosinu a ceramidů.[48] Tato sfingoidní báze v buněčných membránách slouží jako druhý posel, inhibuje agregaci destiček, růstový faktor a proteinkinasu C, čímž ovlivňuje buněčný růst. Z dalších proteinových kinas pak ovlivňuje i kalmodulin-dependentní kinasu nebo tyrosinkinasu.[45, 49, 50] Sfingosin také působí antimikrobně.[51] Studie uvádí, že sfingosin je schopný ovlivňovat permeabilitu membrán tak, že tvoří změny ve struktuře, které vedou k oddělení lipidové fáze na tuhou a tekutou. Další studie uvádí, že mění propustnost skrz tvorbu malých kanálů s krátkou životností, které umožní průchod malých iontů a molekul, a také interaguje s negativně nabitými lipidy, čímž se tvoří nelamelární struktury.[52-54]

Dihydrosfingosin je chemicky (2*S*,3*R*)-2-aminooktadecan-1,3-diol, někdy bývá nazýván sfinganin. Podílí se různými mechanismy na procesu autofágie, buněčné proliferaci, metabolické regulaci a oxidativním stresu.[45] Je také známo, že se účastní smrti T buněk [55] a stejně jako sfingosin působí jako inhibitor proteinkinasy C a patří mezi antimikrobní lipidy.[49, 51] Ačkoliv tato sfingoidní báze není tak dobře

prostudovaná jako S, i zde je pravděpodobné ovlivnění struktury buněčných membrán. Dihydrosfingosin je schopný stabilizovat domény bohaté na cholesterol.[56]

Fytosfingosin je (2*S*,3*S*,4*R*)-2-aminooktadekan-1,3,4-triol. Jedná se o sfingoidní bázi, která vzniká hydroxylací sfingosinu pomocí dihydroceramidhydroxylasy. Jeho název je odvozen na základě jeho četného výskytu v rostlinné říši, ale mimo to se nachází i u kvasinek, hub, mořských organismů nebo právě u savců.[45] Volný P vykazuje protizánětlivé a antiproliferativní účinky, disponuje potenciálním terapeutickým využitím v léčbě zánětlivých a proliferativních kožních nemocí. Je schopen zabránit infiltraci zánětlivých buněk do dermis.[57] P je také schopný inhibovat růst bakterií obdobně jako ostatní sfingoidní báze.[58] Od S i dS se P liší přítomností dalšího hydroxyly v poloze 4, což má vliv na biofyzikální vlastnosti, protože to slouží jako další místo pro tvorbu vodíkových můstků. Díky těmto vazbám pak lze přepokládat, že ceramidy obsahující P tvoří pevnější lipidovou síť.[45]

6-hydroxysfingosin, (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol, je nejnověji popsanou sfingoidní bázi. Tato sfingoidní báze, která se vyskytuje výhradně v epidermis, byla objevena teprve v roce 1994 a stereochemická struktura byla objasněna v roce 2005.[59] S tím souvisí to, že není komerčně dostupná pro experimenty a není prozkoumána tolik, jako je tomu u zbylých sfingoidních bází.[46]

2.5.1 Význam sfingoidních bází v kožní bariéře

Sfingoidní báze a volné mastné kyseliny, souhrnně označovány jako antimikrobiální lipidy (angl. antimicrobial lipids; AML), vykazují antimikrobní aktivitu. Je třeba upozornit, že zde hovoříme o volných mastných kyselinách původem z kožního mazu (kyselina laurová a sapienová), a ne o těch s dlouhým řetězcem pocházejících z ceramidů, které vlastnosti antimikrobní nemají.[51, 60] Tyto dva typy látek působí nejen antibakteriálně (proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím), ale i antifungálně, antivirově nebo antiparaziticky.[51, 61, 62] Zatímco u mastných kyselin existuje několik studií, které se touto jejich vlastností zabývají, u sfingoidních bází je to spíše minimálně. Každopádně je potvrzeno, že u obou těchto skupin je aktivita přítomna, je specifická a na dávce závislá. Někdy se tyto antimikrobiální lipidy

považují za součást vrozené imunity. Báze, u kterých byla detekována antimikrobiální aktivita, jsou S, dS, H a P.[51] Co se týče mechanismu tohoto antimikrobiálního působení, předpokládá se, že může docházet k tvorbě pórů v bakteriální buněčné stěně, k lýze buněk, a to buď zasažením prostorového uspořádání nebo přímou vazbou na proteiny (například inhibice bakteriální proteinkinasy). Někdy se uvádí, že snižují bakteriální adherenci.[62-64] Některé studie ukazují rozdíl jak v působení jednotlivých typů sfingoidních bází, tak i odlišné dopady působení na jednotlivé druhy bakterií. Nižší potenciál vlivu na bakterie ukazuje například P, který je o něco hydrofilnější než ostatní, a proniká tedy pravděpodobně o něco hůře přes bakteriální membrány.[65] Na základě tohoto působení jsou sfingoidní báze považovány za látky s potenciálním profylaktickým nebo terapeutickým účinkem u infekčních onemocnění.[61]

Zatímco oblast antimikrobního působení, tedy podíl sfingoidních bází na ochraně proti mikrobům v kůži, je víceméně objasněna, zbylé ovlivnění bariérových funkcí je zatím nejasné. Je známo, že ceramidy spadají mezi kožní lipidy, které jsou zodpovědné za bariérovou funkci SC tvorbou multilamelárních struktur, tedy chrání tělo před pronikáním látek z vnějšího prostředí a zároveň se podílí na optimální kožní hydrataci.[2] Jejich degradací vznikají volné mastné kyseliny, které se taktéž podílejí na lamelárním uspořádání, zatímco druhá větev, sfingoidní báze [32], zůstávají neúplně prozkoumané a o jejich vlivu na permeabilitu kožní bariéry se toho příliš neví. Vzhledem k minoritnímu množství volných sfingoidních bází oproti třem hlavním kožním lipidům, se u zdravé kožní bariéry volné sfingoidní báze těžko posuzují. Z celkového množství lipidů ve SC tvoří volné sfingoidní báze cca 0,4 % a v celém epidermis je to jen přibližně 0,1 %.[37]

Sfingoidní báze mohou ovlivňovat permeabilitu SC a pokud dojde ke změnám poměrů S:dS, pravděpodobně může dojít k narušení stability lamelárních membrán nebo dokonce k narušení lamelární organizace. Předpokládá se, že sfingoidní báze ovlivní permeabilitu SC spíše strukturálně než svým chováním se jako detergent na základě amfifilní povahy.[26, 41, 54]

2.6 Poruchy kožní bariéry

Setkáváme se s velkou řadou kožních nemocí různého charakteru. Atopická dermatitida (AD), psoriáza (lupénka) a lamelární ichtyóza, to jsou tři nejčastější defekty kůže, jejichž hlavní charakteristický rys je porušená kožní bariéra.[1] To je i důvodem, proč velké množství studií, které se kožní bariérou zabývají, využívá právě modely vycházející z těchto onemocnění. Na jednu stranu to slouží k lepšímu poznání jejich patologického procesu, na druhou stranu samotná porucha nám může pomoci poznávat kožní bariéru jako takovou.

2.6.1 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida je chronické zánětlivé kožní onemocnění, které postihuje až 20 % dětské a 10 % dospělé populace. Projevuje se především svěděním a suchostí kůže. Její patofyziologie je komplexní, vzniká na podkladě genetických a environmentálních rizikových faktorů. Mezi základní patogenetické faktory spadá porušená vrozená imunita (snížené hladiny defenzinů, které působí antibakteriálně, antivirově a antimykoticky), infekce *Staphylococcus aureus* (souvisí s deficitem defenzinů a porušenou bariérovou funkcí) a změněná imunita (zvýšené hladiny IgE a T buněk vedoucí k autoimunitní reakci). V neposlední řadě máme porušenou kožní bariéru, předpokládanou hlavní příčinu rozvoje atopické dermatitidy.[66, 67] Porušená kožní bariéra souvisí s mutací filaggrinu, klíčového proteinu přítomného v SC, a poté s defekty u kožních lipidů. Filaggrin je velmi důležitý pro bariérovou funkci, konkrétně pro kyselé pH, které potřebují ceramidy, respektive enzymy, které se na metabolismu ceramidů podílí.[68] Studie ukazují zvýšené hladiny Cer AS, Cer AH, Cer AP, Cer NS a těch s krátkými řetězci do C42 nebo naopak snížení hladin Cer NP, Cer NH, acylceramidů a těch s dlouhými řetězci nad C44. Obdobně lze pozorovat změny i u hladin volných mastných kyselin, kdy dochází k zvýšení koncentrace těch s krátkými řetězci, a naopak poklesu těch s dlouhými řetězci.[69] Několik prací pak potvrzuje i změnu hladin volných sfingoidních bází.[26, 41-43]

2.6.2 Psoriáza (lupénka)

Psoriáza je zánětlivé onemocnění, při kterém dochází k zvýšené proliferaci a zároveň k defektní diferenciaci keratinocytů, a které postihuje 2–3 % populace. Patogeneze probíhá na podkladu zvýšené aktivace T buněk a porušení epidermální bariéry. Stejně jako u atopické dermatitidy i zde ukazují studie změny hladin ceramidů jako je zvýšení Cer NS a snížení Cer NP, Cer AP a acylceramidů. Za změny je pravděpodobně zodpovědný deficit palmitoyltransferasy u pacientů s psoriázou, který je zodpovědný za syntézu ceramidů *de novo*. [66, 70] Opět existují studie, které objevily zvýšené hladiny sfingodiních bází ve volné formě u epidermis psoriatických pacientů. [40]

2.6.3 Ichtyosis vulgaris

Ichtyózy jsou širokou skupinou kožních nemocí, které nejsou příliš časté. S nejvyšší incidencí (1:300) se potkáme u tzv. ichtyosis vulgaris. Projevuje se hyperproliferací a keratinizací, na kůži jsou pak přítomny nápadné šupiny. Toto onemocnění má velmi podobný patogenetický podklad jako atopická dermatitida, také je zde charakteristická přítomnost mutace genu pro filaggrin. Opět zde dochází k změnám hladin ceramidů, konkrétně jejich snížení včetně redukováných koncentrací acylceramidů. [66, 70]

2.7 SC *ex vivo* a další modely kožní bariéry

Použití lidské kůže *in vivo* je sice nejvhodnější variantou pro napodobení reálných podmínek, ale kvůli finanční náročnosti a možným efektům na jedince při aplikaci toxických látek ne úplně časté. Problémem je také obtížná měřitelnost výsledků a vysoká variabilita. Z tohoto důvodu je v experimentech s kožní bariérou využíváno spíše SC *ex vivo*. [71] *Ex vivo* znamená mimo žijící organismus, tedy že orgán, buňky nebo tkáň jsou získány od žijícího organismu, ale pracuje se s nimi mimo něj. [72] Kůže od lidských jedinců pochází hlavně z oblasti hrudníku, břicha nebo zad, a i zde je třeba počítat s jistou variabilitou, především co do tloušťky SC, stupně hydratace nebo lipidového složení. Je vhodnější používat jako modelovou membránu právě epidermis nebo samotné SC, které napodobují stav vazodilatace.

Kapilární cirkulace za fyziologických podmínek odstraňuje proniklé molekuly, a pokud by byla použita kůže v plné tloušťce, vedlo by to k situaci napodobující vazokonstrikci.[71] Zároveň je vhodné i použití celého SC, nejen jeho svrchních vrstev, protože například změny lipidových struktur se projevují až v hlubších vrstvách.[73]

Ještě o něco dostupnější, než lidské SC *ex vivo* jsou analogické modely, ale získané od zvířat. Využívá se kůže získaná od hlodavců (myš, potkan), prasete nebo hadí. Prasečí kůže je z histologického hlediska i tloušťkou srovnatelná s kůží lidskou. V prasečím SC převažuje hexagonální uspořádání lipidů, zatímco v lidském je to orthorhombické, a ačkoliv jsou zde ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny také v ekvimolárním poměru, kompozice se od lidského SC do jisté míry liší. Studie však ukazují, že propustnost vepřové kůže jak pro hydrofilní, tak pro lipofilní permeanty je velmi podobná, na rozdíl třeba od psů a hlodavců. Zajímavým modelem je pak kůže hadí, která obsahuje ploché dlaždicové buňky obklopené fosfolipidy. U tohoto modelu je permeabilita velmi podobná jako u lidské kůže, je třeba ale zohlednit mezidruhové rozdíly hadů. Asi nejvyužívanější, kvůli snadné dostupnosti, je ale kůže hlodavců *in vitro*, nejvíce se lidské kůži blíží potkaní, která ale obecně bývá o něco propustnější.[71]

V některých ohledech jsou lepší zjednodušené modely, které sice nesimulují tak dobře reálné SC, ale jsou méně variabilní a jejich složení potažmo strukturu můžeme při jejich přípravě přizpůsobit potřebám konkrétního experimentu. Kožní lipidy nebo jejich analoga se aplikují na určitý povrch, čímž se vytvoří modelová membrána. Membrány se pak pro měření umísťují do Franzových difuzních cel nebo se využívá tzv. PAMPA (angl. parallel artificial membrane permeability assay).[74, 75]

3 METODICKÁ ČÁST

3.1 Přístroje a metodika

V této části diplomové práce jsou představeny jednotlivé metody, které byly využity v rámci experimentu, zároveň jsou zde ve zkratce popsány použité přístroje, jejich konstrukce a principy.

3.1.1 Příprava lidské kůže a izolace SC

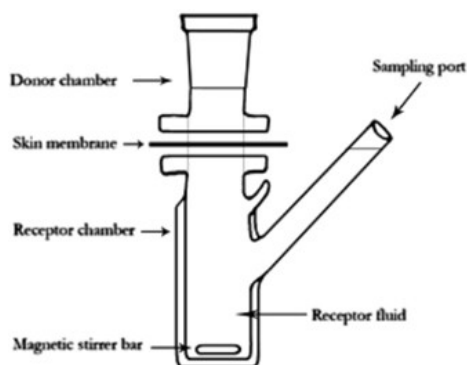
Lidská kůže pro permeační experimenty je získávána od pacientů, kteří podstupují operace v rámci plastické chirurgie. Kůže je ze zdravotnického zařízení dodávána s podkožním tukem, který je nutné před zahájením experimentu pečlivě odstranit pomocí skalpelu. Poté je kůže otřena pomocí acetonu, tím je zbavena zbytků podkožního tuku a zároveň kožního mazu, aby v rámci experimentu nedošlo ke kontaminaci vzorků tukem. Kůže zbavená podkoží se oplachuje ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (viz kapitola 4.1.2 Chemikálie připravené pro experiment) a je pečlivě osušena a zabalena do plastových sáčků. Kůže je poté skladována v mrazničce při teplotě $-20 \pm 0,5$ °C.[76]

Z předpřipravené lidské kůže se izoluje SC dle validovaného postupu, který uvádí Kligman and Christophers. Nejprve je kůže rozmrazena a vložena do ultračisté vody o teplotě přibližně 60 °C po dobu několika vteřin. Za použití dvou pinzet se opatrně stáhne epidermis oddělením od dermální části, vždy pomocí tupých částí, aby nedošlo protržení. Oddělená epidermis se vloží do Petriho misky s fosfátovým puftrem a trypsinem (koncentrace cca 0,5 %), pomocí něhož dojde k rozrušení spodních vrstev (bazální, špičaté a granulózní). Epidermis je takto inkubována 12 hodin při teplotě $32 \pm 0,5$ °C. Po této době se získá SC (spodní vrstvy jsou trypsinem destruovány); SC se nakonec opláchne fosfátovým puftrem a acetonem s cílem zbavení se případných nečistot a povrchových lipidů.[77]

3.1.2 Franzovy difuzní cely

Franzovy difuzní cely se používají pro hodnocení permeačních parametrů lipidových membrán, jednoduchých i komplexnějších modelů, tedy i izolovaných částí

kůže (SC). Franzovy cely, vyrobené z inertního materiálu, se skládají ze dvou skleněných částí, donorové a akceptorové (receptorové) s objemem v rozsahu od 0,5 do 10 ml. Vrchní donorová část slouží především k aplikaci různých permeantů na membránu. Spodní akceptorová část má raménko, které slouží k plnění kapalným médiem (nejčastěji pufrem) a k odběru vzorků pomocí mikropipety nebo injekční stříkačky. Ve spodní části cely se nachází také magnetické míchadlo, které je důležité pro udržení konstantní koncentrace a teploty kapaliny (Obrázek 7). Mezi donorovou a akceptorovou částí cely je umístěn teflonový držák sestávající z tenčí (přiléhá k akceptorové části cely) a tlustší destičky, která přiléhá k donorové části Franzovy cely. Mezi destičky jsou vkládány jednotlivé membrány. U většiny studií permeability je membrána v držáku uložena horizontálně a stranou odpovídající svrchní části kůže tak, aby směřovala do vzduchu. Plocha vystavené membrány se pohybuje od 0,2 do 2 cm². [78, 79]



Obrázek 7 – Schéma Franzovy difuzní cely. [79]

3.1.3 Ztráta vody přes membránu

Ztráta vody přes membránu neboli TEWL (angl. *transepidermal water loss*) je jedním z parametrů, které umožňují posouzení permeability SC, konkrétně permeability pro hydrofilní molekulu vody. Obecně platí, že se zvyšující se hodnotou ztráty vody bývá spojené určité narušení bariérové funkce kůže. Proto je tento parametr také klíčovým v posouzení dermatologických onemocnění. [15]

Pro měření TEWL je využíván přístroj AquaFlux AF200 (Biox Systems Ltd, UK). Ten je spojen s počítačem, který umožňuje přístroj kalibrovat,

nastavovat příslušné parametry měření, sledovat jeho průběh a konečně zobrazit výsledky měření. Měření je založeno na přiložení hlavy přístroje k difuzní ploše membrány. Hlava přístroje (sonda) je tvořena měřicí komorou, která je z jedné strany otevřená a z druhé uzavřená kondenzátorem. Otevřená část se přikládá kolmo na měřený povrch, zatímco kondenzátor je udržován při teplotě pod bodem mrazu (Obrázek 8). Kondenzátor odvádí vodní páru z membrány a ukládá ji jako led. Přístroj je schopen zpracovat gradient vlhkosti výpočtem ze dvou hodnot naměřených v rozdílných prostorech. Po uplynutí definované doby měření přístroj měření vyhodnotí, což se projeví jako tzv. flux (tok), tedy hmotnost vody, která za určitý čas prošla membránou o definované difuzní ploše [g/h/m²].[80]



Obrázek 8 – Přístroj pro měření ztráty vody (AquaFlux AF 200), systém s kondenzační komorou.[81]

3.1.4 Elektrická impedance

Elektrická impedance je dalším z permeačních parametrů, který slouží k stanovení permeability pro nabitě částice. Principem je měření odporu kladeného střídavému proudu v k Ω , který je v případě stanovení u modelových membrán vztažen na jednotku plochy [k $\Omega \times \text{cm}^2$]. Čím nižší je měrný odpor, tím vyšší je propustnost studované membrány pro nabitě částice.[76] Elektrická impedance odráží stav SC (celistvost, přítomnost děr apod.), tedy i kožní bariéry. Různé defekty ve SC jsou obecně spojeny s poklesem elektrické impedance.[82]

Pro měření se využívá multimetr LCR 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo) s měřicím rozpětím 20 Ω – 10 M Ω a chybami v hodnotách k Ω < 0,5 %. Pro

měření elektrické impedance modelových membrán je nastaven paralelní režim se střídavou frekvencí 120 Hz.[83]

3.1.5 Permeabilita pro modelový permeant TH

Dalším z parametrů pro hodnocení modelových membrán/SC/kůže je stanovení permeability pro modelové permeanty, konkrétně TH. Na modelovou membránu se TH nanáší v podobě suspenze (viz kapitola 4.1.2 Chemikálie připravené pro experiment) a zjišťuje se tzv. flux TH v určitých časových úsecích. Principem je stanovení kumulativního množství TH prošlého membránou, které je poté vztaženo na difuzní plochu a čas, za který permeant prošel membránou. Tato závislost je označována jako permeační profil. Kumulativní množství se vyhodnocuje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).[84]

Ke kvantifikaci množství TH by využit HPLC přístroj Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) složený z pumpy LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, kolony CTO-20AC, diode array detektoru SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20A. Součástí pak je i kolona LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo).[83]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

4.1.1 Komerčně dostupné chemikálie a materiál

Sfingoidní báze (S, dS, P) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). Rozpouštědla v HPLC kvalitě a ostatní rozpouštědla byla zakoupena od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo), stejně jako propylenglykol, trypsin z prasečího pankreatu, TH a dodekahydrát fosforečnanu sodného. Chlorid sodný, chlorid draselný a dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného byly zakoupeny od firmy Lachema (Neratovice, Česká republika). Kruhové nylonové membránové filtry (průměr: 47 mm, velikost pórů: 0,45 μm) byly zakoupeny od společnosti GVS Life Sciences (Maine, USA).

4.1.2 Chemikálie připravené pro experiment

Nejdříve byla připravena směs propylenglykolu a ethanolu v poměru 7:3 (v/v). Volba a poměr rozpouštědel byl zvolen podle literatury [85] a s ohledem na to, aby rozpouštědla nevyextrahovala lipidy a nezničila tak SC. V této směsi byly následně suspendovány sfingoidní báze v takovém množství, aby vznikly 1% suspenze. Pro lepší dispergaci byla využita ultrazvuková lázeň, a zároveň, aby byla směs při aplikaci co nejvíce homogenní, byla vialka se směsí vložena do automatické třepačky. Bylo připraveno několik typů suspenzí:

- 1% suspenze S,
- 1% suspenze dS,
- 1% suspenze P,
- 1% suspenze S:dS (5:1, m/m),
- 1% suspenze S:dS (15:1, m/m).

U posledních dvou typů suspenzí byly poměry voleny záměrně, na základě jiného experimentu. Zastoupení sfingoidních bází se snažilo přiblížit poměru sfingoidních bází v zdravé (5:1, m/m) a nemocné kůži (15:1, m/m).[26]

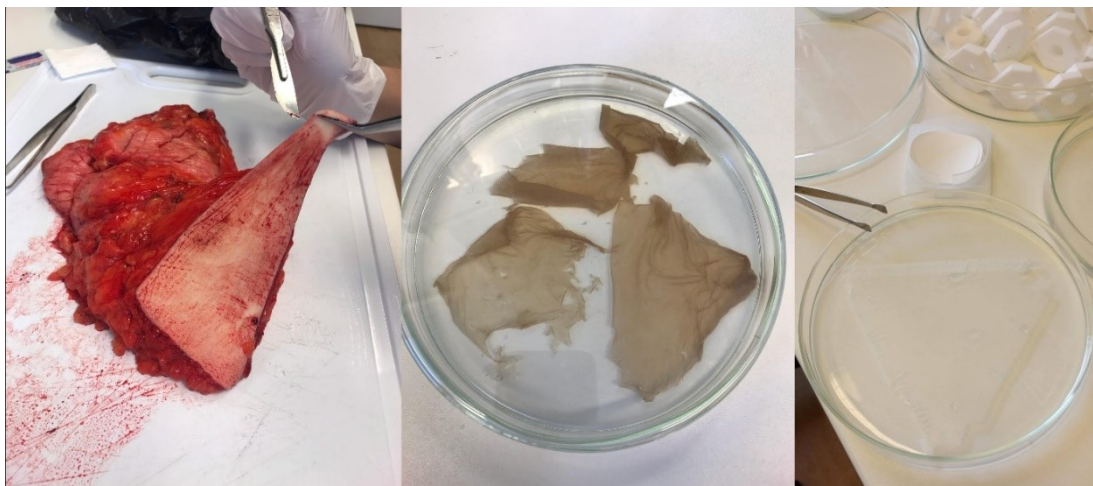
V permeačním experimentu byl používán fosfátový pufr 10 mmol/l (pH 7,4), který se skládá z $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (8 mmol/l), NaCl (137 mmol/l), KCl (2,7 mmol/l), ultračisté vody a gentamicinu (50 mg/l), který slouží k zabránění mikrobiální kontaminace. Pro permeaci byla připravena 5% (w/v) suspenze TH v 60% vodném roztoku propylenglykolu. Vialka byla opět vložena do ultrazvuku a následně ponechána temperovat v termostatu na $32 \pm 0,5$ °C. Ultračistá voda byla připravena použitím filtračního systému Millipore Q.

4.2 Průběh experimentu

Tato část popisuje postupně průběh celého experimentu od přípravy modelů SC až po získání výsledků. Veškerá práce byla provedena dle validovaných metod, popsaných výše, a s použitím dříve uvedených chemikálií a přístrojů.

4.2.1 Příprava modelového SC

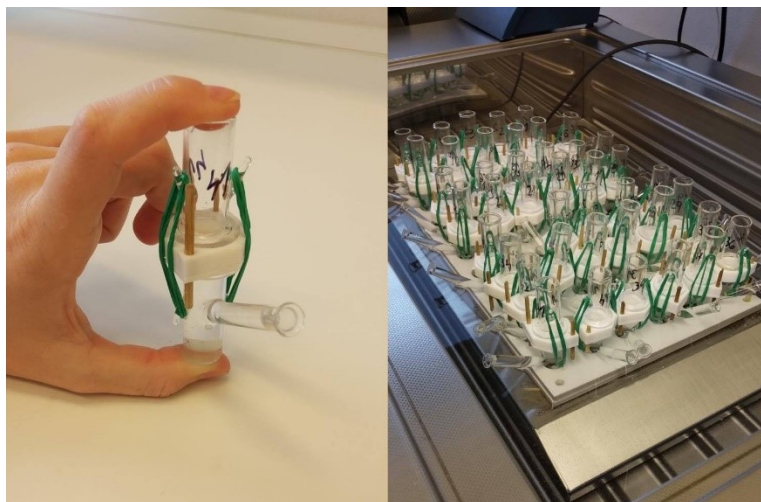
V rámci experimentu byla využita lidská kůže, získaná od pacientky (žena, zdravá, rok narození 1970), která podstoupila operaci v zdravotnickém zařízení Sanatorium Sanus v Hradci Králové na Oddělení plastické a estetické chirurgie. Lidská kůže byla použita na základě souhlasu Etické komise centra Sanus (4/5/2018) a zároveň s ní bylo nakládáno v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Kůže byla zpracována a následně bylo izolováno SC podle výše popsané metodiky (viz kapitola 3.1.1 Příprava lidské kůže a izolace SC). Jednotlivé kroky, tj. odstraňování podkoží, izolace epidermis ponořením kůže do horké vody a izolace epidermis trypsinem, jsou zobrazeny na Obrázku 9.



Obrázek 9 – zleva: lidská kůže v procesu zbavování se podkožního tuku; epidermis oddělená pinzetami ve směsi pufru a trypsinu; izolované SC připravené pro permeační experiment.

4.2.2 Instalace SC do Franzových cel

Izolované SC bylo umístěno na kruhové nylonové membránové filtry, svrchní částí směrem vně, a pomocí skalpelu bylo SC s filtrem rozřezáno na takové kousky, aby mohly být umístěny do teflonových držáků s difuzní plochou 1 cm². Některé části SC byly při oddělování od zbylých vrstev poškozeny, bylo tedy třeba pečlivě vybrat kousky, které neobsahovaly žádné okem viditelné trhliny a jiné defekty. Celkem bylo připraveno 42 vzorků SC (6 typů vzorků po 7 opakováních), které byly instalovány do teflonových držáků. Vzorky byly umístěny mezi teflonové destičky horizontálně. Sestavené cely s držáky (Obrázek 10) se poté naplnily puftrem vždy tak, aby bylo skleněné raménko akceptorové části plné po okraj. Přesné objemy pufru (průměrně 7,5 ml) byly zaznamenány, aby mohly být následně použity pro vyhodnocení výsledků experimentu. Naplněné cely byly vloženy do držáků ve vaně s vodou a ponechány 12 hodin ekvilibrovat při $32 \pm 0,5$ °C, tedy při teplotě fyziologické pro kůži (Obrázek 10).[86]



Obrázek 10 – Sestavené Franzovy difuzní cely ve vaně s vodou temperovanou na $32 \pm 0,5$ °C.

4.2.3 Měření permeačních parametrů

Po ustálení ve Franzových celách následovalo samotné měření permeačních parametrů. V první fázi byly měřeny parametry (TEWL a elektrická impedance) pro samotné SC a v druhé fázi pak parametry (TEWL, elektrická impedance a flux TH) po přidání vzorků v podobě suspenzí lipidů nebo směsi rozpouštědel na kontrolní membránu. V rámci toho bylo 42 cel rozděleno do šesti skupin po sedmi opakováních (Obrázek 11):

- 1. typ vzorku: „kontrola“ – SC, na které bylo nanášeno 100 μ l směsi PG:EtOH (7:3, v/v),
- 2. typ vzorku: „sfingosin“ – SC + aplikováno 100 μ l 1% suspenze S v PG:EtOH (7:3, v/v),
- 3. typ vzorku: „dihydrosfingosin“ – SC + aplikováno 100 μ l 1% suspenze dS v PG:EtOH (7:3, v/v),
- 4. typ vzorku: „fytosfingosin“ – SC + aplikováno 100 μ l 1% suspenze P v PG:EtOH (7:3, v/v),
- 5. typ vzorku: „zdravá kožní bariéra“ – SC + aplikováno 100 μ l 1% suspenze S:dS (5:1, m/m) v PG:EtOH (7:3, v/v),
- 6. typ vzorku: „nemocná kožní bariéra“ – SC + aplikováno 100 μ l 1% suspenze S:dS (15:1, m/m) v PG:EtOH (7:3, v/v).

Po aplikaci směsi rozpouštědel/1% suspenzí sfingoidních bází byly Franzovy cely ponechány přes noc při teplotě $32 \pm 0,5$ °C. Druhý den byly zbytky suspenzí omyty fosfátovým pufrům, opatrně osušeny pomocí vatových tamponů a ponechány při teplotě $32 \pm 0,5$ °C po dobu 2 hodin.

Typ vzorku	1. fáze	2. fáze
„kontrola“	SC	100 μ l PG + EtOH (7:3, v/v)
„sfingosin“	SC	100 μ l 1% suspenze S v PG:EtOH (7:3, v/v)
„dihydrosfingosin“	SC	100 μ l 1% suspenze dS v PG:EtOH (7:3, v/v)
„fytosfingosin“	SC	100 μ l 1% suspenze P v PG:EtOH (7:3, v/v)
„fyziologické SC“	SC	100 μ l 1% suspenze S:dS (5:1, m/m) v PG:EtOH (7:3, v/v)
„patologické SC“	SC	100 μ l 1% suspenze S:dS (15:1, m/m) v PG:EtOH (7:3, v/v)

Obrázek 11 – Tabulka s typy vzorků v jednotlivých fázích.

4.2.3.1 Měření ztráty vody přes membránu

Měření ztráty vody bylo prováděno na začátku experimentu u všech vzorků. Analogicky probíhalo měření TEWL i v druhé fázi, tedy po nanesení směsi rozpouštědel (PG/EtOH)/1% suspenzí sfingoidních bází.

Ztráta vody byla měřena pomocí AquaFlux AF200. Nejdříve bylo potřeba přístroj kalibrovat. Pro změření jednotlivých vzorků byla sundána vrchní (donorová) část Franzovy cely a hlava přístroje přiložena na otvor držáku kolmo, aby přiléhala ze všech stran teflonového držáku. Po zaznění signálu, který oznamoval, že přístroj doměřil, byla zapsána hodnota ztráty vody v $[g/h/m^2]$.

Měření po celou dobu probíhalo za konstantních podmínek, což bylo částečně usnadněno přístrojem, který není výrazně citlivý na okolní změny teploty nebo vlhkosti.[87] Takto bylo proměřeno všech 42 vzorků, a to minimálně ve dvou opakováních. V případě, že se hodnoty mezi sebou výrazně lišily, bylo provedeno třetí opakování.

4.2.3.2 Měření elektrické impedance

Měření elektrické impedance následovalo vždy až po měření TEWL a stejně jako u měření ztráty vody, ve dvou fázích, tj. na začátku experimentu u všech vzorků a po nanesení směsi rozpouštědel (PG/EtOH)/1% suspenzí sfingoidních bází.

Samotnému měření předcházela aplikace 500 μ l fosfátového pufru o pH 7,4 pomocí pipety na každý vzorek. Po 60 minutách ustálení se jedna nerezová sonda ponořila do naneseného pufru v donorové části cely tak, aby se přímo nedotýkala membrány. Druhá sonda byla skrz raménko Franzovy cely umístěna do akceptorové části, čímž byl uzavřen elektrický obvod. Na displeji přístroje pak mohly být přímo odečítány a zapisovány hodnoty v k Ω . V druhé fázi, tedy po aplikaci suspenzí lipidů bylo prováděno měření stejným způsobem, tedy opět až následovně po měření TEWL.

4.2.3.3 Měření permeability pomocí modelového permeantu TH

Poslední z permeačních parametrů, které byly v rámci experimentu měřeny, byla propustnost membrán pro TH. Na začátku byla na každý vzorek SC skrz donorovou část Franzovy cely aplikována předpřipravená suspenze TH v 60% PG, konkrétně 100 μ l. Poté po dobu 8 hodin bylo z akceptorové části skrz ramínko odebíráno 300 μ l pufru, do kterého postupně přecházel TH. Po každém odběru byla Franzova cela zpět doplněna stejným objemem nového fosfátového pufru. První odběr byl proveden v čase 1 hodina, pak 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin a nakonec 8 hodin. Pro každou sérii odběrů bylo pak pomocí HPLC stanovováno kumulativní množství TH prošlého naší membránou. U HPLC byla použita jako mobilní fáze směs MeOH/0,1M NaH₂PO₄ v poměru 4:6 (v/v), průtoková rychlost byla 1,2 ml/min, měření probíhalo při teplotě 35 °C a vlnové délce 272 nm. Nastříkovaný objem byl 20 μ l a nástřík probíhal po dobu 4 minut. Retenční čas TH byl $2,9 \pm 0,1$ min.[84]

4.2.3.4 Zpracování výsledků

Veškeré získané hodnoty byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel a GraphPad s využitím metody analýzy rozptylu (ANOVA). V případě TEWL se zapsané hodnoty fluxu v jednotkách [g/h/m²] pro každou skupinu membrán zprůměrovaly a stanovila se jejich standardní chyba průměru (SEM). Dále se u TEWL určoval tzv. *fold change*, tedy poměr hodnot TEWL před a po nanesení 1% suspenze sfingoidních bází, případně směsi rozpouštědel (PG/EtOH). Totožný postup byl využit i při zpracování hodnot získaných z měření elektrické impedance; průměry získaných hodnot byly dány do poměru a určen *fold change*.

U permeability TH jsou vstupními hodnotami pro zpracování nekorigované koncentrace změřené pomocí HPLC. Tyto koncentrace byly zkorigovány na objem odběru (300 µl), objem Franzovy cely (~ 7,5 ml) a na plochu membrány (1 cm²). Z korigovaných hodnot koncentrací TH bylo získáno tzv. kumulativní množství TH prošlého membránou. Toto kumulativní množství bylo zaneseno do grafu závislosti koncentrace na čase, aby se pomocí lineární regrese spočítala hodnota směrnice přímky, která odpovídá tzv. fluxu TH.

5 VÝSLEDKY

V rámci této kapitoly je pojednáno o výsledcích experimentu. Výsledky všech permeačních parametrů jsou zobrazeny v podobě grafů a současně doplněny slovním popisem.

Jednotlivé membrány byly vždy označeny tak, aby název vyjadřoval, jaký typ sfingoidní báze byl aplikován a zda je pojednáváno o membráně před, nebo po aplikaci 1% suspenzí lipidů na SC. Pokud je tedy použito například označení dS (+), jedná se o membránu již po aplikaci 1% suspenze na modelové SC, konkrétně 1% suspenze dihydrosfingosinu (dS). Kontrolní membrána je označena jako Ctrl (-) před nanesením a Ctrl (+) po nanesení směsi rozpouštědel (PG/EtOH).

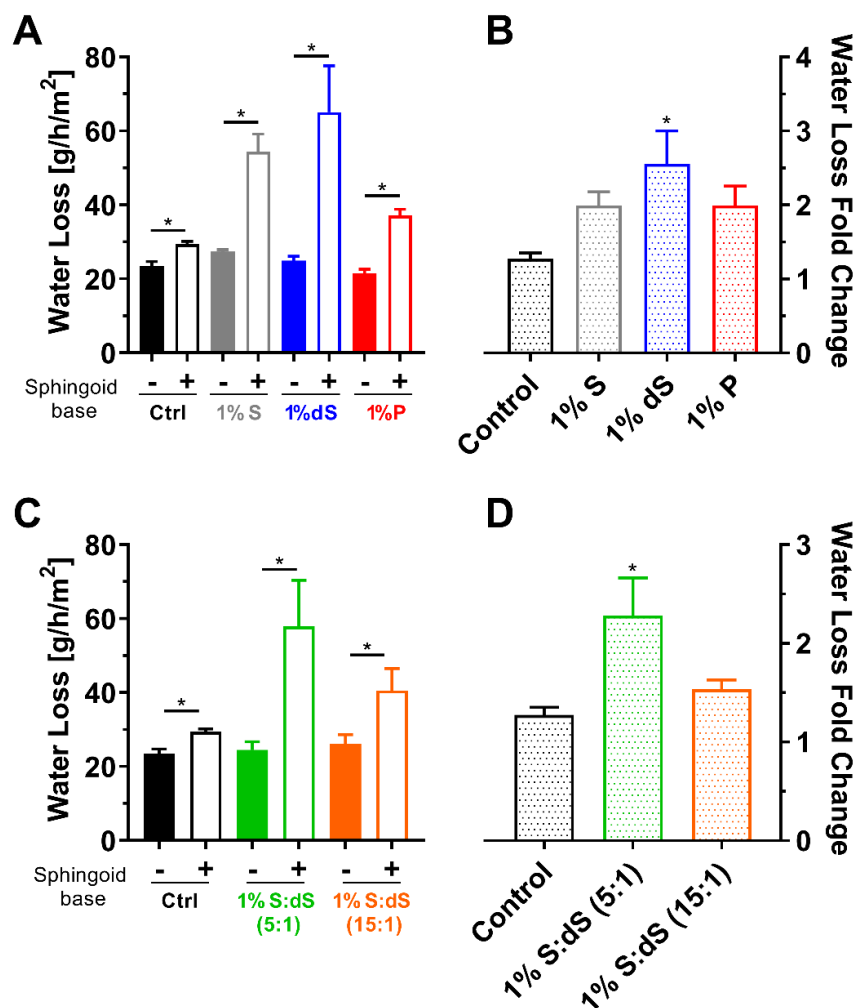
5.1.1 Výsledky měření ztráty vody přes membránu

Výsledky měření ztráty vody přes membránu zobrazuje Obrázek 12. Černá barva byla zvolena pro tzv. kontrolní membránu, na kterou v druhé fázi nebyla aplikována suspenze lipidů, ale pouze směs rozpouštědel (PG/EtOH). V grafu A a grafu B šedá barva znázorňuje údaje pro S, modré jsou sloupce pro dS a červené pro P. V grafu C a D zobrazuje zelená barva směs S:dS (5:1, m/m) a oranžová barva směs S:dS (15:1, m/m). V grafech A a C lze vidět TEWL v g/h/m², kdy byly zvoleny sloupce s výplně (-) pro hodnoty v první fázi (izolované SC před nanesením vzorků suspenzí). Sloupce bez výplně (+) jsou pak pro druhou fázi měření (po aplikaci 1% suspenzí nebo směsi rozpouštědel). Graf B a D znázorňuje hodnotu *fold change*, tedy poměr hodnot ztráty vody před a po nanesení suspenze, případně směsi rozpouštědel (PG/EtOH). Naměřené hodnoty TEWL byly zprůměrovány.

U Ctrl (-) byla změřena a vypočtena hodnota $23,41 \pm 1,31$ g/h/m² a u Ctrl (+) $29,35 \pm 0,82$ g/h/m². Dále byly zjištěny hodnoty pro S (-) $27,35 \pm 0,52$ g/h/m², S (+) $54,44 \pm 4,72$ g/h/m², dS (-) $24,92 \pm 1,19$ g/h/m² a dS (+) $65,07 \pm 12,59$ g/h/m². Pro P (-) byly získány hodnoty $21,46 \pm 1,19$ g/h/m² a pro P (+) $37,08 \pm 1,75$ g/h/m². Pro samostatné volné sfingoidní báze i pro kontrolní membránu se všechny hodnoty TEWL (-) statisticky významně liší od TEWL (+) hodnot ($p < 0,05$) (Obrázek 12, Graf A).

U S:dS (5:1, m/m) (-) byly naměřeny a vypočteny hodnoty $24,47 \pm 2,23 \text{ g/h/m}^2$ a u S:dS (5:1, m/m) (+) $57,87 \pm 12,51 \text{ g/h/m}^2$. Další hodnoty jsou pro S:dS (15:1, m/m) (-) $26,14 \pm 2,48 \text{ g/h/m}^2$ a pro další membránu S:dS(15:1, m/m) (+) $40,58 \pm 5,90 \text{ g/h/m}^2$. Hodnoty TEWL před a po nanesení 1% suspenzí směsí S a dS v různých poměrech se opět statisticky významně liší ($p < 0,05$) (Obrázek 12, Graf C).

V dalších grafech lze vidět vyjádření pomocí *fold change*. Poměr hodnot před a po nanesení 1% suspenzí nebo směsi rozpouštědel (PG/EtOH) je $1,27 \pm 0,08$ pro Ctrl; $2,00 \pm 0,18$ pro S; $2,56 \pm 0,44$ pro dS a $1,99 \pm 0,26$ pro P (Obrázek 12, Graf B). Dále byla získána hodnota pro S:dS (5:1, m/m), která je $2,28 \pm 0,38$ a pro S:dS (15:1, m/m) činí $1,53 \pm 0,09$ (Obrázek 12, Graf D). V případě *fold change* byl statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$) zaznamenán pouze u vzorků s aplikovaným dS a S:dS (5:1, m/m).



Obrázek 12 – (grafy A, B, C, D): Grafické znázornění výsledků TEWL; hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± SEM (střední chyba průměru), $n > 6$, * znázorňuje statisticky významný rozdíl TEWL ($p < 0,05$).

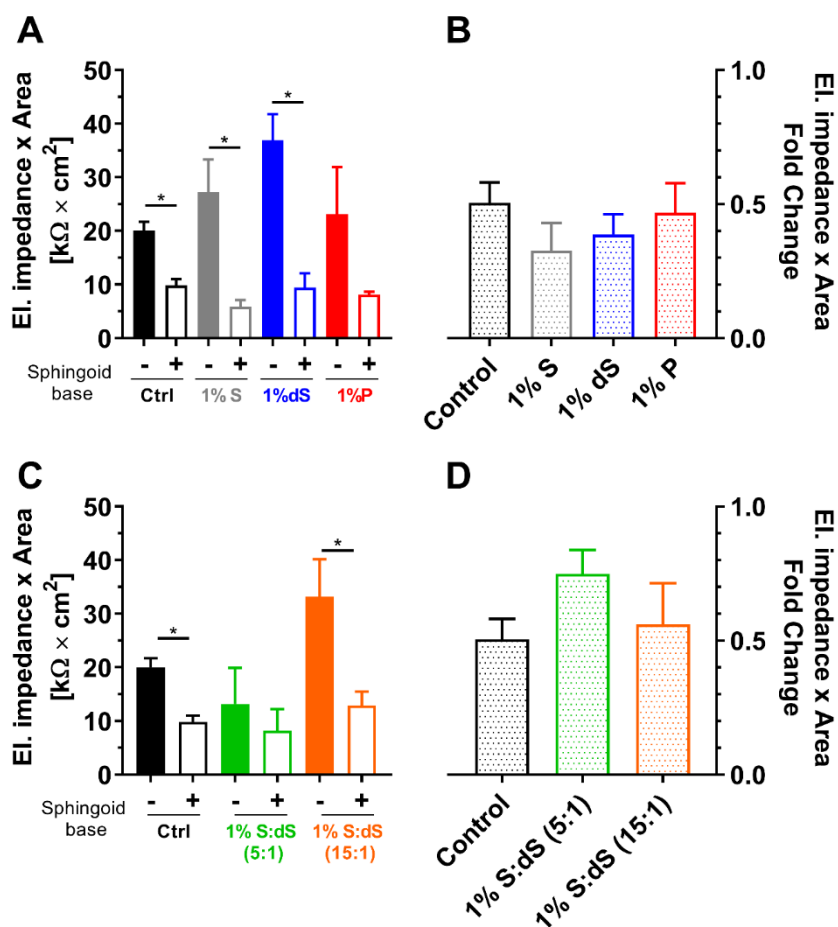
5.1.2 Výsledky měření elektrické impedance

Dalším zjišťovaným permeačním parametrem je elektrická impedance, jejíž výsledné hodnoty znázorňují grafy na Obrázku 13. Co se týče označení jednotlivých vzorků, tak byl použit stejný systém jako u měření hodnot TEWL. V grafech A a C je vyjádřena EI vztažená na jednotku difuzní plochy (kruh v teflonovém držáku) v $k\Omega \times \text{cm}^2$. Grafy B a D znázorňují výsledky měření EI pomocí *fold change*. Po stanovení EI byly naměřené hodnoty zprůměrovány.

Pro Ctrl (-) byla změřena a vypočtena hodnota $20 \pm 2 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, pro Ctrl (+) $10 \pm 1 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. U S (-) je to $27 \pm 6 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, u S (+) $6 \pm 1 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, u dS (-) $37 \pm 5 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a dS (+) $9 \pm 3 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Výsledná hodnota EI pro P (-) činí $23 \pm 9 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a pro P (+) $8 \pm 1 \text{ }\Omega \times \text{cm}^2$ (Obrázek 13, Graf A). Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi EI (-) a EI (+) lze nalézt u Ctrl, S a dS.

Dále byla změřena a vypočtena hodnota pro S:dS (5:1, m/m) (-), která je $13 \pm 7 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a pro S:dS (5:1, m/m) (+) činí $8 \pm 4 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Pro S:dS (15:1, m/m) (-) byla získána hodnota $33 \pm 7 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a pro S:dS (15:1, m/m) (+) $13 \pm 3 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ (Obrázek 13, Graf C). Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi hodnotami před a po nanesení 1% suspenzí nebo rozpouštědla (PG/EtOH) nastal u S:dS (15:1, m/m).

V dalších grafech jsou znázorněny hodnoty *fold change*. *Fold change* pro Ctrl je $0,50 \pm 0,08$, pro S $0,33 \pm 0,10$, pro dS $0,39 \pm 0,08$ a pro P $0,47 \pm 0,11$ (Obrázek 13, Graf B). U S:dS (5:1, m/m) byla získána hodnota $0,75 \pm 0,09$. Dále u S:dS (15:1, m/m) byla změřena a vypočtena hodnota $0,56 \pm 0,15$ (Obrázek 13, Graf D). V případě *fold change* elektrické impedance vztažené na plochu nebyly zjištěny hodnoty, které by se daly označit jako statisticky významně rozdílné oproti Ctrl.



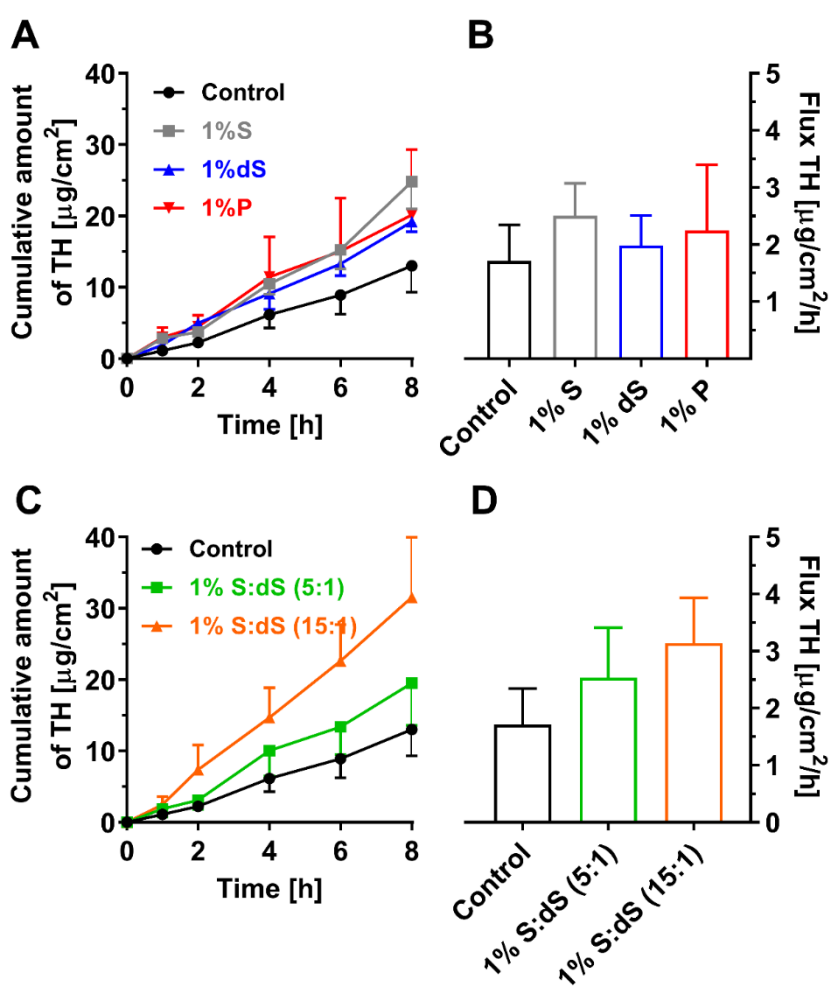
Obrázek 13 – (grafy A, B, C, D): Grafické znázornění výsledků elektrické impedance; hodnoty jsou prezentovány jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru), $n > 4$, * znázorňuje statisticky významný rozdíl EI ($p < 0,05$).

5.1.3 Výsledky měření permeability pro modelový permeant TH

S použitím stejného systému označování jsou uvedeny výsledky pro měření permeability membrán pro TH. V grafech A a C (Obrázek 14) lze vidět vyjádření pomocí kumulativního množství TH; jedná se o korigované množství (hodnoty získané z HPLC korigované objemem jednotlivých odběrů, objemem Franzovy cel a plochou modelové membrány) vztažené na jednotku plochy [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]. Lineární regresí byl následně získán flux TH [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$], který je zobrazen v grafech B a D (Obrázek 14). Veškeré hodnoty platí pro membrány až po nanesení směsi rozpouštědel (PG/EtOH) nebo 1% suspenzí lipidů, membrány tedy nesou

označení (+). Chybová úsečka je vždy vyjádřena z průměrů množství v jednotlivých časech odběru.

Pro Ctrl (+) byla změřena a vypočtena hodnota fluxu TH $1,71 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Dále byla získána hodnota pro S (+), která je $2,50 \pm 0,57 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, pro dS (+) činí $1,98 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a pro P (+) je to $2,24 \pm 1,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Pro membrány s nanesenou směsí lipidů v daném poměru byl zjištěn flux TH $2,54 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ pro S:dS (5:1, m/m) (+) a pro druhou směs, S:dS (15:1, m/m) (+), je hodnota fluxu $3,14 \pm 0,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.



Obrázek 14 – Grafické znázornění výsledků měření permeability pro TH; hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± SEM (střední chyba průměru), $n > 4$.

6 DISKUZE

Po zapsání a analýze výsledků všech provedených měření v rámci permeačního experimentu (stanovení TEWL, EI a fluxu TH) lze zhodnotit vliv volných sfingoidních bází na kožní bariéru, tedy hlavní námět této diplomové práce. Experiment vedl k posouzení vlivu tří volných sfingoidních bází – S, dS a P. Další, nejnověji popsanou sfingoidní bázi, tento experiment nezahrnoval, jelikož 6-hydroxysfingosin není komerčně dostupný a jeho syntéza je časově náročná. Jednotlivé permeační parametry spolu do jisté míry souvisí, minimálně všechny jsou schopné vypovídat o některých bariérových vlastnostech SC. Existují práce, které se zabývají kožní bariérou v jiných ohledech, například z hlediska charakterizace poruch kožní bariéry, ať už v rámci patofyziologie nebo klinického obrazu.[67, 69] Další práce, například některé publikované výzkumnou skupinou *Skin Barrier Research Group*, studují vliv hlavních složek SC, jako jsou ceramidy, volné mastné kyseliny nebo cholesterol. V mnohých ohledech je kožní bariéra dobře prozkoumána, ale některé její aspekty jsou zatím neprobádané. Toto platí i o volných sfingoidních bázích, jelikož doposud publikovaných studií, které by se zabývaly jejich vlivem na kožní bariéru, není mnoho.

Je známo, že u poruch kožní bariéry bývá, co se týče složení, změněný poměr volných sfingoidních bází oproti zdravé kožní bariéře. Obecně je nedostatek studií, které by se volnými sfingoidními bázemi u zdravého i porušeného SC zabývaly, ale ty, které existují, tento předpoklad potvrzují. Například Loiseau a kol.[26], podle kterého jsme volili poměry směsi S a dS pro experiment, tvrdí, že množství S se u modelů SC s AD zvyšuje, zatímco množství dS se snižuje. Toncic a kol.[41] (u kůže s AD) stejně jako Moon a kol.[40] (u kůže s psoriázou) však ukazují, že se zvyšuje množství jak S, tak i dS. Obě tyto studie se shodují v tom, že poměr S:dS se u SC s AD zvyšuje. Další publikace, která změny potvrzuje, pochází od Agrawal a kol.[42], který zjistil zvýšené hladiny S v potu subjektů s AD; poněkud zajímavé je zde i zjištění genderových rozdílů mezi hladinami volného S, u mužských subjektů s AD bylo zvýšení hladin větší oproti ženským subjektům s AD. Wakita a kol.[43] ukazuje u pacientů s psoriázou zvýšení hladin S a dS. Paradoxně existuje i studie, která tvrdí opak; Arikawa a kol.[88] publikoval výsledky, které ukazují pokles hladiny S u pacientů s AD, související s větším osídlením bakteriemi jako je *Staphylococcus*

aureus. Tato studie však nevyužívá ve svém experimentu celé SC, pouze svrchní část, a jelikož podle Fartasch a kol.[73] se projevují změny lipidových struktur až v hlubších vrstvách, pro posouzení je pravděpodobně vhodnější využívat SC celé. Na druhou stranu je nutno podotknout, že zjištění této studie je na základě znalostí klinických projevů AD celkem logické. Je známo, že atopická pokožka je náchylnější k infekci.[66] Zároveň většina zde uvedených studií tvrdí, že u AD je hladina volných sfingoidních bází zvýšena, a to se poněkud vylučuje s jejich antimikrobním působením, které by pak u AD mělo vést spíše k nižšímu riziku nasednutí infekce. Otázka, jak je to možné, je tedy na místě. Teoreticky by to mohlo být způsobené tím, že volné sfingoidní báze ovlivní kožní bariéru v mnoha ohledech (právě i třeba změnou permeability), které vedou k zvýšené náchylnosti k infekci, a jejich antimikrobní působení je pak jaksi zastíněno.

Víme tedy, že se hladiny volných sfingoidních bází u poruch SC nepochybně mění, ale nevíme přesně, jak to ovlivní bariérové vlastnosti SC. To je i důvodem proč byly v této studii na modelové membrány aplikovány právě samostatné volné sfingoidní báze.

Zvolené permeační parametry pomohly analyzovat dopad změněných hladin volných sfingoidních bází na SC, a to jak v obecné rovině, tak i rozdílné ovlivnění jednotlivými sfingoidními bázemi. TEWL, EI a flux TH samozřejmě nejsou jedinými parametry, které mohou vypovídat o vlivu volných sfingoidních bází na kožní bariéru. Volné sfingoidní báze ovlivňují SC i v jiných ohledech, které vyplývají z jejich funkce, a ty jsou shrnuty v teoretické části této práce na základě rešerše publikovaných prací (viz kapitola 2.5.1 Význam sfingoidních bází v kožní bariéře).

V tomto experimentu byl jako první parametr měřen TEWL, který ukazuje ztrátu vody skrz SC v g/h/m^2 . Z doposud získaných informací víme, že pokud je ztráta vody vysoká, vypovídá to o zhoršeném stavu SC, což, jak již bylo zmíněno, spadá mezi znaky některých kožních nemocí.[89] V grafech, případně u samotných hodnot, lze vidět některé tendence (viz kapitola 5.1.1 Výsledky měření ztráty vody přes membránu). Jednoznačně lze tvrdit, že po aplikaci volných sfingoidních bází (S, dS a P) v podobě 1% suspenzí došlo ke statisticky významnému zvýšení TEWL ($p < 0,05$) oproti samotnému modelovému SC. Tendenci zvyšujícího se TEWL

potvrzuje i Toncic a kol.[41], kde skrz analýzu pomocí lineární regrese ukazuje, že s rostoucí koncentrací [pmol/mg] jak S, tak i dS dochází k růstu TEWL. Určité zvýšení je v našem experimentu vidět i u Ctrl, když byla aplikována směs rozpouštědel (PG/EtOH). Oproti Ctrl je statisticky významně odlišné zvýšení TEWL ($p < 0,05$) pouze u dS, ale u ostatních sfingoidních bází lze určité zvýšení oproti Ctrl vidět též. U P došlo ke zvýšení TEWL, které je srovnatelné se zvýšením u S, zároveň tedy nižší oproti dS. Z měření TEWL v této studii tedy lze soudit, že ze samostatných volných sfingoidních bází má na ztrátu vody největší vliv dS. Pokud se podíváme na výsledky u membrán, kde byly aplikovány dvě směsi volných sfingoidních bází, v obou případech je opět statisticky významný nárůst TEWL ($p < 0,05$) po aplikaci 1% suspenzí směsí. Membrána napodobující fyziologický stav SC, S:dS (5:1, m/m), vykazuje oproti Ctrl statisticky významné zvýšení TEWL. Rozdíl oproti Ctrl u druhé směsi, „patologické“ S:dS (15:1, m/m), je spíše zanedbatelný. Toto zjištění teoreticky víceméně koresponduje s výsledky získanými u samostatného S a dS, kdy dS způsobilo větší zvýšení TEWL; analogicky pak u „fyziologické“ směsi, obsahující poměrově víc dS oproti S, je toto zvýšení také větší. Například Agrawal a kol.[42], který v potu subjektů s AD zjistil vyšší hladiny S oproti subjektům bez AD, uvádí zároveň, že u těchto dvou typů subjektů nebyla zaznamenána změna TEWL. Výsledky tohoto experimentu u membrán s aplikovanými směsmi S a dS tedy vyvrací předpoklad, že u zdravého SC by ztráta vody měla být zachována nižší, aby kožní bariéra plnila svou hlavní funkci – zabránění dehydratace. Experiment byl však prováděn na modelovém izolovaném lidském SC a zvolené poměry vychází z práce, která poměry stanovila u myšičího modelového SC. Získané výsledky v jednotlivých experimentech nelze dogmatizovat, jelikož jednotlivé modelové membrány nelze považovat za totožné, ačkoliv se v mnoha parametrech shodují.

Druhý měřený permeační parametr, EI, je nepřímo úměrný toku iontů. Čím vyšší tedy bude EI, tím méně budou skrz membránu procházet ionty a membrána bude více rezistentní. Vůči TEWL je EI nepřímo úměrná též, tzn. měli bychom pozorovat opačnou tendenci, po aplikaci volných sfingoidních bází by mělo dojít ke snížení EI. Tento předpoklad splňují všechny vzorky, jak se samotnými volnými sfingoidními bázemi, tak i se směsmi (viz kapitola 5.1.2 Výsledky měření elektrické impedance). Statisticky významná změna byla zjištěna u S, dS a směsi S:dS (15:1, m/m), u zbylých

membrán, P a S:dS (5:1, m/m), je vidět pokles EI, který ale není statisticky významný, pravděpodobně kvůli velké SEM. To, že u „fyziologické“ membrány nedošlo k statisticky významné změně EI, potvrzuje předpoklad, že po přidání směsi S:dS (5:1, m/m) by nemělo ke změně dojít; membrána si téměř zachovala hodnotu EI.

Posledním zjišťovaným parametrem je flux TH. V rámci této studie nebyly zaznamenány žádné statisticky významné změny fluxu TH oproti Ctrl, avšak některé tendence lze i tak v grafech a u hodnot pozorovat (viz kapitola 5.1.3 Výsledky měření permeability pomocí modelového permeantu TH). Výsledky ukazují, že jednotlivé volné sfingoidní báze vykazují větší flux TH oproti kontrolním membránám. Je vidět korespondence u samostatných volných sfingoidních bází a jejich směsí ve zvolených poměrech; u „patologické“ směsi je flux TH vyšší, než u „fyziologické“, stejně jako je vyšší flux TH u S oproti dS. Na základě těchto zjištění lze tvrdit, že model zdravé kožní bariéry je pro TH méně propustný než model bariéry nemocné. S tímto tvrzením souhlasí i Yoshiike a kol.[90], který porovnával difuzi [$\mu\text{g/ml/h}$] TH u subjektů trpících AD a zdravých kontrolních subjektů, která se u kůže s AD signifikantně zvětšila.

7 ZÁVĚR

Sfingoidní báze jsou nedílnou součástí kožní bariéry, a to ať už o nich hovoříme jako o stavební jednotce ceramidů, nebo jako o jejich volné formě. Význam volných sfingoidních bází je jednou z méně prozkoumaných oblastí výzkumu kožní bariéry. Ač se jedná, co do obsahu, o skupinu látek spíše minoritní, její poznání je neméně důležité.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak volné sfingoidní báze ovlivňují kožní bariéru. Konkrétně jsme se zaměřili na bariérové vlastnosti – permeační parametry. Pro vyhodnocení nám posloužily tři metody, měřili jsme TEWL, EI a flux TH. Jako model kožní bariéry jsme využili izolované lidské SC *ex vivo* a jako zástupce volných sfingoidních bází jsme zvolili S, dS a P a dále pak některé jejich směsi. Hlavního cíle se nám podařilo dosáhnout, na základě výsledků tohoto experimentu lze vyvodit několik závěrů.

Zprvé bylo potvrzeno, že na základě všech třech parametrů mají všechny zkoumané volné sfingoidní báze (S, dS, P) na kožní bariéru vliv, každá však do jiné míry. Obecně po přidání suspenzí s bázemi došlo u všech testovaných membrán k zvýšení TEWL. Oproti kontrolní membráně je vidět nejvýraznější, statisticky významná změna u dS. Lze tedy soudit, že dS ovlivňuje tento parametr nejvíce. Poněkud zajímavé je paradoxní zvýšení TEWL u směsi S:dS (5:1, m/m), která napodobuje fyziologický stav SC, pravděpodobně způsobené růzností modelu lidského a myšího SC. EI je pak nepřímo úměrná přidanému množství sfingoidních bází, došlo k jejímu snížení. Flux TH vykazuje stejnou tendenci jako TEWL, S, dS i P průchod TH skrz modelové SC zvyšují.

V diskuzní části této práce je vidět, že doposud získané informace o volných sfingoidních bázích, včetně těch vyplývajících z tohoto experimentu, jsou občas paradoxní, a ne vždy sourodé. V rámci výzkumné skupiny *Skin Barrier Research Group* probíhal současně s tímto jiný experiment, který se zabýval hodnocením permeačních parametrů pro S, dS a P pomocí zjednodušených modelů kožní bariéry. Ten by mohl naše výsledky v určitých ohledech doplňovat. Nutno podotknout, že tato oblast výzkumu je zatím neúplná a volnými sfingoidními bázemi je třeba se zabývat

z širšího pohledu. Například by se mohlo jednat o jejich spektroskopické hodnocení, které by vliv na permeační parametry doplnilo o poznatky o vlivu volných sfingoidních bází na strukturu SC, uspořádání lipidů nebo jejich fázové chování. Komplexní pochopení významu volných sfingoidních bází v kožní bariéře může přispět k pochopení nejen jí samotné, ale například i patofyziologických pochodů vedoucích k rozvoji poruch kožní bariéry, které s touto oblastí úzce souvisí.

8 POUŽITÉ ZKRATKY

AD	atopická dermatitida
CE	zrohovatělá obálka (angl. <i>corneocyte envelope</i>)
Cer	ceramid
CLE	korneocytární lipidová obálka (angl. <i>corneocyte lipide envelope</i>)
Ctrl	kontrolní membrána
dS	dihydrosfingosin
EI	elektrická impedance
EtOH	ethanol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
MeOH	methanol
NMF	přírodní hydratační faktory (angl. <i>natural moisturizing factors</i>)
P	fytofingosin
PG	propylenglykol
S	sfingosin
SC	rohová vrstva (lat. <i>stratum corneum</i>)
SEM	standardní chyba průměru
TEWL	ztráta vody přes membránu (angl. <i>transepidermal water loss</i>)
TH	teofylin

9 LITERATURA

1. Zámejský, J., *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. 2006, Praha: Grada Publishing, ISBN: 8024715511.
2. Vávrová, K., Kováčik, A., Opálka, L., *Ceramides in the skin barrier*. *European Pharmaceutical Journal*, 2017. **64**(2): p. 28-35.
3. Langmeier, M., *Základy lékařské fyziologie*. 2009, Praha: Grada Publishing, ISBN: 9788024725260.
4. Trojan, S., *Lékařská fyziologie*. 2003, Praha: Grada Publishing, ISBN: 802470512.
5. Čihák, R., *Anatomie 3, 1. vydání*. 1997, Praha: Grada Publishing, ISBN: 8071691402.
6. Elias, P.M., Feingold, K. R., *Skin barrier*. 2006, New York: Taylor & Francis, ISBN: 0824758153.
7. Fredricks, D.N., *Microbial ecology of human skin in health and disease*. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2001. **6**(3): p. 167-9.
8. Rippke, F., Schreiner, V., Schwanitz, H.J., *The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH*. *Am J Clin Dermatol*, 2002. **3**(4): p. 261-72.
9. Umar, M., et al., *Vitamin D and the pathophysiology of inflammatory skin diseases*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2018. **31**(2): p. 74-86.
10. Štork, J., *Dermatovenerologie*. 2008, Praha: Galén, ISBN: 9788072623716.
11. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. *Obes Rev*, 2010. **11**(1): p. 11-8.
12. Hendricks, A.J., et al., *Sweat mechanisms and dysfunctions in atopic dermatitis*. *J Dermatol Sci*, 2018. **89**(2): p. 105-111.
13. Eucerin.cz, *Struktura a funkce kůže*. <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> (cit. 27. 3. 2021).
14. Jonca, N., et al., *Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses*. *Eur J Dermatol*, 2011. **21 Suppl 2**: p. 35-42.
15. Benson, H.A.E., Watkinson, A.C., *Topical and transdermal drug delivery: principles and practice*. 2012, Hoboken: John Wiley & Sons, ISBN: 9780470450291.
16. Elias, P.M., *Stratum corneum defensive functions: an integrated view*. *J Invest Dermatol*, 2005. **125**(2): p. 183-200.
17. Elias, P.M., Menon, G.K., *Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier*. *Adv Lipid Res*, 1991. **24**: p. 1-26.
18. Rawlings, A.V., Harding, C.R., *Moisturization and skin barrier function*. *Dermatol Ther*, 2004. **17 Suppl 1**: p. 43-8.
19. Nishifuji, K., Yoon, J.S., *The stratum corneum: the rampart of the mammalian body*. *Vet Dermatol*, 2013. **24**(1): p. 60-72.e15-6.
20. Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. *J Invest Dermatol*, 1983. **80**(1 Suppl): p. 44-9.
21. Lazo, N.D., Meine, J.G., Downing, D.T., *Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as beta-sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study*. *J Invest Dermatol*, 1995. **105**(2): p. 296-300.

22. 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): p. 328-40.
23. Kezic, S., Jakasa, I., *Filaggrin and skin barrier function*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 1-7.
24. Elias, P.M., et al., *Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE)*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 314-8.
25. Doering, T., Proia, R.L., Sandhoff, K., *Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 167-70.
26. Loiseau, N., et al., *Altered sphingoid base profiles predict compromised membrane structure and permeability in atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2013. **72**(3): p. 296-303.
27. Behne, M., et al., *Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 185-92.
28. Wertz, P.W., et al., *The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum*. J Invest Dermatol, 1989. **93**(1): p. 169-72.
29. Downing, D.T., *Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis*. J Lipid Res, 1992. **33**(3): p. 301-13.
30. Elias, P.M., et al., *Origin of the corneocyte lipid envelope (CLE): observations in harlequin ichthyosis and cultured human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(4): p. 765-9.
31. Indelicato, R., Trinchera, M., *The link between Gaucher disease and Parkinson's disease sheds light on old and novel disorders of sphingolipid metabolism*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
32. Jensen, J.M., et al., *Acid and neutral sphingomyelinase, ceramide synthase, and acid ceramidase activities in cutaneous aging*. Exp Dermatol, 2005. **14**(8): p. 609-18.
33. Pruett, S.T., et al., *Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols*. J Lipid Res, 2008. **49**(8): p. 1621-39.
34. Kobayashi, T., Mitsuo, K., Goto, I., *Free sphingoid bases in normal murine tissues*. Eur J Biochem, 1988. **172**(3): p. 747-52.
35. Merrill, A.H., Jr., et al., *Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 1988. **171**(2): p. 373-81.
36. Stewart, M.E., Downing, D.T., *Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(4): p. 613-8.
37. Wertz, P.W., Downing, D.T., *Free sphingosines in porcine epidermis*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1002**(2): p. 213-7.
38. Wertz, P.W., Downing, D.T., *Free sphingosine in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1990. **94**(2): p. 159-61.
39. Law, S.L., Squier, C.A., Wertz, P.W., *Free sphingosines in oral epithelium*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. **110**(3): p. 511-3.
40. Moon, S.H., et al., *Altered levels of sphingosine and sphinganine in psoriatic epidermis*. Ann Dermatol, 2013. **25**(3): p. 321-6.
41. Tonicic, R.J., et al., *Altered levels of sphingosine, sphinganine and their ceramides in atopic dermatitis are related to skin barrier function, disease severity and local cytokine milieu*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).

42. Agrawal, K., et al., *Sweat lipid mediator profiling: a noninvasive approach for cutaneous research*. J Lipid Res, 2017. **58**(1): p. 188-195.
43. Wakita, H., Nishimura, K., Takigawa, M., *Composition of free long-chain (sphingoid) bases in stratum corneum of normal and pathologic human skin conditions*. Journal of Investigative Dermatology, 1992. **99**(5): p. 608-616.
44. Futerman, A.H., Hannun, Y.A., *The complex life of simple sphingolipids*. EMBO Rep, 2004. **5**(8): p. 777-82.
45. Carreira, A.C., et al., *Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties*. Prog Lipid Res, 2019. **75**: p. 100988.
46. 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): p. 1555-62.
47. Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., *An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown*. Adv Exp Med Biol, 2010. **688**: p. 1-23.
48. Newton, J., et al., *Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy*. Exp Cell Res, 2015. **333**(2): p. 195-200.
49. Merrill, A.H., Jr., et al., *Structural requirements for long-chain (sphingoid) base inhibition of protein kinase C in vitro and for the cellular effects of these compounds*. Biochemistry, 1989. **28**(8): p. 3138-45.
50. Arnold, R.S., Newton, A.C., *Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine*. Biochemistry, 1991. **30**(31): p. 7747-54.
51. Fischer, C.L., *Antimicrobial activity of host-derived lipids*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(2).
52. Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., Colombini, M., *Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations*. Mitochondrion, 2006. **6**(3): p. 118-25.
53. Jiménez-Rojo, N., et al., *Membrane permeabilization induced by sphingosine: effect of negatively charged lipids*. Biophys J, 2014. **106**(12): p. 2577-84.
54. Contreras, F.X., et al., *Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes*. Biophys J, 2006. **90**(11): p. 4085-92.
55. Solomon, J.C., et al., *A novel role for sphingolipid intermediates in activation-induced cell death in T cells*. Cell Death Differ, 2003. **10**(2): p. 193-202.
56. Alanko, S.M., et al., *Displacement of sterols from sterol/sphingomyelin domains in fluid bilayer membranes by competing molecules*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1715**(2): p. 111-21.
57. Kim, S., et al., *Phytosphingosine stimulates the differentiation of human keratinocytes and inhibits TPA-induced inflammatory epidermal hyperplasia in hairless mouse skin*. Mol Med, 2006. **12**(1-3): p. 17-24.
58. Pavicic, T., et al., *Anti-microbial and -inflammatory activity and efficacy of phytosphingosine: an in vitro and in vivo study addressing acne vulgaris*. Int J Cosmet Sci, 2007. **29**(3): p. 181-90.
59. Novotný, J., Hrabálek, A., Vávrová, K., *Synthesis and structure-activity relationships of skin ceramides*. Curr Med Chem, 2010. **17**(21): p. 2301-24.
60. Drake, D.R., et al., *Thematic review series: skin lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface*. J Lipid Res, 2008. **49**(1): p. 4-11.

61. Fischer, C.L., et al., *Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(3): p. 1157-61.
62. Bibel, D.J., et al., *Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin*. Acta Derm Venereol, 1993. **73**(6): p. 407-11.
63. Desbois, A.P., Smith, V.J., *Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(6): p. 1629-42.
64. Bibel, D.J., Aly, R., Shinefield, H.R., *Antimicrobial activity of sphingosines*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(3): p. 269-73.
65. Fischer, C.L., et al., *Sphingoid bases are taken up by Escherichia coli and Staphylococcus aureus and induce ultrastructural damage*. Skin Pharmacol Physiol, 2013. **26**(1): p. 36-44.
66. Röcken, M., Schaller, M., Sattler, E., Burgdorf, W., *Kapesní atlas dermatologie*. 2018, Praha: Grada Publishing, ISBN: 9788027101061.
67. Tsakok, T., et al., *Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond*. Br J Dermatol, 2019. **180**(3): p. 464-474.
68. Vávrová, K., et al., *Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(3): p. 746-753.
69. van Smeden, J., Bouwstra, J.A., *Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 8-26.
70. Li, Q., et al., *The role of ceramides in skin homeostasis and inflammatory skin diseases*. Journal of Dermatological Science, 2020. **97**(1): p. 2-8.
71. Abd, E., et al., *Skin models for the testing of transdermal drugs*. Clin Pharmacol, 2016. **8**: p. 163-176.
72. Cancer.gov, *NCI Dictionary of cancer terms*. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/ex-vivo> (cit. 27. 3. 2021).
73. Fartasch, M., Bassukas, I.D., Diepgen, T.L., *Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics*. Br J Dermatol, 1992. **127**(3): p. 221-7.
74. Čuríková, B.A., et al., *Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers*. Int J Pharm, 2017. **534**(1-2): p. 287-296.
75. Sinkó, B., et al., *Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(5): p. 698-707.
76. Pullmannová, P., et al., *Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(8): p. 2115-26.
77. Kligman, A.M., Christophers, E., *Preparation of isolated sheets of human stratum corneum*. Arch Dermatol, 1963. **88**: p. 702-5.
78. Bartosova, L., Bajgar, J., *Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells*. Curr Med Chem, 2012. **19**(27): p. 4671-7.
79. Seo, J.E., Kim, S., Kim, B.H., *In vitro skin absorption tests of three types of parabens using a Franz diffusion cell*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2017. **27**(3): p. 320-325.

80. Imhof, R.E., et al., *New instrument for measuring water vapor flux density from arbitrary surfaces* IFSCC Magazine, 2002. **5**(4): p. 297-301.
81. Bioxsystems.com, *What is TEWL and how do we measure it?* <https://www.bioxsystems.com/faq/> (cit. 27. 3. 2021).
82. 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): p. 725-9.
83. Školová, B., et al., *Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. **1859**(5): p. 824-834.
84. Školová, B., et al., *The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes*. Langmuir, 2014. **30**(19): p. 5527-35.
85. Sochorová, M., et al., *Permeability barrier and microstructure of skin lipid membrane models of impaired glucosylceramide processing*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6470.
86. Kováčik, A., et al., *Effects of ceramide and dihydroceramide stereochemistry at C-3 on the phase behavior and permeability of skin lipid membranes*. Langmuir, 2018. **34**(1): p. 521-529.
87. Imhof, B., Xiao, P., Angelova-Fischer, I., *TEWL, closed-chamber methods: Aquaflux and vapometer*. 2014. p. 345-352.
88. Arikawa, J., et al., *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): p. 433-9.
89. Watanabe, M., et al., *Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis*. Arch Dermatol, 1991. **127**(11): p. 1689-92.
90. Yoshiike, T., et al., *Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline*. J Dermatol Sci, 1993. **5**(2): p. 92-6.