

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra organické a bioorganické chemie



**Studium modelových lipidových membrán obsahujících**

**omega-hydroxylované ceramidy**

Diplomová práce

Linda Svatošová

Vedoucí práce: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Hradec Králové 2021

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové

Linda Svatošová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále děkuji Mgr. Veronice Ondřejkové za pomoc s experimentální částí této práce a celé skupině Skin Barrier Research Group za vytvoření příjemného prostředí pro práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a blízkým, kteří při mně celou dobu stáli a podporovali mě.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Linda Svatošová

Školitel: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium modelových lipidových membrán obsahujících omega-hydroxylované ceramidy

Acylceramidy (EO-Cer) jsou třídou ceramidů (Cer) s ultradlouhým acylovým řetězcem, na jejichž  $\omega$ -hydroxylovou skupinu je esterově navázána kyselina linolová. EO-Cer, jejichž význam spočívá ve tvorbě dlouhé lamelární fáze (LPP) a korneocytální lipidové obálky (CLE), jsou nepostradatelnou složkou pro fungování kůže jako bariéry. Porucha biosyntézy EO-Cer spojená s nedostatečnou tvorbou CLE a LPP je základem patofyziologie mnoha kožních onemocnění, včetně některých typů ichtyózy. Jedním z enzymů, k jehož deficitu u těchto ichtyóz dochází, je PNPLA1. Při jeho nedostatečné funkci nedochází k  $\omega$ -esterifikaci kyselinou linolovou, a tedy ke vzniku EO-Cer, ale naopak dochází ke kumulaci jejich prekurzorů, tedy  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidů (O-Cer).

Cílem této práce bylo připravit modelové membrány s obsahem O-Cer a sledovat, jak jejich přítomnost ovlivňuje organizaci lipidů a bariérové vlastnosti modelových membrán. V rámci této práce byly připraveny dva typy membrán – prvním typem byly membrány složené ze směsi cholesterolu, mastných kyselin a velmi dlouhých Cer s nefyziologicky zvýšenou koncentrací EO a O-Cer, kvůli lepšímu pochopení vlivu těchto ultradlouhých lipidů, a druhým typem byly membrány s obsahem EO a O-Cer v koncentracích, které více odpovídají fyziologickým hodnotám. Mimo to byl sledován i vliv teploty, při které byly membrány připraveny.

U membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer, které byly připravovány při 90 °C, přidání O-Cer do membrán vedlo, až na výjimky, ke zlepšení

bariérových vlastností. Veškeré takto připravené membrány tvořily mimo krátké lamelární fáze (SPP) a separovaného cholesterolu i LPP. Pokud byly ovšem veškeré EO-Cer v membránách nahrazeny za O-Cer, tak došlo k výraznému narušení bariérových vlastností membrán a flux modelových léčiv se zvýšil na téměř trojnásobek. Důvodem zvýšení permeability membrán by mohla být nepřítomnost LPP, která byla nahrazena v těchto vzorcích jinou lamelární fází s krátkou periodicitou. Snížení teploty při přípravě vzorků na 70 °C mělo zásadní vliv na lamelární uspořádání membrán. Membrány s obsahem EO-Cer, ke kterým byly přidávány O-Cer nebo byla koncentrace EO-Cer dále zvyšována, obsahovaly pouze LPP (a separovaný cholesterol). Oproti kontrolní membráně nedošlo k výrazným změnám v permeabilitě. Výrazný rozdíl byl opět pozorován u membrány, kde byly veškeré EO-Cer nahrazeny O-Cer. V této membráně nebyla nalezena LPP, ale střední lamelární fáze. Takovéto lamelární uspořádání vedlo v této membráně k dramatickému poklesu permeability, v porovnání s membránou připravovanou při 90 °C, a hodnoty se ve většině parametrů přiblížily hodnotám kontroly. Zaznamenali jsme tedy, že teplota přípravy membrán měla výrazný vliv jak na organizaci lipidů, tak na bariérové vlastnosti membrán.

Na membránách s fyziologickým obsahem EO a O-Cer jsme zjistili minimální koncentraci EO-Cer potřebnou pro tvorbu LPP – 7,5 %. Při úplné náhradě EO-Cer za O-Cer nebo při poklesu množství EO-Cer pod 7,5 %, došlo k vymizení LPP a jediná přítomná fáze byla SPP. V membránách bez přítomnosti LPP jsme opět (až na výjimky) zaznamenali zhoršení bariérových vlastností. Na rozdíl od předchozích membrán nešlo v tomto případě o tak výrazné změny. Ovšem se opět domníváme, že důvodem bude nepřítomnost LPP.

U kožních onemocnění, u kterých nedochází k dostatečné biosyntéze EO-Cer, a tyto Cer jsou nahrazeny jejich prekurzory, je narušena tvorba LPP, což může být jedním z důvodů, proč dochází ke zhoršení kožní bariéry u těchto pacientů. Avšak našli bychom i další důvody vedoucí ke zhoršení kožní bariéry, jako je nedostatečná syntéza CLE, proto je potřeba celý problém studovat komplexně.

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Linda Svatošová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Title of diploma thesis: The study of model lipid membranes containing omega-hydroxylated ceramides

Acylceramides (EO-Cer) belong to a class of ceramides (Cer) with an ultralong acyl chain whose  $\omega$ -hydroxyl group is esterified with linoleic acid. The importance of EO-Cer lies in the formation of the long periodicity phase (LPP) and the corneocyte lipid envelope (CLE), which are indispensable components for the skin functioning as a barrier. Disorders in EO-Cer biosynthesis are associated with insufficient production of CLE and LPP leading to many skin diseases, including some types of ichthyosis. One of the enzymes that is deficient in such ichthyoses is PNPLA1. Insufficient function of this enzyme disables  $\omega$ -esterification with linoleic acid, and thus the formation of EO-Cer. On the contrary, their precursors, i.e.  $\omega$ -hydroxylated ceramides (O-Cer), are cumulated.

The aim of this thesis was to prepare model membranes containing O-Cer and to study the effects of O-Cer on the lipid organization and barrier properties of model membranes. Within this thesis, two types of membranes were prepared – the first type were membranes composed of a mixture of cholesterol, fatty acids and very long Cer with non-physiologically increased concentration of EO and O-Cer to better understand the effects of these ultralong lipids, and the second type were membranes containing EO and O-Cer in concentrations similar to physiological values. In addition, the effect of temperature during membrane preparation was studied.

In membranes with non-physiologically increased content of EO and O-Cer (prepared at 90 °C), the addition of O-Cer to such membranes led, with a few exceptions, to improved barrier properties (reduction in flux values and decreased water loss through

the membrane). Apart from the short periodicity phase (SPP) and separated cholesterol, all membranes contained LPP. However, when all EO-Cer were replaced with O-Cer, the barrier properties of the membranes were significantly disrupted, and the flux of model drugs increased almost three times. We assume that the increase in membrane permeability was caused by the absence of LPP, which has been replaced with another lamellar phase with a short periodicity. Decreasing the sample preparation temperature to 70 °C had a fundamental effect on the membrane lamellar arrangement. Membranes containing EO-Cer with addition of O-Cer or with increased concentration of EO-Cer contained only LPP (and separated cholesterol). Compared to the control membrane, no significant changes in permeability were found. Significant difference results were again observed for the membrane, where all EO-Cer were replaced with O-Cer. Instead of LPP, the medium lamellar phase was found in this membrane. This lamellar arrangement caused a dramatic decrease in permeability compared to the membrane prepared at 90 °C, and the values were comparable with the control. We found that the membrane preparation temperature had a significant effect on both the lipid organization and the barrier properties of the membranes.

In membranes with physiological content of EO and O-Cer, we found the minimal EO-Cer concentration required for the LPP formation - 7.5 %. A complete replacement of EO-Cer with O-Cer or a decrease in the amount of EO-Cer below 7.5 % led to a disappearance of the LPP and only SPP was present. In membranes without LPP, a deterioration in barrier properties (increased fluxes and greater water loss) was observed (with a few exceptions). Compared to the previous membranes, the differences were not so pronounced. However, we again believe that the reason might be the absence of LPP.

In skin diseases with insufficient EO-Cer biosynthesis, where EO-Cer are replaced with their precursors, LPP is not formed. This may be one of the reasons why the skin barrier in these patients is deteriorated. However, there are other causes leading to an impaired skin barrier, such as insufficient synthesis of CLE, so it is not possible to consider changes in lipid composition separately as the essence of these diseases, it is necessary to study the whole issue comprehensively.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
2.1 Kůže a její stavba.....	11
2.2 Stratum corneum.....	13
2.3 Ceramidy.....	15
2.3.1 Acylceramidy.....	17
2.3.1.1 Význam acylceramidů.....	17
2.3.1.2 Biosyntéza acylceramidů.....	18
2.4 Korneocytální lipidová obálka.....	19
2.5 Kožní onemocnění spojená s narušenou hladinou acylceramidů.....	20
2.5.1 Ichtyóza.....	20
2.5.2 Atopická dermatitida.....	21
2.5.3 Psoriáza.....	21
2.5.4 Nethertonův syndrom.....	22
<b>3. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>23</b>
3.1 Rozvržení experimentů.....	23
3.2 Rentgenová difrakce.....	24
3.2.1 XRD modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 90 °C.....	25
3.2.2 XRD modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 70 °C.....	26
3.2.3 XRD modelových membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím, připravených při 70 °C.....	27



3.3	Permeabilita modelových lipidových membrán .....	29
3.3.1	Permeabilita membrán s narůstající koncentrací O-Cer .....	30
3.3.2	Permeabilita membrán s narůstající koncentrací EO-Cer.....	32
3.3.3	Permeabilita membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým hodnotám .....	35
3.4	IR spektroskopie .....	37
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
4.1	Použité materiály a chemikálie .....	39
4.2	Příprava lipidových směsí.....	39
4.3	Příprava modelových lipidových membrán.....	41
4.4	Permeační pokusy .....	42
4.4.1	Franzovy difúzní cely .....	42
4.4.2	Měření ztráty vody přes membránu .....	42
4.4.3	Měření elektrické impedance.....	43
4.4.4	Měření permeability membrán pomocí modelových léčiv .....	43
4.4.4.1	Modelová léčiva .....	43
4.4.4.2	Vlastní permeace.....	44
4.4.4.3	Podmínky HPLC analýzy.....	44
4.5	Vyhodnocení dat IR spektroskopie.....	45
4.6	Vyhodnocení dat XRD.....	45
4.7	Statistická analýza dat.....	46
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>50</b>

# 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Hlavní funkcí kůže je tvorba bariéry, která zabraňuje nadměrným ztrátám vody a chrání před nepříznivými vlivy prostředí. Kožní bariéra se nachází v nejsvrchnější vrstvě epidermis – *stratum corneum*, jejíž správné složení a struktura jsou nezbytné pro plnění její ochranné funkce, a jakékoliv odchylky mohou vést k poruše této funkce a ke vzniku kožních onemocnění.

Jednou z nejdůležitějších složek mezibuněčných prostor *stratum corneum* jsou acylceramidy, což jsou ceramidy s ultradlouhým acylovým řetězcem a  $\omega$ -esterifikovanou kyselinou linolovou. Jejich přítomnost je klíčová pro tvorbu zásadních struktur pro fungování kožní bariéry, tedy dlouhé lamelární fáze a korneocytální lipidové obálky. Poruchy biosyntézy vedoucí ke změně koncentrace acylceramidů a nedostatečná tvorba dlouhé lamelární fáze a korneocytální lipidové obálky jsou základem patofyziologie řady kožních onemocnění, včetně některých typů ichtyózy. Jedním z enzymů, k jehož defektu při autozomální recesivní kongenitální ichtyóze dochází, je PNPLA1. Tento enzym katalyzuje  $\omega$ -esterifikaci kyselinou linolovou, a tedy vznik acylceramidů. Při jeho nedostatečné funkci je syntéza acylceramidů snížena, ale naopak dochází ke kumulaci jejich prekurzorů, tedy  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidů.

Cílem této práce bylo připravit modelové membrány s obsahem  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidů a hodnotit jejich vliv na bariérové vlastnosti těchto membrán. Dalším cílem bylo studovat vliv teploty použité při přípravě membrán na jejich organizaci a permeabilitu. V rámci této práce jsme zjišťovali, jaký vliv na funkci kožní bariéry má snížení koncentrace či úplný nedostatek acylceramidů a jejich náhrada za  $\omega$ -hydroxylované ceramidy, jako je tomu u pacientů s defektem enzymu PNPLA1.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kůže a její stavba

Kůže je životně důležitý orgán lidského těla.<sup>1</sup> Přesto patří kožní poruchy mezi nejčastější a nejrozšířenější lidská onemocnění. Kožní onemocnění se vyskytují celosvětově, postihují muže i ženy všech věkových kategorií. Počet kožních onemocnění či onemocnění, které se mohou kožními problémy projevat, je dle Mezinárodní klasifikace nemocí více než 1000.<sup>2</sup>

Nejdůležitější funkcí kůže je ochrana. Kůže vytváří bariéru, díky které chrání vnitřní prostředí těla před vnějšími nežádoucími vlivy (např. před chemikáliemi, patogenními mikroorganismy, ultrafialovým zářením nebo mechanickými vlivy) a zabraňuje ztrátám vody a elektrolytů. Pokud dojde k porušení této bariéry, jako je tomu u rozsáhlých popálenin, dochází k ohrožení života vlivem významných ztrát vody a elektrolytů a také ke zvýšenému riziku infekcí. Podobně tomu je i u předčasně narozených dětí. Ale i drobnější odchylky ve funkci kožní bariéry se mohou projevit, dochází k nim u novorozenců, během stárnutí nebo se projevují jako kožní onemocnění.<sup>3</sup> Odchylky ve funkci většinou vznikají souhrou několika faktorů, jako je genetická porucha metabolismu lipidů, systémová onemocnění, stav imunitního systému, stres, strava a životní styl.<sup>4</sup>

Kromě funkce ochranné se kůže podílí i na řadě dalších funkcí, např. na termoregulaci, probíhá zde syntéza vitamínu D a jsou zde uloženy smyslové receptory.<sup>5</sup>

Kůže dosahuje plochy 1,6–1,8 m<sup>2</sup> a tvoří přibližně 16 % tělesné hmotnosti, jedná se tedy o největší orgán lidského těla.<sup>5,6</sup> Tloušťka kůže se na různých částech těla liší. Může dosahovat tloušťky od 0,5 mm do 4 mm, nejtenčí kůže se vyskytuje například na očních víčkách a nejsilnější naopak na zádech.<sup>6</sup>

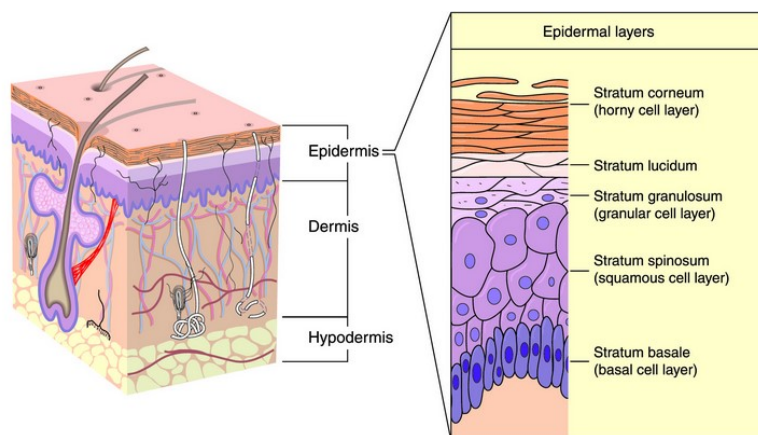
Kůže se skládá z podkožního vaziva (hypodermis, tela subcutanea), škáry (dermis, corium) a pokožky (epidermis).<sup>6,7</sup>

Hypodermis je nejspodnější vrstva kůže, která je tvořena vazivem. Nachází se zde buňky tukové tkáně, která má funkci endokrinní, zajišťuje tepelnou izolaci a je zdrojem energie.<sup>7,8</sup>

Dermis poskytuje oporu epidermis, je tvořena vazivem s elastickými a kolagenními vlákny a na rozdíl od epidermis se zde nachází i nervová zakončení, cévní a lymfatický systém, vlasové folikuly a sekreční žlázy. Je tvořena dvěma vrstvami – *stratum papillare*, která navazuje na epidermis, a hlubší vrstvou *stratum reticulare*.<sup>6,7,9</sup>

Epidermis tvoří povrchovou vrstvu kůže a dále se dělí na pět podvrstev – vnější *stratum corneum* (SC), *stratum lucidum*, *stratum granulosum* (SG), *stratum spinosum* a vnitřní *stratum basale*.<sup>6</sup> Epidermis je epitel, jehož základem jsou buňky keratinocyty, u kterých dochází během migrace k povrchu k diferenciaci. Keratinocyty postupně ztrácejí schopnost dělení, růstu a dochází k jejich oploštění, postupně se mění na buňky tvořící SC, korneocyty. Nakonec dochází k jejich uvolnění z povrchu kůže, tzv. deskvamaci.<sup>9,10</sup> V epidermis se nachází i další typy buněk – melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.<sup>6</sup>

Stavbu kůže znázorňuje Obrázek 1.



Obrázek 1. Stavba kůže. Lidská kůže je složena ze tří vrstev – hypodermis, dermis a epidermis. Epidermis je nejsvrchnější vrstva a je dále tvořena pěti podvrstvami – *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* a *stratum basale*. Zdroj: <https://vesiderm.com/2019/07/11/how-vesiderm-yolk-lecithin-liposomes-gives-you-healthy-skin/>

## 2.2 Stratum corneum

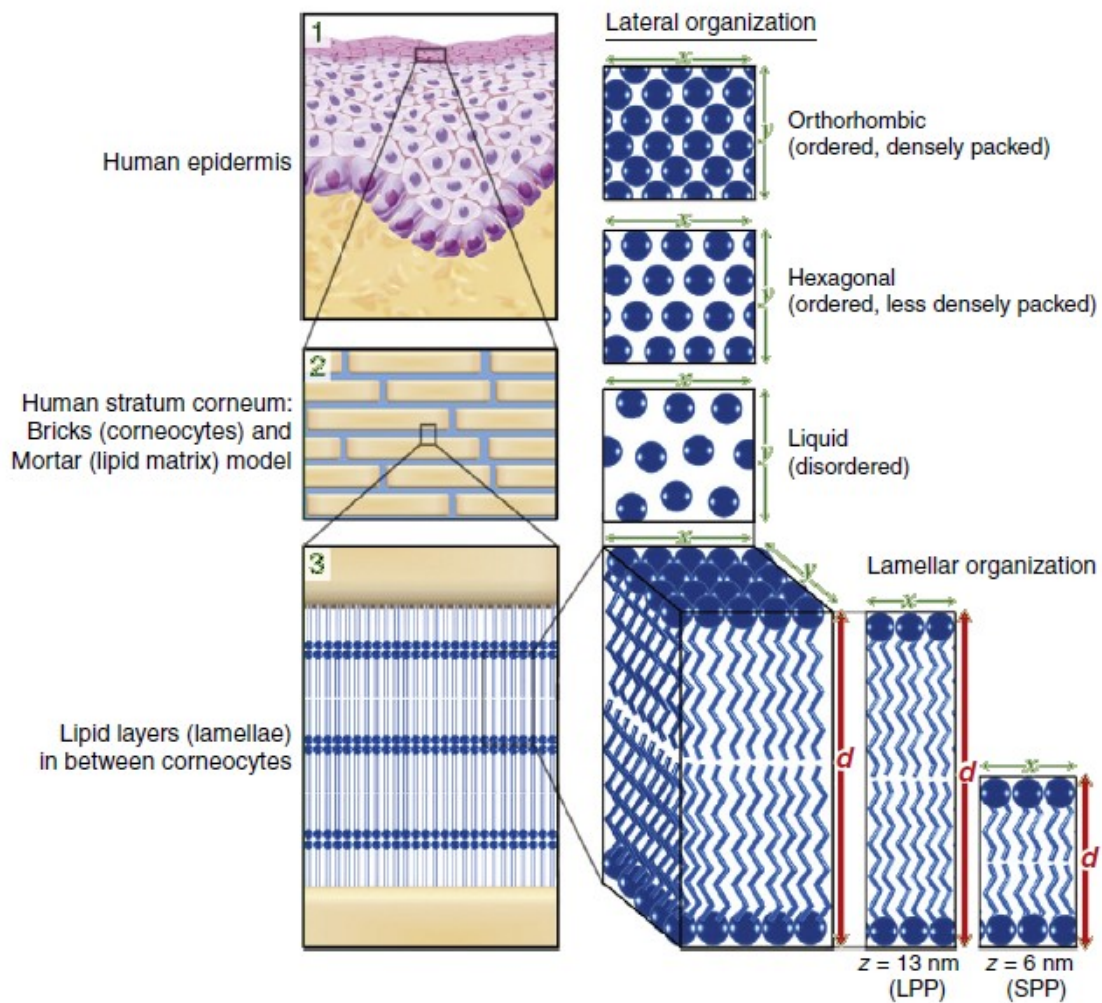
SC je vnější vrstva epidermis a je zodpovědná za ochrannou funkci kůže. Struktura SC je tvořena korneocyty, jejichž mezibuněčné prostory jsou vyplněny směsí lipidů. Toto uspořádání je často přirovnáváno k systému „brick and mortar“, tedy v češtině „cihly a malta“, kde korneocyty představují cihly a lipidy maltu.<sup>11</sup>

Korneocyty, jak již bylo výše zmíněno, jsou ploché diferencované keratinocyty. Jsou uspořádány do vrstev, v závislosti na oblasti těla jich mohou tvořit až okolo 20. Vzájemné spojení a soudržnost je zajištěna pomocí desmozomů.<sup>12</sup> Vnitřní prostředí korneocytů je tvořeno vodou a keratinovými vlákny, na povrchu mají zrohovatělou obálku ze zesílených proteinů, jako je filaggrin, loricerin a involucrin.<sup>10</sup> Na zrohovatělou obálku je z vnější strany navázána korneocytální lipidová obálka (CLE – z anglického corneocyte lipid envelope).<sup>13,14</sup> CLE bude dále popsána v samostatné kapitole.

Extracelulární prostory mezi korneocyty jsou vyplněny přibližně ekvimolární směsí hydrofobních lipidů – ceramidy (Cer), cholesterolem (Chol) a volnými mastnými kyselinami (MK).<sup>10</sup> Cer tvoří přibližně 50 % hmotnosti, Chol 25 % hmotnosti a MK 15 % hmotnosti a zbytek tvoří již v menším množství další metabolity. Jedná se o jedinečné složení, lišící se od jiných buněčných membrán.<sup>15</sup>

Polární prekurzory lipidů SC jsou uvolňovány z lamelárních tělísek (sekreční orgány keratinocytů) na rozhraní SG/SC a následně jsou metabolizovány na lipidy SC. Lamelární tělíska kromě prekurzorů lipidů (fosfolipidy, glukosylceramidy, sfingomyelin a Chol) obsahují také enzymy (fosfolipáza,  $\beta$ -glukocerebrosidáza, sfingomyelináza), které je metabolizují na nepolární produkty.<sup>16,17</sup> Lipidy se následně organizují do mezibuněčných lamel o různých mezirovinných vzdálenostech, kdy hovoříme o lamelárním uspořádání. Mezibuněčné lipidy pak vytváří dlouhou lamelární fázi (LPP – z anglického long periodicity phase) o délce ~13 nm a krátkou lamelární fázi (SPP – z anglického short periodicity phase) o délce ~6 nm. V lamelách mohou lipidy zaujmout tři typy laterálního uspořádání – orthorombické, hexagonální nebo kapalné neuspořádané.<sup>10</sup>

Stavbu SC včetně uspořádání lipidů znázorňuje Obrázek 2.



Obrázek 2. Stavba stratum corneum. Vnější vrstva kůže, stratum corneum, je tvořena korneocyty, které jsou obklopeny lipidovou matrix. Toto uspořádání připomíná systém „cihly a malta“. Lipidy zaujímají charakteristické lamelární a laterální uspořádání.<sup>10</sup>

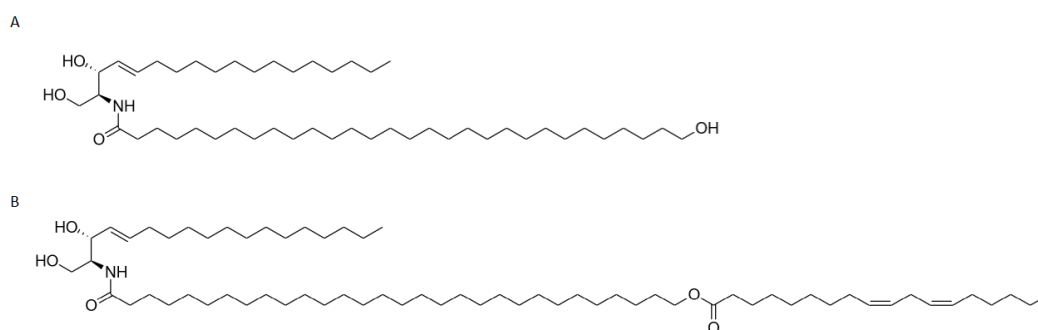
Lipidová matrix funguje jako hlavní cesta k pronikání látek přes SC.<sup>11</sup> Proto je správné složení a organizace lipidů zásadní pro bariérovou funkci kůže. Odchytky od lipidové homeostázy, způsobené změnami v metabolismu lipidů, stojí právě často za některými kožními onemocněními.<sup>18</sup>

## 2.3 Ceramidy

Cer patří do skupiny sfingolipidů a jsou přítomné ve všech tkáních lidského těla. Existuje celá řada druhů Cer, jedná se totiž o strukturně velmi rozmanitou skupinu lipidů. Největší rozmanitost se vyskytuje ve SC, kde mají zároveň Cer z lipidů SC největší zastoupení.<sup>19</sup>

Cer jsou tvořeny sfingoidní bází, na kterou je amidovou vazbou navázán acylový řetězec. Cer se mohou vzájemně lišit nejen kombinací sfingoidní baze a acylového řetězce, ale také například délkou řetězce, existuje tedy více než 1000 strukturně jedinečných Cer SC.<sup>19</sup>

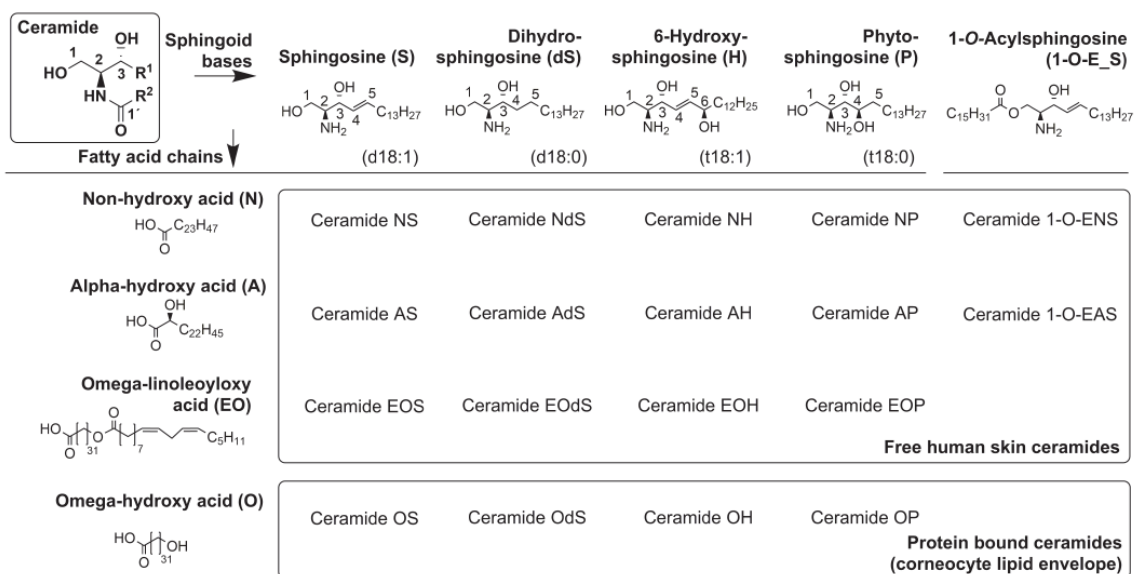
Sfingoidní baze kožních Cer je tvořena především sfingosinem (S), fytosfingosinem (P), dihydrosfingosinem (dS), 6-hydroxysfingosinem (H) nebo nově identifikovaným dihydroxydihydrosfingosinem (T). Acylová část je tvořena obvykle nasycenou a nerozvětvenou MK, která je buď nesubstituovaná (N) či substituovaná hydroxylem v poloze  $\alpha$  (A) nebo u ultradlouhých MK v poloze  $\omega$  (O). Hydroxyl v poloze  $\omega$  může být esterifikován dalším acylovým řetězcem, převážně linolové kyseliny (EO) nebo navázán na proteiny na povrchu korneocytů.<sup>20-22</sup> Navázáním dalšího acylu na hydroxyl v poloze 1 sfingoidní baze, vzniká nová třída se třemi hydrofobními řetězci (1-O-E). Sfingoidní baze je většinou tvořena řetězcem o délce 16–28 uhlíků. MK v případě velmi dlouhých Cer bývá dlouhá nejčastěji okolo 24 uhlíků, v případě ultradlouhých Cer může její délka dosahovat až 38 uhlíků.<sup>21</sup> Příklad Cer typu O a EO je na Obrázku 3.



Obrázek 3. Příklad ultradlouhých ceramidů. Názvosloví dle Motty: A – ceramid OS, B – ceramid EOS.

K pojmenování Cer se nejčastěji využívá názvosloví dle Motty,<sup>23</sup> které je založené na kombinaci písmen podle struktury Cer – první písmeno představuje acylový řetězec a druhá část označuje sfingoidní bazi.<sup>20</sup>

Možné kombinace sfingoidní baze a acylového řetězce tvořící Cer a jejich názvosloví znázorňuje Obrázek 4.

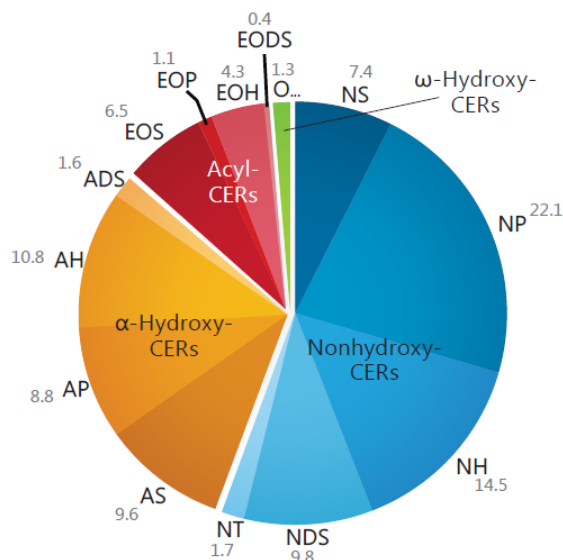


Obrázek 4. Ceramidy jsou tvořeny ze sfingoidní baze a acylového řetězce, které jsou spojeny amidovou vazbou. Obrázek znázorňuje možné kombinace těchto částí a jejich názvosloví.<sup>21</sup>

V průběhu výzkumu SC byly pomocí nových vysoce citlivých metod objevovány nové druhy Cer. Do roku 2017 bylo identifikováno 15 tříd volných Cer a 3 třídy kovalentně vázané na korneocyty.<sup>22</sup>

Zastoupení jednotlivých tříd Cer ve SC zobrazuje Obrázek 5.





Obrázek 5. Relativní zastoupení tříd ceramidů ve stratum corneum. „O...“ značí ceramidy OS, OP a OH.<sup>11</sup>

### 2.3.1 Acylceramidy

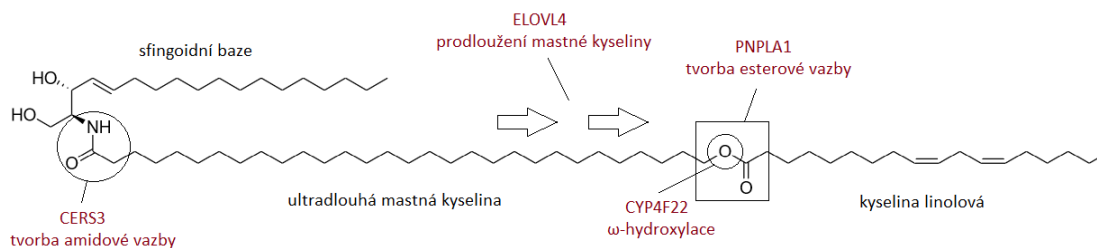
Acylceramidy (EO-Cer) jsou třídou Cer, které obsahují v acylové části ultradlouhou MK, která má na  $\omega$ -hydroxylové skupině esterovou vazbou navázanu kyselinu linolovou. Ultradlouhé MK nejčastěji dosahují délky 30–32 uhlíků, ale mohou být dlouhé až 38 uhlíků. Do této třídy patří Cer EOS, EOH, EOP a EODS.<sup>24,25</sup>

#### 2.3.1.1 Význam acylceramidů

Existence EO-Cer je nezbytná pro tvorbu CLE a LPP, jejichž vznik je zcela klíčový pro integritu kůže a její správné fungování jako kožní bariéry. U kožních onemocnění, jako jsou některé typy ichthyózy či atopická dermatitida, dochází mimo jiné k poruše biosyntézy EO-Cer, což vede ke změně CLE a ke zkrácení, úbytku či úplnému nedostatku LPP, a tedy i k poruše kožní bariéry.<sup>10</sup> Pokud dojde k výraznému defektu či úplné ztrátě EO-Cer, tak tento stav není slučitelný se životem a vede k úmrtí novorozenců krátce po narození.<sup>26</sup>

### 2.3.1.2 Biosyntéza acylceramidů

Biosyntéza EO-Cer obsahuje kroky, které během syntézy velmi dlouhých Cer neprobíhají a jsou tedy pro EO-Cer charakteristické, tyto kroky jsou katalyzovány těmito enzymy (Obrázek 6) – ELOVL4,<sup>27</sup> CYP4F22,<sup>28</sup> CERS3<sup>26</sup> a PNPLA1.<sup>29-31</sup>



Obrázek 6. Specifické enzymy pro biosyntézu acylceramidů.

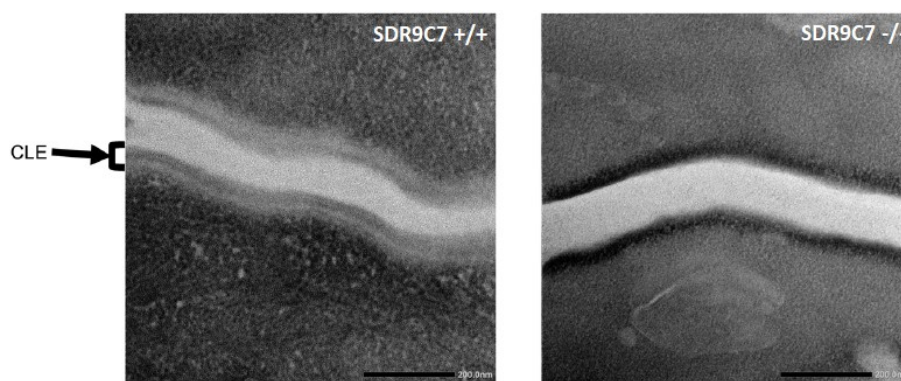
Elongáza 4 (ELOVL4) je jedna ze sedmi elongáz a je zodpovědná za vznik ultradlouhých MK.<sup>27,32</sup> Cytochrom P450 4F22 (CYP4F22) je ω-hydroxyláza, jejímž substrátem jsou ultradlouhé MK, katalyzuje tedy vznik ω-hydroxylovaných ultradlouhých MK, které jsou následně ve formě acyl-koenzymu A využívány CERS3.<sup>28</sup> Ceramid syntáza 3 (CERS3) je členem rodiny CERS, kterých je celkem šest. CERS katalyzují vznik amidové vazby, a tedy vznik Cer, mají ovšem odlišnou substrátovou specifitu vůči acyl-koenzym A, a také rozdílné zastoupení v různých tkáních. Jelikož má CERS3 širokou aktivitu, produkuje různé typy Cer, včetně ultradlouhých ω-hydroxylovaných Cer (O-Cer).<sup>26</sup> Patatin-like phospholipase domain containing 1 (PNPLA1) patří do rodiny PNPLA. Do této rodiny patří devět enzymů, které vykazují lypolytické, acyltransferázové a transacylázové aktivity.<sup>29,30</sup> PNPLA1 má zásadní význam, jelikož zajišťuje esterifikaci kyseliny linolové s O-Cer za vzniku EO-Cer. Při deficitu tohoto enzymu dochází v epidermis ke snížené tvorbě EO-Cer a ke kumulaci prekurzorů, tedy O-Cer.<sup>29-31,33</sup> U mláďat myši s deficitem PNPLA1 byly pozorovány jednoznačné změny ve vzhledu a funkci pokožky (Obrázek 7). Pokožka byla lesklá a napnutá a mláďata umírala brzy po narození z důvodu dehydratace.<sup>30</sup>



Obrázek 7. Porovnání pokožky zdravých myši (vlevo) a myši s deficitem enzymu PNPLA1 (vpravo).<sup>30</sup>

## 2.4 Korneocytální lipidová obálka

CLE je tvořena monovrstvou lipidů, které se kovalentně váží především na glutamátové zbytky involucrinu (Obrázek 8). Skládá se především z ultradlouhých Cer a v menší míře z ultradlouhých MK, vznikajících po odštěpení sfingoidní báze z kovalentně vázaných Cer. Předpokládá se, že CLE slouží jako základ pro tvorbu mezibuněčných lipidových lamel, podle kterého se uspořádávají ostatní volné lipidy, avšak role CLE může být i jiná (např. hydrofobizace povrchu korneocytů).<sup>13,14</sup>



Obrázek 8. Snímek z elektronového mikroskopu. Vlevo znázorněna korneocytální lipidová obálka (CLE) zdravé myši. Vpravo poškozená myši kůže bez CLE.<sup>34</sup>

Během tvorby CLE je linoleátový zbytek EO-Cer metabolizován pomocí 12*R*-LOX, eLOX3 a SDR9C7 za vzniku epoxyenonového derivátu. 12*R*-LOX a eLOX3 jsou lipoxygenázy, jejichž substrátem je pouze kyselina linolová, proto není možné tuto kyselinu v EO-Cer nahradit jinými MK. Původně se předpokládalo, že dochází k odštěpení oxidovaného linoleátu pomocí neznámé esterázy/lipázy za vzniku O-Cer a transglutamináza kazalyzuje napojení na proteiny.<sup>35</sup> Dle nové teorie dochází neenzymaticky k přímé vazbě epoxy-enonu na proteiny bez nutnosti odštěpení oxidovaného linoleátu. Jednoznačné ovšem je, že substrátem pro tvorbu CLE jsou EO-Cer, což potvrzují studie, kdy při deficitu PNPLA1 nedocházelo ke vzniku CLE, přestože se O-Cer kumulovaly.<sup>34</sup>

## 2.5 Kožní onemocnění spojená s narušenou hladinou acylceramidů

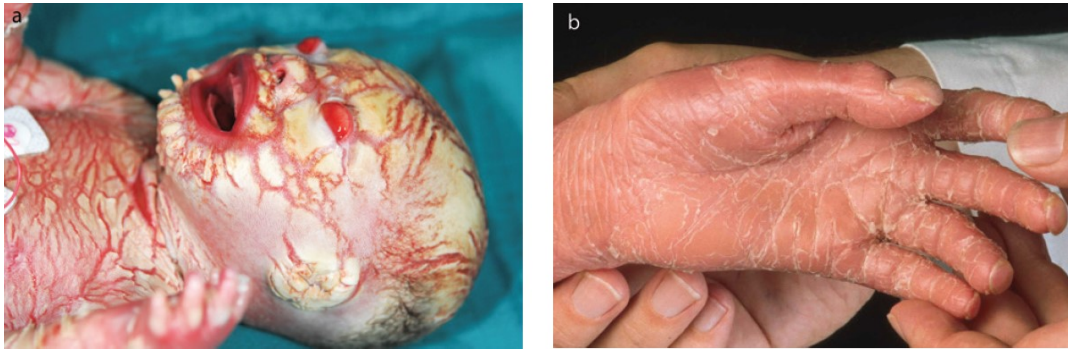
Ke kožním onemocněním, jejichž patofyziologie je spojena se změnou koncentrace EO-Cer, patří například ichtyózy, atopická dermatitida, psoriáza a Nethertonův syndrom.<sup>10</sup>

### 2.5.1 Ichtyózy

Ichtyózy jsou genetická onemocnění, při kterých dochází k poruše bariérové funkce SC. Existuje řada typů ichtyóz, které se vzájemně liší nejen projevy, včetně doby nástupu, ale i genetickou podstatou. Závažnost se může pohybovat od ichtyózy vulgaris, která je poměrně mírná, až po nejtěžší formu ichtyózy, zvané Harlekýnská. Projevy jsou ovšem u většiny známých ichtyóz omezeny pouze na kůži, kterou postihují částečně nebo úplně.<sup>14,33</sup> Poškození bariérové funkce způsobí, že je kůže suchá, zesílená a šupinatá (Obrázek 9).<sup>33</sup>

Autozomálně recesivní vrozené ichtyózy (ARCI) jsou heterogenní skupinou ichtyóz, které jsou většinou nesyndromatické, což znamená, že projev je omezen pouze na kůži.<sup>36</sup> U ARCI dochází především k mutaci genů potřebných k syntéze EO-Cer a tvorby CLE.<sup>31</sup> Je známo dvanáct genů, které jsou spojeny s ARCI – *ABCA12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *CASP14*, *CERS3*, *CYP4F22*, *LIPN*, *NIPAL4*, *PNPLA1*, *SDR9C7*, *SLC27A4* a

TGMI.<sup>14</sup> U lamelární ichtyózy (patří mezi ARCI) bylo z důvodu poruchy syntézy EO-Cer pozorováno především snížení Cer EOS a pozměněná LPP se sníženou mezivinnou vzdáleností.<sup>10,37</sup>



Obrázek 9. Kůže postižená Harlekýnskou ichtyózou: a – vzhled při narození, b – vzhled ve vyšším věku.<sup>38</sup>

### 2.5.2 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida je chronické zánětlivé multifaktoriální kožní onemocnění, u kterého hraje roli kromě poškození kožní bariéry i vliv prostředí a imunologické faktory. Atopická dermatitida se projevuje především suchostí, svěděním a zčervenáním kůže. Toto onemocnění je spojeno s poklesem všech druhů EO-Cer, což způsobuje poruchu při tvorbě LPP, dochází k jejímu zkrácení nebo k úbytku.<sup>10,39,40</sup>

### 2.5.3 Psoriáza

Psoriáza je chronické zánětlivé kožní onemocnění, při kterém dochází k abnormální proliferaci epidermis bez úplné diferenciaci. Patofyziologie vychází především z imunologických defektů epidermis, ale také z defektů kožní bariéry. V souvislosti s EO-Cer dochází u psoriázy k těmto změnám – snížení koncentrace EOS a zkrácení či úbytek LPP.<sup>10,23</sup> Klinické projevy se mohou u různých typů psoriáz lišit. Nejrozšířenější typ, psoriáza vulgaris, se projevuje tvorbou ohraničených svědivých zarudlých plaků se stříbrnými šupinkami.<sup>41</sup>

#### **2.5.4 Nethertonův syndrom**

Nethertonův syndrom je závažné kožní onemocnění, které se vyskytuje vzácně a projevuje se charakteristickými bambusovými vlasy, atopickými projevy a erythrodermou. U pacientů dochází k drastickému poškození kožní bariéry, byl pozorován extrémní pokles hladin EO-Cer, který vedl až k úplné absenci LPP.<sup>10,42</sup>

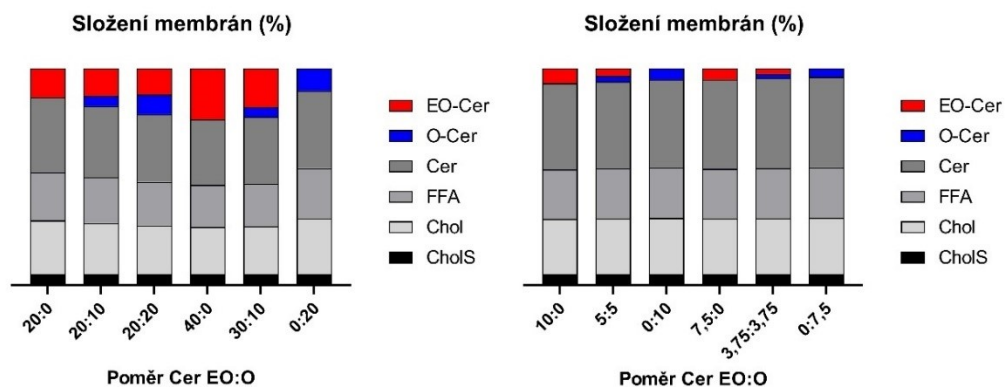
### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Rozvržení experimentů

Pro sledování vlivu přítomnosti O-Cer na funkci kožní bariéry byly provedeny celkem tři experimenty na modelových lipidových membránách s rozdílným obsahem EO a O-Cer. U těchto membrán byla provedena rentgenová difrakce (XRD – z anglického X-ray Diffraction), stanovení permeability membrán pro vodu, ionty a dvě modelová léčiva a infračervená (IR – z anglického infrared) spektroskopie. Všechna měření byla porovnávána s kontrolními membránami, které neobsahovaly O-Cer.

V rámci této práce byly připraveny dva typy modelových membrán: První typ membrán obsahoval směs Chol, MK a velmi dlouhých Cer s nefyziologicky zvýšenou koncentrací EO a O-Cer (20–40 mol%), aby bylo možné jejich vliv na chování modelových membrán lépe pozorovat. Zvýšené koncentrace EO-Cer byly použity i v experimentech jiných výzkumných skupin, jedná se o běžný přístup při pozorování struktury LPP.<sup>43,44</sup> Tyto membrány byly při jejich přípravě zahřívány na dvě rozdílné teploty, 70 °C a 90 °C. Zahřívání membrán na teplotu přesahující teplotu fázového přechodu konkrétní lipidové směsi a následné pomalé chladnutí je důležité pro uspořádání lipidů v modelové membráně. Druhý typ membrán byl připraven jako ekvimolární směs Chol, MK a velmi dlouhých Cer s přibližně fyziologickým zastoupením EO a O-Cer<sup>24</sup> (7,5–10 mol%). Tyto membrány byly při přípravě zahřívány na teplotu 70 °C. Celkový obsah lipidů v každé membráně byl 1,35 mg.

Složení membrán je znázorněno na Obrázku 10.



Obrázek 10. Obsah lipidů v modelových membránách (hmotnostní %). Levý graf znázorňuje složení a poměr EO-Cer a O-Cer v membránách se zvýšeným množstvím těchto lipidů. Pravý graf znázorňuje složení a poměr EO-Cer a O-Cer v modelu blízkém fyziologickému zastoupení EO a O-Cer v kůži. Celkový obsah lipidů v každé membráně byl 1,35 mg.

### 3.2 Rentgenová difrakce

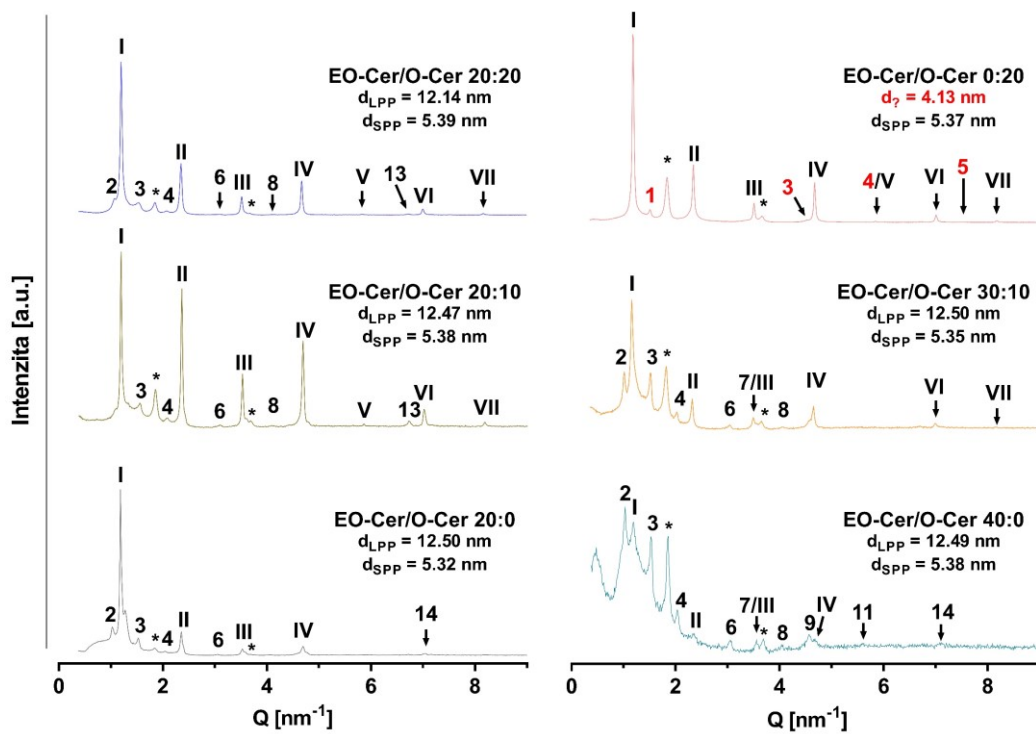
Pomocí XRD jsme pozorovali mikrostrukturu připravených modelových membrán. Tato technika umožňuje zobrazit periodicky se opakující útvary v měřeném vzorku. V našem případě jsme měřením získali informace o přítomnosti lamelárních fází nebo lamelárních struktur a jejich mezirovinových vzdálenostech. Výstupem tohoto měření jsou difraktogramy, které byly vyhodnoceny a jsou zobrazeny v následujících podkapitolách.

Podkapitoly jsou rozděleny podle složení lipidů v modelových membránách a teploty, při které byly membrány zahřívány, aby byly lépe patrné podmínky pro tvorbu LPP. V jednotlivých podkapitolách jsou tedy porovnávány membrány s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer zahřívané při 90 °C, membrány s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer zahřívané při 70 °C a membrány s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím zahřívané při 70 °C.



### 3.2.1 XRD modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 90 °C

Všechny modelové membrány obsahovaly fázi separovaného Chol s mezirovinnou vzdáleností 3,39–3,43 nm, což je v souladu s publikovanou literaturou.<sup>45</sup> U membrány s obsahem EO-Cer:O-Cer 40:0 byla zaznamenána zvýšená intenzita reflexí této fáze. Membrány kromě toho ve své lamelární struktuře obsahovaly další dvě fáze – SPP o délce od 5,32 nm do 5,39 nm, která je tvořena převážně řetězci velmi dlouhých Cer a MK, a LPP, identifikovaná pomocí pěti až devíti reflexí, o délce od 12,14 nm do 12,50 nm, kterou tvoří ultradlouhé řetězce  $\omega$ -esterifikovaných EO-Cer (Obrázek 11).

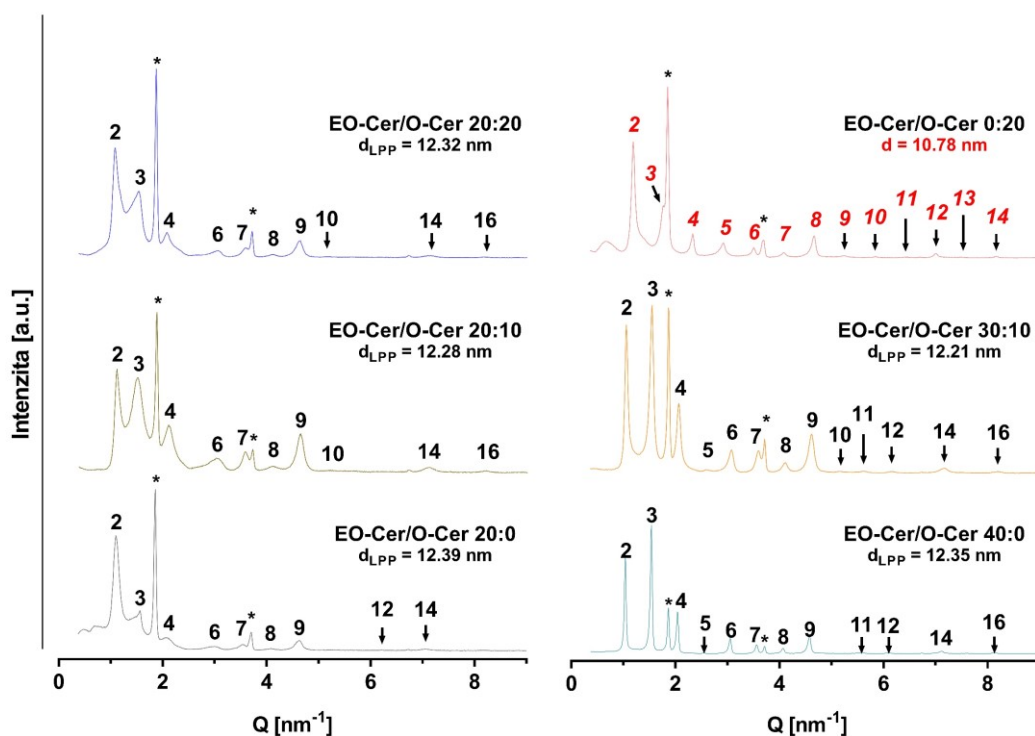


Obrázek 11. Rentgenové difraktogramy modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 90 °C (reprezentativní spektra). Římské číslice označují reflexe krátké lamelární fáze (SPP), arabské číslice označují reflexe dlouhé lamelární fáze (LPP) a hvězdičky označují reflexe separovaného cholesterolu. Písmeno „d“ označuje mezirovinnou vzdálenost fází.

V kontrolní membráně s obsahem EO-Cer 20 % byla identifikována LPP, SPP i fáze separovaného Chol, což odpovídá předchozím nálezům.<sup>46</sup> U této membrány byla intenzita LPP poměrně nízká v porovnání s SPP, avšak se zvyšujícím se množstvím EO-Cer (až na 40 %) v membráně docházelo ke zvýšení intenzity reflexí LPP a k poklesu intenzity reflexí SPP. Výjimkou byla membrána, kde byly veškeré EO-Cer nahrazeny O-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20), u které nebyly nalezeny žádné difrakční píky náležící LPP, což potvrzuje nezbytnost přítomnosti EO-Cer pro tvorbu LPP. Namísto toho byly pozorovány dvě fáze s kratší periodicitou – jedna odpovídala SPP a druhá neznámé fázi s pouze slabými reflexemi a periodicitou 4,13 nm. Při porovnání membrán s poměrem EO-Cer:O-Cer 20:0, 20:10 a 20:20 můžeme pozorovat, že se zvyšující se koncentrací O-Cer dochází k poklesu délky LPP z 12,50 nm až na 12,14 nm, což může být způsobeno kratší celkovou délkou řetězce O-Cer oproti EO-Cer, které tuto fázi tvoří.

### **3.2.2 XRD modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 70 °C**

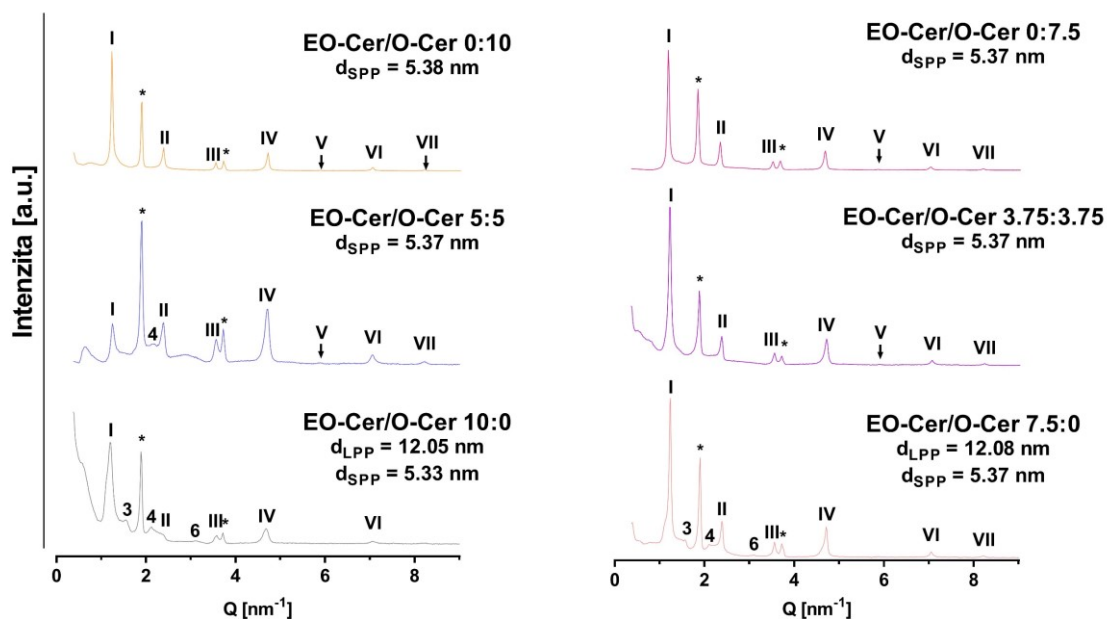
U všech membrán byla opět objevena fáze separovaného Chol (3,39–3,42 nm). Membrána s obsahem EO-Cer:O-Cer 40:0 vykazovala oproti ostatním membránám slabší reflexe této fáze. Dále difraktogramy obsahovaly reflexe odpovídající LPP o periodicitě od 12,21 nm do 12,39 nm. Narozdíl od předchozích membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 90 °C je mezirovinná vzdálenost LPP kratší, ale k její identifikaci jsme zde mohli použít až 13 reflexí, což zvyšuje přesnost určení. Opět můžeme sledovat, že po přidání O-Cer do membrán byla délka LPP kratší než u membrán, které obsahovaly pouze EO-Cer. Intenzita reflexí LPP se zvyšovala s nárůstem množství EO-Cer. Ani u jedné z membrán nebyly nalezeny žádné reflexe náležící SPP. Membrána, ve které byly opět zaměněny veškeré EO-Cer za O-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20) neobsahovala ve své lamelární struktuře SPP ani LPP, byla tu ovšem nalezena střední lamelární fáze (MLP – z anglického medium lamellar phase) o délce 10,78 nm (Obrázek 12). Při porovnání s membránami zahříványými na 90 °C jsou zde patrné rozdíly (chybějící SPP, přesnější určení LPP, tvorba MLP), ze kterých je zřejmé, že teplota zahřívání membrán má zásadní vliv na uspořádání lipidů v membráně.



Obrázek 12. Rentgenové difraktogramy modelových membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 70 °C (reprezentativní spektra). Černé číslice označují reflexe dlouhé lamelární fáze (LPP), červené číslice označují reflexe střední lamelární fáze (MLP) a hvězdičky označují reflexe separovaného cholesterolu. Písmeno „d“ označuje mezirovinnou vzdálenost fází.

### 3.2.3 XRD modelových membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím, připravených při 70 °C

Všechny membrány opět ve své lamelární struktuře obsahovaly fázi separovaného Chol (3,40–3,43 nm). U membrány s obsahem EO-Cer:O-Cer 5:5 byla intenzita reflexí Chol silnější než u ostatních membrán. Ve všech membránách dále byla nalezena SPP o délce od 5,33 nm do 5,38 nm (Obrázek 13), což je rozdíl oproti předchozímu experimentu, kde byly membrány s nefyziologickým množstvím EO a O-Cer zahřívány také na 70 °C, ale k tvorbě SPP nedošlo, vliv na tvorbu SPP bude mít tedy nejspíše i celkové složení membrán.



Obrázek 13. Rentgenové difraktogramy modelových membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím, připravených při 70 °C (reprezentativní spektra). Římské číslice označují reflexe krátké lamelární fáze (SPP), arabské číslice označují reflexe dlouhé lamelární fáze (LPP) a hvězdičky označují reflexe separovaného cholesterolu. Písmeno „d“ označuje mezivinnou vzdálenost fází.

LPP byla tvořena pouze u membrán s obsahem EO-Cer alespoň 7,5 %, délka této fáze byla od 12,05 nm do 12,08 nm. Toto zjištění je v souladu s některými již publikovanými daty, kdy byly porovnány membrány s obsahem 5 a 10 % EO-Cer (příprava membrán byla mírně odlišná). V membráně s obsahem 5 % EO-Cer byla identifikována pouze SPP a fáze separovaného Chol, narozdíl od membrány s 10 % EO-Cer, kde již došlo i ke tvorbě LPP.<sup>46</sup> Oproti tomu v práci od de Jager et al. byla LPP pozorována v malém množství již od 5 %, avšak autoři používali jinou směs lipidů pro tvorbu modelových membrán.<sup>47</sup> Tvorbu LPP jsme mohli identifikovat pomocí tří reflexí. U membrán bez obsahu EO-Cer nebyly přítomny žádné reflexe náležící LPP, stejně jako u membrány s obsahem EO-Cer 3,75 % a membrána s obsahem EO-Cer 5 % obsahovala jednu reflexi, která by mohla odpovídat čtvrté reflexi LPP (na základě předchozích zkušeností z jiných membrán), z jedné reflexe ovšem není možné fázi určit. Mezi membránami s celkovým obsahem EO a O-Cer 10 a 7,5 % nebyly zaznamenány výrazné

rozdíly. V porovnání s předchozími membránami s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer došlo ke zkrácení LPP, ale jinak by se dalo říct, že výsledky membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 90 °C plynule navazují na tyto výsledky při fyziologicky blízkých koncentracích.

### 3.3 Permeabilita modelových lipidových membrán

Pro hodnocení permeability membrán u jednotlivých experimentů jsme použili čtyři parametry – stanovení fluxu theofylinu (TH), fluxu indometacinu (IND), stanovení ztráty vody přes membránu (TEWL – z anglického transepidermal water loss) a elektrické impedance.

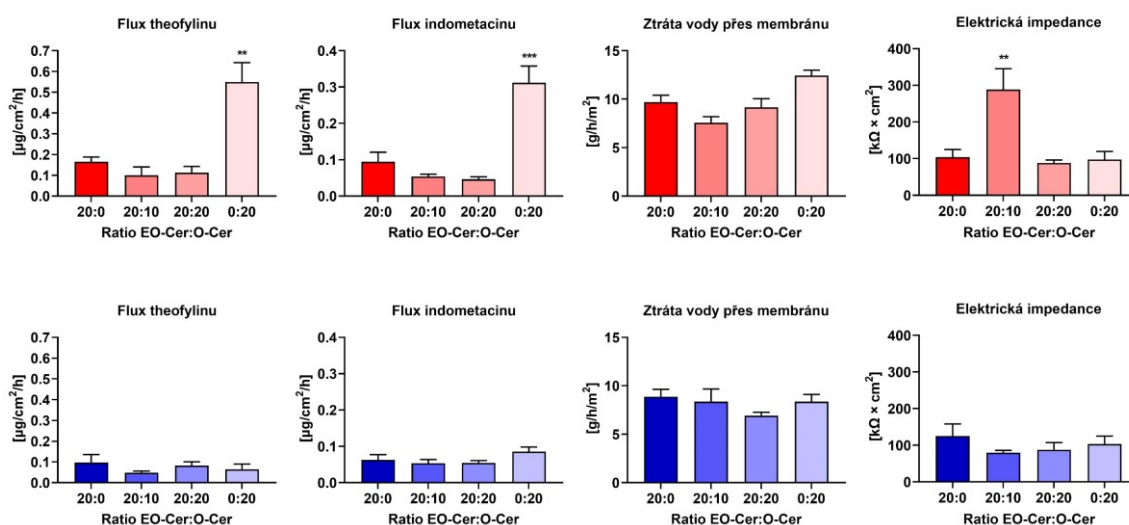
Flux léčiv udává množství prošlého léčiva přes membránu o definované ploše za jednotku času [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]. TH reprezentuje malé polárnější molekuly ( $M_w = 180,164 \text{ g/mol}$ ,  $\log P \sim 0$ ) a IND naopak větší a lipofilnější molekuly ( $M_w = 357,787 \text{ g/mol}$ ,  $\log P \sim 4,3$ ). TEWL slouží ke stanovení množství vody, která projde přes membránu o definované ploše za jednotku času [ $\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$ ]. Jedná se o jeden z nejdůležitějších parametrů využívaných v dermatologii pro určení stavu lidské kůže.<sup>48</sup> Zvýšení hodnot fluxů léčiv či TEWL značí zhoršení funkce kožní bariéry. Elektrická impedance [ $\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$ ] udává odpor membrány vůči střídavému proudu a je nepřímo úměrná propustnosti iontů přes membránu. Zvýšení hodnot elektrické impedance naopak značí nižší propustnost membrány pro ionty, a tedy větší integritu membrány.

V následujících kapitolách jsou nejprve porovnávány membrány s narůstající koncentrací O-Cer připravovaných při 70 a 90 °C, následně membrány s narůstající koncentrací EO-Cer připravovaných při 70 a 90 °C a nakonec membrány s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím zahříváných při 70 °C. Toto rozdělení bylo zvoleno z důvodu lepšího porovnání vlivu koncentrace O a EO-Cer na permeabilitu membrán a zároveň nám umožní lépe sledovat vliv teploty na bariérové vlastnosti, při které byly membrány připraveny.

### 3.3.1 Permeabilita membrán s narůstající koncentrací O-Cer

V této podkapitole jsou navzájem porovnávány membrány zahříváné na 70 a 90 °C s obsahem EO-Cer:O-Cer 20:0 (kontrola), 20:10, 20:20 a 0:20.

Flux TH přes kontrolní membránu bez O-Cer (EO-Cer:O-Cer 20:0) připravovanou při 90 °C byl  $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Obrázek 14, grafy znázorněné červenou barvou) a u membrány, připravované při 70 °C byl  $0,10 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Obrázek 14, grafy znázorněné modrou barvou). Po přidání O-Cer (tedy u EO-Cer:O-Cer 20:10 a EO-Cer:O-Cer 20:20) nedošlo k výrazným změnám ani u jedné z membrán, ať už byla připravována při 90 nebo 70 °C, došlo k pouze mírnému poklesu propustnosti, avšak nikoliv statisticky významnému. Ovšem u membrány bez přítomnosti EO-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20) připravené při 90 °C byl pozorován statisticky významný (více než trojnásobný) nárůst propustnosti ( $p < 0,01$ ) na  $0,55 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . K tomuto nárůstu ovšem nedošlo u membrány připravované při 70 °C, zde u této membrány naopak došlo oproti kontrole k mírnému poklesu hodnot.



Obrázek 14. Permeační parametry modelových membrán s narůstající koncentrací O-Cer. Červené grafy znázorňují hodnoty membrán, připravených při 90 °C a modré grafy při 70 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr všech naměřených hodnot ( $n$ )  $\pm$  SEM,  $n = 7$ . Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku –  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,05$  (\*).

Flux IND pro kontrolní membránu (EO-Cer:O-Cer 20:0) připravovanou při 90 °C byl  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a u membrány připravované při 70 °C byl  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Pozorovali jsme podobné změny jako u TH (i přesto, že IND má jiné fyzikálně chemické vlastnosti). Propustnost membrán se oproti kontrolám příliš neměnila, došlo opět pouze k mírnému poklesu. Výjimkou byla pouze membrána bez EO-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20) připravená při 90 °C, která opět vykazovala statisticky významný (více než trojnásobný) nárůst hodnot ( $p < 0,001$ ) na  $0,31 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . U této membrány připravené při 70 °C k takovému nárůstu nedošlo, oproti kontrole došlo pouze k mírnému nárůstu propustnosti.

Membrány připravené při 90 °C vykazují podobný trend propusti pro obě léčiva. Nárůst propustnosti léčiv u membrány bez obsahu EO-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20) při 90 °C může být spojen s nepřítomností LPP, pro jejíž vznik je přítomnost EO-Cer nezbytná. Je ovšem zajímavé, že k tomuto výraznému zhoršení bariéry nedošlo u této membrány při zahřívání na 70 °C, přestože zde LPP také nebyla vytvořena. Naopak u této membrány došlo pro TH k poklesu propustnosti a u IND k pouze mírnému nárůstu, tento rozdíl bude nejspíše způsoben odlišnými vlastnostmi léčiv. Důvodem, proč nedochází u těchto membrán k výraznému zhoršení propustnosti (i přes netvořící se LPP) jako je tomu u odpovídajících membrán při 90 °C, je nejspíš tvorba MLP, která by mohla částečně zastupovat funkci LPP. Při porovnání membrán připravovaných při 90 a 70 °C jsou zde zřejmé rozdíly – membrány připravované při 70 °C vykazují obecně nižší hodnoty fluxu, z čehož vyplývá, že zahřívání na nižší teplotu má pozitivní vliv na uspořádání lipidů a vede ke zlepšení bariérových vlastností.

Dalším měřeným parametrem byl TEWL. Naměřené hodnoty ztráty vody se u následujících membrán při 90 a 70 °C příliš nelišily od hodnoty u kontrolní membrány (při 90 °C –  $9,69 \pm 0,72 \text{ g}/\text{h}/\text{m}^2$  a při 70 °C –  $8,88 \pm 0,75 \text{ g}/\text{h}/\text{m}^2$ ), došlo pouze k mírnému poklesu. Nárůst byl zaznamenán pouze u membrány bez přítomnosti EO-Cer (EO-Cer:O-Cer 0:20) při 90 °C, kdy došlo ke zvýšení ztráty vody na  $12,43 \pm 0,56 \text{ g}/\text{h}/\text{m}^2$ , nejedná se sice o statisticky významný nárůst, ale tento trend dobře koreluje s propustností membrán pro modelová léčiva. Příčinou tohoto zvýšení by opět mohla být nepřítomnost LPP. U membrán s obsahem EO-Cer:O-Cer 0:20 při 70 °C, u které nebyla

těž tvořena LPP, však k tomuto nárůstu nedošlo, naopak došlo opět k poklesu, stejně jako u fluxu TH, nejspíše opět z důvodu tvorby MLP. Největší zlepšení propustnosti pro vodu ve srovnání s kontrolou bylo u membrán zahříváných při 90 °C zaznamenáno po přidání 10 % O-Cer (EO-Cer:O-Cer 20:10) a při 70 °C až po přidání 20 % O-Cer (EO-Cer:O-Cer 20:20). Membrány připravované při 70 °C opět vykazují celkově nižší hodnoty TEWL než u 90 °C, což znovu potvrzuje pozitivní vliv nižší teploty na uspořádání lipidů.

Obecně přídavek O-Cer ke 20 % EO-Cer vede k mírnému zlepšení bariérových vlastností (snížení fluxů léčiv a snížení ztrát vody přes membránu). Tato skutečnost bude nejspíše způsobena tím, že u membrán bylo použito větší než ekvivalentní množství Cer, a tedy O-Cer, které jsou zde navíc a nesnižují koncentraci EO-Cer, která je potřebná pro tvorbu LPP, by mohly zlepšovat bariérovou funkci těchto membrán.

Elektrická impedance kontrolního vzorku při 90 °C byla  $103,80 \pm 21,00 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  a při 70 °C byla  $124,70 \pm 33,49 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . Následující membrány se zvyšujícím se množstvím O-Cer měly hodnoty elektrické impedance mírně nižší oproti kontrole. Statisticky významný nárůst ( $p < 0,01$ ) elektrické impedance, a tedy snížení propustnosti membrány pro ionty, byl pozorován u membrány EO-Cer:O-Cer 20:10 při 90 °C, která měla hodnotu impedance  $288,00 \pm 57,16 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . Z části by se tento pokles propustnosti membrány pro ionty dal přisoudit poklesu hodnoty ztráty vody pro tuto membránu, z části mohlo v této membráně dojít ke tvorbě domén s vyšším odporem vůči střídavému elektrickému proudu.

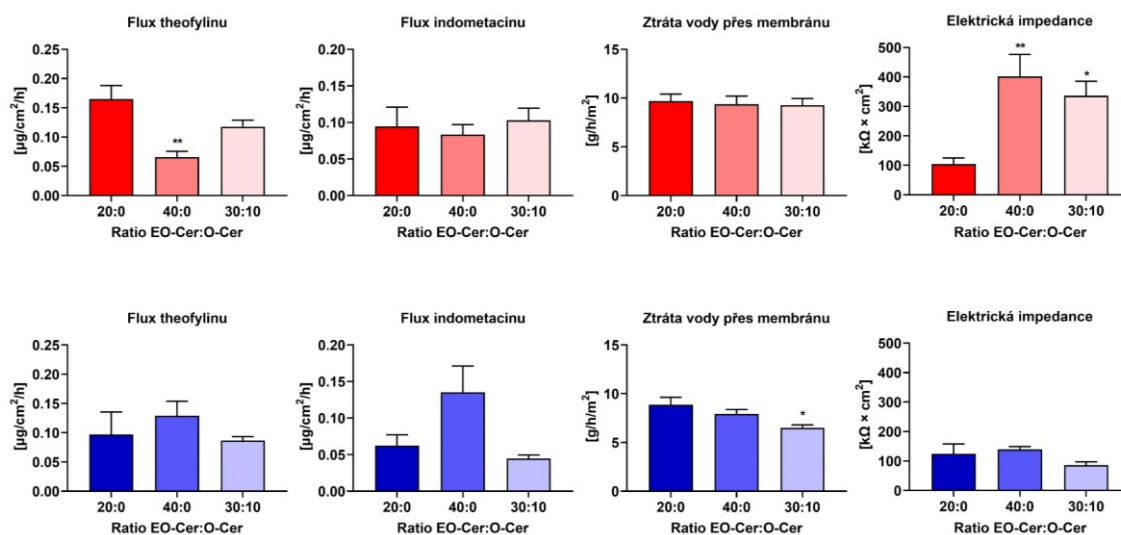
### 3.3.2 Permeabilita membrán s narůstající koncentrací EO-Cer

V této podkapitole jsou porovnány membrány s obsahem EO-Cer:O-Cer 20:0 (kontrola), 40:0 a 30:10 připravované při 90 a 70 °C.

U membrán připravovaných při 90 °C bylo zaznamenáno statisticky významné ( $p < 0,01$ ) snížení fluxu TH u membrány s nárůstem EO-Cer (EO-Cer:O-Cer 40:0) v porovnání s kontrolou (EO-Cer:O-Cer 20:0;  $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), hodnota klesla na  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . U membrány EO-Cer:O-Cer 30:10 v porovnání s kontrolou nedošlo k významným změnám, propustnost jen mírně klesla. U membrán zahříváných na 70 °C byl trend opačný. Zvýšení koncentrace EO-Cer na 40 % vedlo ke zvýšení propustnosti



u této membrány ( $0,13 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) oproti kontrole ( $0,10 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Permeabilita membrány se složením EO-Cer:O-Cer 30:10 potom opět poklesla na hodnotu blízkou kontrole (Obrázek 15).



Obrázek 15. Permeační parametry modelových membrán s narůstající koncentrací EO-Cer. Červené grafy znázorňují hodnoty membrán při 90 °C a modré grafy při 70 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr všech naměřených hodnot ( $n$ )  $\pm$  SEM,  $n = 7$ . Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku –  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,05$  (\*).

U fluxu IND pro membrány s rostoucím množstvím EO-Cer jsme nezaznamenali statisticky významné změny oproti kontrolním membránám (při 90 °C –  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a při 70 °C –  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Největší rozdíl oproti kontrole byl zaznamenán u membrány EO-Cer:O-Cer 40:0 při 70 °C, u které došlo k nárůstu propustnosti.

Při porovnání fluxů obou léčiv je vidět, že především membrány připravované při 70 °C mají podobný trend v propustnosti pro obě léčiva. U membrány s obsahem EO-Cer:O-Cer 30:10 při 90 °C dochází u TH ke zlepšení vlastností a u IND naopak k velmi mírnému zhoršení, tento rozdíl bude nejspíše způsoben odlišnými vlastnostmi léčiv. Přídavek 30 % EO-Cer (s 10 % O-Cer) vedl u většiny membrán ke zlepšení jejich vlastností. Je ovšem zajímavé, že vliv přídavku 40 % EO-Cer na membránu závisí na

teplotě přípravy, při 90 °C měl přídavek 40 % EO-Cer pozitivní vliv a naopak při 70 °C došlo ke zhoršení permeability. Pravděpodobně při rozdílných teplotách přípravy membrán dochází k rozdílnému uspořádání nadbytečného Cer EOS v membráně, což značně ovlivňuje její charakteristiky.

Naměřené hodnoty TEWL u následujících membrán připravených při 90 a 70 °C mají srovnatelné hodnoty jako kontrolní membrána (při 90 °C –  $9,69 \pm 0,72$  g/h/m<sup>2</sup> a při 70 °C –  $8,88 \pm 0,75$  g/h/m<sup>2</sup>), s výjimkou membrány EO-Cer:O-Cer 30:10 při 70 °C, kdy došlo k statisticky významnému ( $p < 0,05$ ) poklesu ztráty vody na  $6,51 \pm 0,30$  g/h/m<sup>2</sup>.

Opět byl zaznamenán vliv teploty přípravy na vlastnosti membrán, membrány připravované při 70 °C měly (v porovnání s membránami připravenými při 90 °C) obecně nižší hodnoty fluxů léčiv a TEWL, s výjimkou fluxu TH a IND u membrány EO-Cer:O-Cer 40:0. Přídavek O-Cer ke 30 % EO-Cer měl opět pozitivní vliv na propustnost membrán, což může být opět způsobeno zvýšeným množstvím Cer v membránách, avšak toto tvrzení nemůžeme prokázat s jistotou, jelikož membrána s obsahem 30 % Cer EOS (bez přídavku O-Cer) nebyla připravena. Z těchto výsledků se tedy na první pohled jeví, že O-Cer nenarušují funkci EO-Cer (dokud jsou tyto v membráně obsaženy v dostatečné koncentraci).

U membrán s nárůstem EO-Cer při 90 °C došlo k extrémnímu nárůstu elektrické impedance oproti kontrole ( $103,80 \pm 21,00$  k $\Omega \times$  cm<sup>2</sup>), a tedy k poklesu propustnosti membrány pro ionty. Elektrická impedance membrány EO-Cer:O-Cer 40:0 byla  $401,60 \pm 74,51$  k $\Omega \times$  cm<sup>2</sup>, což je statisticky významný nárůst ( $p < 0,01$ ). U membrány EO-Cer:O-Cer 30:10 byla hodnota též statisticky významně zvýšena ( $p < 0,05$ ) na  $336,40 \pm 48,96$  k $\Omega \times$  cm<sup>2</sup>. Membrány s nárůstem EO-Cer při 70 °C se výrazně od kontrolní membrány ( $124,70 \pm 33,49$  k $\Omega \times$  cm<sup>2</sup>) nelišily. Snížení propustnosti membrán pro ionty při 90 °C opět zčásti odpovídá trendům zjištěným u fluxu TH, kdy došlo také k výraznému poklesu propustnosti membrán, ovšem není možné vyloučit i jiné vlivy, jako je tvorba domén, na kterou je měření elektrické impedance citlivé.

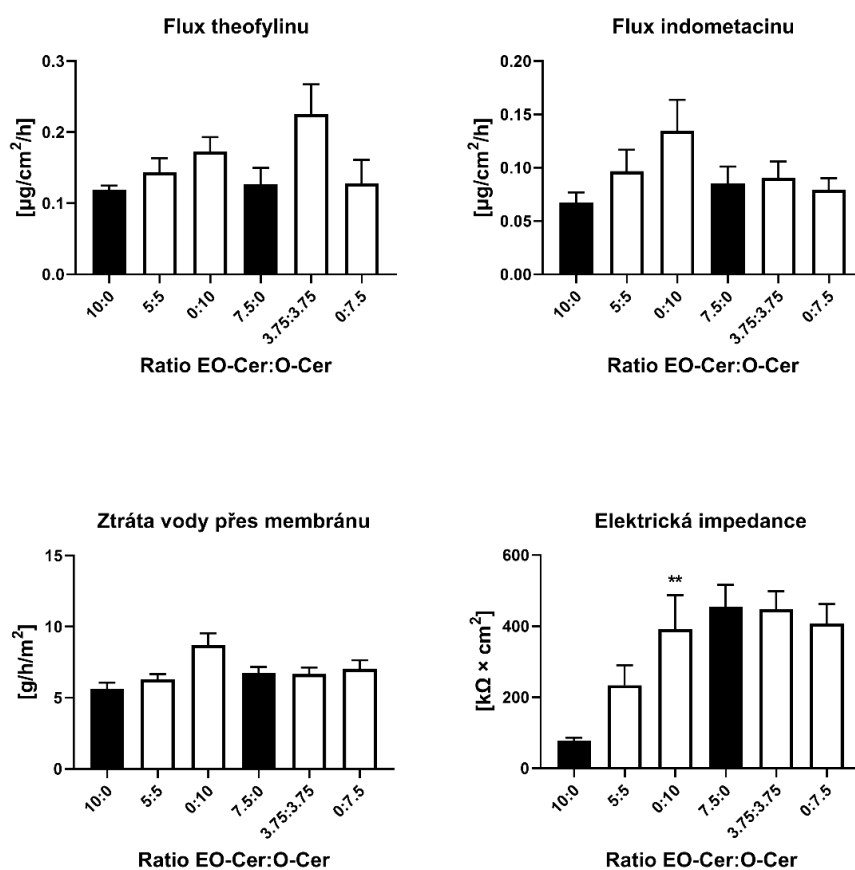
### 3.3.3 Permeabilita membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým hodnotám

V následující podkapitole jsou vyhodnoceny membrány s obsahem EO a O-Cer, který více odpovídá fyziologickým koncentracím ve SC. Tyto membrány byly zahřívány při 70 °C, což se v předchozích experimentech ukázalo jako výhodnější než zahřívání na 90 °C. Kontrolními membránami jsou označeny membrány bez obsahu O-Cer, tedy membrány s obsahem EO-Cer 7,5 % a 10 %. Membrány použité v této kapitole lépe napodobují kůži pacientů s kožními nemocemi (jako ichtyóza), kdy kvůli defektu biosyntézy dochází ke kumulaci prekurzorů (O-Cer) a snižuje se koncentrace EO-Cer.

Flux TH kontrolní membrány EO-Cer:O-Cer 10:0 byl  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a membrány EO-Cer:O-Cer 7,5:0  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (Obrázek 16). Oproti kontrolním membránám došlo u všech následujících membrán ke zvýšené propustnosti. Téměř ke dvojnásobnému nárůstu došlo u membrány EO-Cer:O-Cer 3,75:3,75, nejednalo se ovšem o statisticky významný nárůst.

Podobný trend byl sledován i u fluxu IND, kde byla propustnost kontrolní membrány s obsahem 10 % EO-Cer  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a u membrány s obsahem 7,5 % EO-Cer  $0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Opět došlo u následujících membrán ze zvýšení propustnosti, kromě membrány s obsahem EO-Cer:O-Cer 0:7,5, u které došlo k nepatrnému poklesu.

U porovnávaných membrán nebyla oproti kontrolním membránám tvořena LPP, což může být příčinou zhoršené propustnosti membrán. Je zajímavé, že výrazné zhoršení nebylo pozorováno u membrány EO-Cer:O-Cer 0:7,5, u které dokonce u IND došlo i ke zlepšení propustnosti, přestože neobsahovala žádné EO-Cer a nebyla tedy tvořena ani LPP.



Obrázek 16. Permeační parametry modelových membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým hodnotám. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr všech naměřených hodnot ( $n$ )  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrolnímu vzorku –  $p < 0,01$  (\*\*) a  $p < 0,05$  (\*). Černé sloupce označují kontrolní membrány.

Ztráta vody přes membránu kontrolního vzorku EO-Cer:O-Cer 10:0 byla  $5,62 \pm 0,44 \text{ g}/\text{h}/\text{m}^2$  a u EO-Cer:O-Cer 7,5:0 byla  $6,73 \pm 0,44 \text{ g}/\text{h}/\text{m}^2$ . U ostatních membrán došlo k nárůstu ztráty vody, kromě membrány EO-Cer:O-Cer 3,75:3,75, u které došlo k velmi mírnému poklesu. Žádná ze změn ovšem nebyla statisticky významná. Hodnoty ztrát vody poměrně hezky korelují s výsledky fluxů léčiv a pravděpodobně bude zhoršení vlastností těchto membrán souviset s chybějící LPP.

Negativní vliv O-Cer na bariérové vlastnosti u těchto membrán vyplývá z toho, že jejich přítomnost snižuje koncentraci EO-Cer pod určitou úroveň, která je nezbytná pro

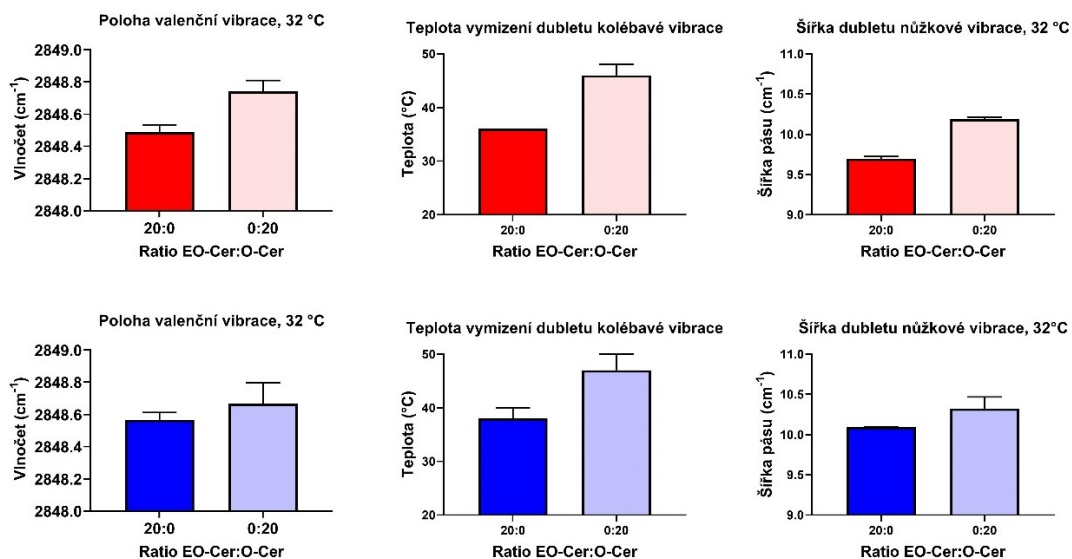
tvorbu LPP, bez které docházelo u membrán v předchozích experimentech (až na výjimky) ke zhoršení propustnosti membrán.

Kontrolní membrána EO-Cer:O-Cer 10:0 měla hodnotu elektrické impedance  $78,38 \pm 7,67 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$  a membrána EO-Cer:O-Cer 7,5:0 měla hodnotu  $454,40 \pm 62,46 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . U membrán s obsahem EO-Cer:O-Cer 5:5 a 0:10 došlo k nárůstu hodnot oproti kontrole, nárůst u membrány 0:10 je statisticky významný ( $p < 0,01$ ). Naopak u membrán s obsahem EO-Cer:O-Cer 3,75:3,75 a 0:7,5 došlo oproti kontrole k mírnému poklesu (ale hodnoty jsou velmi podobné). Důvod takto velkého rozdílu hodnot mezi kontrolami v tuto chvíli nedokážeme dostatečně objasnit.

### 3.4 IR spektroskopie

IR spektroskopie slouží ke studiu mikrostruktury membrán. Pomocí měření byla sledována konformace lipidových řetězců a jejich laterální uspořádání. Výstupem měření byla spektra závislosti reflektance na vlnočtu, která byla vyhodnocena a následně byly do grafů na následujícím obrázku (Obrázek 17) vyneseny vybrané parametry modelových membrán, u kterých byly EO-Cer zaměněny za O-Cer. Tyto membrány byly opět připravovány při 90 °C (červené) a 70 °C (modré).

Posun polohy maxima valenční vibrace u membrány EO-Cer:O-Cer 0:20 do vyšších hodnot vlnočtu oproti membráně EO-Cer:O-Cer 20:0 značí nižší uspořádanost celého systému, a tedy i nižší velikost přitažlivých sil lipidových řetězců v této membráně. Tento efekt se projevil jak u membrán připravovaných při 90 °C (nárůst o přibližně  $0,25 \text{ cm}^{-1}$ ), tak i u membrán připravovaných při 70 °C, avšak zde nebyl tento efekt tak patrný. Nižší uspořádanost lipidových řetězců při záměně EO-Cer za O-Cer se odráží i do výsledků fluxů léčiv, a především u membrány připravované při 90 °C, u kterých došlo ke statisticky významnému nárůstu fluxů TH i IND. Posun hodnot maxima valenční vibrace byl zaznamenán i při studii lipidů kůže u pacientů s atopickou dermatitidou a souvisí tedy se zhoršením bariérové funkce kůže.<sup>49</sup>



Obrázek 17. Vyhodnocení IR spektroskopie modelových membrán s obsahem EO-Cer:O-Cer 20:0 a 0:20. Červené grafy znázorňují hodnoty pro membrány připravované při 90 °C a modré grafy při 70 °C. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr všech naměřených hodnot ( $n$ )  $\pm$  SEM,  $n = 2$ .

Vymizení dubletu koléřavé vibrace při dané teplotě značí přechod z těsnějšího orthorhombického uspořádaní jednotlivých lipidových domén, které tvoří kvalitnější bariéru, do volnějšího hexagonálního uspořádaní. Jedná se zde o termodynamickou stabilitu těchto domén. S tímto souvisí šířka dubletu nůžkové vibrace (počítána jako rozdíl hodnot vlnočtu dvou maxim nůžkové vibrace při fyziologické teplotě 32 °C), která indikuje velikost vznikajících lipidových domén a koreluje s kvalitou bariérových vlastností těchto membrán.<sup>50</sup> U membrány EO-Cer:O-Cer 0:20 byla zaznamenána vyšší hodnota teploty, při které dochází k přechodu do volnějšího uspořádaní a tato membrána má tedy vyšší termodynamickou stabilitu přítomných lipidových domén. Příčinu tohoto efektu můžeme hledat v řetězcích linolové kyseliny, které obsahují dvě dvojně vazby v cis uspořádaní a které obecně zvyšují neuspořádanost této části EO-Cer. Membrána, která obsahovala pouze O-Cer bez řetězců linolové kyseliny měla v tomto případě dle očekávání tranzici do hexagonálního uspořádaní při vyšší teplotě. Šířka nůžkové vibrace u membrány EO-Cer:O-Cer 20:0 byla nižší, což indikuje, že řetězce linolové kyseliny vnášejí do této membrány určitou neuspořádanost a tím dochází ke tvorbě menších lipidových domén.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité materiály a chemikálie

EO-Cer a O-Cer (Cer EOS, Cer EOP, Cer EOdS Cer OS, Cer OP, Cer OdS) byly připraveny na Katedře organické a bioorganické chemie dle publikovaného postupu.<sup>51</sup> Velmi dlouhé Cer (Cer NS, Cer AS, Cer NdS, Cer AdS, Cer NP a Cer AP) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). MK (kyselina palmitová, stearová, arachidová, behenová a lignocerová), Chol, CholS, TH, IND, gentamycin sulfát, propylenglykol, komponenty pro přípravu pufu a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo). Všechna rozpouštědla byla v analytické nebo HPLC kvalitě. Voda byla čištěna použitím filtračního systému Millipore Q systém (Merck Millipore, Billarica, MA).

### 4.2 Příprava lipidových směsí

Aby bylo možné sledovat, jak přítomnost O-Cer ovlivňuje bariérové vlastnosti a mikrostrukturu SC, bylo potřeba připravit lipidové směsi s obsahem těchto Cer, které se následně nanášejí na podklad, a představují tak mezibuněčné prostředí SC. Nejprve byly připraveny směsi lipidů, které byly tvořeny MK, Cer a Chol, s přídavkem Chol-sulfátu (CholS), který tvořil 5 % z celkové hmotnosti.

MK byly tvořeny směsí v následujícím zastoupení: 1,3 % kyselina palmitová (C16), 3,3 % kyselina stearová (C18), 6,9 % kyselina arachidová (C20), 47,1 % kyselina behenová (C22) a 41,4 % kyselina lignocerová (C24). Toto složení bylo zvoleno na základě zastoupení MK ve SC.<sup>52</sup> Navážené MK byly smíchány a následně rozpuštěny ve směsi hexan: 96% ethanol v poměru 2:1 (v/v), aby vznikla homogenní směs. Rozpouštědlo bylo odstraněno proudem dusíku a dosušeno v exikátoru nad parafinem a P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Cer byly tvořeny třemi skupinami – směsí EO-Cer, směsí O-Cer a směsí velmi dlouhých Cer, jejichž poměry se mezi jednotlivými vzorky lišily. Směs EO-Cer byla připravena z 77,8 % EOS, 16,7 % EOP a 5,5 % EOdS. Směs O-Cer obsahovala 77,8 %

OS, 16,7 % OP a 5,5 % OdS. Směs velmi dlouhých Cer byla tvořena 8,1 % NS, 25,9 % AS, 8,9 % NdS, 1,4 % AdS, 25,3 % NP a 30,4 % AP. Zastoupení jednotlivých Cer opět bylo voleno tak, aby odpovídalo složení Cer ve SC.<sup>19,24</sup> Navážky jednotlivých směsí byly, shodně jako u směsi MK, smíchány, rozpuštěny ve směsi hexan: 96% ethanol v poměru 2:1 (v/v) a následně bylo rozpouštědlo odpařeno.

V dalším kroku bylo potřeba připravit lipidové směsi pro jednotlivé vzorky. Kontrolní vzorek byl připraven jako ekvimolární směs MK, Cer a Chol, s přidavkem CholS. Cer frakce v tomto případě obsahovala 80 % velmi dlouhých Cer a 20 % EO-Cer (kontrolní vzorek u membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer). V dalších vzorcích pak byly použity různé poměry EO-Cer a O-Cer, případně i velmi dlouhých Cer (Tabulka 1).

Jednotlivé složky byly rozpuštěny ve směsi hexan: 96% ethanol v poměru 2:1 (v/v) a následně do vzorků bylo přeneseno množství odpovídající danému procentuálnímu zastoupení. Rozpouštědlo bylo opět odpařeno pomocí dusíku a vzorky dosušeny v exsikátoru (parafín, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

**Membrány s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer**

EO-Cer	O-Cer	velmi dlouhé Cer
20 %	0 %	80 %
20 %	10 %	80 %
20 %	20 %	80 %
40 %	0 %	80 %
30 %	10 %	80 %
0 %	20 %	80 %

**Membrány s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím**

EO-Cer	O-Cer	velmi dlouhé Cer
10 %	0 %	90 %
5 %	5 %	90 %
0 %	10 %	90 %
7,5 %	0 %	92,5 %
3,75 %	3,75 %	92,5 %
0 %	7,5 %	92,5 %

Tabulka 1. Poměry ceramidů pro přípravu modelových membrán.



### 4.3 Příprava modelových lipidových membrán

Lipidové směsi byly opět rozpuštěny ve směsi hexan: 96% ethanol v poměru 2:1 (v/v) na výslednou koncentraci 4,5 mg/ml. Pro podporu rozpouštění byly vialky ponořeny do ultrazvukové lázně.

Modelové membrány pro permeační pokusy byly vytvořeny nastříkáním lipidů na podkladové polykarbonátové filtry Nucleopore s póry o velikosti 0,015  $\mu\text{m}$  (Whatman, Kent, Velká Británie). Nejprve bylo potřeba filtry upravit na velikost  $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$ . Po aktivaci ve směsi hexan: 96% ethanol v poměru 2:1 (v/v) a vysušení na filtračním papíře v Petriho misce, byly filtry upevněny do kovových držáků s kruhovým otvorem o průměru 1 cm.

Nastříkání bylo provedeno pomocí proudu dusíku na Linomatu V (Camag, Muttenz, Švýcarsko). Pro tyto účely byl Linomat upraven a nastaven tak, aby nastříknutá plocha byla o velikosti  $1 \text{ cm}^2$ . Na každou membránu bylo pomocí stříkačky aplikováno třikrát 100  $\mu\text{l}$  roztoku lipidů, ovšem vždy před novou vrstvou byla membrána pootočena o 90 stupňů, aby byl nános rovnoměrný. Na jednu membránu bylo použito 1,35 mg lipidů. Pro nastavení nastříkání byl použit program winCATS. Membrány byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro změření IR spektroskopie a XRD byly lipidy nastříknuty stejným způsobem jako pro permeační pokusy, ovšem místo pokladového filtru bylo použito krycí sklíčko o rozměru  $22 \times 22 \text{ mm}$  (nastříkovaná plocha  $1 \text{ cm}^2$  v kovovém držáku o průměru otvoru 1 cm). Pro IR spektroskopii i XRD bylo od každého vzorku připraveno po dvou sklíčkách.

Takto připravené membrány (na polykarbonátových filtrech i na sklíčkách) byly zahřívány v elektrické troubě po dobu 10 minut na 90 nebo 70  $^\circ\text{C}$ , což je teplota nad hodnotou teploty fázového přechodu těchto lipidových směsí. Poté jsme je nechali pomalu chladnout (přes noc), čímž jsme dosáhli vzniku lamelární struktury. Následně jsme je inkubovali v termostatu při teplotě 32  $^\circ\text{C}$ .

#### **4.4 Permeační pokusy**

Pro provedení permeačních pokusů byly nejprve umístěny membrány do Franzových difúzních cel. Permeabilita membrán byla popsána pomocí následujících měření, tzv. permeačních parametrů – TEWL, elektrická impedance a kumulativní množství léčiva prošlého přes membránu. Tyto měření nám dávají informaci o vlivu O-Cer na bariérové vlastnosti modelových lipidových membrán, díky čehož se nepřímo dá studovat jejich vliv na bariérovou funkci SC.

##### **4.4.1 Franzovy difúzní cely**

Franzovy difúzní cely jsou vyráběny z borosilikátového skla. Jedná se o dvoudílné cely tvořené vrchní (donorovou) a spodní (akceptorovou) částí, mezi které se vkládá modelová membrána v teflonových držácích s difúzní plochou 0,5 cm<sup>2</sup>. Nastříkané lipidy směřují směrem nahoru. Donorová část cely je ve tvaru dutého válce a slouží například k aplikaci roztoku léčiva na membránu. Akceptorová část cely je válcovitá, má uzavřené dno a je opatřena raménkem, které slouží k odebírání vzorků. Do této části se vkládá také míchadlo, které zajišťuje neustálé promíchávání přítomného roztoku. Složené cely jsou zajištěny pomocí gumiček.

Akceptorová část cel byla naplněna 10 mM izotonickým fosfátovým pufrům o pH = 7,4 s přidávkem gentamycinu o koncentraci 50 mg/l, přesný objem byl u jednotlivých cel zaznamenán a použit při výpočtech. Následně byly cely vloženy do termostatované vany s vodou o teplotě 32 °C (opatřené vícemístnou magnetickou míchačkou), kde byly přes noc ponechány, aby se ustálila teplota akceptorové fáze a aby se membrány hydratovaly. Tyto podmínky (teplota 32 °C, pH pufru 7,4) napodobují přirozené podmínky povrchu kůže.

##### **4.4.2 Měření ztráty vody přes membránu**

Pro měření ztráty vody přes membránu byl použit přístroj AquaFlux AF200 (Biox Systems Ltd, Londýn, Velká Británie), který se využívá při měření TEWL. Tento

permeační parametr udává množství vody, které projde přes jednotku plochy (modelové membrány či kůže) za jednotku času [g/h/m<sup>2</sup>].

Během měření byla z jednotlivých Franzových cel postupně sejmuta donorová část a k membráně v teflonovém držáku přiložena hlava sondy. Měření trvalo, dokud nedošlo k ustálení hodnoty, která byla následně zaznamenána. Cely byly pak opět sestaveny a vráceny do vodní lázně. Pro každou membránu byly hodnoty změřeny dvakrát.

Měření probíhalo po celou dobu za přibližně stejné teploty (26–28 °C) a relativní vlhkosti vzduchu (36–39 %)

#### **4.4.3 Měření elektrické impedance**

Elektrická impedance [kΩ × cm<sup>2</sup>], která udává propustnost membrány pro ionty, byla měřena pomocí přístroje LCR 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo), který byl nastaven v paralelním režimu se střídavou frekvencí 120 Hz. Měřicí rozsah přístroje je od 20 Ω do 10 MΩ, měřeno v kΩ, s chybou v hodnotách kΩ menší než 0,5 %.

Před samotným měřením bylo na každou membránu aplikováno 500 μl fosfátového pufru o pH = 7,4 a necháno alespoň jednu hodinu ustálit. Součástí přístroje jsou dvě nerezové sondy, kdy jedna z nich se vkládá raménkem do akceptorové části a druhá je ponořena do kapky pufru na membráně, čímž dojde k uzavření elektrického obvodu a probíhá měření. Naměřené hodnoty z displeje byly postupně u všech membrán zaznamenávány. Každá membrána byla proměřena dvakrát. Po dokončení měření byl pomocí celulózového tampónku opatrně odstraněn pufr.

#### **4.4.4 Měření permeability membrán pomocí modelových léčiv**

##### **4.4.4.1 Modelová léčiva**

Jelikož permeabilita membrán není pro všechny typy látek stejná, byly použity jako modelová léčiva látky s odlišnými fyzikálními vlastnostmi – TH a IND.

TH ( $M_w = 180,164$  g/mol,  $\log P \sim 0$ ) reprezentoval látky polárnější s menší molekulovou hmotností. IND ( $M_w = 357,787$  g/mol,  $\log P \sim 4,3$ ) naopak představoval látku lipofilnější s větší molekulovou hmotností.

Léčiva jsme používali ve formě suspenze, která byla připravena navážením léčiv a následnou suspendací v 60% vodném roztoku propylenglykolu. Takto byla připravena 5% (m/v) suspenze TH a 2% (m/v) suspenze IND. Před použitím byly obě suspenze důkladně promíchány pomocí vortexu.

#### **4.4.4.2 Vlastní permeace**

Do donorové části Franzových cel bylo na každou modelovou membránu aplikováno 100  $\mu$ l suspenze léčiva. Poté byl každé dvě hodiny od aplikace léčiva odebírán raménkem z akceptorové části z každé cely vzorek o objemu 300  $\mu$ l, tento objem byl následně doplněn čistým fosfátovým pufr. Vzorky byly z každé cely odebírány celkem pětkrát, tedy po 2, 4, 6, 8 a 10 hodinách.

Takto byla nejprve provedena permeabilita pro TH. Po odebrání posledního vzorku byl ve všech celách vyměněn fosfátový pufr, z membrán byl vymyt zbytek TH a opatrně byly vysušeny. Cely byly opět vráceny do vodní lázně a nechala se přes noc ustálit teplota akceptorové fáze. Následující den bylo celé měření opakováno i pro IND stejným způsobem.

#### **4.4.4.3 Podmínky HPLC analýzy**

Množství léčiva [ $\mu$ g], které prošlo přes membránu, bylo vypočteno z koncentrace zjištěné pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a objemu pufru ve Franzových celách. Zjištěné množství léčiva ve vzorcích bylo v závislosti na čase vyneseno do grafu a ze směrnice přímky jsme odečetli hodnotu fluxu léčiva [ $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h].

Pro HPLC analýzu byl použit přístroj Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Přístroj je složen z pumpy LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosampleru SIL-20A HT, termostatu kolony CTO-20AC, diodového detektoru

SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20A. Pro analýzu dat byl použit software LCsolutions 1.22.

Analýza vzorků s TH byla provedena pomocí reverzní fáze na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5  $\mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt, Německo) při 35 °C s použitím mobilní fáze methanol/0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v poměru 4:6 (v/v) při průtokové rychlosti 1,2 ml/min. Na kolonu bylo nastříknuto 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Měření absorpce ultrafialového (UV) záření bylo provedeno při vlnové délce 272 nm, retenční čas TH byl  $3,2 \pm 0,1$  min.

Vzorky obsahující IND byly analyzovány na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5  $\mu\text{m}$ , Merck) s použitím mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová v poměru 90:60:5 (v/v/v) při průtokové rychlosti 2 ml/min. Na kolonu nahřátou na 40 °C bylo nastříknuto 100  $\mu\text{l}$  vzorku. Měření UV absorpce bylo provedeno při vlnové délce 260 nm, retenční čas IND byl  $3,1 \pm 0,1$  min.

#### 4.5 Vyhodnocení dat IR spektroskopie

Infračervená spektra byla zaznamenána pomocí přístroje Nicolet 6700 spektrometr (Thermo Scientific, USA), který je vybaven MIRacle ATR ZnSe krystalem (PIKE Technologies, Madison, USA). Jednotlivé vzorky byly proměřeny při teplotách od 28 do 100 °C, kdy každé 2 °C bylo zaznamenáno IR spektrum. IR spektra jsme vyhodnotili pomocí softwaru Bruker OPUS.

#### 4.6 Vyhodnocení dat XRD

Samotné měření bylo provedeno na základě spolupráce na pracovišti Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Poslané vzorky byly měřeny pomocí práškového difraktometru X'Pert PRO  $\theta$ - $\theta$  (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko) s  $\text{CoK}\alpha$  zářením ( $\lambda = 1,7903 \text{ \AA}$ ,  $U = 35 \text{ kV}$ ,  $I = 40 \text{ mA}$ ) v upravených držácích vzorků v uhlovém rozsahu  $0,6$ – $30^\circ$  ( $2\theta$ ). Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwarového balíčku X'Pert Data Viewer (PANalytical B. V., Almelo, Nizozemsko).

#### **4.7 Statistická analýza dat**

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr  $\pm$  střední chyba průměru (SEM). Pro vyhodnocení dat byla použita analýza rozptylu (ANOVA) s Dunnettovým testem (na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,05$ ).

## 5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit vliv přítomnosti O-Cer na mikrostrukturu a permeabilitu modelových membrán. K hodnocení mikrostruktury bylo použito XRD a IR spektroskopie a pro hodnocení permeability bylo použito měření fluxů léčiv, TEWL a elektrická impedance. Sledovali jsme také vliv teploty přípravy modelových membrán na jejich vlastnosti.

Přítomnost O-Cer v membránách s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer připravených při 90 °C způsobila, až na výjimky, zlepšení bariérových vlastností těchto membrán (snížení hodnot fluxů léčiv a pokles ztrát vody přes membránu). U těchto membrán nevedlo totiž přidání O-Cer ke snížení koncentrace EO-Cer, proto byla struktura těchto membrán tvořena kromě SPP a fází separovaného Chol i LPP, pro jejíž tvorbu je zásadní dostatečné množství EO-Cer. V případě, kdy došlo k záměně veškerých EO-Cer za O-Cer, tak byla permeabilita membrán výrazně narušena. U těchto membrán byla místo LPP nalezena jiná lamelární fáze s krátkou periodicitou, což by mohlo být důvodem zhoršené permeability. U membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer připravených při 70 °C byly zaznamenány zřejmé rozdíly oproti membránám připraveným při 90 °C. Struktura těchto membrán byla tvořena pouze LPP a fází separovaného Chol. Permeabilita membrán se oproti kontrolním membránám příliš nelišila. Zásadní rozdíl byl ovšem zaznamenán u membrán, kde byly EO-Cer zcela zaměněny za O-Cer. U těchto membrán nedošlo k výraznému nárůstu permeability jako u membrán připravovaných při 90 °C, ale hodnoty se pohybovaly okolo hodnot kontrol. Tyto membrány ve své struktuře místo LPP obsahovaly MLP, která zde nejspíše funkci LPP zastoupila. Membrány připravené při 70 °C obecně vykazují nižší hodnoty fluxů léčiv a TEWL, což znamená, že zahřívání na nižší teplotu má vliv na uspořádání lipidů i na bariérové vlastnosti membrán.

Jelikož se zahřívání membrán na 70 °C projevilo jako výhodnější, tak byla tato teplota použita i při přípravě membrán s obsahem EO a O-Cer blízkým fyziologickým koncentracím. U těchto membrán byla zjištěna minimální koncentrace EO-Cer pro tvorbu LPP – a to 7,5 %. Pokud došlo k částečné či úplné záměně EO-Cer za O-Cer a obsah

EO-Cer byl nižší než 7,5 %, tak došlo (až na výjimky) opět ke zhoršení bariérových vlastností (zvýšení fluxů léčiv a větší ztráty vody přes membránu). Domníváme se, že za tímto poškozením opět stojí nepřítomnost LPP. Ovšem oproti předchozím membránám s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer zde nebyly změny tolik výrazné. Nebyl zde zaznamenán ani stejný vliv teploty přípravy na organizaci lipidů jako u membrán s nefyziologicky zvýšeným obsahem EO a O-Cer při 70 °C (kde byla nalezena pouze LPP), jelikož zde došlo i k tvorbě SPP. Na organizaci lipidů v modelových membránách má tedy kromě teploty velký vliv i celkové složení membrán.

Jedním z důvodů, které mohou vést k narušení kožní bariéry a k rozvoji různých projevů kožních onemocnění, je nedostatečná tvorba LPP z důvodu poruchy biosyntézy EO-Cer, která vede k poklesu koncentrace EO-Cer a k náhradě za jejich prekurzory. Změny ve složení lipidů představují pouze část podstaty kožních onemocnění a důvodů vedoucích ke zhoršení kožní bariéry existuje mnohem více, proto je potřeba studovat tyto onemocnění komplexně.



## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ARCI** autozomálně recesivní vrozené ichtyózy
- Cer** ceramid(y)
- CLE** korneocytální lipidová obálka
- EO-Cer** acylceramidy
- HPLC** vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- Chol** cholesterol
- CholS** cholesterol-sulfát
- IND** indometacin
- IR** infračervená spektroskopie
- LPP** dlouhá lamelární fáze
- MK** mastné kyseliny
- MLP** střední lamelární fáze
- O-Cer**  $\omega$ -hydroxylované ceramidy
- PNPLA1** patatin-like phospholipase domain containing 1
- SC** *stratum corneum*
- SEM** standardní chyba průměru
- SG** *stratum granulosum*
- SPP** krátká lamelární fáze
- TEWL** transepidermální ztráta vody
- TH** theofylin
- UV** ultrafialové záření
- XRD** rentgenová prášková difrakce

## 7. LITERATURA

1. Bocheva, G., Slominski, R. M. & Slominski, A. T. Neuroendocrine aspects of skin aging. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–19 (2019).
2. Hay, R. J., Johns, N. E., Williams, H. C., Bolliger, I. W., Dellavalle, R. P., Margolis, D. J., Marks, R., Naldi, L., Weinstock, M. A., Wulf, S. K., Michaud, C., Murray, C. J. L. & Naghavi, M. The global burden of skin disease in 2010: An analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1527–1534 (2014).
3. Feingold, K. R. & Elias, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 280–294 (2014).
4. Bragazzi, N. L., Sellami, M., Salem, I., Conic, R., Kimak, M., Pigatto, P. D. M. & Damiani, G. Fasting and its impact on skin anatomy, physiology, and physiopathology: A comprehensive review of the literature. *Nutrients* **11**, 1–15 (2019).
5. Wickett, R. R. & Visscher, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* **34**, 98–110 (2006).
6. Čihák, R. *Anatomie 3*. (Grada Publishing, a.s., 2004).
7. Kittnar, O. *Lékařská fyziologie*. (Grada Publishing, a.s., 2011).
8. Lai-Cheong, J. E. & McGrath, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Med. (United Kingdom)* **45**, 347–351 (2017).
9. Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C. & Przyborski, S. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J. Anat.* **234**, 438–455 (2019).

10. van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 295–313 (2014).
11. 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. Dermatology* **49**, 8–26 (2016).
12. Menon, G. K., Cleary, G. W. & Lane, M. E. The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **435**, 3–9 (2012).
13. Elias, P. M., Gruber, R., Crumrine, D., Menon, G., Williams, M. L., Wakefield, J. S., Holleran, W. M. & Uchida, Y. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 314–318 (2014).
14. Akiyama, M. Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *J. Dermatol. Sci.* **88**, 3–9 (2017).
15. Feingold, K. R. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* **48**, 2531–2546 (2007).
16. Bouwstra, J. A. & Ponec, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 2080–2095 (2006).
17. Feingold, K. R. The outer frontier: The importance of lipid metabolism in the skin. *J. Lipid Res.* **50**, 417–422 (2009).
18. Boiten, W., Absalah, S., Vreeken, R., Bouwstra, J. & van Smeden, J. Quantitative analysis of ceramides using a novel lipidomics approach with three dimensional response modelling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1861**, 1652–1661 (2016).
19. T'Kindt, R., Jorge, L., Dumont, E., Couturon, P., David, F., Sandra, P. & Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 403–411 (2012).

20. Breiden, B. & Sandhoff, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 441–452 (2014).
21. Vavrova, K., Kovačik, A. & Opalka, L. Ceramides in the skin barrier. *Eur. Pharm. J.* **64**, 28–35 (2017).
22. Moore, D. J. & Rawlings, A. V. The chemistry, function and (patho)physiology of stratum corneum barrier ceramides. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 366–372 (2017).
23. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. & Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1182**, 147–151 (1993).
24. Masukawa, Y., Narita, H., Sato, H., Naoe, A., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y. & Kitahara, T. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* **50**, 1708–1719 (2009).
25. Opálka, L., Kováčik, A., Maixner, J. & Vávrová, K. Omega-O-Acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base, and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir* **32**, 12894–12904 (2016).
26. Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., Nickel, W., Willecke, K., Riezman, H., Gröne, H. J. & Sandhoff, R. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 586–608 (2012).
27. Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem Jr, N., Kim, S. Y., Mandal, N. A., Reddy, G. B., Bodepudi, R., Nathan, L., Brown, J. C., Hama, H., Dlugosz, A., Elias, P. M., Walter, M. & Ayyagari, R. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ( $\geq$ C28) and the unique  $\omega$ -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 471–482 (2007).

28. Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M. & Kihara, A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7707–7712 (2015).
29. Hirabayashi, T., Anjo, T., Kaneko, A., Senoo, Y., Shibata, A., Takama, H., Yokoyama, K., Nishito, Y., Ono, T., Taya, C., Muramatsu, K., Fukami, K., Muñoz-Garcia, A., Brash, A. R., Ikeda, K., Arita, M., Akiyama, M. & Murakami, M. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* **8**, 1–13 (2017).
30. Pichery, M., Huchénq, A., Sandhoff, R., Severino-Freire, M., Zaafour, S., Opálka, L., Levade, T., Soldan, V., Bertrand-Michel, J., Lhuillier, E., Serre, G., Maruani, A., Mazereeuw-Hautier, J. & Jonca, N. PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 1787–1800 (2017).
31. Ohno, Y., Kamiyama, N., Nakamichi, S. & Kihara, A. PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid  $\omega$ -O-acylceramide. *Nat. Commun.* **8**, 1–8 (2017).
32. Kihara, A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.* **63**, 50–69 (2016).
33. Grond, S., Eichmann, T. O., Dubrac, S., Kolb, D., Schmuth, M., Fischer, J., Crumrine, D., Elias, P. M., Haemmerle, G., Zechner, R., Lass, A. & Radner, F. P. W. PNPLA1 Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-O-Acylceramides. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 394–402 (2017).

34. Takeichi, T., Hirabayashi, T., Miyasaka, Y., Kawamoto, A., Okuno, Y., Taguchi, S., Tanahashi, K., Murase, C., Takama, H., Tanaka, K., Boeglin, W. E., Calcutt, M. W., Watanabe, D., Kono, M., Muro, Y., Ishikawa, J., Ohno, T., Brash, A. R. & Akiyama, M. SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J. Clin. Invest.* **130**, 890–903 (2020).
35. Uchida, Y. & Holleran, W. M. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J. Dermatol. Sci.* **51**, 77–87 (2008).
36. Fischer, J. Autosomal recessive congenital ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1319–1321 (2009).
37. Lavrijsen, A. P. M., Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Weerheim, A., Bodde, H. E. & Ponc, M. Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 619–624 (1995).
38. Traupe, H., Fischer, J. & Oji, V. Die nichtsyndromalen Ichthyosen - aktueller Stand. *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* **12**, 109–121 (2014).
39. Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Koyano, S., Yamazaki, S. & Hatamochi, A. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2511–2514 (2010).
40. Janssens, M., Van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Kezic, S., Lavrijsen, A. P. M. & Bouwstra, J. A. Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 2136–2138 (2011).
41. Rendon, A. & Schäkel, K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–28 (2019).

42. van Smeden, J., Janssens, M., Boiten, W. A., Van Drongelen, V., Furio, L., Vreeken, R. J., Hovnanian, A. & Bouwstra, J. A. Intercellular skin barrier lipid composition and organization in netherton syndrome patients. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1238–1245 (2014).
43. de Sousa Neto, D., Gooris, G. & Bouwstra, J. Effect of the  $\omega$ -acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I). *Chem. Phys. Lipids* **164**, 184–195 (2011).
44. Mojumdar, E. H., Gooris, G. S., Barlow, D. J., Lawrence, M. J., Deme, B. & Bouwstra, J. A. Skin Lipids: Localization of Ceramide and Fatty Acid in the Unit Cell of the Long Periodicity Phase. *Biophys. J.* **108**, 2670–2679 (2015).
45. Schreiner, V., Gooris, G. S., Pfeiffer, S., Lanzendörfer, G., Wenck, H., Diembeck, W., Proksch, E. & Bouwstra, J. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 654–660 (2000).
46. Opálka, L., Kováčik, A., Pullmannová, P., Maixner, J. & Vávrová, K. Effects of omega-O-acylceramide structures and concentrations in healthy and diseased skin barrier lipid membrane models. *J. Lipid Res.* **61**, 219–228 (2020).
47. de Jager, M., Gooris, G., Ponec, M. & Bouwstra, J. Acylceramide head group architecture affects lipid organization in synthetic ceramide mixtures. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 911–916 (2004).
48. Netzlaff, F., Kostka, K. H., Lehr, C. M. & Schaefer, U. F. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**, 44–50 (2006).
49. Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P. & Bouwstra, J. A. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* **53**, 2755–2766 (2012).

50. Damien, F. & Boncheva, M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 611–614 (2010).
51. Opálka, L., Kováčik, A., Sochorová, M., Roh, J., Kuneš, J., Lenčo, J. & Vávrová, K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Org. Lett.* **17**, 5456–5459 (2015).
52. Groen, D., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. Model membranes prepared with ceramide EOS, cholesterol and free fatty acids form a unique lamellar phase. *Langmuir* **26**, 4168–4175 (2010).