

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**VLIV GLUKOSYLSFINGOSINU NA BARIÉROVOU FUNKCI
KŮŽE A KOMPLEXNÍHO LIPIDOVÉHO MODELU KŮŽE**

Diplomová práce

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

Konzultant: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Oksana Yanok

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové 2019

Oksana Yanok

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří především mému školiteli PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Dále za ochotu a pomoc děkuji PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D., Dr. Georgiosovi Paraskevopoulosovi, Ph.D. a celé pracovní skupině *Skin Barrier Research Group*. Dále bych ráda poděkovala grantovým agenturám (GAČR 19-09135J) a Univerzitě Karlově (SVV 260401).

ABTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Kandidát: Oksana Yanok

Školitel: PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv glukosylsfingosinu na bariérovou funkci kůže a komplexního lipidového modelu kůže.

Vlastní kožní bariéra, která zajišťuje ochranu před ztrátou vody a škodlivými vlivy vnějšího prostředí, je lokalizována ve *stratum corneum*. Dominantní skupinou lipidů *stratum corneum* jsou ceramidy (Cer), které zároveň hrají hlavní roli v zajištění bariérových vlastností kůže. Enzymy sfingomyelin-deacyláza a glukosylceramid-deacyláza hydrolyzují amidovou vazbu prekurzorů Cer za vzniku vysoce polárních metabolitů, tzv. lysolipidů. Zvýšená aktivita těchto enzymů je považována za jeden z hlavních faktorů, které vedou ke vzniku řady kožních onemocnění charakterizovaných poruchou kožní bariéry (např. atopická dermatitida). V této práci jsme připravili modelové membrány napodobující zdravou kožní bariéru v ekvimolárním složení (lidské Cer, cholesterol, volné mastné kyseliny) s přidavkem 5 hmotnostních % cholesterol sulfátu. Dále jsme připravili modely, u kterých bylo postupně snižováno množství Cer a nahrazováno hydrofilním lysolipidem glukosylsfingosinem. Permeabilita našich modelů byla hodnocena pomocí čtyř parametrů, tj. ztráty vody, elektrické impedance a měření propustnosti pro dva (fyzikálně-chemicky odlišné) modelové permeanty. S cílem stanovení mikrostruktury membrán byla provedena rentgenová difrakce. Výsledky ukázaly, že úbytek Cer a/nebo přítomnost glukosylsfingosinu má za následek zvýšení ztráty vody membránou a zvýšení propustnosti membrán pro modelové permeanty. U membrán, které neobsahovaly Cer, nebyla nalezena fáze s dlouhou periodicitou, zodpovědná za správné bariérové vlastnosti kůže. Naše výsledky potvrzují nepříznivý vliv glukosylsfingosinu na bariérovou funkci modelů *stratum corneum*.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of pharmaceutical technology

Candidate: Oksana Yanok

Supervisor: Pharm.Dr. Andrej Kováčik, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: The effects of glucosyl sphingosine on barrier function of skin and complex skin model.

The skin barrier, which provides protection from water loss and harmful environmental influences is located in the *stratum corneum*. The dominant group of lipids within the *stratum corneum* are ceramides (Cer), which also have the most important role in ensuring the barrier properties of the skin. The enzymes sphingomyelin deacylase and glucosylceramide deacylase hydrolyze the amide bond of Cer precursors, which leads to highly polar metabolites, called lysolipids. The increased activity of these enzymes is considered to be one of the major factors leading to the development of a number of skin diseases characterized by a skin barrier disorder (for example atopic dermatitis). In this study we prepared model membranes mimicking a healthy skin barrier as an equimolar mixtures of human Cer, cholesterol, free fatty acids with the addition of 5 % cholesterol sulfate. We also prepared models in which the amount of Cer was gradually reduced and replaced by the hydrophilic lysolipid glucosylsphingosine. The permeability was measured for two (physically-chemically different) model permeants, and X-ray diffraction was performed to determine membrane microstructure. The results showed that the loss of Cer and/or the presence of glucosylsphingosine results in an increase in membrane water loss and increase in membrane permeability for model permeants. A long periodic lamellar phase, which is most important in the barrier function, was not found in membranes that did not contain Cer,. Our results confirm the adverse effect of glucosylsphingosine on the barrier function of *stratum corneum* models.

Obsah

1.	Úvod a cíl práce	8
2.	Teoretická část	9
2.1.	Kůže.....	9
2.1.1.	Funkce a stavba kůže	9
2.1.2.	Stratum corneum (SC).....	10
2.1.3.	Lamelární tělíska (LT)	11
2.2.	Chemické složení lipidů ve zdravé lidské kůži	11
2.2.1.	Ceramidy	12
2.2.1.1	Sfingoidní báze	12
2.2.1.2	Acyl mastné kyseliny	13
2.2.1.3	Prekurzory ceramidů	14
2.2.1.3.1	Sfingomyeliny (SM).....	14
2.2.1.3.2	Glukosylceramidy (GC).....	14
2.2.1.4	Syntéza ceramidů	14
2.2.1.4.1	Syntéza ceramidů de novo	15
2.2.1.4.2	Degradace prekurzorů ceramidů pomocí Gcázy a Smázy	15
2.2.1.5	Lysolipidy.....	16
2.2.2.	Cholesterol.....	16
2.2.3.	Cholesterol sulfát	16
2.2.4.	Volné mastné kyseliny	16
2.3.	Organizace lipidů ve <i>stratum corneum</i>	17
2.3.1.	Lamelární uspořádání.....	17
2.3.2.	Laterální uspořádání.....	17
2.4.	Porucha kožní bariéry – atopická dermatitida	18
2.5.	Metody hodnocení kožní bariéry	19
2.5.1.	Modely kožní bariéry	19
2.5.1.1	Hodnocení propustnosti modelových membrán.....	20
2.5.1.2	Mikrostruktura membrán.....	21
2.5.1.2.1	Rentgenová prášková difrakce	21
2.5.1.2.2	Infračervená spektroskopie	22
3.	Experimentální část	23
3.1.	Chemikálie	23
3.2.	Kůže.....	23
3.3.	Izolace lipidů stratum corneum	23

3.4.	Příprava modelových lipidových membrán	24
3.4.1.	Příprava směsi mastných kyselin	24
3.4.2.	Příprava lipidových směsí	24
3.4.3.	Příprava lipidových membrán.....	25
3.5.	Permeační pokusy.....	26
3.5.1.	Franzovy difuzní cely.....	26
3.5.2.	Donorové vzorky	26
3.5.3.	Měření ztráty vody membránami.....	26
3.5.4.	Měření elektrické impedance.....	26
3.5.5.	Permeace	27
3.5.6.	Podmínky HPLC analýzy.....	27
3.5.7.	Statistické zpracování dat.....	28
3.6.	Rentgenová prášková difrakce	28
4.	Výsledky a diskuze.....	29
4.1	Hodnocení permeačních pokusů.....	29
4.1.1	Ztráta vody membránou	29
4.1.2	Elektrická impedance.....	30
4.1.3	Permeabilita modelových membrán pro TH a IND	31
4.2	Hodnocení mikrostruktury modelových membrán.....	33
5.	Závěr.....	36
6.	Literatura	37
7.	Seznam obrázků	44

1. Úvod a cíl práce

Horní vrstva epidermis, *stratum corneum*, je složena z kožních buněk keratinocytů a lipidové matrix. Lipidová matrix představuje přibližně ekvimolární směs ceramidů, cholesterolu a vyšších mastných kyselin [1, 2, 3]. Hlavní rolí v zajištění bariérových funkcí kůže hrají ceramidy, které jsou buď syntetizovány *de novo* pomocí enzymu ceramid-syntáza, nebo jsou uvolňovány z jejich prekurzorů, tj. sfingomyelinů a glukosylceramidů působením enzymů sfingomyelináza a β -glukocerebrosidáza [4]. U pacientů s porušenou kožní bariérou byla popsána zvýšená činnost enzymů (sfingomyelin/glukosylceramid deacyláza), které rozkládají sfingomyelin a glukosylceramid na příslušné polární lysolipidické metabolity – sfingosinfosforylcholin a glukosylsfingosin [5, 6].

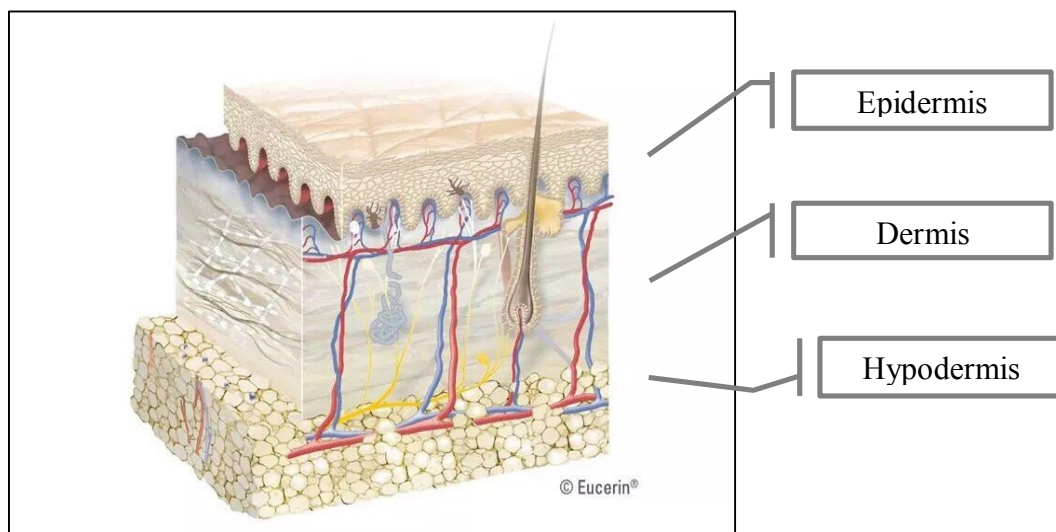
Cílem této práce bylo zjistit vliv lysolipidu glukosylsfingosinu na bariérovou funkci kůže pomocí hodnocení propustnosti a mikrostruktury modelových membrán, u kterých bylo 5 až 100 % ceramidů nahrazeno polárním glukosylsfingosinem. Vliv tohoto lysolipidu na permeabilitu modelových membrán jsme stanovovali pomocí permeačních parametrů – ztráta vody, elektrická impedance a propustnost membrán pro různé modelové permeanty. Mikrostruktura modelových membrán byla hodnocena pomocí rentgenové difrakce.

2. Teoretická část

2.1. Kůže

2.1.1. Funkce a stavba kůže

Kůže je největší, neustále se obnovující lidský orgán, jehož primární funkcí je ochrana organismu proti vlivům vnějšího prostředí a tvorba účinné bariéry proti ztrátám vody a elektrolytů [7-9]. Kůže je složena ze tří vrstev: *hypodermis*, *dermis* a *epidermis* (obrázek 1)[10, 11].



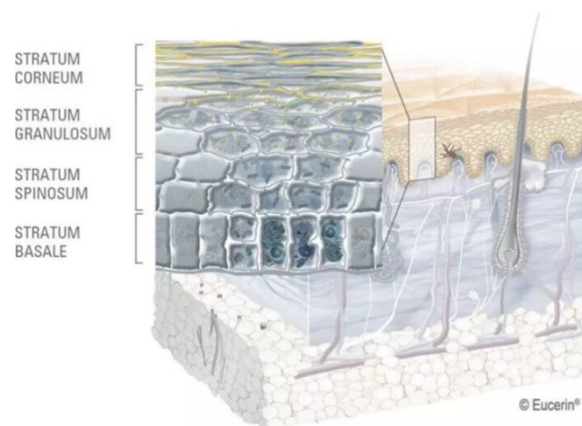
Obr. 1 Struktura kůže

Nejhlubší vrstva kůže – *hypodermis*; tato vrstva je umístěna pod škárkou – *dermis*, která přechází v horní vrstvu – *epidermis* [12].

Hypodermis (subcutis) je nejhlubší vrstva kůže, složená hlavně z adipocytů. Hypodermis je umístěna pod škárkou (*dermis*), což je vysoce vaskularizovaná vazivová vrstva s tloušťkou 0,6 až 3 mm, složená z kolagenu a elastických vláken. Obsahuje řadu buněk, včetně fibroblastů, které zajišťují tvorbu extracelulární matrix (kolagen, elastin, glykosaminoglykany) a makrofágů, zodpovědných za imunitní ochranu [7- 11, 13].

Horní vrstva kůže, *epidermis*, má tloušťku 0,05 až 1,5 mm, a až z 95 % se skládá z keratinocytů, zbylých 5 % tvoří další buňky (hlavně melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky). Epidermis je rozdělena do 5 vrstev, které odrážejí fáze diferenciaci keratinocytů (obrázek 2). Nejhlubší vrstva epidermis – *stratum basale* – představuje jednu vrstvu cylindrických keratinocytů s vysokým mitotickou aktivitou, které jsou

zodpovědné za kontinuální obnovování epidermis. Dále ve směru k povrchu následuje *stratum spinosum* – několik řad velkých polygonálních buněk, tady poprvé se objevují lamelární tělíska (LT), a *stratum granulosum* – tvoří 2 nebo 3 vrstvy zploštěných epiteliálních buněk. Čtvrtá vrstva epidermis – světlá vrstva (*stratum lucidum*) je přítomná pouze na dlaních a chodidlech. Nejvrchnější vrstva epidermis je vrstva odumřelých buněk, *stratum corneum* (SC) [1, 8-11, 13].

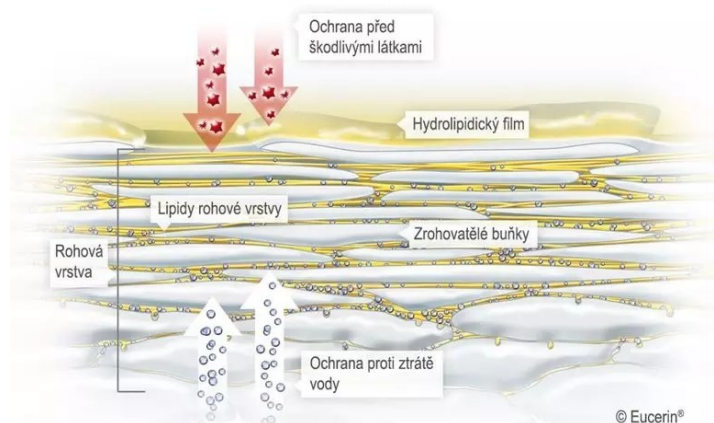


Obr. 2 Struktura epidermis

Nejhlubší vrstva – *stratum basale*, dále následuje *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a horní vrstva – *stratum corneum* [12].

2.1.2. Stratum corneum (SC)

Vlastní kožní bariéra je lokalizovaná ve SC, která má tloušťku 10-50 μm a vyznačuje se nízkým obsahem vody (5-20 %). SC se skládá z 18 až 21 vrstev korneocytů a lipidové matrix (obrázek 3). Korneocyty představují terminální stadium diference keratinocytů. Jde o ploché, metabolicky neaktivní, bezjaderné buňky vyplněné keratinem, ponořené do extracelulární lipidové matrix, což je přibližně ekvimolární (1:1:1) směs ceramidů (Cer), cholesterolu (Chol) a vyšších/volných mastných kyselin (VMK) pocházející z LT [1-3, 10].



Obr. 3 Rohová vrstva epidermis

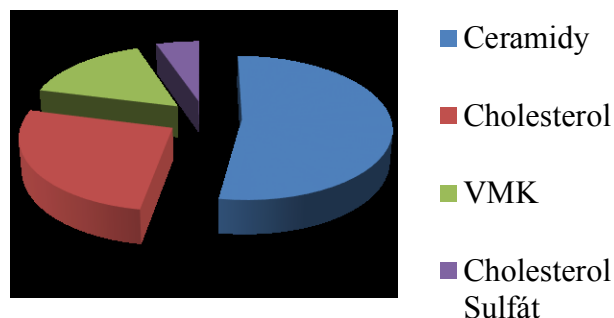
Stratum corneum – 18 až 21 vrstev bezjaderných buněk (keratinocytů), v lipidové matrix. Základní funkce SC, ochrana organismu před ztrátou vody a bariéra před nežádoucími (škodlivými) látkami [12].

2.1.3. Lamelární tělíska (LT)

Hlavní úlohu ve formování kožní bariéry SC hrají LT – malé sekreční orgány velikosti 0,1-0,5 μm ohraničené membránou, typické pouze pro savčí epidermis. První LT se objevují ve *stratum spinosum*, ve *stratum granulosum* se jejich počet významně zvyšuje. LT obsahují cholesterol, fosfolipidy, prekurzory Cer (glukosylceramidy (GC) a sfingomyeliny (SM)), stejně jako i hydrolytické enzymy pro jejich zpracování (β -glukocerebrosidáza (β -GCáza), sfingomyelináza (SMáza), fosfolipáza A2) [14-17].

2.2. Chemické složení lipidů ve zdravé lidské kůži

V hlubokých vrstvách epidermis, které jsou reprezentované živými buňkami, fosfolipidy tvoří dominantní skupinu lipidů. Během procesu keratinizace postupně dochází ke snížení jejich obsahu směrem k povrchu. Už ve SC jsou fosfolipidy nahrazeny přibližně ekvimolární směsí Cer (45-50%), Chol (25%) a VMK (10-15%). 5 % kožních lipidů SC tvoří další látky, z nichž jedna z nejdůležitějších je cholesterol sulfát (CholS) (obrázek 4) [3, 14, 18, 19].

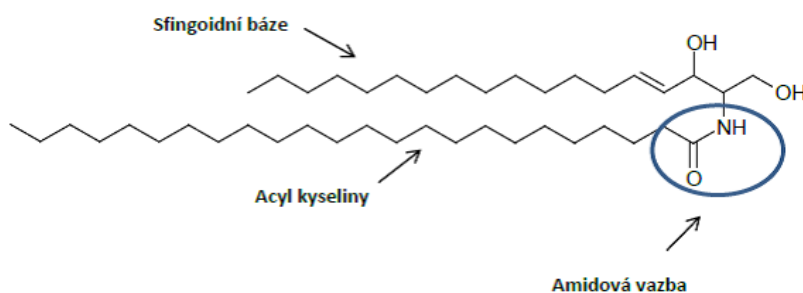


Obr. 4 Schematické znázornění složení lipidové matrix SC, 45–50 % lipidové matrix je tvořeno Cer, 25 % tvoří Chol, 10–15 % VMK, kolem 5 % tvoří další lipidy, hlavně CholS.

2.2.1. Ceramidy

Cer nebo *N*-acylsfingosiny, nejdůležitější skupina epidermálních lipidů, hrají klíčovou roli v zajištění kožní bariéry – zabezpečují hospodaření organismu s vodou. Změny ve složení Cer nebo jejich snížená hladina v pokožce mohou být příčinou poruch bariérových funkcí a řady onemocnění [17, 20].

Cer se tvoří biochemickou reakcí aminoskupiny sfingosinu s acyl-koenzymem A (AcylCoA) za vzniku amidové vazby v molekule Cer [17]. Molekula Cer je tvořena malou polární hlavou (na rozdíl od fosfolipidů) a dvěma lipofilními řetězci. První pochází z tzv. sfingoidní báze a druhý řetězec je acylem dlouhé mastné kyseliny (obrázek 5) [21].



Obrázek 5 Struktura ceramidů.

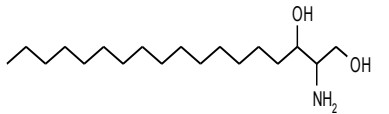
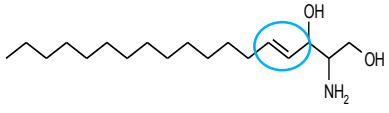
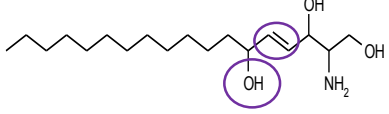
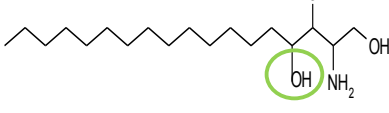
2.2.1.1 Sfingoidní báze

Sfingosiny (sfingoidní báze) patří do skupiny vyšších aminoalkoholů (nejčastěji C18), jejichž základem struktury je 1,3-dihydroxy-2-amino-4-*trans*-oktadecen (C18-

sfingosin; S). Sfingosin je syntetizován v endoplazmatickém retikulu z palmitoyl-CoA a aminokyseliny L-serinu. Mezi sfingosinové báze také patří 6-hydroxysfingosiny (s hydroxylovou skupinou v poloze 6; H), nasycené deriváty sfingosinu, tj. dihydrosfingosiny (sfinganiny; DS) a fytosfingosiny (s hydroxylovou skupinou v poloze 4; P) (tabulka 1) [17, 22, 23].

2.2.1.2 Acyl mastné kyseliny

Acylová část molekuly Cer je typická dlouhou nerozvětvenou karboxylovou kyselinou (nejčastěji palmitová C16, stearová C18, behenová C22, lignocerová C24), která může být nesubstituovaná (N) nebo substituovaná hydroxylovou skupinou v poloze α - (A) či ω - (O). Poslední typ může být dále modifikován, hydroxylová skupina v poloze omega může být esterifikovaná kyselinou linolovou nebo linolenovou (EO). Základní typy Cer vznikají kombinací sfingoidních bází a acylů (tabulka 1) [4, 21-23].

Acyl Sfingoidní báze	N	A	O	EO
 Dihydrosfingosin (DS)	Cer NDS	Cer ADS	Cer ODS	Cer EODS
 Sfingosin (S)	Cer NS	Cer AS	Cer OS	Cer EOS
 6-hydroxysfingosin (H)	Cer NH	Cer AH	Cer OH	Cer EOH
 Fytosfingosin (P)	Cer NP	Cer AP	Cer OP	Cer EOP

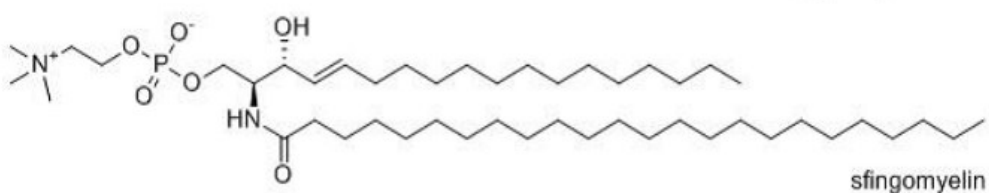
Tabulka 1 Nomenklatura ceramidů podle Motty. Cer jsou označeny kombinací písmen sfingoidních bází (DS, S, H nebo P) a acylů karboxylových kyselin (N – nehydroxylovaný acyl, A – hydroxylovaný

v poloze α -, O – hydroxylovaný v poloze ω -, EO – hydroxylovaná skupina v poloze ω - je esterifikovaná kyselinou linolovou nebo linolenovou) [24, 25].

2.2.1.3 Prekurzory Cer

2.2.1.3.1 Sfingomyeliny (SM)

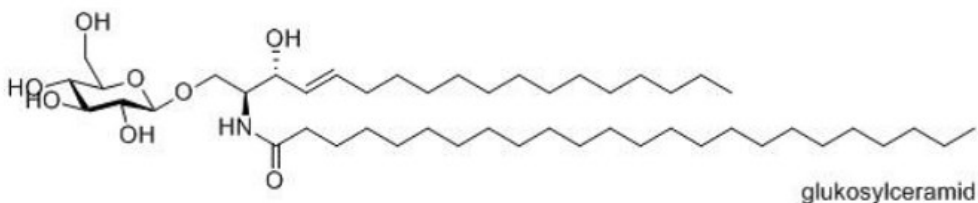
Jedná se o sfingolipidy obsahující ve své struktuře Cer, cholin a zbytek kyseliny fosforečné (obrázek 6). Jsou degradovány pomocí SMázy, lyzozomálního enzymu, který odštěpuje fosforylcholin za uvolnění molekuly Cer [17, 20].



Obrázek 6 Strukturální vzorec SM.

2.2.1.3.2 Glukosylceramidy (GC)

Tato skupina sfingolipidů se liší od SM tím, že neobsahuje fosfát, ale monosacharid nebo oligosacharid vázaný na primární hydroxylovou skupinu Cer pomocí *O*-glykosidové vazby (obrázek 7) [17, 20]. Enzym (β -GCáza), nezbytný pro odštěpení sacharidové jednotky a uvolnění Cer, je uložen v lyzozomech [17, 20].



Obrázek 7 Strukturální vzorec GC.

2.2.1.4 Syntéza Cer

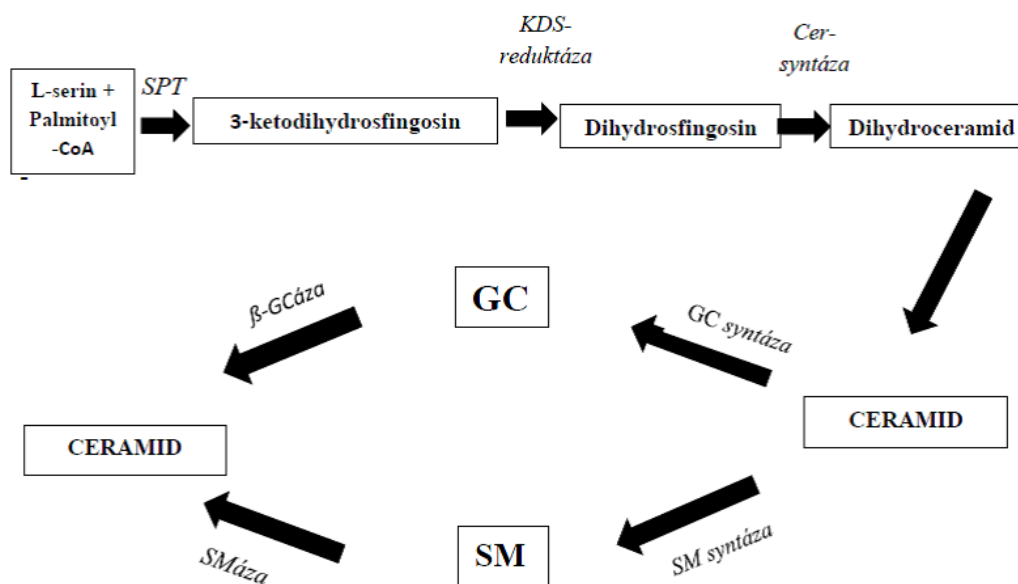
Existují dvě hlavní cesty vzniku Cer (obrázek 8), a to syntéza *de novo* a syntéza Cer z jejich přirozených prekurzorů (zásoba pro syntézu v čase potřeby) [4].

2.2.1.4.1 Syntéza Cer *de novo*

Proces syntézy Cer začíná v endoplasmatickém retikulu a je katalyzován serin-palmitoyltransferázou (SPT) a ceramid-syntázou (Cer-syntáza). SPT katalyzuje kondenzaci L-serinu a mastné kyseliny za vzniku 3-ketodihydrosfingosinu (3-KDS). Dalším krokem je redukce 3-KDS, katalyzované enzymem KDS-reduktázou. Produkt této reakce, dihydrosfingosin, je následně acylován Cer-syntázou za vzniku dihydroceramidu, který může být dále hydroxylován na fytoceramid (Cer na bázi fytosfingosinu), nebo desaturován na sfingosinový Cer [4, 21, 24, 26, 27].

2.2.1.4.2 Degradace prekurzorů Cer pomocí Gcázy a Smázy

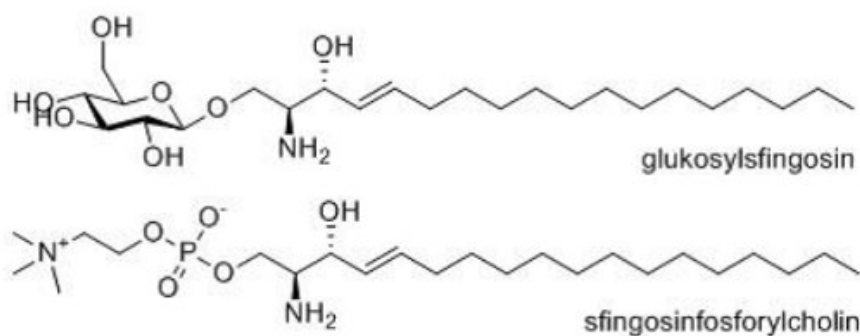
Nově syntetizované Cer jsou transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou chemicky upravovány za vzniku GC nebo SM. GC a SM představují depotní formy Cer, a spolu s hydrolytickými enzymy jsou skladovány v LT keratinocytů. Jakmile keratinocyty dosahují v jejich vývoji hranice mezi SG a SC, dochází ke splynutí LT s plazmatickou membránou a uvolnění obsahu LT do mezibuněčného prostoru SC. β -Gcáza a Smáza hydrolyzují GC a SM za uvolnění molekul Cer [4, 21, 24, 26, 27].



Obr. 8 Schematické znázornění biosyntézy Cer, SPT = serin-palmitoyltransferáza. β Gcáza = β -glukocerebrosidáza. Smáza = sfingomyelináza. GC = glukosylceramid. SM = sfingomyelin.

2.2.1.5 Lysolipidy

Účinkem hydrolytických enzymů SMázy a GCázy jsou prekurzory Cer (SM a GC) štěpeny na Cer a fosforylcholin (rozklad SM) nebo Cer a glukózy (štěpení GC). Ve SC u pacientů s atopickou dermatidou byla prokázána snížená aktivita SMázy a GCázy a zvýšena exprese SM/GC deacylázy, které hydrolyzují amidovou vazbu mezi acylovou částí a sfingoidní bází sfingolipidů (GC/SM) za vzniku lysolipidů. Hydrolyzou amidové vazby SM působením SM deacylázy dochází ke vzniku jeho lysoformy - sfingosinfosforylcholinu (SPC; obrázek 9) a volné mastné kyseliny. GC je štěpen GC deacylázou za uvolnění glukosylsfingosinu (GS; obrázek 9) a opět je uvolněna mastná kyselina [5, 6].



Obrázek 9 Strukturní vzorce lysolipidů.

2.2.2. Cholesterol

Chol je jedním ze tří nejdůležitějších lipidů SC, kde tvoří až 25 % hmotnosti lipidové matrix. Jeho hlavní funkcí je pravděpodobně organizace lipidů do lamelárních struktur, kromě toho se Chol podílí na zajištění částečné fluidity (kapalnosti), bez čehož by byla membrána křehká a nesoudržná [27-29].

2.2.3. Cholesterol sulfát

CholS tvoří přibližně 5 % hmotnosti lipidů v SC a tento je pravděpodobně nezbytný při deskvamaci (odlupování) svrchních částí SC [16, 30].

2.2.4. Volné mastné kyseliny

Součástí kožní bariéry jsou nasycené nerozvětvené VMK s délkou řetězce 16 až

30 uhlíků, přitom převažují řetězce o délce 18, 24, 26 a 28 uhlíků. Ze tří nejdůležitějších skupin lipidů SC pouze MK mají schopnost ionizace, a proto jsou nezbytné pro tvorbu lamelárního uspořádání [8, 29, 30].

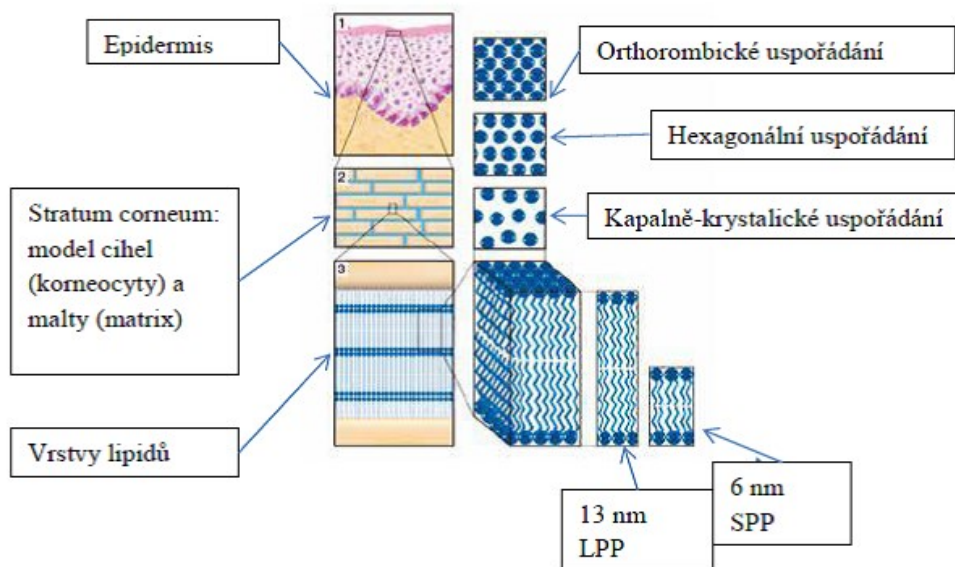
2.3. Organizace lipidů ve *stratum corneum*

2.3.1. Lamelární uspořádání

Lipidy extracelulární matrix SC jsou organizovány do lamel, což jsou pravidelně se opakující dvojvrstvy lipidů (Cer, VMK, Chol/CholS) (obrázek 6). Z výsledků studia uspořádání lipidů ve zdravé epidermis pomocí rentgenové difrakce byly identifikovány 2 typy lamelárního uspořádání bariérových lipidů. Vedle fáze s tzv. krátkou periodicitou, s mezivinnou vzdáleností přibližně 6 nm (angl. *short periodicity phase*, SPP), byla identifikována fáze s dlouhou periodicitou, s délkou lamel přibližně 13 nm (angl. *long periodicity phase* LPP). Přítomnost LPP je nezbytná pro zajištění správné bariérové funkce kůže. [23, 31]. Pokles tvorby LPP souvisí s mnoha kožními onemocněními, jako je např. atopický ekzém apod. Vedle LPP a SPP se ve zdravém SC vyskytuje i fáze separovaného Chol. Doposud však není známá příčina této fyziologické separace.

2.3.2. Laterální uspořádání

Lipidy uvnitř lamel mohou mít fluidní (kapalné nebo kapalně-krystalické, neuspořádané), hexagonální (šesterečná mřížka) nebo orthorhombické (čtvercová/obdélníková mřížka) laterální uspořádání (obrázek 10). Orthorhombická fáze se vyznačuje velmi těsnou organizací lipidových řetězců do obdélníkové krystalické mřížky (řetězce, zejména methylenové skupiny dlouhých řetězců jsou v tzv. *all-trans* konformaci), kde je vyloučena možnost rotačních pohybů řetězců lipidů [30, 32, 33]. Právě orthorhombická organizace lipidů je nejdůležitější pro zajištění bariérových funkcí kůže [21, 34]. V hexagonálním uspořádání vytvářejí lipidy šestiúhelníkovou mřížku (nárůst méně uspořádaných *gauche* na úkor *all-trans* konformerů) a mají částečnou rotační schopnost [21, 30, 32, 33]. Kapalně-krystalická (fluidní) fáze se vyznačuje vysokou rotační mobilitou řetězců. Lipidové řetězce jsou zde převážně ve formě volné *gauche* konformaci [21, 30, 32, 33]. V hlubokých oblastech SC dominuje orthorhombické uspořádání lipidů, zatímco v horních vrstvách převládá hexagonální a kapalný typ [34-37].

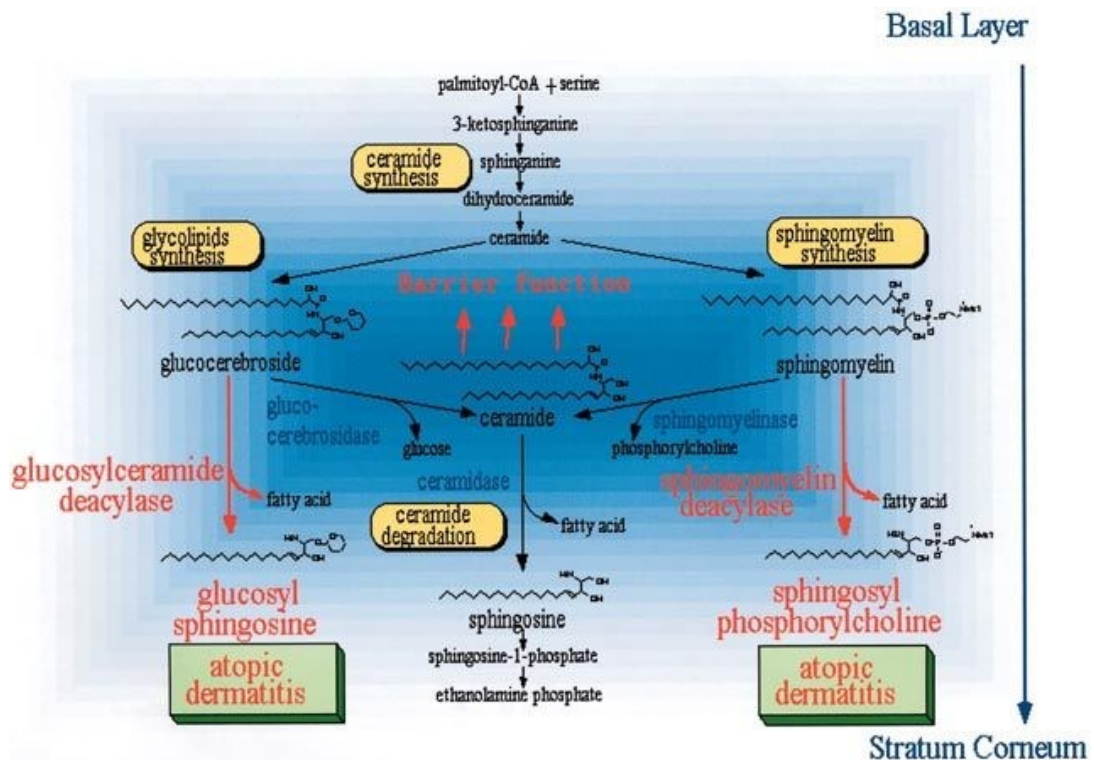


Obrázek 10 Principy organizace lipidů ve SC [38].

2.4. Porucha kožní bariéry – atopická dermatitida

Atopická dermatitida (AD) je chronické recidivující zánětlivé onemocnění, které výrazně snižuje kvalitu života pacienta. Dosud byla AD klasifikována jako klasické alergické onemocnění, nedávno se však zjistilo, že se jedná o poruchu kožní bariéry [39].

Výskyt nemoci v lidské populaci neustále roste. V dnešní době je AD nejčastějším chronickým kožním onemocněním hlavně dětí – postihuje 10-20 % dětí na celém světě, zatímco prevalence u dospělé populace je 1-3 %. Projevy AD se nejčastěji objevují do 6 let věku s tím, že u 5-10 % postižených dětí je největší riziko incidence mezi 3. a 24. měsícem [39-44]. Jde o multifaktoriální onemocnění. Za primární faktor se považuje porucha kožní bariéry, zejména pozměněný profil spektra Cer ve SC, mutace genů pro filaggrin a zvýšená hladina kožních proteáz [39, 41]. Bylo prokázáno, že u pacientů s AD je celkový obsah lipidů v kůži snížený. Hlavním etiologickým faktorem pro vznik AD je nedostatek Cer (zejména ultradlouhých Cer s esterifikovanou hydroxylovou skupinou v poloze omega, tzv. acylCer) v SC, což je následkem změny aktivity enzymů nezbytných pro jejich syntézu, nebo odbourávání. Tak u pacientů s AD dochází ke snížení aktivity SMázy a β -GCázy a ke zvýšení aktivity GCer/SM deacylázy a ceramidázy (obrázek 11) [5, 14, 30, 45, 46].



Obrázek 11 Změněná aktivita enzymů nezbytných pro syntézu, nebo odbourávání Cer u pacientů s AD, zejména snížení aktivity SMázy a β -GCázy a ke zvýšení aktivity Gcer/SM deacylázy a ceramidázy [5].

Kůže atopiků se navíc vyznačuje nedostatkem defenzinů, peptidů přirozeně se vyskytujících v kůži, které působí proti bakteriím, virům a houbám, což vysvětluje větší náchylnost pacientů k virovým, bakteriálním nebo houbovým infekcím [39, 41]. Jednou z možností léčby AD je, kromě topického podávání kortikoidů, topická aplikace tělu vlastních látek (Cer) nebo látek, které jsou fyziologickým Cer strukturálně blízké (tzv. pseudoceramidy). Podávání (pseudo)Cer je slibnou možností léčby těchto pacientů a také omezení nežádoucích účinků antibiotik nebo kortikosteroidů [47].

2.5. Metody hodnocení kožní bariéry

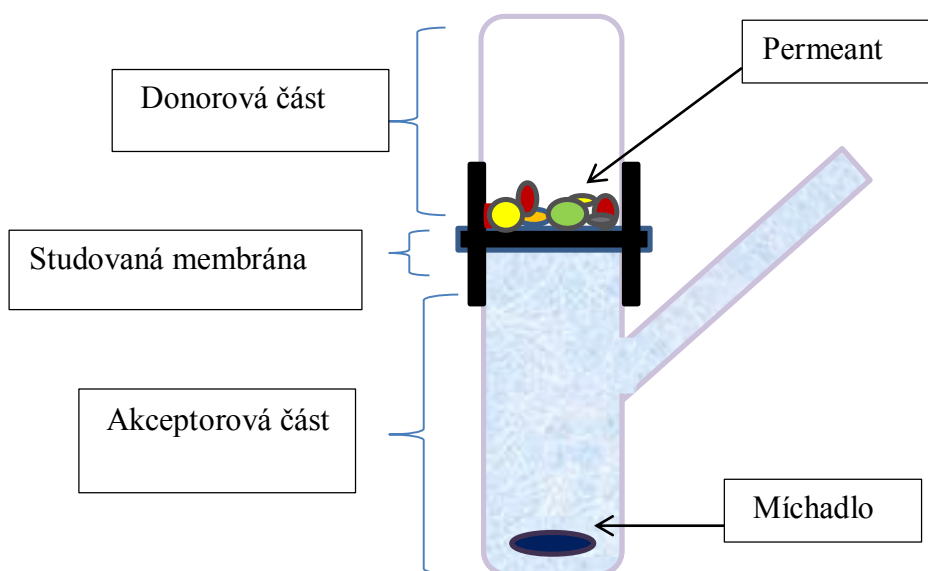
2.5.1. Modely kožní bariéry

Jednou z možností hodnocení bariérových vlastností kůže je studium modelových kožních membrán. Modely kožní bariéry jsou v pracovní skupině *Skin Barrier Research Group* připravovány a hodnoceny pomocí validovaného postupu. Modely si lze představit jako tenké (cca 11 μm) filmy o přibližné ploše 0,8 cm^2 . Tyto jsou připravovány postupným nastříkáním organických roztoků kožních lipidů pod proudem dusíku, jejich sušením, zahříváním a postupným chlazením na laboratorní

teplotu. Připravené modelové membrány jsou hodnoceny v permeačních a biofyzikálních experimentech.

2.5.1.1 .Hodnocení propustnosti modelových membrán

Pro testování permeability (propustnosti) membrán se nejčastěji používají Franzovy difuzní cely (obrázek 12). Jsou to nádoby z inertních materiálů (nejčastěji sklo), tvořeny horní (donorovou) a spodní (akceptorovou, s ramínkem) částí, ve které je magnetické míchadlo. Mezi donorovou a akceptorovou částí je zpravidla (teflonový) držák, ve kterém je umístěna modelová membrána, lipidem k donorové části. Na modelovou membránu se aplikuje permeant (modelová látka charakterizující propustnost studované membrány). Permeant postupně prostupuje v čase do spodní, akceptorové části, vyplněné kapalinou (nejčastěji pufrem o fyziologickém pH), která se v pravidelných intervalech ramínkem odebírá a poté je analyzováno množství permeantu, nejčastěji pomocí kapalinové chromatografie (HPLC) [21, 27, 48]. Franzovy cely jsou využívány nejen na hodnocení modelových membrán, ale také např. ve studiu akceleračních transdermální permeace léčiv [49].



Obr. 12 Schematické znázornění Franzovy difuzní cely.

Jednou z nejdůležitějších parametrů propustnosti modelů kožní bariéry je ztráta vody. Tato dermatologická charakteristika, odvozena od trans-epidermální ztráty vody

(angl. *transepidermal water loss*; TEWL) charakterizuje množství vody prošlé membránou za jednotku času přes jednotku plochy. Čím nižší je naměřená hodnota, tím lepší je bariérová funkce dané membrány a nižší je její propustnost pro molekuly vody [50].

Na základě měření elektrické impedance, což je měrný odpor membrány střídavému proudu vztažený na jednotku plochy [$k\Omega \times cm^2$], lze stanovit propustnost modelové membrány pro ionty. Podstatou měření elektrické impedance je tvorba paralelního obvodu, kterým by procházel střídavý proud. Propustnost pro ionty je nepřímo úměrná velikosti odporu, působícímu proti proudu [45, 51, 52]. Platí, že čím je hodnota elektrické impedance vyšší, tím je daná membrána lepší bariérou proti prostupu iontů a hodně polárních látek; je tedy nepřímo úměrná ztrátě vody.

2.5.1.2 Mikrostruktura membrán

Pro lepší vysvětlení permeability modelových membrán, jsou tyto modely dále hodnoceny pomocí nejrůznějších biofyzikálních experimentů. Cílem těchto metod je pokus o zobrazení struktury membrány, přiblížení např. lamelárního a laterálního uspořádání lipidů. K těmto metodám patří např. rentgenová difrakce a infračervená spektroskopie aj.

2.5.1.2.1 Rentgenová prášková difrakce

Po dopadu paprsku rentgenového záření na studovanou membránu pod určitým úhlem θ dochází k difrakci (ohybu) záření a jeho rozptylu v různých směrech. Difrakce je zaznamenána pouze pro paprsky zesílené interferencí, které splňují tzv. Braggovu podmínku, tj. $n\lambda = 2d \sin \theta$, kde n je řád difrakce (malé přirozené číslo), λ – vlnová délka záření, θ – úhel dopadu a d – mezirovinná vzdálenost [53].

Pokud máme systém identických (pravidelně se opakujících) strukturních rovin obsazených atomy v bodech se stejnou mezirovinnou vzdáleností, dráhový rozdíl paprsků rozptýlených na jednotlivých rovinách odpovídá vlnové délce použitého záření nebo jejímu celočíselnému násobku. Při splnění těchto podmínek dochází k zesílení amplitudy a intenzity vln, nastává konstruktivní interference difraktovaného svazku rentgenového záření [53]. Z výpočtu (Braggova zákona) lze zjistit délku lamelární fáze (mezirovinnou vzdálenost) v modelové membráně [54]. Výsledkem měření je graf se

zaznamenanou polohou elektronů ve stupních 2θ na ose x, a intenzitou difraktovaného záření na ose y [54, 55].

2.5.1.2.2 Infračervená spektroskopie

Stanovit (zejména laterální) uspořádání lipidů v SC umožňuje také infračervená (IČ) spektroskopie. Po absorpci elektromagnetického záření z IČ oblasti spektra nedochází k excitaci elektronů (ve srovnání s UV zářením, IČ záření má nižší energii), ale dochází buď ke změnám délky vazeb mezi atomy (valenční vibrace), nebo se mění valenční úhly (vibrace deformační). Polohy vibračních pásů jsou se udávány ve vlnočtech [cm^{-1}], což je převrácená hodnota vlnové délky. Pomocí jednotlivých vibrací lze získat informace o mikrostruktuře lipidů v SC, např. konformace řetězců, fázové přechody, mísitelnost lipidů, laterální krystalická mřížka apod. Výstupem měření je závislost absorbance na vlnočtu – IČ spektrum [56, 57].

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Glukosylsfiningosin (GS) byl zakoupen u firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Cholesterol, cholesterol sulfát, kyselina palmitová, kyselina lignocerová, kyselina stearová, kyselina behenová, kyselina arachidová, indometacin (IND), theofylin (TH), gentamicin, propylenglykol a rozpouštědla byly objednány z firmy Merc (Schnelldorf, Německo). Použitá rozpouštědla byla HPLC kvality nebo analytická.

3.2. Kůže

Byla použita lidská břišní nebo prsní kůže získaná od pacientek po plastických operacích prvního privátního chirurgického centru Sanus po schválení Etickou komisí. Části kůže byly promyty ve fyziologickém 10 mM fosfátovém pufru (8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,4) s přídavkem gentamicin sulfátu (50 mg/l). Kůže byly osušeny buničinou a poté skladovány v mrazáku při teplotě -20°C .

3.3. Izolace lipidů *stratum corneum*

Z postupně rozmrazené lidské kůže, předem ponořené do vody o teplotě 60°C po dobu 30 s, byla pomocí pinzety odstraněna epidermis. Poté byla epidermis vložena do Petriho misky, která byla naplněna roztokem trypsinu (0,5 %) ve 10 mM fosfátovém pufru s přídavkem gentamicin sulfátu (50 mg/l). Izolovaná epidermis byla ponechána v tomto roztoku 24 h při teplotě 32°C (termostat).

Na druhý den bylo SC několikrát promyto vodou (trypsin rozkládá živé vrstvy epidermis, kromě jediné – SC). Po krátkém promytí SC acetonem a fosfátovým pufrům bylo toto vysušeno v exsikátoru nad oxidem fosforečným a parafínem.

Lipidy SC byly získány extrakcí vysušeného SC za použití směsi chloroform/methanol (v poměr 2:1, 1:1, 1:2) po dobu 2 hodin. Organické roztoky byly zahuštěny na vakuové odparce. Surové extrakty byly rozpuštěny ve vhodném objemu směsi chloroform/metanol (2:1) a poté naneseny na sloupec silikagelu (sloupcová chromatografie). Lipidy byly vyčištěny pomocí gradientové eluce, postupně se

zvýšovala polarita mobilní fáze (chloroform/kyselina octová) v poměru 99:1 a potom chloroform/methanol v poměrech 100:1, 50:1, 10:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2. Složení jednotlivých frakcí bylo stanoveno na základě tenkovrstvé chromatografie (TLC) za použití standardů. Frakce obsahující Cer byly zahuštěny na rotační vakuové odparce. Izolovaná frakce byla vysušena v exsikátoru (24 h) a až do doby přípravy modelových membrán uskladněna při teplotě -20 °C.

3.4. Příprava modelových lipidových membrán

3.4.1. Příprava směsi mastných kyselin

Pro přípravu modelových membrán byla zhotovena směs VMK v poměru odpovídajícímu zastoupení ve zdravé epidermis [58]. Kyselina palmitová (1,8 %), kyselina stearová (4,0 %), kyselina arachidová (7,6 %), kyselina lignocerová (38,8 %) a kyselina behenová (47,8 %) byly rozpuštěny ve směsi hexan/96% ethanol v poměru 2:1 (v/v). Organické roztoky byly spojeny a následně odstraněna organická rozpouštědla pod proudem dusíku. Směs VMK byla ponechána přes noc v exsikátoru do úplného odstranění použitých rozpouštědel.

3.4.2. Příprava lipidových směsí

V experimentu hodnocení vlivu GS na bariérové vlastnosti modelových membrán bylo celkem připraveno sedm typů modelových směsí. Kontrolní vzorek (0 % GS) představoval ekvimolární směs izolovaných lidských Cer, Chol a VMK s přídavkem 5 hmotnostních % CholS. Poté bylo u dalších lipidových směsí postupně nahrazováno 5, 10, 20, 30 a 50 molárních % Cer frakce za GS (tabulka 2). Lipidy byly rozpuštěny ve směsi hexan/96% ethanol (2:1, v/v), CholS (těžce rozpustný v organických rozpouštědlech) v 96 % ethanolu. Smícháním připravených lipidových roztoků v požadovaném poměru byly zhotoveny lipidové směsi, ze kterých byla poté odstraněna použitá organická rozpouštědla. Celkem 7 směsí ve vialkách bylo vysušeno v exsikátoru nad oxidem fosforečným.

Tab. 2 Složení lipidových směsí. Molární poměry Cer, GS, VMK, Chol, s přidavkem 5 hmotnostních % CholS

	Cer	GS	VMK	Chol	CholS
Kontrola	1	0	1	1	5 %
5 %	0,95	0,05	1	1	5 %
10 %	0,90	0,10	1	1	5 %
20 %	0,80	0,20	1	1	5 %
30 %	0,70	0,30	1	1	5 %
50 %	0,50	0,50	1	1	5 %
100 %	0,00	1,00	1	1	5 %

3.4.3. Příprava lipidových membrán

Lipidy jednotlivých směsí (0–100 %) byly naředěny do požadované koncentrace (4,5 mg/ml) ve směsi hexan/96% ethanol v poměru 2:1 (v/v). Organické roztoky byly následně nastříkovány za použití přístroje Linomat V (Camag, Muttenz, Švýcarsko) na předem připravené polykarbonátové podkladové filtry, umístěné v kovových držácích. Filmy s póry o velikosti 0,015 μm byly před nastříkáním promyté ve směsi hexan/96% ethanol v poměru 2:1. Každá modelová membrána obsahovala celkem 1,35 mg lipidů. Celkem bylo připraveno 37 membrán (7 membrán z kontrolní směsi a 5 membrán z každé směsi se sníženou koncentrací Cer). Organické roztoky byly pomocí 100 μl stříkačky (nástřík $3 \times 100 \mu\text{l}$) nastříkovány pod proudem dusíku na plochu 10 mm \times 10 mm polykarbonátového filtru. Stejným způsobem byly připraveny i modelové membrány pro měření rentgenové práškové difrakce s tím rozdílem, že místo podkladových filtrů byla použita krycí sklička (22 mm \times 22 mm), vhodná pro měření. Lipidové membrány byly po nastříknutí zahřáty po dobu 10 minut na teplotu 90 $^{\circ}\text{C}$ (teplota nad hlavním fázovým přechodem lipidů) a následně po pozvolném vychladnutí (3 hod) byly po dobu 24 hodin skladovány při teplotě 32 $^{\circ}\text{C}$ v termostatu.

3.5. Permeační pokusy

3.5.1. Franzovy difuzní cely

Pro stanovení permeability modelových membrán jsme používali Franzovy difuzní cely s akceptorovou částí (objem $6,5 \pm 0,5$ ml) naplněnou fosfátovým pufrem (pH 7,4) s přidavkem gentamicinu (50 mg/l). Modelové membrány byly po zahřátí a následném chladnutí vyjmuty z kovových držáků a upevněny do teflonových držáků s kruhovou difuzní plochou $0,5 \text{ cm}^2$. Teflonový držák s modelovou membránou byl pomocí silikonové pasty upevněn mezi donorovou a akceptorovou částí Franzovy cely. Difuzní cely byly poté vloženy do vodní lázně (fyziologická teplota $32 \text{ }^\circ\text{C}$) a takto ponechány do druhého dne.

3.5.2. Donorové vzorky

Jako donorové vzorky byly použity permeanty, simulující látky s různou polaritou a velikostí molekuly. Pro tento permeační pokus byl zvolen indomethacin (IND), jako látka s vyšší lipofilitou ($\log P = 4,27$) a větší molekulovou hmotností ($M_w = 357,79 \text{ g/mol}$). Jako druhá modelová látka byl zvolen theofylin (TH), tedy permeant s relativně malou hmotností ($M_w = 180,16 \text{ g/mol}$) a vyváženou hydrofilně-lipofilní konstantou ($\log P = 0,02$). Z modelových látek byly připraveny (5 % TH a 2 % IND) suspenze v 60% vodném roztoku propylenglykolu. Suspenze byly skladovány při teplotě $32 \text{ }^\circ\text{C}$ v termostatu a před permeací byly homogenizovány na třepačce.

3.5.3. Měření ztráty vody membránami

Měření ztráty vody udává množství vody prošlé membránou za jednotku času přes jednotku plochy [g/h/m^2]. Pro stanovení ztráty vody membránami jsme používali přístroj AquaFlux AF200 (Biox system Ltd, UK). Po odstranění donorové části difuzní cely byla na povrch modelové membrány přiložena měřicí sonda po dobu 80-100 s a zaznamenávala se průměrná hodnota v ustáleném stavu ze dvou měření.

3.5.4. Měření elektrické impedance

Další metodou hodnocení bariérových vlastností modelových membrán bylo měření propustnosti membrány pro ionty na základě stanovení elektrické impedance. Měření se provádělo pomocí LCR přístroje 4080 (Conrad electronic, Hirschau,

Německo), s měřicím rozmezím 20-10 M Ω , v nastaveném paralelním režimu s frekvencí 120 Hz. Na povrch modelové membrány bylo před měřením aplikováno 500 μ l fyziologického fosfátového pufru. Po 30min ustálení byla špička jedné měřicí sondy ponořena do aplikovaného pufru v donorové části a druhá sonda byla (přes ramínko) ponořena do akceptorové části Francovy difuzní cely. Po nejméně dvou provedených měřeních byly zaznamenány naměřené hodnoty elektrické impedance. Po ukončení experimentu byl pufr opatrně odstraněn pomocí vatových tamponů.

3.5.5. Permeace

Na povrch modelových lipidových membrán bylo aplikováno 100 μ l donorového vzorku, tj. 5% suspenze TH v 60% propylenglykolu. V čase 2, 4, 6, 8 a 10 hod bylo z akceptorové části (přes ramínko) odebráno 300 μ l akceptorové fáze. Odebrané množství bylo následně doplněno stejným objemem nového pufru. Po provedení permeačních pokusů s TH byly membrány důkladně vyčištěny, promyty puftrem a opatrně vysušeny pomocí vatových tamponů. Franzovy cely byly opatrně rozebrány, pufr byl nahrazen novým fosfátovým puftrem a cely byly opět zmontovány. Cely s modelovými membránami byly ve vodní lázni temperovány (32 °C) po dobu 12 hod. Po této době byla na modelové membrány aplikována 2% suspenze IND v 60% propylenglykolu a proveden principiálně stejný permeační experiment jako s TH. Odebrané vzorky byly hodnoceny a jejich koncentrace kvantifikovány pomocí HPLC. Z těchto koncentrací bylo stanoveno tzv. kumulativní množství TH (IND) [μ g/cm²] a tok (angl. *flux*) permeantu, tj. množství látky, které prošlo přes modelovou membránu o definované ploše v čase [μ g/cm²/h] [45, 59, 60].

3.5.6. Podmínky HPLC analýzy

Měření neznámých koncentrací IND a TH z permeačních experimentů bylo provedeno za isokratických podmínek pomocí HPLC. Pro analýzu byl použitý přístroj Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), který se skládá z pumpy LC-20AS, odstraňovače plynu DGU-20A3, automatického dávkovače SIL-20A HT, kolonového termostatu CTO-20AC, detektoru 23 SPD-M20A, komunikačního modulu CBM-20A a softwaru LCsolutions 1.22.

Separace TH byla provedena na reverzní fázi na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18; 5 μ m, Merck, Darmstadt, Německo) za použití směsi

methanol/0,1 M NaHPO₄ (4:6, v/v) jako mobilní fázi. Separace byla provedena při teplotě 35 °C, průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 1,2 ml/min. UV absorbance vzorků s TH byla nastavena na vlnovou délku 272 nm. Na kolonu bylo nastříknuto 20 µl vzorku. Retenční čas byl 3,2 ± 0,1 min. [61].

Pomocí reverzní fáze na koloně LiChroCART 240-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, Merck, Darmstadt, Německo) byl separován IND za použití směsi acetonitril/voda/kyselina octová (90:60:5, v/v/v) jako mobilní fázi. Vzorky byly analyzovány při 40 °C a při průtoku 2 ml/min. UV absorpce vzorku byla nastavena na vlnovou délku 270 nm. Na kolonu jsme nanесли 100 µl neznámého vzorku. Retenční čas IND byl 3,1 ± 0,1 min. [61].

3.5.7. Statistické zpracování dat

Statistická analýza dat byla provedena na základě analýzy typu ANOVA s Dunnettovým testem (hladina spolehlivosti $p = 0,05$) v programu GraphPad Prism. Všechna data jsou vyjádřena jako průměr ± střední chyba průměru (SEM).

3.6. Rentgenová prášková difrakce

Modelové membrány, tj. lipidové filmy nastříkané na podpůrném sklíčku byly hodnoceny pomocí rentgenové difrakce. Mikrostruktura modelů byla stanovena za použití práškového difraktometru Xpert PRO θ - θ (PANalytical B. V., Amelo, Nizozemsko) s využitím CuK α záření ($\lambda = 1,5418$ Å, $U = 40$ kV, $I = 30$ mA). Data byla zaznamenána detektorem Xcelerator s rozsahem 0,01167 ° (2θ) a poté vyhodnocena pomocí programu Xpert Data Viewer (PANalytical B. V., Amelo, Nizozemsko). Samotné měření vzorků bylo prováděno na VŠCHT v Praze (Centrální laboratoře, Dr. Jaroslav Maixner).

4. Výsledky a diskuze

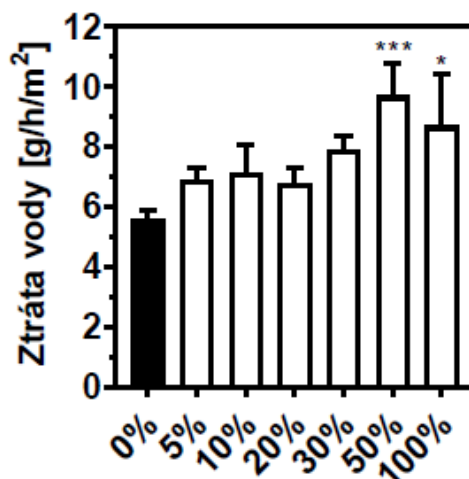
Základním cílem této práce bylo zjistit, jakým způsobem budou ovlivněny bariérové vlastnosti modelových membrán s přidavkem metabolitů Cer (tj. lysolipidů), konkrétně přidavkem GS. Pro tento účel jsme připravili modelové membrány SC ve složení: izolované lidské Cer, směs VMK v poměru stejném, jak jsou VMK zastoupeny ve zdravé epidermis [58], Chol a CholS. Pro tento experiment byly vyhotoveny modelové membrány s ekvimolárním zastoupením Cer, Chol a VMK (+ CholS), dále pak modelové membrány, které obsahovaly 5 % až 100 % GS. U těchto membrán bylo postupně snižováno množství Cer a nahrazováno odpovídajícím množstvím GS. Připravené modelové membrány validovaným postupem byly hodnoceny v permeačních (propustnost membrán) a biofyzikálních experimentech (mikrostruktura membrán).

4.1 Hodnocení permeačních pokusů

K hodnocení permeability analyzovaných modelů SC byly použity 4 parametry (markery) permeability, tj. elektrická impedance, ztráta vody, propustnost membrán pro látky s vyváženou lipofilitou (flux TH) a konečně permeabilita membrán pro lipofilní látky s vyšší molekulovou hmotností (flux IND).

4.1.1 Ztráta vody membránou

Na obrázku č. 13 jsou porovnány výsledky experimentu z měření ztráty vody u modelů s rozdílnou koncentrací GS. U kontrolní membrány (černý sloupek) je hodnota ztráty vody 5,57 g/m²/h, což odpovídá publikovaným výsledkům [60]. Trend ve zvýšení hodnot ztráty vody bylo zaznamenáno u všech modelových membrán obsahujících GS. Statisticky významné rozdíly ve ztrátě vody byly pozorovány jen u velmi vysokých hodnot v koncentraci GS, tedy u membrán s 50 % (až 2× větší ve srovnání s kontrolou, dosahuje 9,67 g/m²/h) a 100 % GS (8,67 g/m²/h). Snížení hladin Cer a následné zvýšení koncentrace GS zvyšují propustnost modelových membrán pro vodu, zvyšují tedy ztrátu vody membránou. Zvýšení hodnot ztráty vody bylo zaznamenáno i u modelových membrán obsahujících prekurzory Cer SM [45] a GC [59]. Modelové membrány, u kterých část Cer byla nahrazena za SM nebo GC vykazovaly statisticky významně vyšší hodnoty ztráty vody ve srovnání s kontrolními membránami [45, 59].



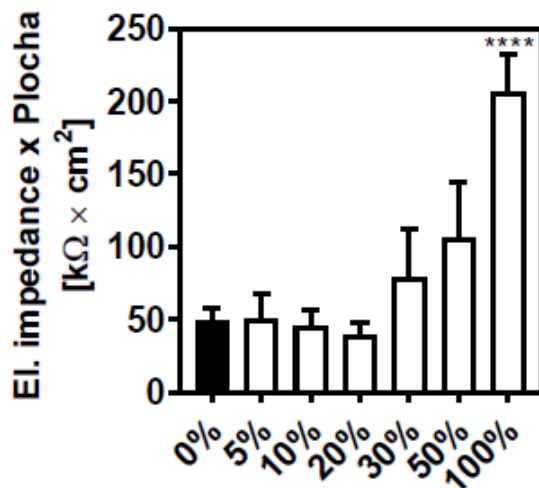
Obrázek 13. Vliv koncentrace GS na propustnost modelových membrán SC pro vodu. Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.

4.1.2 Elektrická impedance

Elektrická impedance je parametr permeability (obrázek 14) nepřímo úměrný propustnosti membrány pro ionty, tj. čím je elektrická impedance vyšší, tím je daná membrána méně propustná (zejména pro ionty). Nejvyšší naměřená hodnota elektrické impedance u námi studovaných modelových membrán byla zaznamenána u membrán, které paradoxně neobsahovaly žádné Cer, jelikož 100 mol % Cer bylo nahrazeno za GS. Hodnota elektrické impedance ($207 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$) až čtyřnásobně převyšuje hodnotu impedance u kontrolní membrány ($49 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$; černý sloupek grafu v obrázku 14). Hodnoty elektrické impedance u ostatních modelových membrán nevykazují statisticky významné rozdíly a jsou prakticky srovnatelné s kontrolními membránami (obrázek 14).

Na rozdíl od ztráty vody, kde modelové membrány s vysokým zastoupením GS nabývají vysokých hodnot (jsou tedy nejvíce propustné), hodnoty elektrické impedance modelových membrán naznačují, že právě membrány s vysokým podílem lysolipidů vedou k lepšímu odporu daných membrán vůči průchodu střídavého proudu. Podobný efekt zvýšení elektrické impedance byl pozorován i u modelových membrán obsahujících prekursor Cer, tj. SM [45] a GC [59]. Tato skutečnost by mohla vysvětlovat hypotézu, že snížení heterogenity modelu membrán vede k lepšímu uspořádání lipidů v mnohovrstvách, což se projevuje zvýšením hodnot elektrické impedance. Další možnou hypotézou je tvorba lipidových domén GS a/nebo ostatních

lipidů v modelech SC. Výrazné zvýšení hodnot elektrické impedance bylo pozorováno i u jednoduchých modelových membrán, ve složení 6-hydroxyCer/VMK/Chol/CholS [62].

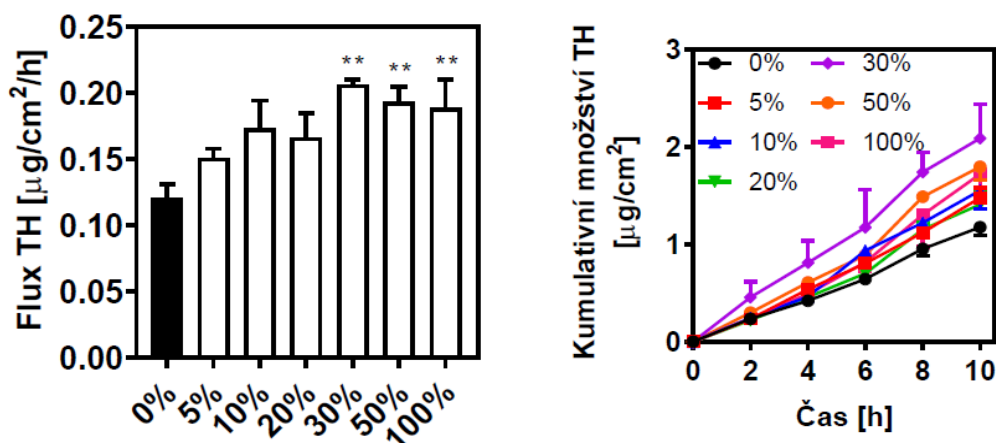


Obrázek 14. Vliv koncentrace GS na elektrickou impedanci modelových membrán SC. Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.

4.1.3 Permeabilita modelových membrán pro TH a IND

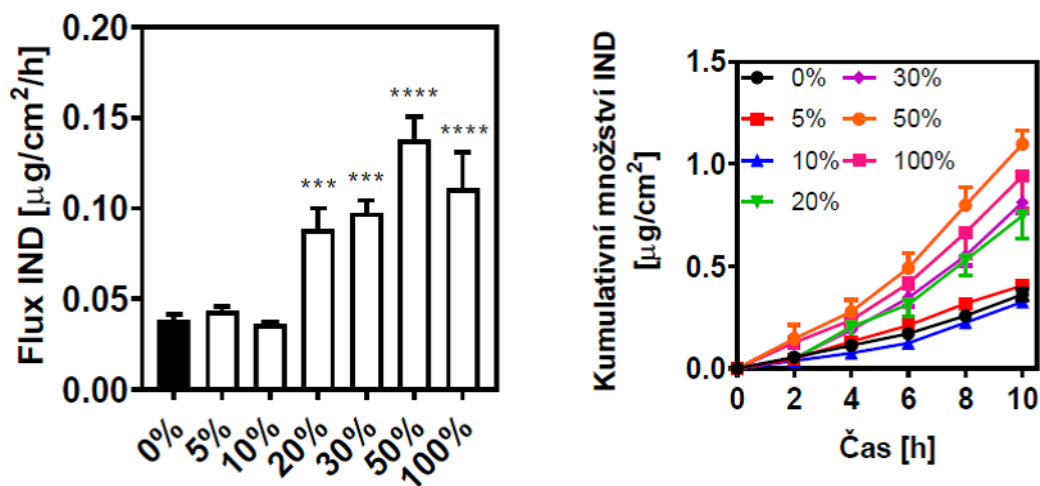
Z výsledků HPLC analýzy byly získány hodnoty nekorigovaných koncentrací permeantů (TH nebo IND), které prošly modelovými membránami v časech 2, 4, 6, 8 a 10 hod. Tyto hodnoty byly přepočítány (vztaženo na objem konkrétní akceptorové části Franzovy cely, množství odebraného vzorku) byly stanoveny koncentrace permeantů a následně tzv. permeační profily. Z permeačních profilů [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] a časů odběru byly pomocí lineární regrese vypočítány hodnoty toků (tzv. fluxů [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]) modelových látek. Výsledky permeačního experimentu jsou zobrazeny na obrázku 15 a obrázku 16.

Na obrázku 15 jsou zobrazeny výsledky permeačního experimentu pro modelovou látku TH. Flux TH u kontrolní membrány ($0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) nabývá podobných hodnot, což je v souladu s již publikovanými výsledky (Sochorová a kol) [60]. Ze získaných hodnot permeačních profilů (barevné křivky; druhý graf) a hodnot fluxů TH je patrné, že přidavek GS statisticky neovlivňuje propustnost modelových membrán obsahujících 5–20 % GS. 30 % přidavek lysolipidu (GS) k modelovým membránám statisticky zvyšuje jejich propustnost pro malé molekuly s vyváženou lipofilitou (první graf).



Obrázek 15. Výsledky měření propustností membrán pro TH – flux TH [µg/cm²/h] (graf vlevo) a permeační profil TH (graf vpravo). Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.

Podobné závěry lze pozorovat u propustností modelových membrán SC pro IND (obrázek 16). Kontrolní membrány nabývají podobných, již publikovaných hodnot (0,04 µg/cm²/h) (Sochorová a kol) [60]. Statisticky významně odlišná hodnota byla pozorována u modelových membrán s 20 %, 30 %, 50 % a 100 % GS. Až 3× vyšší množství IND, ve srovnání s kontrolou, prošlo vzorkem s 50 % koncentrací GS; hodnota fluxu u této membrány činila 0,138 µg/cm²/h.



Obrázek 16. Výsledky měření propustností membrán pro IND – flux IND [µg/cm²/h] (graf vlevo) a permeační profil TH (graf vpravo). Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.

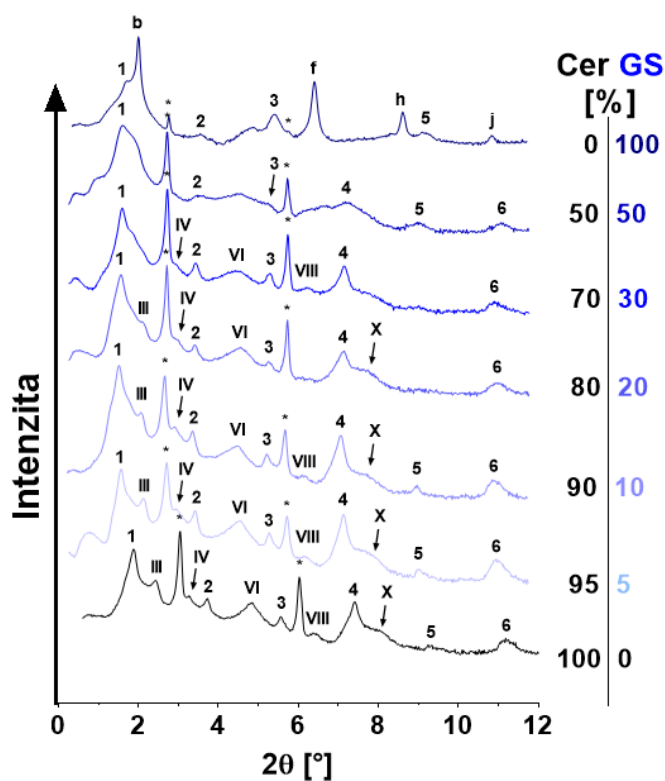
Klíčovou roli v udržení bariérových vlastností modelových membrán je přítomnost bariérových Cer. V našich modelových membránách je permeabilita membrán ovlivněna dvěma faktory. Prvním faktorem je faktické snížení množství

bariérových Cer (od 5 % do jejich úplné eliminace), dále pak je to přítomnost metabolitů Cer, tj. efekt GS na bariérové vlastnosti námi připravených modelů. Výsledná permeabilita modelových membrán je tedy kombinací úbytku Cer a postupným přidávkem vysoce polárních metabolitů Cer. Kromě hodnocení vlivu GS na bariérové vlastnosti modelů SC byl hodnocen i efekt SPC, avšak výsledky těchto pokusů jsou obsahem jiné ucelené práce. Podobné pokusy, avšak s hodnocením vlivu prekurzorů Cer, byly provedeny v pracích *Pullmannová a kol.* (vliv SM) [45] a *Sochorová a kol.* (vliv GC) [59]. Porucha bariérové funkce byla zaznamenána při hodnocení permeability modelových membrán obsahujících 25-50 % SM. U membrán s vyšším procentuálním zastoupením SM (nad 50 %), propustnost pro modelové permeanty byla nižší ve srovnání s kontrolou [45]. V studii vlivu GC na propustnost membrán [59] statisticky významně vyšší hodnoty byly zaznamenány pouze u modelů, kde 5-25 % Cer bylo nahrazeno za GC, u membrán s vyšším procentuálním zastoupením GC propustnost nebyla ovlivněna.

4.2 Hodnocení mikrostruktury modelových membrán

Abychom mohli vysvětlit a popsat rozdíly v propustnosti modelových membrán, byly modelové membrány SC hodnoceny pomocí rentgenové difrakce. Tato metoda poskytuje náhled na mikrostrukturu modelových membrán, což mnohdy objasní odlišnosti a rozdíly v permeabilitě modelových membrán. U modelových membrán byly z naměřených difraktogramů hodnoceny mezivzdálenosti fází a lamelárních uskupení, tj. fáze s dlouhou (LPP) a krátkou (SPP) periodicitou a konečně fáze separovaného Chol.

Na obrázku 17 jsou difraktogramy kontrolní modelové membrány (0 % GS; izolované Cer/VMK/Chol/ChoIS) a modelových membrán obsahujících 5–100 % GS. U kontrolní membrány, svým složením simulující zdravé SC, byla nalezena fáze s krátkou periodicitou ($d = 5,56$ nm), fáze s dlouhou periodicitou ($d = 12,8$ nm), a nakonec fáze Chol/ChoIS s periodicitou přibližně 3,42 nm (obrázek 17). Toto odpovídá počtu a hodnotám nalezeným jak ve zdravém SC [63, 64], tak v modelových membránách [59, 65, 66].



Obrázek 17. Mikrostruktura modelových membrán SC. Difraktogramy kontrolní membrány (0 % GS) a membrán se zvyšujícím se podílem GS. Římskou číslicí jsou označeny fáze s dlouhou periodicitou (LPP), arabskou číslicí fáze s krátkou periodicitou (SPP), písmeny fáze s periodicitou přibližně 4,5 nm a * značí fázi separovaného Chol.

Postupný úbytek frakce izolovaných Cer a následný přírůstek GS se výrazně nepodepsaly na změně lamelárního uspořádání modelových membrán SC. Ve všech membránách (5–50 %) byly nalezeny fáze LPP, SPP a fáze separovaného Chol. Délky mezirovinných vzdáleností jsou zobrazeny v tabulce 3. Mezi jednotlivými membránami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Reflexe jednotlivých fází se lišily pouze relativní intenzitou. Úplné odstranění Cer z modelových membrán vede k tvorbě lamelární fáze s periodicitou 4,50 nm. Tato skutečnost se dá vysvětlit úplným nedostatkem Cer, a tedy i ultradlouhých, pro LPP klíčových Cer (tzv. acylCer) [67]. Přítomnost GS a/nebo absence Cer vede ke tvorbě nového lamelárního uskupení. V pracích *Pullmanová a kol.* [45] a *Sochorová a kol.* [59] byl hodnocen vliv prekurzoru Cer (SM a GC) na mikrostrukturu membrán. Náhrada 50 % Cer za jejich prekurzor GC a jejich úplná absence u membrán se 100 % koncentrací GC vedla k eliminaci LPP a vzniku nové fáze s periodicitou 4,3–4,5 nm [59]. Stejně tak částečná náhrada Cer za polární prekurzor SM vedla k inhibici tvorby LPP [45] což taky je vysvětleno jako

následek nedostatku acylCer. Studium mikrostruktury byl proveden i u modelových membrán se sníženým obsahem Chol (Sochorová a kol.) [60]. LPP byla přítomna i u membrán s úplnou absencí Chol. V tomto případě tvorba LPP byla zajištěna přítomností acylCer [60].

Tabulka 3. Délky lipidových lamel modelových lipidových membrán SC z obrázku 13. SPP – fáze s krátkou periodicitou, LPP – fáze s dlouhou periodicitou, * – fáze separovaného Chol. Hodnoty mezivinných vzdáleností jsou v nanometrech.

Fáze	0%	5%	10%	20%	30%	50%	100%
SPP	5,56	5,63	5,62	5,62	5,63	5,62	5,63
*	3,42	3,42	3,47	3,42	3,42	3,42	3,42
LPP	12,8	12,7	13,06	12,69	12,77	12,70	-

5. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jak lysolipid GS ovlivní permeabilitu a mikrostrukturu modelových membrán SC. Pro tento účel jsme připravili modelové membrány se 100 % koncentrací Cer, a dále membrány, u kterých bylo 5 až 100 % Cer frakce nahrazeno odpovídajícím molárním množstvím jejich metabolitů (GS). Bylo zaznamenáno, že úbytek Cer a zvyšující se množství GS má za následek zvýšení ztráty vody membránou. Výsledky permeačních experimentů s TH a IND rovněž potvrzují, že s rostoucí koncentrací GS se zvyšuje propustnost membrán SC jak pro malé molekuly s vyváženou lipofilitou (TH), tak i pro lipofilnější molekuly s větší molekulovou hmotností (IND). Na rozdíl od hodnot ztráty vody a fluxů, které svědčí o negativním vlivu lysolipidů na bariérovou funkci, u modelových membrán s vysokým podílem lysolipidu byl zaznamenán vyšší odpor vůči střídavému proudu, tj. nižší propustnost modelových membrán pro ionty. Úplné odstranění Cer (100% GS) mělo za následek vznik nové lamelární fáze, což můžeme vysvětlit jako nedostatek acylCer nezbytných pro tvorbu LPP. Pro potvrzení hypotézy o negativním vlivu lysolipidu na bariérové vlastnosti kůže je potřeba srovnat výsledky našich experimentů s GS s dalším lysolipidem (SPC). Aby se dokázal či vyvrátil nepříznivý vliv lysolipidů na permeabilitu membrán v budoucnu je potřeba prostudovat modelové membrány ve stejném složení s tím rozdílem, že úbytek Cer nebude nahrazován žádným lysolipidem (potvrzení/vyvrácení důležitosti Cer). Dále se nabízí prozkoumat význam lysolipidů na složitějších modelech kožní bariéry, např. na izolovaném SC/epidermis/kůži v plné tloušťce. Tato práce částečně přispěla k poznání významu lysolipidů v kožní bariéře a může být vhodným podkladem pro studium patofyziologie kožních nemocí.

6. Literatura

1. PAPPAS, A. Epidermal Surface Lipids. In: Proceedings of the 2nd International Conference: Sebaceous Gland, Acne, Rosacea and Related Disorders: Basic and Clinical Research, Clinical Entities and Treatment. 2008, 1–4.
2. BOUWSTRA, J. A. and P. L. HONEYWELL-NGUYEN. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliver Rev.* 2002, 54, S41–S55.
3. TSAKOVSKA, I. et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology.* 2017, 87, 27–42.
4. BORODZICZ, S. et al. The role of epidermal sphingolipids in dermatologic diseases. *Lipids Health Dis.* 2016, 15, 19.
5. MUTSUMI, I. et al. Abnormal Expression of the Novel Epidermal Enzyme, Glucosylceramide Deacylase, and the Accumulation of its Enzymatic Reaction Product, Glucosylsphingosine, in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis. *Lab Invest.* 2003, 83, 397–408.
6. ITO, M. et al. A Novel Enzyme That Cleaves the N -Acyl Linkage of Ceramides in Various Glycosphingolipids as Well as Sphingomyelin to Produce Their Lyso Forms. *J Biol Chem.* 1995, 270(41), 24370-24374.
7. GRAY, H. F. R. S. *Gray's Anatomy.* London: Bountry Books, 2012. ISBN 978-0-753723-89-0.
8. MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliver Rev.* 2002, 54, S3–S17.
9. BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012, 30(3), 257–262.
10. LAI-CHEONG, J. E. et al. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine.* 2009, 41(6), 317–320.
11. BENITEZ, J. M. and F. J. MONTANS. The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Comput Struct.* 2017, 190, 75–107.

12. Eucerin. Jak kůže funguje. Eucerin.cz [online]. 2019 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>.
13. MOKRÝ, J. et al. Handbook of practical classes in histology and embryology. Hradec Králové: Libor Dvořák, 2011, s. 132. ISBN 978-80-260-0630-5.
14. MADISON, K. C. Barrier Function of the Skin: „La Raison d'Être” of the Epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003, 121(2), 231–241.
15. FARTASCH, M. The epidermal lamellar body: a fascinating secretory organelle. *J Invest Dermatol.* 2004, 122(5), XI–XII.
16. POSPÍŠILOVÁ, M. Studium lipidových membrán obsahujících lysolipidy jako modelů atopické dermatitidy. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie. Vedoucí práce Kateřina Vávrová.
17. LEDVINA, M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMÁN. Biochemie pro studující medicíny II. díl. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2009. ISBN 978-80-246-1415-1.
18. LONG, V. J. W. Variations In Lipid Composition At Different Depths In The Cow Snout Epidermis. *J Invest Dermatol.* 1970, 55(4), 269–273. ISSN 0022-202X.
19. IWAI, I. et al. The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *J Invest Dermatol.* 2012, 132(9), 2215–2225.
20. FERRIER, D. R. a R. A. HARVEY. Biochemisrty (Lippincott's Illustrated Reviews). 6th Ed. New York: LWW (Wolters Kluwer). ISBN 978-1-4511-7562-2
21. KOVÁČIK, A. Studium vlivu hydroxylace ceramidů na permeabilitu a mikrostrukturu modelových lipidových membrán. Hradec Králové, 2017. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra organické a bioorganické chemie. Vedoucí práce Kateřina Vávrová.

22. MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.
23. BOUWSTRA, J. A. & S. G. GOORIS. The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems. *Open Dermatol J.* 2010, 4, 10-13.
24. KIHARA, A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog Lipid Res.* 2016, 63, 50–69.
25. MOTTA, S. et al. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1182(2), 147-151.
26. MECKFESSEL, M. H. and S. BRANDT. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2014, 71(1), 177–84.
27. STAŇKOVÁ, K. *Studium lipidových membrán obsahujících prekuzory ceramidů jako modelů atopické dermatitidy*. Hradec Králové, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie. Vedoucí práce Kateřina Vávrová.
28. NORLEN, L. Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J Am Acad Dermatol.* 2001, 117(4), 830–6.
29. WERTZ, P. W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol.* 2000, 208, 7–11.
30. ХЛЕБНИКОВА Д. Д. И А. В. ПЕТРУНИН. Липиды человеческого эпидермиса(фундаментальные сведения и клиническая имплементация). Москва: Моники, 2015. ISBN 978-5-98511-268-9.
31. JANSSENS, M. et al. Lamellar Lipid Organization and Ceramide Composition in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Eczema. *J Invest Dermatol.* 2011, 131(10), 2136-2138.
32. ČERNOCHOVÁ, K. *Studium fázového chování vybraných směsí lipidů*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce

Jarmila Zbytovská.

33. ŠKOLOVÁ, B. Syntéza a studium analogů ceramidů. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra anorganické a organické chemie. Vedoucí práce Kateřina Vávrová
34. CAUSSIN, J. et al. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Bba-Biomembranes*. 2008, 1778(6), 1472-82
35. MASASHI, O. et al. Bouwstra b. The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1838(7), 1851–1861.
36. MOJUMDAR, E. H. et al. The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Bba-Biomembranes*. 2014, 1838(10), 2473–2483.
37. PILGRAM, G. S. K. et al. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*. 2001, 117(3), 710-717.
38. JANSSENS, M. et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*. 2012, 53(12), 2755–2766.
39. BENAKOVÁ, N. Ekzémy a dermatitidy. Praha: Maxdorf, 2013. ISBN 978-80-7345-331-2.
40. Eucerin. Atopická dermatitida na těle. Eucerin.cz [online]. 2019 [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/indikace/atopicka-dermatitida/na-tele>
41. ROCKEN, M. Kapesní atlas dermatologie. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.
42. LEUNG, D. Y. M. and T. BIEBER. Atopic dermatitis. *The Lancet*. 2003, 361(9352), 151–160. ISSN 0140-6736.

43. LEUNG, D. Y. M. et al. Hamid New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004, 113(5), 651–657.
44. LEE, J. H., S. W. SON and S. H. CHO. A Comprehensive Review of the Treatment of Atopic Eczema. *Allergy Asthma Immun.* 2016, 8(3), 181–90.
45. PULLMANNOVÁ, P. et al. Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Bba-Biomembranes.* 2014, 1838(8), 2115-2126.
46. ISHIKAWA, J. et al. Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J Invest Dermatol.* 2010, 130(10), 2511–2514.
47. ZÁHEJSKÝ, J. Role ceramidů v bariérové funkci kůže, jejich význam ve vývoji kožních onemocnění a jejich terapii. *Pediatr. praxi.* 2013, 7(4), 170–174.
48. KOTINGOVÁ, L., L. BORSKÁ a Z. FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chem. listy.* 2009, 103(7), 533–539. ISSN 0009-2770.
49. KOPEČNÁ, M. et al. Fluorescent Penetration Enhancers Reveal Complex Interactions among the Enhancer, Drug, Solvent, and Skin. *Mol Pharm.* 2018, 16(2), 886-897.
50. LAU-GILLARD, P. J. et al. „Evaluation of a hand-held evaporimeter (VapoMeter®) for the measurement of transepidermal water loss in healthy dogs." *Veterinary dermatology.* 2010, 21(2), 136–145.
51. WHITE, E. A., M. E. ORAZEM a A. L. BUNGE. A critical analysis of single-frequency LCR databridge impedance measurements of human skin. *Toxicol In Vitro.* 2011, 25(4), 774–784.
52. FASANO, W. J. a P. M. HINDERLITER. The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2004, 18(5), 725-729.
53. KODIŠEK, M. a V. KAPRENKO. *Biofyzikální chemie. 3., opr. a rozš. vyd.* Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2241-7.

54. VALVODA, V., M. POLCAROVÁ a P. LUKÁČ. *Základy strukturní analýzy*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 1992. ISBN 80-7066-648-X.
55. FRIEDEL, F. et al. Material analysis with X-ray microdiffraction. *Cryst Res Technol*. 2005, 40(1–2), 182–187.
56. LÁZNÍKOVÁ, A. a V. KUBÍČEK. *Základy fyzikální chemie*. Praha: Uiverzita Karlova, 2014.
57. SKOLOVA, B et al. Different phase behavior and packing of ceramides with long (C16) and very long (C24) acyls in model membranes: infrared spectroscopy using deuterated lipids. *J Phys Chem B*. 2014, 118(35), 10460-10470.
58. GROEN, D. et al. Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir*. 2010, 26(6), 4168-4175.
59. SOCHOROVÁ, M. et al. Permeability Barrier and Microstructure of Skin Lipid Membrane Models of Impaired Glucosylceramide Processing. *Sci Rep*. 2017, 7(1), 6470.
60. SOCHOROVÁ, M. et al. Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *J Colloid Interface Sci*. 2019, 535, 227-238.
61. NOVOTNÝ, J. et al. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009, 22(1), 22–30.
62. KOVÁČIK, A. et al. Effects of 6-Hydroxyceramides on the Thermotropic Phase Behavior and Permeability of Model Skin Lipid Membranes. *Langmuir* 2017, 33(11), 2890-2899.
63. WHITE, S. et al. Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An x-ray diffraction study. *Biochemistry*. 2002, 27(10), 3725-3732.
64. BOUWSTRA JA. et al. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol*. 1991, 97(6),1005-12.

65. MOJUMDAR, E. et al. Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft Matter*. 2015, 11(21), 4326-4336.
66. BOUWSTRA JA. et al. Phase behavior of isolated skin lipids. *J Lipid Res*. 1996, 37(5),999-1011.
67. OPÁLKA, L. et al. Omega- O -Acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base, and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir*. 2016, 32(48) 12894-12904.

7. Seznam obrázků

Obr. 1 Struktura kůže	9
Obr. 2 Struktura epidermis	10
Obr. 3 Rohová vrstva epidermis	11
Obr. 4 Schematické znázornění složení lipidové matrix SC, 45–50 % lipidové matrix je tvořeno Cer, 25 % tvoří Chol, 10–15 % – VMK, kolem 5 % tvoří další lipidy, hlavně Chol S.	12
Obrázek 5 Struktura ceramidů.....	12
Obrázek 6 Strukturní vzorec SM.	14
Obrázek 7 Strukturní vzorce SM a GC.	14
Obr. 8 Schematické znázornění biosyntézy ceramidů, SPT = serin-palmitoyltransferáza. β GCáza = β -glukocerebrosidáza. SMáza = sfingomyelináza. GC = glukosylceramid. SM = sfingomyelin.	15
Obrázek 9 Strukturní vzorce lysolipidů.	16
Obrázek 10 Principy organizace lipidů ve SC [38].	18
Obrázek 11 Změněná aktivita enzymů nezbytných pro syntézu, nebo odbourávání Cer u pacientů s AD, zejména snížení aktivity SMázy a β -GCázy a ke zvýšení aktivity Gcer/SM deacylázy a ceramidázy [5].	19
Obr. 12 Schematické znázornění Franzovy difuzní cely.	20
Obrázek 13. Vliv koncentrace GS na propustnost modelových membrán SC pro vodu. Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.	30
Obrázek 14. Vliv koncentrace GS na elektrickou impedanci modelových membrán SC. Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.	31
Obrázek 15. Výsledky měření propustností membrán pro TH – flux TH [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$] (graf vlevo) a permeační profil TH (graf vpravo). Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.	32
Obrázek 16. Výsledky měření propustností membrán pro IND – flux IND [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$] (graf vlevo) a permeační profil TH (graf vpravo). Černý sloupec – kontrolní vzorek (0 %; Cer/VMK/Chol/CholS), bílé sloupce – membrány obsahující GS. * značí statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou.	32
Obrázek 17. Mikrostruktura modelových membrán SC. Difraktogramy kontrolní membrány (0 % GS) a membrán se zvyšujícím se podílem GS. Římskou číslicí jsou označeny fáze s dlouhou periodicitou (LPP), arabskou číslicí fáze s krátkou periodicitou (SPP), písmeny fáze s periodicitou přibližně 4,5 nm a * značí fázi separovaného Chol.	34