

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutickej technológie**

***Skin Barrier Research Group***



**HODNOTENIE SFINGOZÍNU, DIHYDROSFINGOZÍNU  
A FYTOSFINGOZÍNU  
V MODELOCH KOŽNEJ BARIÉRY**

*Diplomová práca*

**Denisa Kubátová**

**Vedúci diplomovej práce:** PharmDr. Andrej Kováčik, Ph.D.

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

***Hradec Králové 2021***

## **PodĎakovanie**

Týmto, by som sa rada poĎakovala najmä svojmu školiteľovi *PharmDr. Andrejovi Kováčikovi, Ph.D.*, za cenné a odborné rady, za ústretovosť, trpezlivosť a milý prístup počas vykonávania experimentu, a aj počas spracovania mojej diplomovej práce. VĎaka patrí taktiež konzultantovi mojej práce *PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D.* a ostatným členom *Skin Barrier Research Group*, za ich rady počas experimentálnej časti práce. Za finančnú podporu Ďakujem Grantovej agentúre Českej republiky (19-09135J) a Univerzite Karlovej (SVV 260 547).

## **Prehlásenie**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 2021

Denisa Kubátová

## Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract.....	8
3. Použité skratky .....	10
4. Úvod a cieľ práce .....	11
5. Teoretická časť .....	13
5.1 Koža .....	13
5.1.1 Význam a funkcie kože .....	13
5.1.2 Stavba kože .....	14
5.1.2.1 Dermis a tela subcutanea .....	14
5.1.2.2 Epidermis .....	15
5.1.3 Stratum corneum – rohová vrstva kože a kožná bariéra .....	16
5.2 Lipidy v stratum corneum .....	18
5.2.1 Cholesterol a cholesterol-sulfát.....	18
5.2.2 Voľné mastné kyseliny.....	19
5.2.3 Ceramidy.....	19
5.2.3.1 Biosyntéza ceramidov .....	19
5.2.3.2 Štruktúra a usporiadanie ceramidov v stratum corneum .....	20
5.3 Sfingoidné bázy .....	22
5.3.1 Sfingozín.....	24
5.3.2 Dihydrosfingozín .....	25
5.3.3 Fytosfingozín .....	25
5.3.4 6-hydroxysfingozín .....	26
5.4 Porucha kožnej bariéry pri kožných ochoreniach .....	26
6. Metodická časť.....	28
6.1 Príprava lipidových zmesí a modelových membrán.....	28
6.2 Permeačné experimenty vo Franzových celách.....	28
6.2.1 Strata vody cez membránu .....	29
6.2.2 Elektrická impedancia.....	30
6.2.3 Permeabilita modelových membrán pre teofylín a indometacín ako modelových permeantov.....	30
7. Experimentálna časť.....	32
7.1 Použité lipidy a chemikálie .....	32

7.2	Navažovanie a príprava jednotlivých lipidových zmesí .....	32
7.3	Príprava modelových lipidových membrán .....	33
7.4	Meranie bariérových vlastností modelových lipidových membrán.....	35
7.4.1	Franzove difúzne cely .....	35
7.4.1.1	Meranie straty vody cez membránu .....	37
7.4.1.2	Meranie elektrickej impedancie .....	38
7.4.1.3	Meranie permeability membrán pre teofylín a indometacín .....	38
7.5	Spracovanie dát.....	38
8.	Výsledky a diskusia .....	39
8.1	Strata vody cez membránu .....	40
8.2	Elektrická impedancia modelových membrán.....	42
8.3	Permeabilita modelových membrán pre modelové permeanty .....	44
8.3.1	Flux teofylínu.....	45
8.3.2	Flux indometacínu .....	46
9.	Záver .....	48
10.	Literatúra .....	50

## 1. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technológie

Autor: *Denisa Kubátová*

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

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

Názov diplomovej práce: **Hodnotenie sfingozínu, dihydrosfingozínu a fytosfingozínu v modeloch kožnej bariéry**

*Stratum corneum* (SC), alebo rohová vrstva kože, ktorá sa nachádza v najvrchnejšej časti epidermis, predstavuje kožnú bariéru organizmu. SC je zložené z kornecyotov a intercelulárnej lipidovej matrix, ktorú tvoria najmä ceramidy (Cer), voľné mastné kyseliny (angl. *free fatty acids*; FFA) a cholesterol (Chol) zastúpené v ekvimolárnom pomere. Látky zo skupiny sfingolipidov – Cer, sú acylované sfingoidné bázy (napríklad sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS) či fytosfingozín (P)), mastnou kyselinou (napríklad kyselinou lignocerovou (LIG)). V lipidovej matrix sa nachádzajú aj metabolické produkty Cer (voľné sfingoidné bázy), avšak ich význam na bariérové funkcie SC nie sú úplne známe. Niektoré štúdie ukazujú, že nielen jednotlivé Cer s rôznymi sfingoidnými bázami, ale aj pravdepodobne zvýšená prítomnosť voľných báz, môžu viesť k zmene permeability kožnej bariéry.

Cieľom tejto práce bolo hodnotenie vplyvu voľných sfingoidných báz na permeabilitu modelových membrán SC. Bolo pripravených dohromady deväť typov membrán líšiacich sa jednak v prítomnosti Cer (Cer NS vs. NdS vs. NP), ale aj v prítomnosti jednotlivých voľných sfingoidných báz (S vs. dS vs. P). Modelové membrány vždy obsahovali zmes FFA (C<sub>16</sub> – C<sub>24</sub>), Chol a taktiež 5 % hmotnostný podiel cholesterol-sulfátu. Prvá, kontrolná, séria obsahovala Cer NS alebo Cer NdS alebo Cer NP. V druhej sérii sa miesto Cer nachádzali ich metabolické produkty (konkrétna voľná báza) a zodpovedajúce molárne množstvo LIG, a tretiu sériu predstavoval model, kde sa nachádzali v rovnakom molárnom pomere Cer, jeho voľná báza a LIG. Prostredníctvom jednotlivých parametrov, konkrétne straty vody, elektrickej impedancie a sledovania fluxu dvoch rozdielnych permeantov – teofylínu (TH) a indometacínu (IND), boli hodnotené jednotlivé permeačné vlastnosti modelových membrán SC.

Všetky membrány obsahujúce S vykazovali oproti dS a P nižšiu priepustnosť pre vodu, nie však pre ióny. Hypotéza, že „rozbitím“ Cer dôjde k zvýšeniu priepustnosti modelových membrán SC sa potvrdila len pri membránach obsahujúcich S. Zaujímavé je taktiež, že v prítomnosti voľného dS došlo k zvýšeniu priepustnosti membrán SC pre modelové permeanty, ale v prípade voľného P sa ich priepustnosť naopak znížila. Výsledky experimentu ukázali, že pri každom type Cer dochádza k odlišnej priepustnosti pre vodu, ióny, TH a IND. Práca prispela k pochopeniu významu voľných sfingoidných báz na priepustnosť modelových membrán, čo by mohlo byť využiteľné pri štúdiu komplexných modelov simulujúcich zdravú/poškodenú kožnú bariéru.

## 2. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: *Denisa Kubátová*

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

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

Title of diploma thesis: **Study of sphingosine, dihydrosphingosine and phytosphingosine in skin barrier models**

The *stratum corneum* (SC), the uppermost layer of the skin, localized in the uppermost part of the epidermis, represents the skin barrier of the organism. SC is composed of corneocytes and an intercellular lipid matrix, which is formed by ceramides (Cer), free fatty acids (FFA), and cholesterol (Chol) in an equimolar ratio. Substances from the group of sphingolipids – Cer, are sphingoid bases (for example, sphingosine (S), dihydrosphingosine (dS), phytosphingosine (P)) acylated with a fatty acid (for example, lignoceric acid (LIG)). In the lipid matrix, the metabolic products of Cer (free sphingoid bases) are also present, but their role in SC barrier functions is not clear. Some studies show that Cer with different sphingoid bases, and increased presence of free sphingoid bases, can lead to a change in the permeability of the skin barrier.

This work aimed to study the effect of permeability of sphingoid bases on the model membrane permeability. Nine types of membranes were prepared; they differed both in the presence of Cer (Cer NS vs. NdS vs. NP) but also in the presence of free sphingoid bases (S vs. dS vs. P). In each membrane, there was always a mixture of FFA (C<sub>16</sub> – C<sub>24</sub>), Chol, and 5 % wt proportion of cholesteryl-sulfate. The first control series contained Cer NS or Cer NdS or Cer NP. In the second series, there were metabolic products of Cer (free sphingoid base) and appropriate molar amount of LIG, and the third series was a model where Cer, its free base, and LIG were found in the same molar ratio. The individual permeation markers, water loss, electrical impedance, and the flux of two different permeants – theophylline (TH) and indomethacin (IND), permeability properties of the model membranes were evaluated.



All S-containing membranes showed lower (compared to dS and P) permeability to water but not to ions. The hypothesis saying that "breaking" of Cer increases the permeability of model membranes was confirmed only for membranes containing S. It is also interesting that in the presence of free dS increased the permeability for model permeants, but in the case of free P their permeability decreased. The results of the experiment showed that for each type of Cer, there is a different permeability for water, ions, TH, and IND. The work contributed to the understanding of the importance of free sphingoid bases on the permeability of model membranes, which could be useful in the study of complex models simulating a healthy/diseased skin barrier.

### 3. Použité skratky

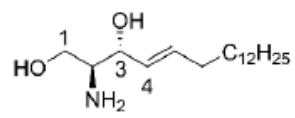
<b>AD</b>	atopická dermatitída
<b>Cer</b>	ceramid(y)
<b>dS</b>	dihydrosfingozín
<b>EI</b>	elektrická impedancia
<b>FFA</b>	voľné mastné kyseliny (z angl. <i>free fatty acids</i> )
<b>H</b>	6-hydroxysfingozín
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. <i>high-performance chromatography</i> )
<b>Chol</b>	cholesterol
<b>CholS</b>	cholesterol-sulfát
<b>IND</b>	indometacín
<b>LIG</b>	kyselina lignocerová
<b>P</b>	fyto sfingozín
<b>PG</b>	propylénglykol
<b>S</b>	sfingozín
<b>SC</b>	stratum corneum
<b>TEWL</b>	strata vody cez membránu (z angl. <i>transepidermal water loss</i> )
<b>TH</b>	teofylín

#### 4. Úvod a cieľ práce

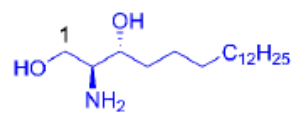
Sfingolipidy predstavujú jednu zo základných tried lipidov, ktoré môžeme nájsť v eukaryotických bunkách.[1] Ich spoločným znakom je prítomnosť sfingoidnej bázy, ktorá môže byť rôzne substituovaná. Ako ceramidy (Cer), ktoré predstavujú dominantné sfingolipidy v *stratum corneum* (SC), označujeme látky, ktoré majú na sfingoidnej báze *N*-acylovaný reťazec mastnej kyseliny.[2] Základná štruktúra Cer teda predstavuje sfingoidnú bázu, na ktorej je naviazaná mastná kyselina.

SC – najvrchnejšia časť epidermis, aj vďaka prítomnosti Cer, tvorí ochranu pred škodlivinami z prostredia, znižuje transpepidermálnu stratu vody, a podieľa sa na homeostáze epidermis a celého organizmu. Cer spolu s voľnými mastnými kyselinami (angl. *free fatty acids*; FFA) a cholesterolom (Chol), predstavujú intercelulárnu lipidovú matrix SC, ktorá je nevyhnutná pre správnu bariérovú funkciu kože. Funkciou Cer nie je len ich úloha ako stavebnej zložky epidermis, ale aj to, že sa podieľajú ako bioaktívne metabolity v biochemických procesoch a imunitnej regulácii.[3]

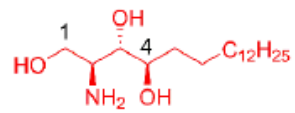
Doposiaľ ešte nebola úplne objasnená prítomnosť a aj ovplyvňovanie bariérových vlastností práve voľnými sfingoidnými bázami v kožnej bariére. Preto bolo hlavným cieľom mojej práce pripraviť modelové membrány a hodnotiť vplyv voľných sfingoidných báz na ich permeabilitu. Bolo pripravených niekoľko druhov membrán, ktoré sa líšili v zastúpení jednotlivých zložiek. Cieľom bolo skúmať najmä to, ako jednotlivé voľné sfingoidné bázy (sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS) a fytosfingozín (P); **Obrázok 1**) budú pôsobiť na permeačné parametre modelových membrán a teda hodnotiť ako sú jednotlivé modelové systémy schopné tvoriť bariéru pre vybrané druhy látok (vodu, ióny, teofylín (TH) a indometacín (IND)).



**sphingosin (S)**



**dihydrosphingosin (dS)**



**phytosphingosin (P)**

**Obrázok 1 – Vzorke sfingoidných báz využívaných v tejto práci.**

## 5. Teoretická časť

### 5.1 Koža

#### 5.1.1 Význam a funkcie kože

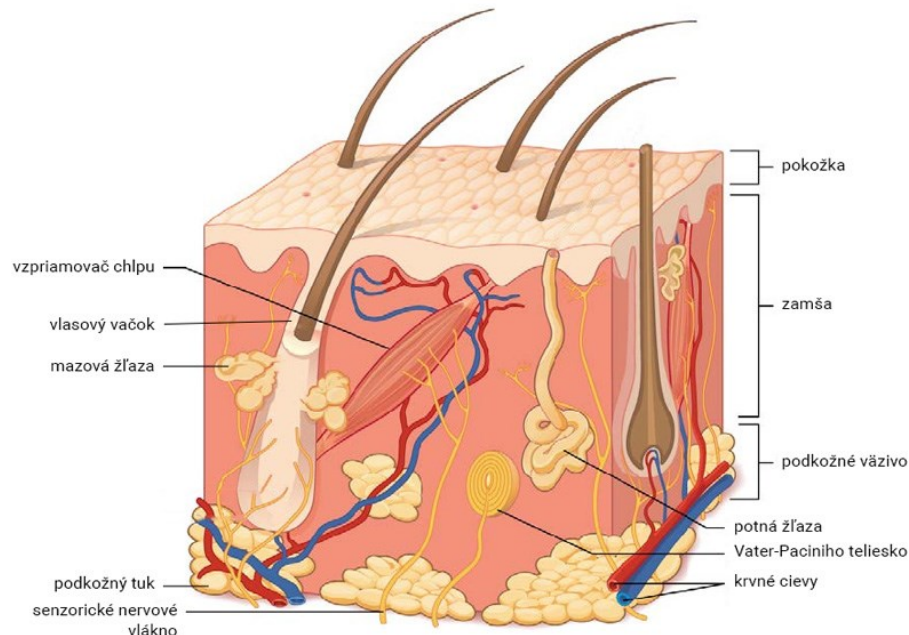
Koža (lat. *cutis*, gréc. *derma*), predstavuje rozsiahly plošný orgán, ktorý tvorí vonkajší povrch organizmu a zároveň predstavuje bariéru a ochranu organizmu voči vonkajšiemu prostrediu, a to voči fyzikálnym, chemickým či mikrobiologickým škodlivinám. Funkcie kože sú rozsiahle a predstavujú napríklad funkciu termoregulačnú, ktorá je zabezpečená pomocou potných žliaz a zmien prietoku krvi v cievnom systéme. Ďalej má koža funkciu exkrecnú (vdďaka potným a mazovým žľazám), a z malej, ale za to fyziologicky nezanedbateľnej časti, taktiež funkciu dýchaciu. Koža sa taktiež podieľa na funkciách imunitného systému. Dôležitou funkciou kože je taktiež syntéza vitamínu D, ktorá predstavuje hlavný zdroj tohto vitamínu pre ľudské organizmy.[4, 5]

Koža u dospelého človeka dosahuje plochy takmer 2 m<sup>2</sup> (priemerne 1,6 – 1,8 m<sup>2</sup>), jej hrúbka sa pohybuje v rozmedzí od 0,5 mm do 4 mm, v závislosti na oblasti tela. Najtenšia je napríklad v oblasti očných viečok a naopak najhrubšia na chrbte. Hmotnosť kože je približne 3 kg, no v extrémnych prípadoch môže dosiahnuť až 20 kg a to v prípade väčšieho podielu tukových vankúšikov.[4]

Pre správnu funkciu kože je taktiež dôležitá hodnota jej pH, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 4,1 – 5,8 a ku ktorej prispieva niekoľko mechanizmov. Niektoré štúdie hovoria, že s vekom dochádza k miernemu zvyšovaniu pH kože.[6] pH kože zabezpečuje hneď niekoľko dôležitých funkcií. Kyslá hodnota pH je dôležitá napríklad pre ochranu kože pred osídľovaním rôznymi mikroorganizmami (napríklad *Staphylococcus aureus* alebo *Malassezia sp.*). Zistilo sa ale aj to, že správne pH kože môže ovplyvňovať správnu funkciu kožnej bariéry, taktiež syntézu lipidov alebo epidermálnu diferenciáciu a deskvamáciu. Dôležité je tiež poznamenať, že niektoré enzýmy metabolizmu Cer (napríklad glukocerebrozidáza alebo kyslá sfingomyelináza) sú regulované pomocou pH.[7]

### 5.1.2 Stavba kože

Koža pozostáva z troch základných častí, a to z epidermis, dermis a tela subcutanea (**Obrázok 2**). Kožu ďalej tvoria jej deriváty, ako sú potné či mazové žľazy, vlasové folikuly, nervové zakončenia apod.[4, 8]



**Obrázok 2 – Znázornenie základných vrstiev ľudskej kože.[9]**

#### 5.1.2.1 Dermis a tela subcutanea

Tela subcutanea alebo tiež podkožné tukové väzivo, je najhlbšou vrstvou kože. Spojuje dermis s nižšie položenými tkanivami (svaly a šľachy) a je hlavne tvorené tukovými bunkami (adipocytmi) a lamelárne usporiadaným riedkym väzivom. Toto podkožné väzivo plní niekoľko funkcií, ako je napríklad funkcia ochranná alebo izolačná. Je skladištom zásobných látok (energie vo forme triglyceridov) a na niektorých miestach (dlane, chodidlá) má aj funkciu mechanickú (tlak, nárazy apod.). Najhrubšie tukové väzivo sa nachádza na bruchu alebo stehnách a naopak z cely chýba na očných viečkach, alebo na ušných lalôčkoch.[4, 8]

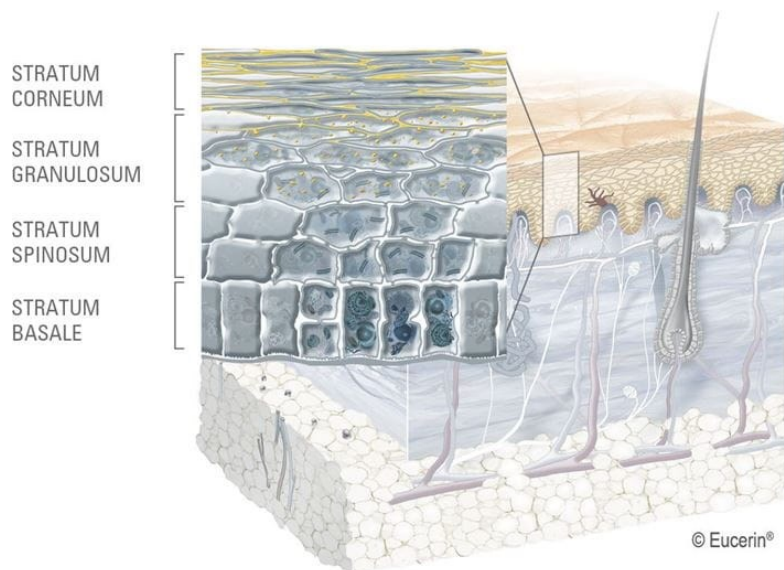
Dermis (zamša) je stredná vrstva kože a je zložená z väziva s kolagenovými a elastickými vláknami, čo zaručuje dermis dostatočnú pružnosť aj pevnosť. Jej hrúbka sa pohybuje v rozmedzí 0,6 – 3,0 mm, a má dve základné vrstvy, a to povrchovú

vrstvu – **stratum papillare** a hlbšiu vrstvu – **stratum reticulare**. V dermis sa nachádzajú nervové zakončenia, vlasové folikuly a taktiež mazové či potné žľazy.[4, 8]

#### 5.1.2.2 Epidermis

Najvrchnejšou a najtenšou vrstvou kože je epidermis. Jej hrúbka je od 0,3 mm do 1,5 mm a je tvorená najmä kožnými bunkami – keratinocytmi a bunkami viacvrstvého rohovatejúceho dlaždicového epitelu. V epidermis sa nachádzajú aj iné bunky, ako napríklad melanocyty (ktoré zabezpečujú pigmentáciu), Langerhansove bunky (podieľajú sa na imunitných reakciách), alebo Merkelove bunky (zabezpečujúce zmyslovú funkciu ako mechanoreceptory).[8] Hrúbka epidermálnej vrstvy, ktorej doba obnovy trvá približne dva týždne, závisí na niekoľkých faktoroch. Jednak je to jej lokalizácia, ďalej mechanická stimulácia, a istým spôsobom sú to taktiež genetické faktory.[10]

Epidermis sa delí na 4–5 základných vrstiev (**Obrázok 3**). Najspodnejšou vrstvou, ktorá tvorí rozhranie medzi epidermis a dermis je **stratum basale**, pre ktorú sú typické palisádovo radené cylindrické keratinocyty, ktoré majú veľké jadrá a malé množstvo cytoplazmy. Nad touto vrstvou sa nachádza ďalšia vrstva, a to konkrétne **stratum spinosum**, ktorá je charakterizovaná ostnintým tvarom keratinocytov, ktoré majú väčší objem a smerom k povrchu sú oploštené. Keratinocyty dolnej časti spolu s časťou buniek bazálnej vrstvy majú schopnosť deliť sa. V hornej časti **stratum spinosum** dochádza k premene keratinocytov prakticky na keratín, a teda môžeme povedať, že tu začína proces diferenciácie. Ďalšími vrstvami, ktoré sa nachádzajú vyššie nad uvedenými, sú **stratum granulosum** (tvorené 1 až 3 radami oploštených buniek) a **stratum lucidum** (tvoriace prechod medzi nezrohovatenou epidermis a **stratum corneum**). Nachádzajú sa tu prekursor keratínu (granule keratohyalínu), a bunky, ktoré sú označované ako tranzitné keratinocyty, ktoré strácajú jadro aj organely. Dá sa povedať, že primárnou funkciou epidermis, je produkcia ochrannej a polopriepustnej **stratum corneum**. [4, 8, 11] Ide o najvrchnejšiu vrstvou epidermis, alebo tiež povedané rohová vrstvu kože.



**Obrázok 3 – Znáznornenie jednotlivých vrstiev ľudskej epidermis – stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum.[12]**

### 5.1.3 Stratum corneum – rohová vrstva kože a kožná bariéra

Rohová vrstva kože, teda SC, je zložená z úplne zrohovatených buniek, tzv. **korneocytov**, ktoré sú bez jadra. Tieto korneocyty sú v koži uložené v približne 15–20 vrstvách, a v podstate sa jedná o odumrelé bunky.[4] Medzi týmito korneocytmi, v extracelulárnom priestore, sa nachádzajú vysoko usporiadané lipidy, ktoré vytvárajú tzv. **lipidovú matrix**. V jednoduchosti môžeme povedať, že kožná bariéra je tvorená bunkami ktoré do seba zapadajú (korneocyty) s tzv. nepriepustnou korneocytárnou obálkou a je obklopená lipidovou hmotou. Takéto usporiadanie taktiež pripomína tzv. „maltu (= matrix) a tehly (= korneocyty)“. Korneocytárna obálka v tomto prípade tvorí hranicu medzi korneocytmi a lipidovou matrix.[13] Korneocyty zabezpečujú mechanickú podporu, chránia bunky pred UV poškodením či regulujú zápal. Lipidová matrix sa podieľa na regulácii permeability, deskvamácii, a má taktiež antimikrobiálnu aktivitu.[14, 15]

Lipidy v SC sú v ekvimolárnom pomere zložené z Cer, FFA a Chol. Menšie zastúpenie má taktiež cholesterol-sulfát (CholS).[16, 17] Zaujímavosťou je, že v SC sa nenašli, na rozdiel od fosfolipidových bunkových membrán, žiadne fosfolipidy.[18] SC spolu s lipidovou matrix predstavujú zásadnú rolu vo funkcii kožnej bariéry.[17-19] Táto kožná bariéra je nevyhnutá pre život cicavcov na súši a zabezpečuje ochranu pred nadmernou stratou vody. Lipidy SC taktiež chránia pred vstupom rôznych škodlivých a cudzorodých častíc do organizmu, čím

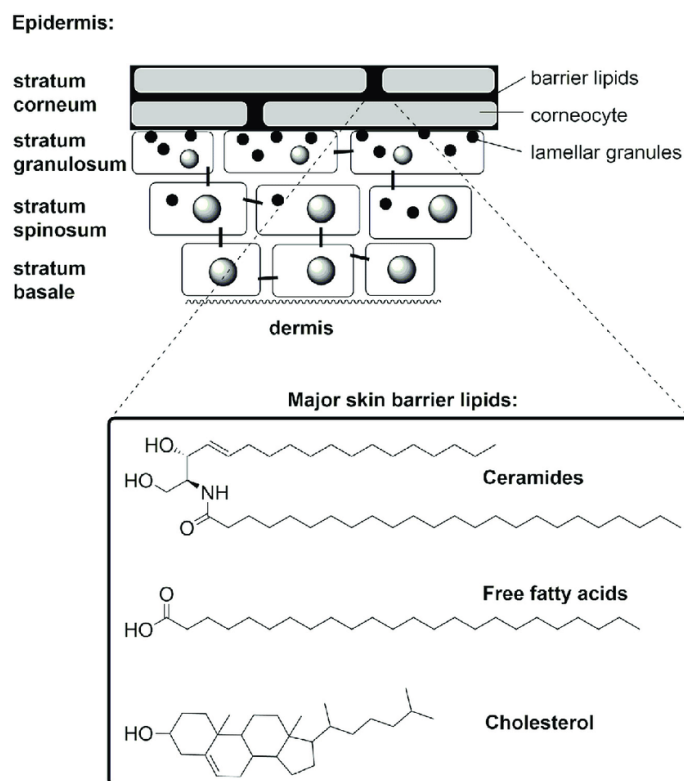


sa podieľajú na udržaní homeostázy – teda stálosti vnútorného prostredia.[2, 20] Príkladom dôležitosti lipidovej matrix je taktiež fakt, že u rôznych kožných ochorení sú pozorované zmeny zloženia a usporiadania lipidov v SC.[19, 21] Taktiež určité genetické zmeny v metabolizme lipidov v SC vedú ku abnormálnej lipidovej štruktúre a zníženiu jej bariérovej funkcie.[11]

Kožná bariéra predstavuje bariéru rovnako aj pre vstup liečiv do organizmu. Jedným z možných prestupov xenobiotík je transcelulárny prenos, ktorý je sprostredkovaný skrz korneocyty. Tento prestup je obtiažný, no môže byť uľahčený zvýšením vody v SC. Korneocyty nasávajú vodu, bobtnajú a dochádza k zníženiu viskozity lipidov a taktiež k porušeniu integrity lamiel. To nastáva vďaka prítomnosti hydrofilných aminokyselín v korneocytoch, ktoré majú funkčné skupiny vhodné pre viazanie vody (napríklad -COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH). Významnejší prenos xenobiotík je tzv. paracelulárny prenos, pri ktorom xenobiotikum postupuje cez lamely lipidovej matrix a „obchádza“ korneocyty. K tomu, aby bol prenos xenobiotika možný, je nutné, aby malo xenobiotikum (permeant) vhodné fyzikálne-chemické vlastnosti (molekulovú hmotnosť, rozdeľovací koeficient a schopnosť interagovať s vodíkovými mostíkmi).[22]

## 5.2 Lipidy v stratum corneum

Hlavnými lipidmi, ktoré sa nachádzajú v lamelách SC sú Cer, FFA a Chol [23] (**Obrázok 4**).



**Obrázok 4 – Znáozornenie jednotlivých vrstiev epidermis spolu s tromi základnými typmi lipidov SC.[2]**

### 5.2.1 Cholesterol a cholesterol-sulfát

Základným sterolom v lipidovej matrix je Chol. Je nevyhnutný pre správnu funkciu bariérovej funkcie pokožky, prispieva k tekutosti lipidov a taktiež k ich správnej lamelárnej a laterálnej štruktúre.[2] V zdravej pokožke predstavuje 25 wt % a jeho syntéza je dôležitá pre homeostázu epidermis, avšak jeho úloha v permeabilite SC zatiaľ nie je úplne známa.[24, 25] Dokonca bolo zistené, že pomer 0,4:1:1 mol (Chol/Cer/FFA) v ľudskej SC je dostatočný na to, aby sa zabránilo strate vody, a predpokladá sa, že Chol v SC zohráva podstatnejšiu úlohu ako len zamedzovať strate vody či vstupu škodlivín z prostredia.[25]

CholS je sodná soľ síranového esteru Chol. Môžeme ho rovnako ako Chol nájsť v SC a predstavuje približne 5 % hmotnosti všetkých lipidov SC. Jeho úloha zatiaľ nie je úplne objasnená, ale predpokladá sa, že zabezpečuje akúsi súdržnosť SC a taktiež prispieva

k regulácii deskvamácie, teda odlupovaniu vrchných častí epidermis, teda korneocytov zo SC.[2]

### 5.2.2 Voľné mastné kyseliny

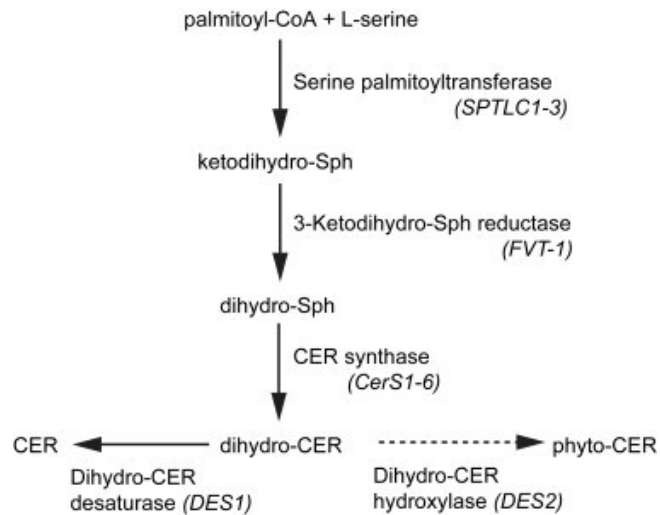
FFA predstavujú taktiež jednu zo základných zložiek lipidovej matrix SC. Sú to karboxylové kyseliny o dĺžke 14–34 uhlíkov. Najviac zastúpenými FFA v SC, ktoré tvoria až 50 % všetkých FFA, sú kyselina lignocerová (LIG) o dĺžke 24 uhlíkov a taktiež kyselina cerotová o dĺžke 26 uhlíkov.[2, 26] Je dôležité povedať, že väčšina FFA v SC je nasýtená a nerozvetvená, no naopak FFA ktoré sú kratšie a sú nenasýtené (tzn. majú vo svojej molekule násobné väzby), nachádzame v SC pri patologických dejoch, akým je napríklad atopická dermatitída.[2]

### 5.2.3 Ceramidy

Poslednou skupinou lipidov, ktorá má svoje najväčšie zastúpenie v SC sú Cer. Cer predstavujú približne 50 % všetkých lipidov, ktoré nachádzame v SC. Cer patria do skupiny sfingolipidov. Cer sú charakterizované sfingoidnou bázou, ktorá je rôzne substituovaná a ktorá je *N*-acylovaná reťazcom mastnej kyseliny [2] (viď nižšie).

#### 5.2.3.1 Biosyntéza ceramidov

Vznik Cer môže prebiehať rôznymi spôsobmi. Jedným z nich je biosyntéza Cer *de novo* v bunkách cicavcov (**Obrázok 5**), ktorá prebieha v endoplazmatickom retikule a pozostáva z niekoľkých krokov. V prvom kroku syntézy dochádza ku kondenzácii serínu a palmitoyl-CoA za vzniku 3-ketodihydrosfingozínu, ktorý je následne redukovaný na dS. dS je následne acylovaný za vzniku dihydro-Cer. Pomocou enzýmu desaturázy môže dôjsť k zavedeniu dvojnej väzby do molekuly a tak vzniku S-Cer. V prípade, že dochádza k hydroxylácii pomocou špecifického enzýmu hydroxylázy, dochádza k zavedeniu hydroxylovej skupiny a tak vzniku Cer s P – (fyto-Cer).[27]



**Obrázok 5 – Zobrazenie zjednodušenej schémy biosyntézy Cer de novo – z palmitoyl-CoA a serínu vzniká keto-derivát, z ktorého vzniká dihydrosfingozín a ďalej dihydro-Cer, z ktorých sa syntetizuje dihydro-Cer (desaturázou), resp. fyto-Cer (hydroxylázou). [27]**

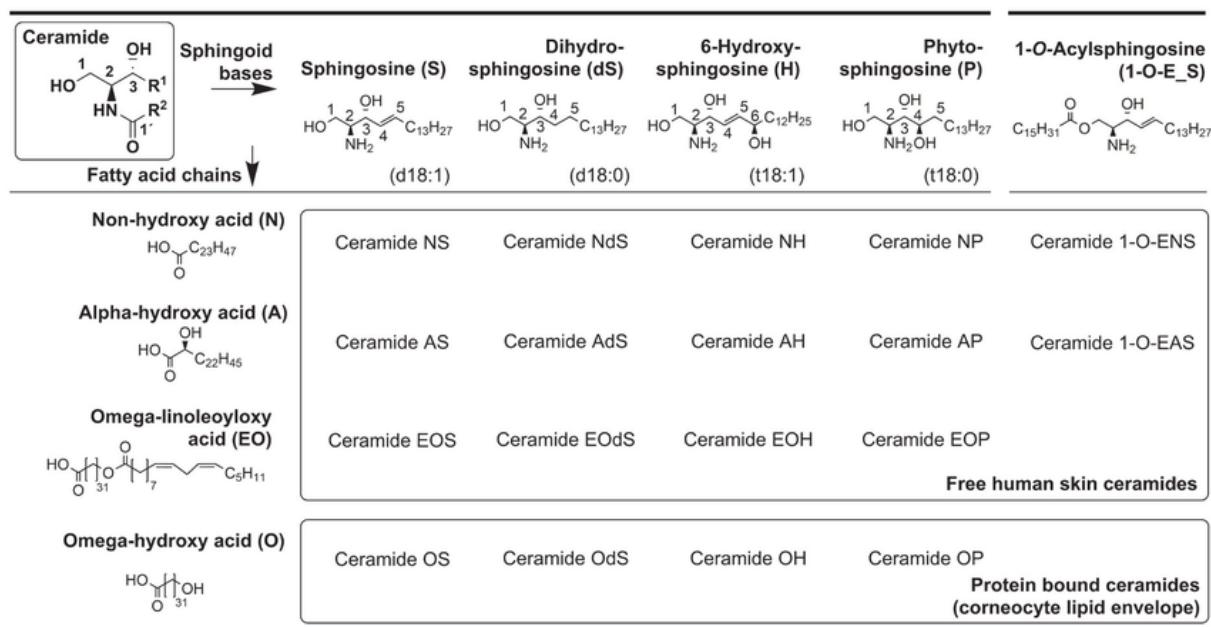
Iný spôsob, ako môže dôjsť k vzniku Cer, je hydrolýza sfingomyelínu v plazmatickej membráne na Cer, a to pomocou enzýmu sfingomyelinázy, ktorá je aktivovaná rôznymi bunkovými podnetmi. Ďalšou možnosťou vzniku Cer je hydrolytický rozpad glukozylceramidu a galaktozylceramidu, ktoré sú následne pomocou špecifických enzýmov metabolizované na Cer. Nové zistenia hovoria aj o ďalšej možnosti, kedy pri štiepení sfingolipidov, dochádza ku vzniku sfingozínu, ktorý je následne acylovaný na Cer. Jedná sa o tzv. sfingolipidovú recyklačnú cestu. [28]

### 5.2.3.2 Štruktúra a usporiadanie ceramidov v *stratum corneum*

Doposiaľ bolo opísaných 15 podtried Cer, ktoré sa líšia napríklad rôznymi dĺžkami reťazcov. Zjednodušene si Cer môžeme predstaviť ako molekulu, ktorá je zložená z polárnej hlavy a dvoch hydrofóbných reťazcov. Jeden hydrofóbný reťazec predstavuje sfingoidnú bázu a ten druhý acyl mastnej kyseliny, ktorý je naviazaný na sfingoidnú bázu pomocou amidickej väzby. Ak by sme teda v krátkosti chceli vyjadriť názov, týchto zlúčenín, jednalo by sa o *N*-acylsfingozíny.

Sfingoidné bázy (ktoré budú popísané v ďalších kapitolách), predstavujú zvyčajne 18 uhlíkový aminoalkohol a môže ísť konkrétne o S, dS, P, alebo 6-hydroxysfingozín (H). Acyl mastnej kyseliny tvoria buď dlhé (24 uhlíkové) alebo ultradlhé (30 – 32 uhlíkové) reťazce. Acyly

týchto mastných kyselín môžu byť buď bez substitúcie (N), alebo  $\alpha$ -hydroxylované (A) či  $\omega$ -hydroxylované (O).  $\omega$ -hydroxylované acyly nachádzame u Cer, ktoré majú ultradlhý reťazec a na  $\omega$ -hydroxyl môže byť ešte naviazaná kyselina linoleová (EO), alebo zvyšky glutamátových proteínov, ktoré sa nachádzajú na povrchu korneocytov. Bola však aj objavená nová skupina Cer, ktorá má tri hydrofóbne reťazce a kde je tretí reťazec spojený esterovou väzbou s primárnym hydroxylom v polohe jedna sfingoidnej bázy (1-O-E).[2] Na **Obrázku 6** môžeme vidieť uvedené jednotlivé vzorce spomínaných komponent Cer. Názvoslovie vzniklo kombináciou jak sfingoidnej bázy (S, dS, P alebo H) tak acylu mastnej kyseliny (N, A, O, alebo EO) a je definované podľa Motty a kol.[29]



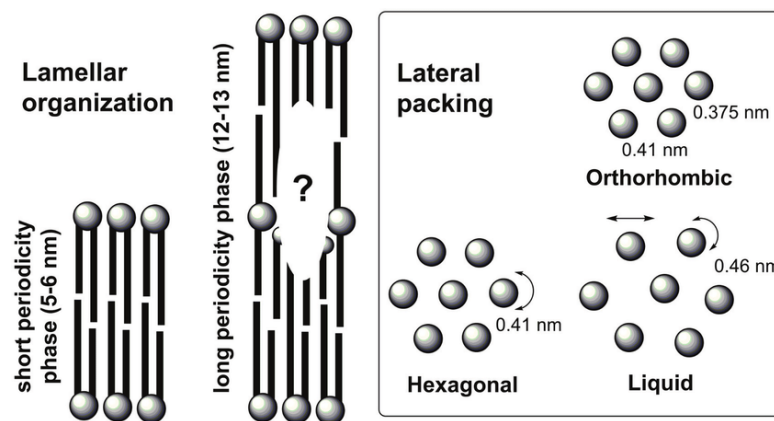
**Obrázok 6 – Zobrazenie jednotlivých štruktúrnych typov Cer a ich názvoslovie.[2]**

Pre správnu funkciu kožnej bariéry je samozrejme dôležité aj jednotlivé usporiadanie lipidov v intracelulárnom priestore SC. V ostatných membránach buniek nachádzame klasické usporiadanie fosfolipidovej dvojvrstvy, ktoré však u SC chýba. Pre SC je totiž charakteristické multilamelárne usporiadanie lipidových reťazcov, kde sú tieto lamely ukotvené na povrchu korneocytov. V porovnaní s fosfolipidmi majú lipidy SC malú polárnu hlavu a dlhé hydrofóbne reťazce, ktoré sú nasýtené a prevláda u nich *all-trans* konformácia.[2]

Vlastnosťou lamelárne usporiadaných lipidov je tvorba tzv. dlhej lamelárnej fázy (angl. *long periodicity phase*) s opakujúcou sa vzdialenosťou lamiel 11,9 – 13,1 nm, ktorá bola potvrdená aj röntgenovou difrakciou. Štúdie ukazujú ale aj prítomnosť tzv. krátkej periodickej

fázy (angl. *short periodicity phase*) s opakujúcou sa vzdialenosťou 5,3 – 6,4 nm (**Obrázok 7**). Reťazce lipidov v lamách SC môžu vytvárať dve konformácie, a to buď tzv. vlásenkovú (uzatvorenú), kde oba reťazce sú vedľa seba, alebo otvorenú konformáciu, kde reťazce Cer smerujú do opačného smeru.[2]

Laterálne usporiadanie lipidov v SC môžeme rozdeliť na tri typy. Prvé z nich je tzv. orthorhombické, ktoré je charakterizované veľmi tesným spojením a obmedzenou rotáciou lipidových molekúl. Druhé usporiadanie je hexagonálne, kde je možná väčšia možnosť otáčania lipidov v mriežke a tretie usporiadanie je kvapalné (fluidné) usporiadanie, kde je možnosť otáčania najväčšia (**Obrázok 7**). Pri fyziologickej teplote kože (32 °C) prevláda u lipidov SC ľudských organizmov orthorhombické usporiadanie. Toto usporiadanie je nutné k správnej funkcii SC ako bariéry.[2, 30]



**Obrázok 7 – Zobrazenie lamelárneho a laterálneho usporiadanie lipidov v membránach SC.[2]**

### 5.3 Sfingoidné bázy

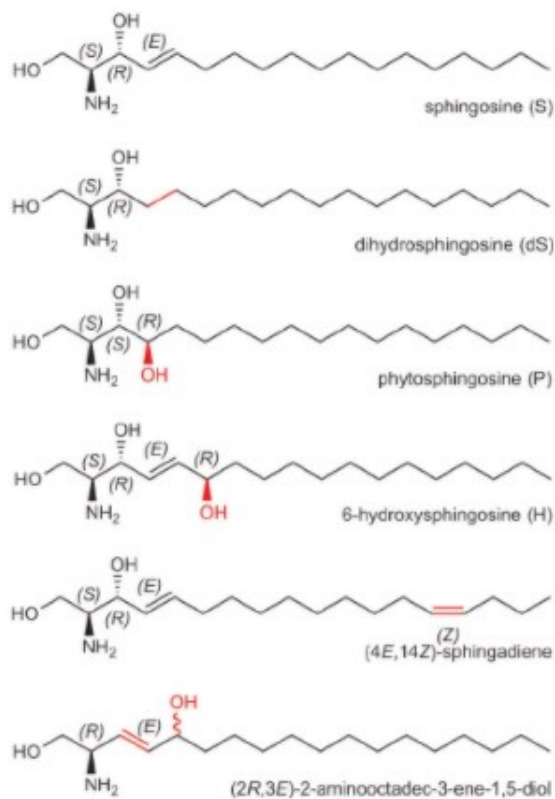
Hlavnou súčasťou sfingolipidov, a teda súčasne aj Cer, sú sfingoidné bázy. Často sa stretne s označením „bázy s dlhým reťazcom“, čo charakterizuje ich zvyčajne 18 uhlíkový reťazec. Po chemickej stránke sa jedná o aminoalkoholy a niekedy sa im súhrne hovorí aj sfingozíny, podľa prvej izolovanej bázy.[18, 31] Prvou objavenou (nemeckým chemikom J. L. W. Thudichom) sfingoidnou bázou bol už v roku 1884 sfingozín, ktorý nesie meno po sfinge, a to práve kvôli tajomnému chovaniu, ktoré oba tieto subjekty v sebe ukrývajú.[18, 32] Voľné sfingoidné bázy sú jednak prekursorom pre vznik Cer, a zároveň, pôsobením enzýmov ceramidáz na určité typy Cer, dochádza v SC k ich uvoľneniu.[33] Existujú štúdie, ktoré

potvrdzujú prítomnosť voľných sfingoidných báz v epidermis [34-36], a ich vyššie množstvo oproti iným tkanivám.[37] Približné množstvo vzhľadom k všetkým lipidom v SC činí 5 až 6 %.[38]

Pre ľudí typické sfingoidné bázy zaraďujeme S a dS (často označovaný aj ako sfinganín), ktoré sa nachádzajú vo všetkých ľudských tkanivách. V mozgu, obličkách, pečeni a koži nachádzame P. Báza, ktorá sa nachádza len v koži, je H. V súčasnosti sú popísané aj ďalšie typy báz, napríklad (4*E*,14*Z*)-sfingadién či (2*R*,3*E*)-2-aminooctadec-3-én-1,5-diol, ktoré sa však v ľudskej epidermis nenachádzajú.[18] Navyše bol v ľudskej epidermis detekovaný nový typ sfingoidnej bázy obsahujúci štyri hydroxylové funkčné skupiny.[39] Na **Obrázku 8** sú zobrazené vzorce spomínaných sfingoidných báz.

Je vhodné poznamenať, že sfingoidné bázy nenachádzame len v epidermis, ale aj napríklad v cerumene, slinách, v materskom mlieku, krvi či na povrchu ústnej dutiny. Ich vlastnosťou je, že preukazujú antibakteriálnu, antivírusovú, anitiparazitickú ale aj protiplesňovú aktivitu. S, dS a aj P vykazujú širší rozsah aktivity proti baktériám aj proti kvasinkám.[40] Existuje teda možnosť, že exogénne dodanie voľných báz do pokožky, môže priniesť novú terapeutickú možnosť a poskytnúť tak aj profylaxiu u ľudí, u ktorých hrozí potenciálna infekcia.[33] Sfingoidné bázy nachádzame okrem živočíchov aj u húb, rastlín, hmyzu, vodných organizmov a taktiež u niektorých druhov baktérií (rody *Sphingomonas* a *Bacterioides*).[31, 32]

Hladiny voľných sfingoidných báz a Cer je taktiež predmetom skúmania v súvislosti s rôznymi kožnými ochoreniami. Tejto problematike sa venuje **kap. 5.4**.



**Obrázok 8 – Zobrazenie sfingoidných báz prítomných v ľudských tkanivách.[18]**

### 5.3.1 Sfingozín

Sfingozín, prvá objavená a popísaná sfingoidná báza, má chemický vzorec (2S,3R,4E)-2-amino-octadec-4-en-1,3-diol.[32] Jedná sa o nenasýtený aminoalkohol, ktorý obsahuje dve hydroxylové skupiny a jednu dvojitú väzbu. Ak dôjde v polohe 2 k naviazaniu FFA, dochádza ku vzniku Cer. Ako bolo spomínané vyššie, túto sfingoidnú bázu môžeme nájsť vo všetkých ľudských tkanivách.[18] Katabolizmom Cer dochádza prostredníctvom ceramidáz ku vzniku S. Ten je následne pomocou sfingozínkináz fosforylovaný na sfingozín-fosfát (zvýšená expresia receptorov pre sfingozínkinázy a sfingozín-fosfát je zistená v nádorových bunkách[41]), a k jeho úplnému rozkladu dochádza v endoplazmatickom retikule pomocou sfingozín-1-fosfát-lyázy.[42] Ak by sme chceli poukázať na vlastnosti S, ktoré priamo nesúvisia s SC, mohli by sme napríklad spomenúť jeho úlohu ako bioaktívnej molekuly. S plní úlohu druhého posla, a je zahrnutý do rôznych bunkových procesov, ako napríklad proliferácie, diferenciácie, zápalu či apoptózy.[32] Môžeme spomenúť aj jeho inhibičný vplyv na autofosforyláciu tyrozínkinázového inzulínového receptora a inhibície kalmodulin



dependentnej proteinkinázy C.[43] Vlastnosťou S je taktiež ovplyvnenie prepúšťania určitých látok cez membrány. Ukázalo sa totiž, že S robí fosfolipidovú vrstvu v plazmatických membránach priepustnejšou a tak dochádza k úniku bunkových vezikúl. S má pri fyziologickom pH totiž kladný náboj a tak môže interagovať s negatívne nabitými fosfolipidmi.[44, 45] Jeho ďalšou vlastnosťou je už spomínané antimikrobné pôsobenie.[40]

### 5.3.2 Dihydrosfingozín

Po chemickej stránke je dihydrosfingozín – (2*S*,3*R*)-2-aminooktadekan-1,3-diol (**Obrázok 8**). Od S sa líši neprítomnosťou dvojitej väzby, a rovnako ako S, ho nachádzame vo všetkých tkanivách ľudského organizmu.[18, 32] dS je považovaný za medziprodukt syntézy Cer a hrá taktiež dôležitú úlohu v rôznych reakciách a procesoch v živých bunkách [46] a zároveň má tiež istú antimikrobiálnu aktivitu.[40] Okrem dôležitosti dS v epidermis ako súčasť Cer je napríklad zaujímavé jeho zvýšené intracelulárne množstvo (spolu s dihydro-Cer) pri liečbe rakoviny  $\gamma$ -tokotrienolom, na rozdiel od S a Cer-S.[47]

### 5.3.3 Fytosfingozín

Ďalšou bázou, ktorej je vhodné venovať pozornosť, je fytosfingozín (P) s chemickým vzorcom (2*S*,3*S*,4*R*)-2-aminooktadekan-1,3,4-triol. Na rozdiel od dS má navyše jeden hydroxyl v polohe 4.[32] Jeho názov naznačuje, že patrí do skupiny lipidov, ktoré sú rozšírené najmä v rastlinnej ríši či u kvasiniek. Rovnako ako predchádzajúce spomínané sfingoidné bázy, poskytuje po jeho fosforylácii na fytosfingozín-fosfát dôležitú signálnu molekulu v bunkovej signalizácii. Práve zavedenie ďalšieho hydroxyly u fyto-Cer pravdepodobne dochádza k silnejšej lipidovej sieti v membráne, a to vďaka zvýšeniu množstva vodíkových väzieb v medzifázovej oblasti membrán SC.[42] Fyziologické úlohy P v epidermis zatiaľ nie sú úplne prebádané. Je však zaujímavé, že P vykazuje určité protizápalové vlastnosti spolu so zastavením rastu keratinocytov, čo môže mať prínos v liečbe kožných ochorení.[48] Dôležité sú aj jeho vlastnosti nesúvisiace s epidermis a kožnou bariérou, ako napríklad zistená schopnosť P indukovať bunkovú smrť ľudských rakovinových buniek.[49]

#### 5.3.4 6-hydroxysfingozín

Poslednou bázou, ktorá síce nebola predmetom tejto diplomovej práce, no je vhodné ju spomenúť, je H. Chemicky sa jedná o (2S,3R,4E,6R)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol. Táto báza, objavená v roku 1994, s tromi hydroxylovými skupinami nie je ešte z celia preskúmaná, nie je ani komerčne dostupná a nachádza sa len v ľudskej epidermis. Je však pozorované zníženie množstva Cer-H u pacientov s atopickou pokožkou.[18] Cer-H sa v modeloch kožnej bariéry chová odlišne oproti Cer-S či Cer-P, a to napríklad v schopnosti vo vytváraní dlhej opakujúcej lamelárnej fázy (čo je typické len pre ultradlhé Cer), či zníženej permeability pre ióny.[50]

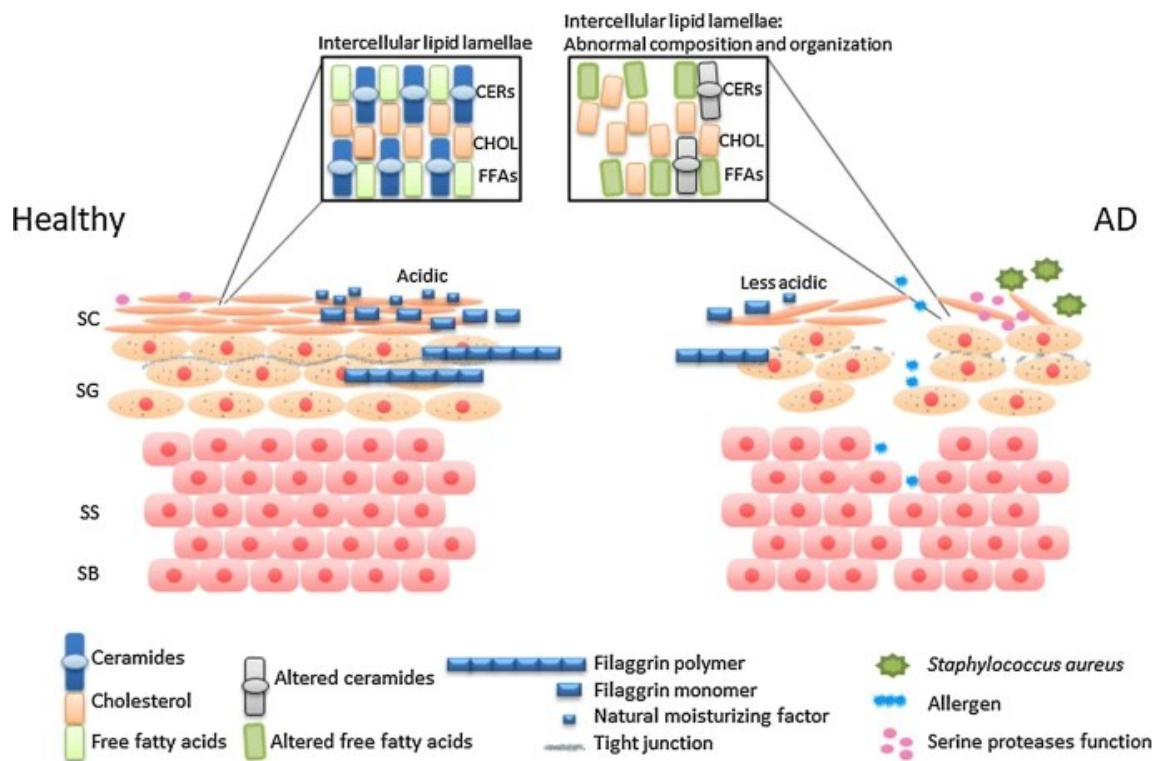
### 5.4 Porucha kožnej bariéry pri kožných ochoreniach

Kožné ochorenia predstavujú rozsiahlu skupinu ochorení, ktoré zahŕňujú napríklad atopickú dermatitídu (AD), psoriázu, ichtyózu či xerózu. Táto oblasť je predmetom skúmania rôznych štúdií, ktoré sa zaoberajú napríklad poruchou kožnej bariéry. Pokiaľ dôjde k modifikácii či zmene zloženia kožných lipidov, môže to viesť k strate všetkých dôležitých funkcií kožnej bariéry. Je známe, že ak je prítomné jedno zo spomínaných kožných ochorení, dochádza k zníženiu hladiny Cer, a taktiež k zmene tzv. Cer profilov.[51] Pri topickej aplikovaní Cer (vo forme krému) dochádza ku zvýšenej hydratácii pokožky a k zlepšeniu jej bariérových vlastností.[52]

Pri AD, ktorá sa považuje za najbežnejšie chronické zápalové ochorenie kože a má tiež istý dedičný podklad [53], môže dôjsť k narušeniu SC aj neprimeraným škrabaním plôch, ktoré sú zasiahnuté a pacientov svrbia. Je potvrdené, že atopická pokožka vykazuje zhoršené bariérové funkcie (**Obrázok 9**), čo naznačuje zvýšená transepidermálna strata vody (angl. *trans-epidermal water loss*, TEWL). Rovnako je u týchto pacientov zvýšená expresia enzýmu sfingomyelin-deacylázy, dochádza tak k zvýšenej degradácii prekursorov Cer, a tak zníženej prítomnosti Cer (napríklad Cer EOS). Rovnako aj u iných ochorení kože, napríklad pri psoriáze dochádza ku zvýšeniu TEWL oproti zdravému SC.[54, 55]

Existujú štúdie, ktoré hovoria taktiež o zmene pomeru voľných sfingoidných báz v nefyziologickej SC. Jedná sa napríklad o štúdiu [38], ktorá hovorí, že pri AD dochádza u zvýšení voľného S, no naopak zníženiu voľného dS a taktiež k určitej zmene laterálnej

štruktúry lipidových lamiel SC. Iné štúdie hovoria, že pri psoriáze a AD dochádza ku zvýšeniu obidvoch spomínaných voľných sfingoidných báz a taktiež k zvýšeniu TEWL [56, 57], ktorá so zmenou hladín voľných sfingoidných báz súvisí. Táto oblasť však ešte nie je z celá preskúmaná, a neexistujú v tejto problematike konzistentné výsledky.



**Obrázok 9 – Zobrazenie porušenia kožnej bariéry pri AD.[58]**

## 6. Metodická časť

V tejto kapitole sú všeobecne opísané jednotlivé metódy, ktoré sa pri hodnotení modelových membrán využívajú a ktoré tiež boli použité pri experimente. Všetky popísané metódy sú validované a zároveň publikované pracovnou skupinou *Skin Barrier Research Group*. [50, 59, 60]

### 6.1 Príprava lipidových zmesí a modelových membrán

Modelové lipidové membrány (v podobe tenkých filmov) sa pripravujú nastrekovaním jednotlivých lipidových zmesí. V prvom kroku je nutné lipidy navážiť, rozpustiť v organickom rozpúšťadle a takto pripravené roztoky rozdeliť v molárnom pomere 1:1:1 (Cer, FFA, Chol). Cer zložka môže byť nahradená iným sfingolipidom, napr. S či dS. Zložka mastných kyselín obsahuje jednu (LIG, najviac zastúpená v SC [26]), ale často zmes mastných kyselín. Pomery jednotlivých zložiek sa môžu meniť v závislosti na dizajnu experimentu. Vzniknuté roztoky (lipidové zmesi) sa zahustia (odstráni sa rozpúšťadlo) a vysušia.

Suché lipidové zmesi sa potom rozpustia vo vhodnom rozpúšťadle a nastrekujú vo forme organických roztokov prostredníctvom prístroja Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švajčiarsko), a to na podporné filtre, ktoré uľahčujú manipuláciu s lipidovými filmami. Prístroj pracuje pod prúdom dusíka a správne nastrekovanie na filtre je možné vďaka tomu, že je vybavený ďalším ramenom, ktorý zabezpečuje pohyb po ose y. [60] Lipidové membrány, po celú dobu nastrekovania uchytené v kovových držiakoch, sú následne vysušené v exsikátore a zahriate v elektrickej peci nad teplotu fázového prechodu jednotlivých zložiek; po vychladnutí sú membrány vložené do termostatu, kde sa uchovávajú do času konania permeačného experimentu.

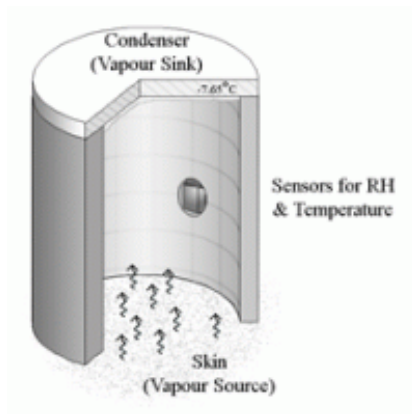
### 6.2 Permeačné experimenty vo Franzových celách

Jednotlivé permeačné parametre sa hodnotia prostredníctvom Franzových difúzných ciel. Franzové difúzne cely pozostávajú z dvoch častí – a to vrchnej (donorovej) a spodnej (akceptorovej) časti. Vrchná časť cely slúži na možnú aplikáciu permeantov, alebo meranie

dermatologických parametrov, napr. stratu vody. Spodná časť, ktorá obsahuje ramienko, slúži jednak na naplnenie Franzovej cely médiom (najčastejšie pufrom), a následne na odoberanie vzoriek (permeantov, ktoré prešli z donorovej časti do média) a ich ďalšie spracovanie. Súčasťou spodnej časti býva aj magnetické miešadlo, ktoré umožňuje premiešavanie a teda homogenitu obsahu. Medzi jednotlivé časti sa nachádzajú teflónové držiaky na umiestnenie modelových membrán. Difúzna oblasť v tvare centrálného kruhu má rozmer  $0,5 \text{ cm}^2$ . Pripravené Franzové cely s membránami je následne nutné umiestniť do magnetickej vane, vytemperovanej na  $32 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , čo predstavuje fyziologickú teplotu kože. Po približne 12 hodinovej ekvilibracii sa môže prejsť k meraniu straty vody a elektrickej impedancie.[59]

### 6.2.1 Strata vody cez membránu

Strata vody známa pod skratkou TEWL je parameter, ktorý je jeden zo základných ukazovateľov funkcie kožnej bariéry.[61] Tento parameter je možné merať prostredníctvom prístroja AquaFlux (Aquaflux AF200, Biox, UK). AquaFlux sa využíva najmä v dermatológii, pretože práve nadmerná strata vody skrz SC môže byť jedným z indikátorov poškodenej bariérovej funkcie. Uzatvorená komora Aquafluxu obsahuje senzory pre relatívnu vlhkosť a teplotu a zároveň meria odparovanú vodu z povrchu membrány. Kondenzátor nepretržite odvádza vodnú paru a ukladá ju ako ľad (**Obrázok 10**). Výsledný gradient vlhkosti sa vypočíta z dvoch nameraných hodnôt, ktoré boli namerané v dvoch priestorovo oddelených bodoch.[62] Prístroje s uzatvorenými komorami sú výhodné a to vďaka ich odolnosti voči vonkajším pohybom vzduchu.[61] Podmienky prostredia, pri ktorých meranie prebieha, by mali byť konštantné.[63] Pred samotným meraním je nutná kalibrácia prístroja. Gradient vlhkosti sa použije k výpočtu hustoty toku, tj. určí sa hmotnosť vody, ktorá prešla skrz membránu, vztiahnutá na časový interval a plochu membrány  $[\text{g}/\text{h}/\text{m}^2]$ .



**Obrázok 10 – Zobrazenie metódy kondenzátorovej komory TEWL.[64]**

### 6.2.2 Elektrická impedancia

Elektrickou impedanciou sa označuje odpor membrány [ $k\Omega$ ], ktorý je kladený striedavému prúdu a je vzťahnutý na jednotku jej plochy [ $k\Omega \times \text{cm}^2$ ]. Je to odpor, ktorý je nepriamo úmerný priepustnosti pre nabité častice, hlavne ióny. Tento parameter sa využíva k vyhodnocovaniu jak integrity, tak napr. neporušenosti pokožky.[65] Pre jeho meranie sa používa prístroj LCR 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Nemecko), s rozpätím merania  $20 \Omega - 10 \text{ M}\Omega$ , chyby pri hodnotách  $k\Omega < 0,5 \%$ , ktorý pracoval v paralelnom režime so striedavou frekvenciou 120 Hz, a dve nerezové sondy. Pri meraní je jedna sonda vložená do ramienka spodnej časti Franzovej cely (ktorá obsahuje fosfátový pufor) a druhá na povrchu membrány, respektíve ponorená do kvapky kvapaliny (najčastejšie 500  $\mu\text{l}$  fosfátového puforu), ktorá bola na membránu aplikovaná, aby uzavrela paralelný obvod a bolo možné impedanciu zmerať. Hodnota odporu sa odčíta z displeja prístroja. Pufor sa po zmeraní príslušného parametru z donorovej časti opatrne odstráni.[63]

### 6.2.3 Permeabilita modelových membrán pre teofylín a indometacín ako modelových permeantov

K hodnoteniu priepustnosti modelových membrán boli vykonané permeačné experimenty s látkami, ktoré sú väčšie než voda a ióny. Boli použité modelové permeanty TH a IND Pomocou TH ( $M_w = 180,164 \text{ g/mol}$ ,  $\log P \sim 0$ ) bola sledovaná permeabilita membrán pre polárne látky s menšou molekulovou hmotnosťou a pomocou IND ( $M_w = 357,787 \text{ g/mol}$ ,  $\log P \sim 4,3$ ) zase permeabilita membrán pre látky lipofilnejšie a väčšou molekulovou

hmotnosťou. Pre kvantifikáciu TH a IND bola použitá metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). HPLC pracuje na princípe reverznej fázy za použitia prístroja Schimadzu Prominence (Schimadzi Kjóto, Japonsko), ktorý pozostáva z čerpadla LC-20AD, odplyňovača DGU-20A3, autosamplera SIL-20A HT, kolóny CTO-20AC, detektoru SPD-M20A a komunikačného modulu CBM-20A. Dáta sú analyzované prostredníctvom softwaru LC-Solutions 1.22. TH sa separuje pomocou reverznej fázy na kolóne LiChroCART 250-4, a mobilnou fázou bola zmes methanolu/0,1 M Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v pomere 4:6 (v/v), prietoková rýchlosť bola 1,2 ml/min. Meranie UV absorpcie bolo realizované pri vlnovej dĺžke 272 nm, a teplote 35 °C, retenčný čas TH bol 2,9 ± 0,1 min. IND sa analyzuje taktiež pomocou kolóny LiChroCART 250-4, mobilnú fázu v tomto prípade tvorila zmes acetonitrilu/vody/kyseliny octovej v pomere 90:60:5 (v/v/v), prietoková rýchlosť bola 2 ml/min. UV absorpcia bola meraná pri vlnovej dĺžke 260 nm a teplote 40 °C, retenčný čas IND je 3,1 ± 0,1 min.[60, 66] Prostredníctvom HPLC metódy sa získajú hodnoty tzv. nekorigovaných koncentrácií modelových látok (permeantov). Korekcia týchto koncentrácií spočíva vo výpočte kumulatívneho množstva [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] a následného fluxu (toku) permeantov za čas [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ], ktoré prešli cez jednotlivé modelové membrány. Vo výpočte kumulatívneho množstva sa zohľadňuje objem Franzovej cely (približne 7 ml) a objemy odberov jednotlivých vzoriek (300  $\mu\text{l}$ ) a difúzna plocha membrány (kruh s plochou približne 0,5  $\text{cm}^2$ ). Hodnoty kumulatívneho množstva sa vynesú voči času [h], a flux permeantu sa vypočíta zo smernice rovnice priamky, ktorá sa získa lineárnou regresiou matematickej funkcie kumulatívneho množstva liečiva v závislosti na čase.[63]

## 7. Experimentálna časť

V tejto kapitole sú popísané jednotlivé kroky experimentu vychádzajúce z metodologickej časti tejto práce.

### 7.1 Použité lipidy a chemikálie

Lipidy ako sú Cer NS, Cer NdS, Cer NP, S, dS a P boli zakúpené od spoločnosti Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Chol, CholS a ďalšie chemikálie boli zakúpené u firiem Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko) a PENTA (Praha, Česká republika).

### 7.2 Navažovanie a príprava jednotlivých lipidových zmesí

Pred prípravou lipidových membrán SC bolo potrebné pripraviť lipidové zmesi. Do 18 vialiek boli navážené samostatné látky a následne sa každá vialka zriedila pomocou organického rozpúšťadla chloroform/methanol v pomere 2:1 (v/v). Po nariadení sa organické roztoky namiešali podľa molárnych pomerov, ako uvádza **Tabuľka 1**. Pripravených bolo celkom 9 typov zmesí s označením **S1 – S3**, **dS1 – dS3** a **P1 – P3**. Organické rozpúšťadlo sa pod prúdom suchého dusíka odstránilo do sucha. Vialky boli na noc vložené do exsikátora pripojeného na vákuum a na ďalší deň sa vložili do mrazničky, a boli pripravené na ďalšie použitie.



	<b>Cer NS</b>	<b>S</b>	<b>LIG</b>	<b>FFA</b>	<b>Chol</b>	<b>CholS</b>
<b>S1</b>	1	0	0	1	1	5 %
<b>S2</b>	0	1	1	1	1	5 %
<b>S3</b>	0,5	0,5	0,5	1	1	5 %
	<b>Cer NdS</b>	<b>dS</b>	<b>LIG</b>	<b>FFA</b>	<b>Chol</b>	<b>CholS</b>
<b>dS1</b>	1	0	0	1	1	5 %
<b>dS2</b>	0	1	1	1	1	5 %
<b>dS3</b>	0,5	0,5	0,5	1	1	5 %
	<b>Cer NP</b>	<b>P</b>	<b>LIG</b>	<b>FFA</b>	<b>Chol</b>	<b>CholS</b>
<b>P1</b>	1	0	0	1	1	5 %
<b>P2</b>	0	1	1	1	1	5 %
<b>P3</b>	0,5	0,5	0,5	1	1	5 %

**Tabuľka 1 – Zloženie modelových membrán. Uvedené sú jednotlivé molárne pomery zastúpených zložiek.** V tabuľke sú znázornené jednotlivé molárne pomery použitých zložiek. K lipidovým zmesiam bolo vždy pridaných 5 hmotnostných percent CholS. Vzorky S1, dS1 a P1 značia vždy kontrolu, kde sú zložky Cer NS/Cer NdS/Cer NP, FFA a Chol v pomere 1:1:1. Vzorky S2, dS2 a P2 označujú sériu, kde sa nenachádza daný Cer, ale len jeho voľná báza (S, dS, P) a LIG, FFA a Chol v molárom pomere 1:1:1:1. Vzorky S3, dS3 a P3 značia sériu, kde sú v rovnakom molárnom pomere Cer, jeho voľná báza (S, dS, P) a LIG. CholS sa nachádza v každej sérii, a tvorí 5 % hmotnosti jednotlivej modelovej membrány.

### 7.3 Príprava modelových lipidových membrán

Príprava modelových membrán pozostávala z niekoľkých krokov. Najprv, bolo potrebné si pripraviť kovové držiaky, ktorých priemer otvoru bol 1 cm. Medzi spodnú a vrchnú časť sa umiestnili teflonové tesnenia, na ktoré boli následne položené polykarbonátové filtre Nucleopore s priemerom pórov 15 nm (Whatman, Kent, UK). Tieto podporné filtre nijak

významne neprispeli k bariérovým vlastnostiam membrán.[67] Bolo pripravených celkovo 42 držiakov s filtrami. Pre zmesi **S1**, **dS1** a **P1** 3 držiaky (kontroly), pre zmesi **S2**, **dS2** a **P2** 6 držiakov a pre zmesi **S3**, **dS3** a **P3** 5 držiakov.

Vysušené lipidové zmesi (**S1 – S3**, **dS1 – dS3** a **P1 – P3**) boli následne rozpustené v zmesi rozpúšťadiel hexán/ethanol 96% v pomere 2:1 (v/v). Výsledná koncentrácia každej lipidovej zmesi bola 4,5 mg/ml. Lipidové zmesi po rozpustení boli nastrekované na pripravené filtre umiestnené v kovových držiakoch (**Obrázok 11**). Nástrek bol realizovaný prostredníctvom prístroja Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švajčiarsko). Jeden nástrek predstavoval dávku lipidovej zmesi 100  $\mu$ l. Na každú membránu bol nástrek aplikovaný celkovo trikrát, takže výsledná modelová membrána obsahovala 1,35 mg lipidov.



**Obrázok 11 – Nastrekovanie lipidových zmesí (= zhotovovanie modelových membrán) pomocou prístroja Linomat 5.**

Po nástreku lipidových zmesí boli membrány vysušené v exsikátore a následne zahriaté v elektrickej peci na  $70 \pm 0,5$  °C, po dobu 30 minút. V priestore sa nachádzala rovnako aj kadička s vodou pre udržanie vlhkosti počas zahrievania. Zvolená teplota v peci sa nachádza nad teplotou fázového prechodu všetkých lipidov. Membrány museli potom postupne chladnúť na laboratórnu teplotu, približne po dobu troch až štyroch hodín (**Obrázok 12**).

Došlo tak k vytvoreniu multilamelárnej štruktúry modelových membrán. Po vychladnutí boli membrány vložené do termostatu na 24 hodín a uchované pri teplote ľudskej kože, čo odpovedá 32 °C.[59, 60]

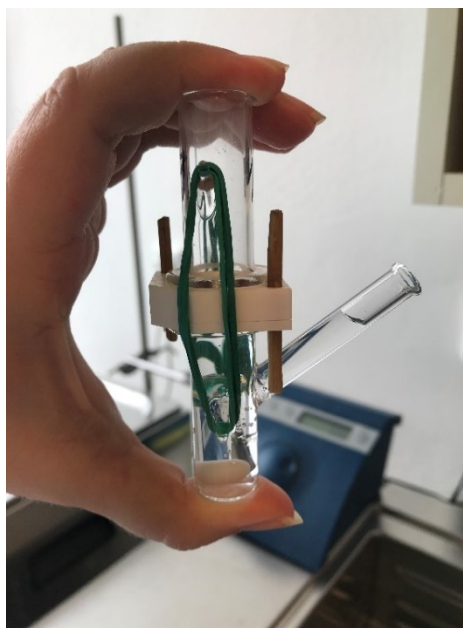


**Obrázok 12 – Kovové držiaky s membránami ds1 – ds3 po nastreknutí lipidových zmesí.**

## 7.4 Meranie bariérových vlastností modelových lipidových membrán

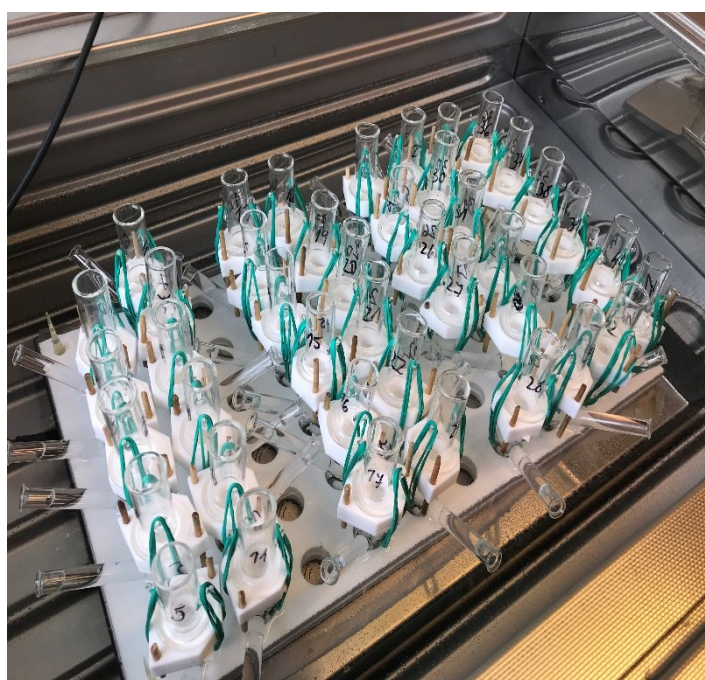
### 7.4.1 Franzove difúzne cely

Modelové lipidové membrány boli po vychladnutí opatrne vyňaté z kovových držiakov, umiestnené do teflónových držiakov (s kruhovou difúznou plochou 0,5 cm<sup>2</sup>) a takto pripravené vzorky boli presunuté medzi vrchnú a spodnú časť Franzových difúzných ciel (**Obrázok 13**). V spodnej časti každej cely bolo magnetické miešadlo, ktoré zabezpečovalo stále miešanie obsahu cely.



**Obrázok 13 – Franzova difúzna cela pripravená pre permeačný experiment.**

Franzové difúzne cely boli následne naplnené fosfátovým purom o pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, KCl a gentamicín). Objemy, ktorými boli cely naplnené sa zaznamenávali a využili sa neskôr pri vyhodnocovaní výsledkov kumulatívneho množstva permeantov. Približný objem sa pohyboval okolo 6,5 až 7,0 ml. Pripravené cely boli umiestnené do magnetickej vane, v ktorej bola teplota vody temperovaná na  $32 \pm 0,5$  °C. Pred samotným experimentom sa cely nechali vo vani temperovať po dobu 12 hodín (**Obrázok 14**).



**Obrázok 14 - Permeačná vaňa s Franzovými difúznymi celami pred experimentom.**

#### 7.4.1.1 Meranie straty vody cez membránu

To, aké bariérové vlastnosti majú jednotlivé pripravené lipidové membrány, nám priblížilo meranie ich jednotlivých vlastností. Konkrétne sme sa zamerali na meranie straty vody cez danú membránu, meranie elektrickej impedancie a taktiež meranie permeability modelových membrán pre modelové permeanty (TH a IND).

Na meranie straty vody membránou bol použitý prístroj AquaFlux. Tento prístroj je využívaný najmä v dermatológii pri skúmaní napr. kožných defektov. Z Franzovej cely bola odobraná donorová časť, a sonda prístroja bola položená kolmo na povrch teflonového držiaka tak, aby boli všetky strany správne priľnuté a celý obvod sondy bol okolo povrchu membrány (**Obrázok 15**). Stlačením tlačidla sa spustilo meranie, ktoré trvalo vždy približne 90 sekúnd, koniec bol identifikovaný zaznením signálu. Výsledná hodnota bola odčítaná z displeja počítaču, s ktorým je prístroj AquaFlux spojený. Výsledky nameranej straty vody boli namerané v jednotkách  $[g/h/m^2]$ , čo teda predstavuje hmotnosť vody, ktorá prejde membránou za určitý čas a určitou plochou. Každá modelová membrána (42 vzoriek) bola premeraná minimálne dvakrát.



**Obrázok 15 – Meranie straty vody modelových membrán pomocou prístroja AquaFlux.**

#### 7.4.1.2 *Meranie elektrickej impedancie*

Ďalším parametrom, ktorý bol v experimente meraný, bola elektrická impedancia. Pred samotným meraním bolo potrebné aplikovať na každú membránu 500  $\mu$ l fosfátového pufru (pH 7,4). Po 60 minútovej ekvilibracii sa jedna sonda prístroja LCR 4080 vložila do donorovej časti na kvapku naneseného fosfátového pufru a druhá do ramienka akceptorovej časti Franzovej difúznej cely. Z prístroja LCR boli následne odčítavané hodnoty elektrickej impedancie. Po zmeraní bolo nutné odstrániť fosfátový pufr z povrchu membrán. Opatrne sa odsal prostredníctvom vatových tyčiniek. Meranie bolo uskutočnené v každej cele minimálne dvakrát. Hodnoty boli prepočítané na difúznu plochu teflónových držiakov.

#### 7.4.1.3 *Meranie permeability membrán pre teofylín a indometacín*

Po zmeraní straty vody a elektrickej impedancie sa pomocou automatickej pipety aplikovali suspenzie TH/IND na modelové membrány. Koncentrácia TH bola 5 % (w/v) a v prípade IND 2 % (w/v). Po navážení TH/IND boli nariadené prostredníctvom 60 % vodného roztoku propylénglykolu (PG). PG nemá na membrány nežiadúce účinky a nemení ich vlastnosti.[60] V čase 0 hodín bolo na každú membránu aplikovaných 100  $\mu$ l 5% suspenzie TH. V dvojhodinových intervaloch (v čase 2., 4., 6., 8. a 10. hodina) sa odobralo 300  $\mu$ l kvapaliny z akceptorovej časti Franzovej cely do pripravených vialiek. Rovnaký objem fosfátového pufru bolo nutné po každom odbere vrátiť späť. Po experimente s TH sa fosfátový pufr v akceptorovej časti vymenil za nový, membrány sa opatrne očistili a po 12h ekvilibracii sa aplikovala 2% suspenzia IND a celý experiment sa zopakoval.[63] Vzorky TH a IND boli následne vyhodnocované pomocou HPLC a výpočtov. Hodnotil sa permeačný profil a flux pre TH a IND, teda jeho kumulatívne množstvo, ktoré cez modelovú membránu prešlo do akceptorovej časti Franzovej cely.

### 7.5 Spracovanie dát

Spracovanie výsledkov a tvorba grafov boli realizované pomocou programov Microsoft Excel a GraphPad. Na štatistickú analýzu dát bol použitý program GraphPad so štatistickým spracovaním pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) a Dunnetovým post-hoc testom.



## 8. Výsledky a diskusia

V tejto práci sme sa zamerali na hodnotenie voľných sfingoidných báz a ich vplyv na bariérové vlastnosti modelových membrán SC. Pripravené modely boli hodnotené pomocou permeačných markerov, tj. straty vody (TEWL), elektrickej impedancie (EI) a priepustnosti pre modelové permeanty (TH a IND). Výsledky jednotlivých experimentov sú v tejto kapitole popísané za použitia grafov a slovného opisu. V každom grafe sú zahrnuté všetky typy pripravených modelových lipidových membrán. Každá séria, ktorá sa líši typom Cer je označená samostatnou farbou. **Čierny stĺpček** značí membrány so S, **modrý** s dS a **červený** s P. V rámci sérií sú odlišne označené modelové membrány, kde **plný stĺpček** značí membránu kde sa nachádzal celý Cer, **prázdny stĺpčekom** sú označené membrány kde sa nachádzala voľná sfingoidná báza a LIG. Tieto membrány simulujú tzv. úplný rozklad Cer na sfingoidnú bázu a LIG. **Bodkovaným stĺpčekom** sú označené membrány, kde sa nachádzal Cer i voľná sfingoidná báza a LIG. Tieto membrány zase simulujú tzv. čiastočný rozklad Cer na sfingoidnú bázu a LIG za súčasnej prítomnosti daného Cer. V popise je využité označenie membrán podľa **Tabuľky 1**, tj. **S1 – S3** sú označenia pre kontrolné membrány s Cer NS (prvý typ), ďalej membrány s S + LIG (druhý typ) a konečne membrány s Cer NS + S + LIG (tretí typ). Analogické je označenie u membrán na báze dS (**dS1 – dS3**) a P (**P1 – P3**).

Jednotlivé štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ) v parametroch permeability sú v grafoch znázornené prostredníctvom piktogramov:

\* porovnanie parametrov kontrolných membrán medzi sebou (plné stĺpčeky), tj. Cer NS (**S1**) vs. Cer NdS (**dS1**) vs. Cer NP (**P1**),

# porovnanie parametrov modelových membrán v rámci skupiny, napr. Cer NS (**S1**) vs. S + LIG (**S2**) vs. Cer NS + S + LIG (**S3**),

§ porovnanie parametrov membrán simulujúcich úplný rozklad Cer na voľnú sfingoidnú bázu a LIG (prázdne stĺpčeky), tj. S + LIG (**S2**) vs. dS + LIG (**dS2**) vs. P + LIG (**P2**),

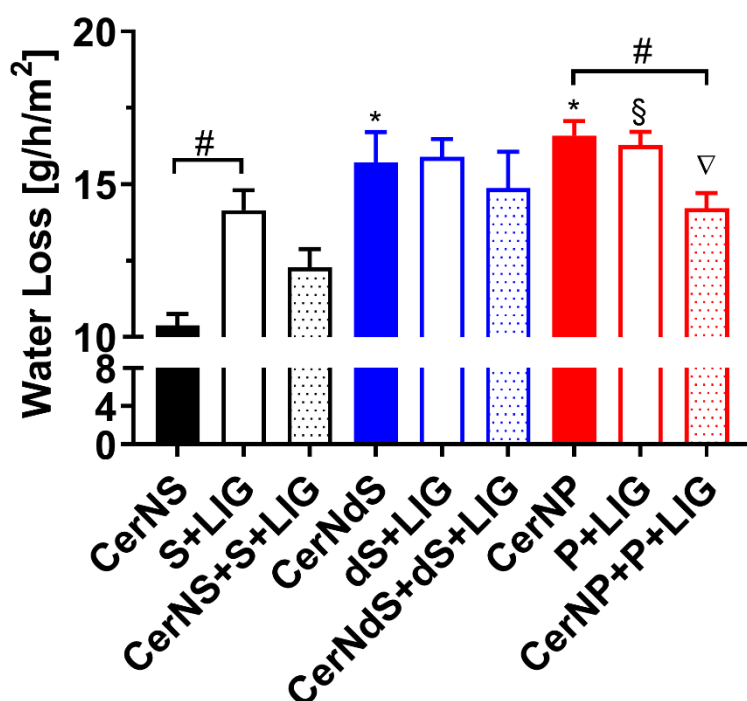
▽ porovnanie parametrov membrán simulujúcich čiastočný rozklad Cer (bodkované stĺpčeky), tj. Cer NS + S + LIG (**S3**) vs. Cer NdS + dS + LIG (**dS3**) vs. Cer NP + P + LIG (**P3**).

## 8.1 Strata vody cez membránu

Výsledky merania straty vody cez membránu graficky znázorňuje **Obrázok 16**, v ktorom sa nachádzajú všetky typy membrán, farebne i tvarovo odlišené podľa vyššie uvedeného spôsobu značenia. Výsledné hodnoty sú uvedené v jednotkách [g/h/m<sup>2</sup>]. Výsledná hodnota TEWL je vyjadrená ako priemer všetkých nameraných hodnôt pre daný typ membrány s uvedením štandardnej chyby priemeru (SEM, angl. *standard error of mean*).

V prvej sérii boli namerané a následne vypočítané hodnoty pre **S1** (Cer NS) 10,37 ± 0,39 g/m<sup>2</sup>/h, pre **S2** (S + LIG) 14,15 ± 0,65 g/m<sup>2</sup>/h, a pre **S3** (Cer NS + S + LIG) 12,29 ± 0,58 g/m<sup>2</sup>/h. V druhej sérii modelových membrán boli namerané a následne vypočítané hodnoty TEWL pre **dS1** (Cer NdS) 15,72 ± 0,99 g/m<sup>2</sup>/h, pre **dS2** (dS + LIG) 15,89 ± 0,59 g/m<sup>2</sup>/h a pre **dS3** (Cer NdS + dS + LIG) 14,87 ± 1,19 g/m<sup>2</sup>/h.

Rovnako ako u membrán s obsahom dS, tak aj membrány obsahujúce polárne lipidy (tj. sfingoidnú bázu P alebo Cer NP) vykazujú vyššie hodnoty TEWL. Pre modelové membrány **P1** (Cer NP) bola nameraná hodnota 16,59 ± 0,47 g/m<sup>2</sup>/h, pre **P2** (P + LIG) 16,27 ± 0,44 g/m<sup>2</sup>/h a pre **P3** (Cer NP + P + LIG) 14,22 ± 0,49 g/m<sup>2</sup>/h.



**Obrázok 16** – Grafické znázornenie výsledkov TEWL, dáta sú vyjadrené ako priemer všetkých nameraných hodnôt ( $n$ ) ± SEM (štandardná chyba priemeru),  $n > 3$ ; \*, #, §, ∇ vyjadrujú štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,05$ ).



Štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ) v rámci porovnávania kontrolných membrán sú pozorované medzi vzorkami **S1** (Cer NS) a **dS1** (Cer NdS) a taktiež medzi vzorkami **S1** (Cer NS) a **P1** (Cer NP). V jednotlivých skupinách nachádzame štatisticky významné rozdiely medzi **S1** (Cer NS) a **S2** (S + LIG), a medzi **P1** (Cer NP) a **P3** (Cer NP + P + LIG). Ďalšie štatistické významné rozdiely nachádzame medzi vzorkami **S2** (S + LIG) a **P2** (P + LIG), teda medzi membránami ktoré obsahujú voľnú sfingoidnú bázu a taktiež medzi **S3** (Cer SP + S + LIG) a **P3** (Cer NP + P + LIG), tj. vzorkami, ktoré majú Cer i voľnú sfingoidnú bázu a LIG.

Z jednotlivých výsledkov môžeme usúdiť, že hodnota TEWL, ktorá nám popisuje mieru straty vody danou membránou, je najnižšia u kontrolnej membrány s Cer NS (**Obrázok 16**; čierny stĺpček). Pri porovnaní predchádzajúcich prác [50, 59, 60], ktoré ukazujú, že membrány, ktoré obsahujú S, vykazujú najvyšší odpor pre prechod vody membránou, je možné toto tvrdenie potvrdiť, vzhľadom na to, že je v tejto práci patrný signifikantný rozdiel medzi kontrolnými membránami, kde **S1** (Cer NS) vykazuje najnižšiu hodnotu straty vody.

Pri „rozbití“ Cer a prítomnosti voľných sfingoidných báz došlo v prípade membrán **S2** (S + LIG) k výraznému nárastu permeability pre molekuly vody oproti membránam **S1** (Cer NS), čo je odhadnuteľný vzhľadom k tomu, že bariérový lipid je nahradený za jeho metabolické produkty. Je zaujímavé, že takto výrazný rozdiel v priepustnosti membrán pre vodu však nebol pozorovaný v prípade membrán s dS (**dS1** vs. **dS2**) a membrán P (**P1** vs. **P2**).

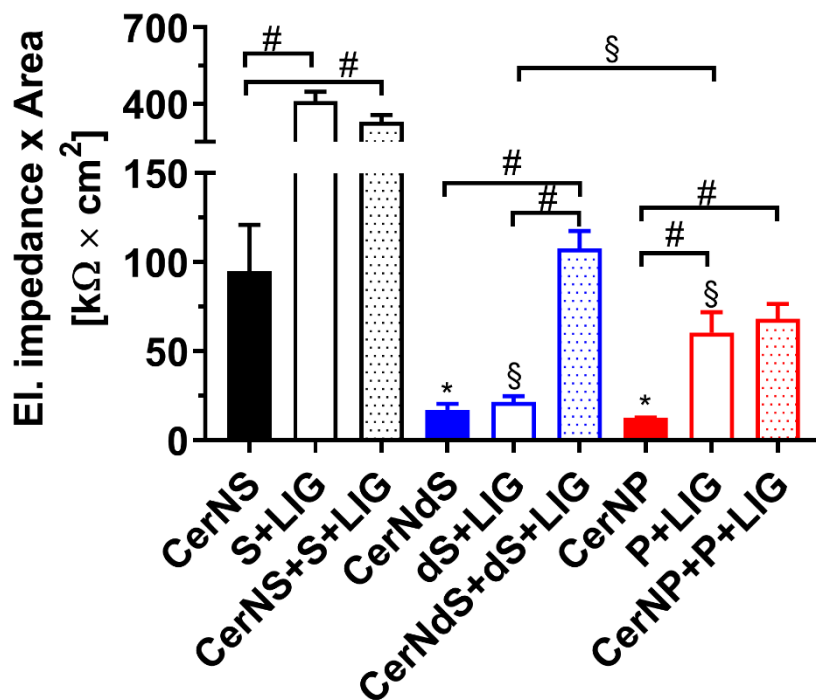
V prípade tretieho typu membrán, ktorý simuluje čiastočné „rozbitie“ bariérového Cer na rozkladné produkty, inými slovami, kde sa nachádza Cer aj voľná sfingoidná báza, vidíme zníženie priepustnosti u všetkých membránam (bodkované stĺpčky v **Obrázku 16**), kde sa nachádza len voľná báza + LIG. Zaujímavé sú aj štatisticky významné rozdiely medzi membránami **P1** a **P3**. Záverom sa dá povedať, že membrány obsahujúce Cer i voľnú sfingoidnú bázu vykazujú menšiu priepustnosť.

Pri niektorých chorobách kože, ako je napríklad AD, sa u pacientov predpokladá vyššia priepustnosť pokožky, ktorá môže byť spôsobená hydrolýzou Cer. Ak dochádza k zmenám kompozície, alebo štrukturálnym zmenám sfingoidných báz, môže dochádzať k zmene bariérových vlastností membrán.[38] To, že sa hodnota TEWL pri zvyšujúcej sa koncentrácii voľných sfingoidných báz zvyšuje, potvrdzuje aj štúdia, zaoberajúca sa zmenami hladín S a dS pri AD či psoriáze.[57, 68] Štúdia, ktorá potvrdzuje zvýšenie voľného S v pote pacientov s AD, však hovorí, že medzi zdravými a pacientmi s AD neboli pozorované zmeny TEWL.[69]

## 8.2 Elektrická impedancia modelových membrán

Ďalším permeačným parametrom, ktorý bol skúmaný, bola EI, ktorá bola zisťovaná podľa vyššie uvedeného postupu (**kap 7.4.1.2.**). Každá membrána bola premeraná minimálne dvakrát. Výsledné hodnoty sú znázornené na **Obrázku 17**, kde je využitý rovnaký spôsob označovania ako v predchádzajúcom prípade, tj. priemer s uvedením štandardnej chyby priemeru (SEM). Hodnota EI je vzťahnutá na jednotku difúznej plochy teflónového držiaka a vyjadrená v jednotkách  $\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$ .

V prvej sérii boli namerané a následne vypočítané hodnoty EI pre membrány **S1** (Cer NS)  $95 \pm 26 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , pre **S2** (S + LIG)  $410 \pm 37 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , a pre **S3** (Cer NS + S + LIG)  $330 \pm 27 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . Nasýtenie dvojnej väzby sa podpísalo na výraznej zmene EI, tj. v druhej sérii boli vypočítané hodnoty EI pre **dS1** (Cer NdS)  $17 \pm 3 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , pre **dS2** (dS + LIG)  $22 \pm 3 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , a pre **dS3** (Cer NdS + dS + LIG)  $108 \pm 10 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . Zmeny v polárnej hlave, tj. zavedenie hydroxylovej skupiny do polohy C4 v sfingoidnej báze, sa zobrazilo v hodnotách EI nasledovne: pre membrány **P1** (Cer NP)  $13 \pm 0 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , pre **P2** (P + LIG)  $60 \pm 11 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ , a pre **P3** (Cer NP + P + LIG)  $68 \pm 8 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ . Štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ), podľa zobrazenia piktogramov na grafe vidíme vo viacerých prípadoch, tj. jak medzi kontrolami (**S1** vs. **dS1** vs. **P1**), tak v rámci jednotlivých skupín, ako je zobrazené na **Obrázku 17**.



**Obrázok 17 – Grafické znázornenie výsledkov EI, dáta sú vyjadrené ako priemer všetkých nameraných hodnôt ( $n$ )  $\pm$  SEM (štandardná chyba priemeru),  $n > 3$ ; \*, #, §, vyjadrujú štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,05$ ).**

Výsledky EI, ktoré môžeme vidieť na **Obrázku 17**, sa vyznačujú vyšším množstvom štatisticky významných rozdielov. EI je parameter, ktorý je nepriamo úmerný priepustnosti pre ióny. Čím je hodnota EI vyššia, tým je tok iónov menší a membrána je silnejšia. Dôležité je zmieniť, že hodnota TEWL by teoreticky mala korelovať s hodnotou EI, s ktorou je nepriamo úmerná. Čím vyššia je priepustnosť pre vodu, tým je EI nižšia a tok iónov je vyšší. V prípade membrán **S1 – S3** sa toto pravidlo ale nepotvrdilo.

To, že hodnoty elektrickej impedancie pri kontrolných membránach **dS1** (Cer NdS) a **P1** (Cer NP), sú oproti membránam **S1** (Cer NS) nižšie, potvrdzuje výsledky už predchádzajúcich prác.[59, 60] V prípade tohoto experimentu vykazujú kontrolné membrány (**S1**, **dS1**, **P1**) postupnosť v strate vody (TEWL) postupnosť **P1 > dS1 > S1**. TEWL a hodnota EI s výsledkami jasne koreluje a obidva parametre vykazujú medzi membránami signifikantné rozdiely. V práci Kováčik et al. [50] však nachádzame postupnosť **dS1 > P1 > S1**, kde hodnota EI s hodnotou TEWL nekoreluje, čo je pravdepodobne zapríčinené inou metodikou prípravy modelových membrán než tých, ktoré boli použité v našom experimente. Impedancia taktiež patrí medzi parameter, ktorý je zo všetkých použitých najcitlivejší, a i malé zmeny v membránach môžu viesť k zmenám výsledkov.[50]

Hodnota EI u membrán **S2** (S + LIG) rapídne stúpla, teda tok iónov sa výrazne znížil, kdežto pri strate vody vykazovala táto membrána vyššiu priepustnosť. Pri ostatných sériách (**dS1 – dS3** a **P1 – P3**) sa teória korelácie TEWL a EI dá pozorovať. Je zaujímavé, že v prípade membrán **dS3** (Cer NdS + dS + LIG) sa dá pozorovať najvyšší odpor, teda čiastočné rozbitie Cer NdS paradoxne zlepšuje bariérové vlastnosti modelových membrán. Podobný trend by sa dal pozorovať v prípade modelových membrán **P3** (Cer NP + P + LIG).

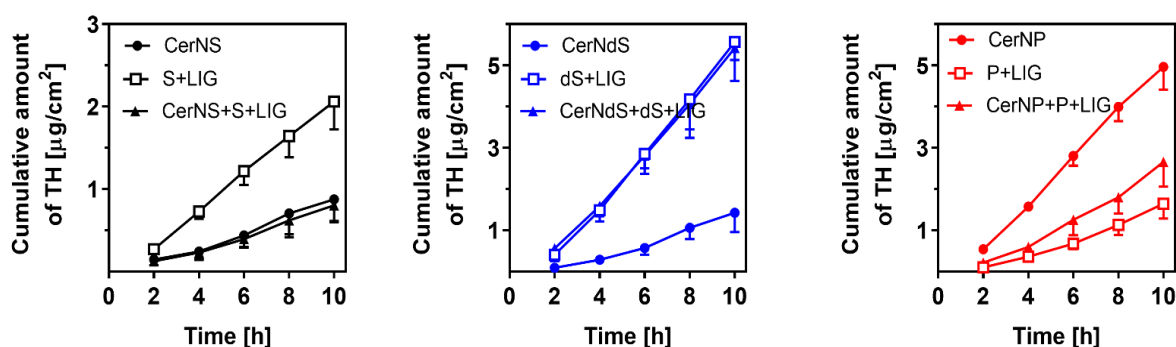
### 8.3 Permeabilita modelových membrán pre modelové permeanty

Pripravené modelové membrány boli hodnotené na priepustnosť pre vybrané permeanty. Pre náš experiment bol použitý TH, čo je látka malej molekulovej hmotnosti a približne podobnou rozpustnosťou vo vode a tukoch. TH pravdepodobne prestupuje cez membránu mechanizmom prostej difúzie. Naopak IND je reprezentant typicky lipofilného permeantu s veľkou molekulovou hmotnosťou, ktorý uprednostňuje mechanizmus laterálnej difúzie cez bariérové lipidy.[70] Pre opis výsledkov TH aj IND, bude využívaný rovnaký spôsob, ako v predchádzajúcich prípadoch. Na **Obrázku 18** a **Obrázku 20**, je vyjadrené pomocou grafov kumulatívne množstvo jednotlivých permeantov. Jedná sa o hodnotu korigovanej koncentrácie [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ], kde je zohľadnený objem Franzovej cely, objem odberu jednotlivých vzoriek, a difúzna plocha membrány. **Obrázok 19** a **Obrázok 21** znázorňujú grafy, kde sa nachádzajú hodnoty, ktoré slúžia taktiež pre vyjadrenie priepustnosti membrán. Ide o tzv. flux (tok) modelových permeantov. Tieto hodnoty sa získali lineárnou regresiou kumulácie permeantov v závislosti na čase, vyjadrené jednotkou [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ]. Inými slovami sa flux dá popísať ako smernica priamky, ktorá predstavuje permeačný profil pre daný permeant. Platí, že čím je hodnota fluxu vyššia, tým je daná membrána pre modelový permeant (TH alebo IND) priepustnejšia.

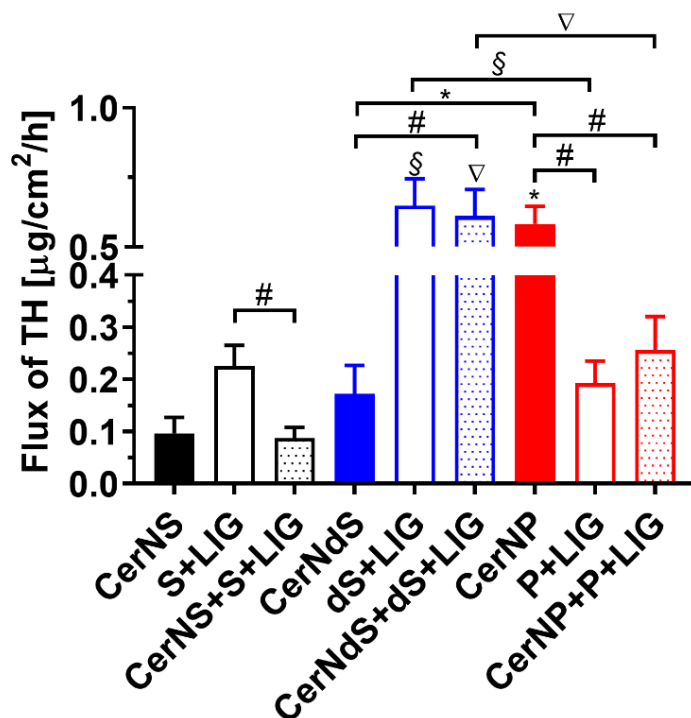
### 8.3.1 Flux teofylínu

Permeabilita pre TH už bola hodnotená v modelových membránach s obsahom Cer NS [67], Cer NdS [59, 66] a tiež membrán s obsahom Cer NP [60] s obsahom LIG či dokonca zmesou FFA. Z grafu na **Obrázku 18 a 19** z nášho experimentu je zrejmé, že priepustnosť kontrolných modelových membrán **S1** (Cer NS), **dS1** (Cer NdS) a **P1** (Cer NP) mala nasledovné hodnoty fluxov:  $0,10 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (**S1**),  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (**dS1**) a  $0,58 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  (**P1**).

Modelové membrány **S2** (S + LIG) sú výrazne priepustné pre TH ( $0,23 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), naopak čiastočné „rozbitie“ Cer NS nemá výrazný vplyv na zmenu priepustnosti modelových membrán **S3** (Cer NS + S + LIG;  $0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Podobné závery sa dajú pozorovať aj pri membránach **dS2** (dS + LIG), ktoré sú priepustnejšie než kontroly **dS1**, tj.  $0,65 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Prítomnosť voľného dS znamená trvalo zvýšenú permeabilitu, jak je patrné u **dS3** membrány (Cer NdS + dS + LIG) s fluxom  $0,61 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Na druhej strane je veľmi zaujímavé zistenie, že priepustnosť membrány **P2** (P + LIG;  $0,19 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) je výrazne nižšia oproti kontrolnej membráne **P1** (Cer NP). V prípade, že modelová membrána obsahuje jak Cer NP, tak voľný P a LIG, modelové membrány **P3** dosahujú hodnotu fluxu  $0,26 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ .



**Obrázok 18 – Grafické znázornenie kumulatívneho množstva pre TH IND modelových membrán hodnotených v tejto práci.**

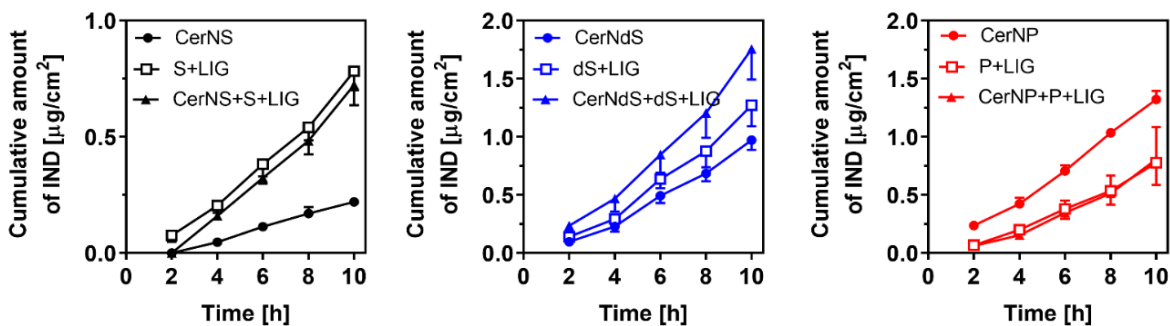


**Obrázok 19 – Grafické znázornenie výsledkov merania permeability pre TH, dáta sú vyjadrené ako priemer všetkých nameraných hodnôt ( $n$ )  $\pm$  SEM (štandardná chyba priemeru),  $n > 3$ ; \*, #, §,  $\nabla$  vyjadrujú štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,05$ ).**

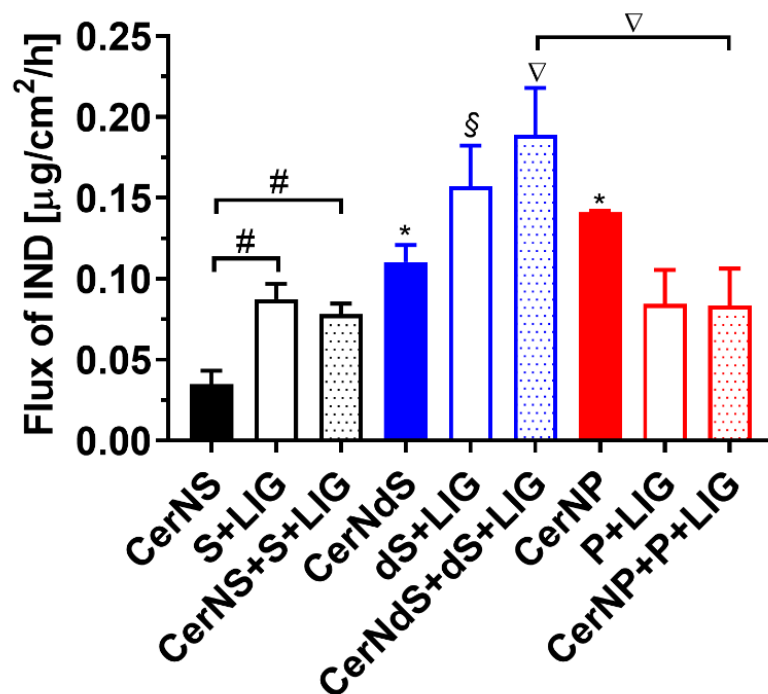
### 8.3.2 Flux indometacínu

Z grafu na **Obrázku 20 a 21** je možné sledovať priepustnosť membrán pre IND, permeantu, ktorý má v porovnaní s TH väčšiu molekulu a je lipofilnejší.[71] V grafe nachádzame taktiež štatisticky významné rozdiely medzi kontrolnými membránami **dS1** (Cer NdS;  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) a **P1** (Cer NP;  $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) a kontrolnou membránou **S1** (Cer NS;  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ). Opakuje sa situácia, že membrány **S1** a **dS1** vykazujú menšiu priepustnosť pre IND ako membrány **P1**, čo súhlasí s literatúrou.[60] Vo všeobecnosti, podľa predchádzajúcich prác sa dá konštatovať, že kontrolné membrány obsahujúce dS a P vykazujú oproti S vyššiu priepustnosť pre TH a približne rovnakú priepustnosť pre IND.[50, 59] V tejto práci sa takýto výsledok u TH potvrdil, no nejedná sa o štatisticky významný rozdiel.

V prípade modelových membrán **S2** (S + LIG) vidíme zvýšenie priepustnosti pre IND, tj.  $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Zvýšenie fluxu IND u membrány **dS2** (dS + LIG;  $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) pravdepodobne naznačuje, že nielen samotný Cer NdS, ale aj prítomnosť voľného dS zhoršuje bariérové vlastnosti modelových membrán SC. Tento trend ale nepozorujeme u membrán **P2** (P + LIG), kde hodnota fluxu ( $0,08 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) je nižšia než u kontrolných membrán **P1** (Cer NP). Zatiaľ čo u membrán **S3** a **P3** je hodnota fluxu podobná ako u **S2** a **P2**, v prípade **dS3** membrán je jeho hodnota výrazne vyššia v porovnaní s **dS2**.



**Obrázok 20** – Grafické znázornenie kumulatívneho množstva pre IND modelových membrán hodnotených v tejto práci.



**Obrázok 21** – Grafické znázornenie výsledkov merania permeability pre IND, dáta sú vyjadrené ako priemer všetkých nameraných hodnôt ( $n$ )  $\pm$  SEM (štandardná chyba priemeru),  $n > 3$ ; \*, #, §, ∇ vyjadrujú štatisticky významný rozdiel ( $p < 0,05$ ).

## 9. Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo preskúmať význam voľných sfingoidných báz na bariérové vlastnosti modelových membrán SC. Bolo pripravených 9 typov modelových systémov, ktoré boli hodnotené v permeačných experimentoch, tj. bola u nich hodnotená schopnosť tvorby bariéry pre vybrané druhy látok (vodu, ióny, malé polárne molekuly a veľké lipofilné látky).

Z výsledkov popísaných v tejto diplomovej práci sa dá usúdiť, že pri každom type ceramidu/sfingoidnej bázy dochádza k odlišnej priepustnosti modelových membrán. Nedá sa teda zovšeobecniť tvrdenie, že membrány s voľnou sfingoidnou bázou („úplné rozbitie ceramidu“), či rovnakým pomerom ceramidu a voľnej bázy („čiastočné rozbitie ceramidu“), vykazujú vyššiu či nižšiu priepustnosť pre vodu alebo ďalšie modelové permeanty. Hypotéza je platná len v prípade modelových membrán na báze sfingozínu. Rozbitie Cer NS sa podpisuje na zvýšení priepustnosti modelových membrán. Zatiaľ čo membrány obsahujúce voľný dihydrosfingozín majú voči kontrolnej membráne vyššiu priepustnosť pre malé i veľké molekuly, membrány obsahujúce voľný fytosfingozín majú nižšiu permeabilitu pre TH a IND.

Najvýznamnejšie závery tejto práce sú tieto:

- **S1** membrány („bez rozbitia Cer NS“) sú najmenej priepustné pre vodu, ióny a TH či IND. Membrány **S2**, ktoré simulujú tzv. úplné rozbitie Cer NS na S a LIG sú veľmi priepustné pre vodu, nie však pre ióny. Zároveň vytvárajú tieto membrány vhodnú bariéru jak pre malé polárne molekuly, tak pre väčšie, lipofilnejšie permeanty. „Čiastočné rozbitie Cer NS“ znamená zníženie priepustnosti **S3** membrán, avšak nedosahujú parametre membrán **S1**.
- **dS1** membrány („bez rozbitia Cer NdS“) zvyšujú priepustnosť pre vodu v porovnaní s **S1**, ale „úplným alebo čiastočným rozbitím Cer NdS“ (membrány **dS2**) nedochádza v skupine k výrazným zmenám TEWL.
- U **P1** membrán dochádza taktiež k zvýšeniu priepustnosti pre vodu (oproti **S1**), no je zaujímavé, že u membrány **P3** (s „čiastočne rozbitým Cer NP“) dochádza k zníženiu priepustnosti oproti kontrole **P1**, a tak k potencionálne lepším bariérovým vlastnostiam. „Rozbitie Cer NP“ v tomto prípade znižuje priepustnosť modelových



membrán **P2** pre modelové permeanty, a môže teda poukazovať na lepšie bariérové vlastnosti modelových membrán.

Všetky hodnotené parametre, ktoré boli využité pri hodnotení experimentu (TEWL, EI, flux TH a IND), spolu do istej miery súvisia, a vypovedajú o bariérových vlastnostiach modelových systémov SC v tejto práci. Je vhodné však poznamenať, že v tomto experimente sa odlišoval postup prípravy modelových membrán, kedy membrány boli zahriate v peci na 70 °C po dobu 30 minút, a v priestore sa nachádzala kadička s vodou. V diskutovaných prácach boli však membrány zahriate na 90 °C po dobu 10 minút bez pridanej vodnej pary.[50, 59, 60]

Práca a jej závery môžu pomôcť k pochopeniu významu voľných báz v SC, a byť využité pri študovaní komplexnejších modelov membrán, ktoré budú predstavovať zdravú či poškodenú kožnú bariéru a prispieť tak k pochopeniu vzniku jej porúch. Taktiež môžu byť použité pre štúdiu týchto modelov pomocou spektroskopických metód, ktoré by mohli objasniť ich mikroštruktúru, vplyv sfingoidných báz na usporiadanie lipidov v SC a ich fázové chovanie.

Súčasne s týmto experimentom prebiehal v rámci *Skin Barrier Research Group* ďalší experiment, ktorý hodnotil vplyv sfingoidných báz na izolovanom ľudskom SC *ex vivo* modeli. Výsledky oboch experimentov sa môžu navzájom dopĺňať a zaistiť tak lepšie pochopenie tejto problematiky, ktorá ešte nie je z cela objasnená.

## 10. Literatúra

1. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(3): p. 175-191.
2. Vávrová, K., A. Kováčik, and L. Opálka, *Ceramides in the skin barrier*. European Pharmaceutical Journal, 2017. **64**(2): p. 28-35.
3. Li, Q., et al., *The role of ceramides in skin homeostasis and inflammatory skin diseases*. J Dermatol Sci, 2020. **97**(1): p. 2-8.
4. Čihák, R., *Anatomie 3, 3. vydání*. 2016, Praha: Grada Publishing, ISBN: 9788024756363.
5. Umar, M., et al., *Vitamin D and the pathophysiology of inflammatory skin diseases*. Skin Pharmacol Physiol, 2018. **31**(2): p. 74-86.
6. Schreml, S., et al., *Impact of age and body site on adult female skin surface pH*. Dermatology, 2012. **224**(1): p. 66-71.
7. Proksch, E., *pH in nature, humans and skin*. J Dermatol, 2018. **45**(9): p. 1044-1052.
8. Štork, J., et al., *Dermatovenerologie, 2. vydání*. Praha: Galén, ISBN: 9788072628988.
9. Biopedia.sk, *Krycia sústava*. <https://biopedia.sk/clovek/krycia-sustava> (cit. 11. 4. 2021).
10. Kittnar, O., *Lékařská fyziologie*. 2011, Praha: Grada Publishing, ISBN: 9788024730684.
11. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
12. Eucerin.cz, *Struktura a funkce kůže*. <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> (cit. 11. 4. 2021).
13. Behne, M., et al., *Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 185-92.
14. Murphrey, M.B., J.H. Miao, and P.M. Zito, *Histology, Stratum Corneum*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
15. Vávrová, K. and A. Hrabálek, *Role ceramidů v kůži*. Praktické lékařství, 2006. **2**(2): p. 55-58.
16. Breiden, B. and K. Sandhoff, *The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 441-52.
17. Pullmannová, P., et al., *Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains*. Biophys Chem, 2017. **224**: p. 20-31.
18. Kováčik, A., J. Roh, and K. Vávrová, *The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family*. ChemBioChem, 2014. **45**.
19. van Smeden, J., et al., *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 295-313.
20. Feingold, K. and P. Elias, *The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 279.
21. Holleran, W.M., Y. Takagi, and Y. Uchida, *Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5456-66.
22. Hrabálek, A. and K. Vávrová, *Lze překonat kožní bariéru?* Praktické lékařství, 2006. **1**(1): p. 8-11.

23. Jungersted, J.M., et al., *Lipids and skin barrier function--a clinical perspective*. Contact Dermatitis, 2008. **58**(5): p. 255-62.
24. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 280-94.
25. Sochorová, M., et al., *Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum*. J Colloid Interface Sci, 2019. **535**: p. 227-238.
26. Norlén, L., et al., *A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(9): p. 508-16.
27. Mizutani, Y., et al., *Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function*. Biochimie, 2009. **91**(6): p. 784-90.
28. Castro, B.M., M. Prieto, and L.C. Silva, *Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties*. Prog Lipid Res, 2014. **54**: p. 53-67.
29. Motta, S., et al., *Ceramide composition of the psoriatic scale*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1182**(2): p. 147-51.
30. Mojumdar, E.H., G.S. Gooris, and J.A. Bouwstra, *Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization*. Soft Matter, 2015. **11**(21): p. 4326-36.
31. Pruett, S.T., et al., *Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols*. J Lipid Res, 2008. **49**(8): p. 1621-39.
32. Carreira, A.C., et al., *Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties*. Prog Lipid Res, 2019. **75**: p. 100988.
33. Fischer, C.L., et al., *The roles of cutaneous lipids in host defense*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 319-22.
34. Law, S.L., C.A. Squier, and P.W. Wertz, *Free sphingosines in oral epithelium*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995. **110**(3): p. 511-3.
35. Wertz, P.W. and D.T. Downing, *Free sphingosines in porcine epidermis*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1002**(2): p. 213-7.
36. Wertz, P.W. and D.T. Downing, *Free sphingosine in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1990. **94**(2): p. 159-61.
37. Wertz, P.W. and D.T. Downing, *Ceramidase activity in porcine epidermis*. FEBS Lett, 1990. **268**(1): p. 110-2.
38. Loiseau, N., et al., *Altered sphingoid base profiles predict compromised membrane structure and permeability in atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2013. **72**(3): p. 296-303.
39. t'Kindt, R., et al., *Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Anal Chem, 2012. **84**(1): p. 403-11.
40. Fischer, C.L., *Antimicrobial activity of host-derived lipids*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(2).
41. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(7): p. 489-503.
42. Gault, C.R., L.M. Obeid, and Y.A. Hannun, *An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown*. Adv Exp Med Biol, 2010. **688**: p. 1-23.
43. Arnold, R.S. and A.C. Newton, *Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine*. Biochemistry, 1991. **30**(31): p. 7747-54.
44. Contreras, F.X., et al., *Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes*. Biophys J, 2006. **90**(11): p. 4085-92.

45. Jiménez-Rojo, N., et al., *Membrane permeabilization induced by sphingosine: effect of negatively charged lipids*. Biophys J, 2014. **106**(12): p. 2577-84.
46. Brogden, G., et al., *Isolation and quantification of sphingosine and sphinganine from rat serum revealed gender differences*. Biomolecules, 2019. **9**(9).
47. Jiang, Q., et al., *Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide*. Int J Cancer, 2012. **130**(3): p. 685-93.
48. Kim, S., et al., *Phytosphingosine stimulates the differentiation of human keratinocytes and inhibits TPA-induced inflammatory epidermal hyperplasia in hairless mouse skin*. Mol Med, 2006. **12**(1-3): p. 17-24.
49. Park, M.T., et al., *Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 878-85.
50. Kováčik, A., et al., *Effects of 6-hydroxyceramides on the thermotropic phase behavior and permeability of model skin lipid membranes*. Langmuir, 2017. **33**(11): p. 2890-2899.
51. Choi, M.J. and H.I. Maibach, *Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin*. Am J Clin Dermatol, 2005. **6**(4): p. 215-23.
52. Spada, F., T.M. Barnes, and K.A. Greive, *Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2018. **11**: p. 491-497.
53. Weidinger, S., et al., *Atopic dermatitis*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 1.
54. Coderch, L., et al., *Ceramides and skin function*. Am J Clin Dermatol, 2003. **4**(2): p. 107-29.
55. Harding, C.R., *The stratum corneum: structure and function in health and disease*. Dermatol Ther, 2004. **17 Suppl 1**: p. 6-15.
56. Moon, S.H., et al., *Altered levels of sphingosine and sphinganine in psoriatic epidermis*. Ann Dermatol, 2013. **25**(3): p. 321-6.
57. Toncic, R.J., et al., *Altered levels of sphingosine, sphinganine and their ceramides in atopic dermatitis are related to skin barrier function, disease severity and local cytokine milieu*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
58. Rerknimitr, P., et al., *Skin barrier function and atopic dermatitis*. Current Dermatology Reports, 2018. **7**(4): p. 209-220.
59. Kováčik, A., et al., *Effects of ceramide and dihydroceramide stereochemistry at C-3 on the phase behavior and permeability of skin lipid membranes*. Langmuir, 2018. **34**(1): p. 521-529.
60. Školová, B., et al., *Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. **1859**(5): p. 824-834.
61. Imhof, B., P. Xiao, and I. Angelova-Fischer, *TEWL, closed-chamber methods: Aquaflux and vapometer*. 2014.
62. Imhof, R.E., et al., *New instrument for measuring water vapor flux density from arbitrary surfaces* IFSCC Magazine 2002. **5**(4): p. 297-301.
63. Pullmannová, P., et al., *Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(8): p. 2115-26.

64. Bioxsystems.com, *AquaFlux™ Questions: What is the TEWL and how do you measure it?* <https://www.bioxsystems.com/faq/> (cit. 11. 4. 2021).
65. Fasano, W.J. and 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): p. 725-9.
66. Školová, B., et al., *The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes*. *Langmuir*, 2014. **30**(19): p. 5527-35.
67. Školová, B., et al., *Ceramides in the skin lipid membranes: length matters*. *Langmuir*, 2013. **29**(50): p. 15624-33.
68. Wakita, H., K. Nishimura, and M. Takigawa, *Composition of free long-chain (sphingoid) bases in stratum corneum of normal and pathologic human skin conditions*. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**(5): p. 617-22.
69. Agrawal, K., et al., *Sweat lipid mediator profiling: a noninvasive approach for cutaneous research*. *J Lipid Res*, 2017. **58**(1): p. 188-195.
70. Mitragotri, S., *Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways*. *J Control Release*, 2003. **86**(1): p. 69-92.
71. PubChem.ncbi.nlm.nih.gov, *PubChem compound summary for CID 3715, indomethacin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin> (cit. 11. 4. 2021).