

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie



Diplomová práca

**OPTIMALIZÁCIA MODELU KOŽNEJ BARIÉRY S OBSAHOM  
CERAMIDOV IZOLOVANÝCH Z ĽUDSKÉHO STRATUM  
CORNEUM**

Optimization of the skin barrier model with isolated ceramides of human Stratum  
corneum

Vedúci práce: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

### **Čestné vyhlásenie**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Táto práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, jún 2021

Lucia Dulanská

## **Pod'akovanie**

Rada by som sa pod'akovala mojej školiteľke Mgr. Petre Pullmannovej, PhD. za jej nekonečnú trpezlivosť, ochotu a odborné rady pri vedení tejto diplomovej práce. Taktiež ďakujem členom *Skin Barrier Research Group* za príjemné pracovné prostredie. Za technickú pomoc pri meraní FTIR ďakujem Ive Vencovskej a Dr. Karlovi Palátovi; Dr. Jaroslavovi Maixnerovi z VŠCHT v Prahe ďakujem za pomoc pri meraní XRD.

Za neoceniteľnú morálnu podporu a oporu po celú dobu môjho štúdia ďakujem mojej rodine a priateľom.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD A CIEĽ PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>2 ZOZNAM SKRATIEK</b> .....	<b>8</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>9</b>
3.1 KOŽNÁ BARIÉRA – CHARAKTERISTIKA, ŠTRUKTÚRA, FUNKCIA.....	9
3.1.1 <i>Charakteristika</i> .....	9
3.1.2 <i>Štruktúra</i> .....	9
3.1.3 <i>Funkcia kožnej bariéry</i> .....	12
3.2 STRATUM CORNEUM.....	13
3.2.1 <i>Typy ceramidov v ľudskej koži</i> .....	14
3.2.2 <i>Biofyzika lipidov kožnej bariéry</i> .....	15
3.2.3 <i>Modely Stratum corneum</i> .....	17
3.2.4 <i>Fázové prechody</i> .....	22
3.3 KORNEOCYTÁRNA LIPIDOVÁ OBÁLKA (CORNIFIED LIPID ENVELOPE) .....	23
3.4 RTG PRÁŠKOVÁ DIFRAKCIA .....	25
3.5 FTIR SPEKTROSKOPIA = INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIA S FOURIEROVOU TRANSFORMÁCIOU .....	27
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>31</b>
4.1 PRÍSTROJE A CHEMIKÁLIE .....	31
4.2 IZOLÁCIA <i>STRATUM CORNEUM</i> Z ĽUDSKEJ EPIDERMIS .....	32
4.3 EXTRAKCIA LIPIDOV ZO <i>STRATUM CORNEUM</i> .....	33
4.4 KOLÓNOVÁ CHROMATOGRÁFIA ĽUDSKÝCH KOŽNÝCH LIPIDOV .....	33
4.5 HPTLC ANALÝZA.....	34
4.6 ČASTICE SILIKAGÉLU AKO MODEL KORNEOCYTÁRNEJ LIPIDOVEJ OBÁLKY.....	36
<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>41</b>
5.1 HPTLC ANALÝZA.....	41
5.2 FTIR SPEKTROSKOPIA .....	42
5.2.1 <i>Valenčné vibrácie</i> .....	45
5.2.2 <i>Deformačné vibrácie</i> .....	47
5.2.3 <i>Vplyv modelu CLE na usporiadanie reťazcov</i> .....	50
5.3 RTG PRÁŠKOVÁ DIFRAKCIA .....	56
<b>6 DISKUSIA</b> .....	<b>64</b>
<b>7 ZÁVERY</b> .....	<b>68</b>
<b>9 LITERATÚRA</b> .....	<b>69</b>
<b>8 PRÍLOHA</b> .....	<b>80</b>

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie**

**Autor:** Lucia Dulanská

**Školiteľ:** Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Optimalizácia modelu kožnej bariéry s obsahom ceramidov izolovaných z ľudského *Stratum corneum*

*Stratum corneum* (SC), najvrchnejšia vrstva kože, reguluje transkutánne straty vody a chráni pred vonkajšími podmienkami a škodlivými látkami. Skladá sa z zrohovatých buniek - korneocytov a extracelulárnej lipidovej matrix, ktorá je zodpovedná za bariérové funkcie. Korneocyty sú pokryté kovalentne viazanými lipidmi a vytvárajú tak korneocytárnu lipidovú obálku (CLE). CLE sa považuje za prepojenie extracelulárnych lipidov s korneocytmi a slúži ako predlohová matrica. Naším cieľom bolo optimalizovať model kožnej bariéry simulujúcim taktiež prítomnosť CLE.

Lipidová časť modelu bola pripravená z ekvimolárnej zmesi izolovaných ceramidov ľudskej kože (hCer), cholesterolu a voľných mastných kyselín (FFA, buď protonovaných alebo deuterovaných) s 5 % (m/m) cholesterol-sulfátom. hCer sa extrahovali z izolovaného ľudského SC a purifikovali sa stĺpcovou chromatografiou. Zloženie hCer sa stanovilo vysokoúčinnou tenkovrstvovou chromatografiou. Častice silikagélu s reverznou a normálnou fázou slúžili ako model CLE a negatívna kontrola. Röntgenová difrakcia odhalila periodickú štruktúru modelov a ukázala dve lamelárne fázy s krátkymi a dlhými medzirovinnými vzdialenosťami, a separovaný cholesterol. Dlhá opakovaná vzdialenosť sa zmenila v závislosti od typu a množstva silikagélu. Termotropné správanie vzoriek s protonovaným alebo deuterovaným FFA bolo skúmané infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou.

## **ABSTRACT**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biophysics and Physical Chemistry**

**Author:** Lucia Dulanská

**Supervisor:** Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D

**Title of thesis:** Optimization of the skin barrier model with isolated ceramides of human *Stratum corneum*

*Stratum corneum* (SC), the uppermost layer of the skin, regulates transcutaneous water loss and protects against outer conditions and harmful substances. It consists of cornified cells - corneocytes and extracellular lipid matrix, which is responsible for the barrier functions. Corneocytes are covered with covalently bound lipids creating the corneocyte lipid envelope (CLE). CLE is considered to interconnect the extracellular lipids with corneocytes and to have a templating effect. We aimed to optimize a skin lipid model simulating also the presence of CLE.

The lipidic part of the model was prepared from an equimolar mixture of isolated human skin ceramides (hCer), cholesterol and free fatty acids (FFA, either protonated or deuterated) with 5 weight % of cholesteryl sulfate. hCer were extracted from the isolated human SC and purified by the column chromatography. The composition of hCer was determined by the high-performance thin-layer chromatography. The reverse-phase and normal phase silica gel particles served as the CLE model and the negative control, respectively. X-ray diffraction revealed the periodic structure of models and showed two lamellar phases with short and long repeat distances and separated cholesterol. The long repeat distance changed in dependence on the type and amount of silica gel. The thermotropic behavior of samples with protonated or deuterated FFA was revealed by Fourier-transform infrared spectroscopy.

# 1 ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Ľudská koža, konkrétne jej najvrchnejšia časť (*Stratum corneum*), je kľúčový orgán nášho tela, ktorý okrem ochrany voči negatívnym vplyvom vonkajšieho prostredia reguluje aj transkutánne straty vody. Nevyhnutnou podmienkou pre správne fungovanie kožnej bariéry je závislé od jej špecifickej štruktúry a zloženia. *Stratum corneum* je zložené zo zrohovatých buniek (korneocytov), medzi ktorými sa nachádza extracelulárna lipidová matrix, ktorá je primárne zodpovedná za správne bariérové vlastnosti kože. Na povrchu korneocytov sa nachádza obal, tvorený kovalentne viazanými lipidmi - korneocytárna lipidová obálka (CLE). CLE je štruktúra tvoriaca spoj medzi kožnými lipidmi lipidovej matrix a korneocytmi. Významnosť a dôležitosť CLE nie je spochybniteľná, jej presný vznik a úloha však stále nie sú plne objasnené. Tento fakt komplikuje aj skutočnosť, že stále nie sú vyvinuté postupy, ako vytvoriť modely *Stratum corneum*, ktoré by okrem voľných lipidov zahŕňali aj modely CLE.

Výskumná skupina *Skin Barrier Research Group* pod vedením prof. Vávrovej aktívne skúma *Stratum corneum* a lipidy kožnej bariéry v snahe čo najlepšie porozumieť ich vzniku, usporiadaniu či správaniu v ľudskej koži. Našou úlohou bola optimalizácia modelov kožnej bariéry, ktorá by obsahovala aj model CLE a sledovať správanie lipidov v týchto modeloch. Ako lipidy kožnej bariéry sme použili izolované ľudské ceramidy, mastné kyseliny (protonované aj deuterované) a cholesterol v ekvimolárnom množstve s 5% (m/m) cholesterol-sulfátom. Namiesto korneocytov sme použili častice silikagélu s hydrofobizovanými 18-uhlíkatými alkylovými reťazcami (RP-18) aj bez nich (NP), ktoré nám slúžili ako kontrola. Štrukturálne usporiadanie lipidov v modeloch CLE sa vyhodnocovalo röntgenovou difraktometriou, termotropné správanie vzoriek zase infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou.

## 2 ZOZNAM SKRATIEK

Cer EOS	<i>N</i> -(32-linoleyloxy)dotriakontanoyl- <i>D</i> -erythro-sfingoín
Cer EOP	<i>N</i> -(32-linoleyloxy)dotriakontanoyl-fytosfingoín
Cer NS24	<i>N</i> -tetrakosanoyl- <i>D</i> -erythro-sfingoín
Cer NP24	<i>N</i> -tetrakosanoyl-fytosfingoín
Cer AS24	$\alpha$ -hydroxy- <i>N</i> -tetrakosanoyl <i>D</i> -erythro-sfingoín
Cer AP24	$\alpha$ -hydroxy- <i>N</i> - tetrakosanoyl-fytosfingoín
SC	<i>Stratum corneum</i>
CLE	korneocytárna lipidová obálka
PBS	phosphate buffered saline
hCer	ľudské ceramidy
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol sulfát
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá kvapalinová chromatografia
Lig	lignocerová kyselina
FFA	vyššie mastné kyseliny
dFFA	deuterované vyššie mastné kyseliny
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
LPP	long periodicity phase – fáza s dlhou periodicitou
SPP	short periodicity phase – fáza s krátkou periodicitou



## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Kožná bariéra – charakteristika, štruktúra, funkcia

#### 3.1.1 Charakteristika

Ľudská koža patrí medzi jeden z najväčších orgánov ľudského tela. Je členitá, štruktúralne aj funkčne zložitá a okrem mnohých esenciálnych funkcií, ktoré vykonáva, je hraničným orgánom medzi vnútorným a vonkajším prostredím. Zaberá plochu 1,5-2 m<sup>2</sup> a z celkovej hmotnosti človeka zaberá 16 %, v závislosti od výšky a konštitučnej stavby jedinca. Hrúbka a farba kože sú premenlivé, hrúbka závisí od veku jedinca, lokalizácie kože a jej hydratácie, farba sa môže odvíjať od množstva betakaroténu, melanínu, stupňa hydratácie, množstva podkožného tuku alebo hrúbky rohovej vrstvy.<sup>1</sup>

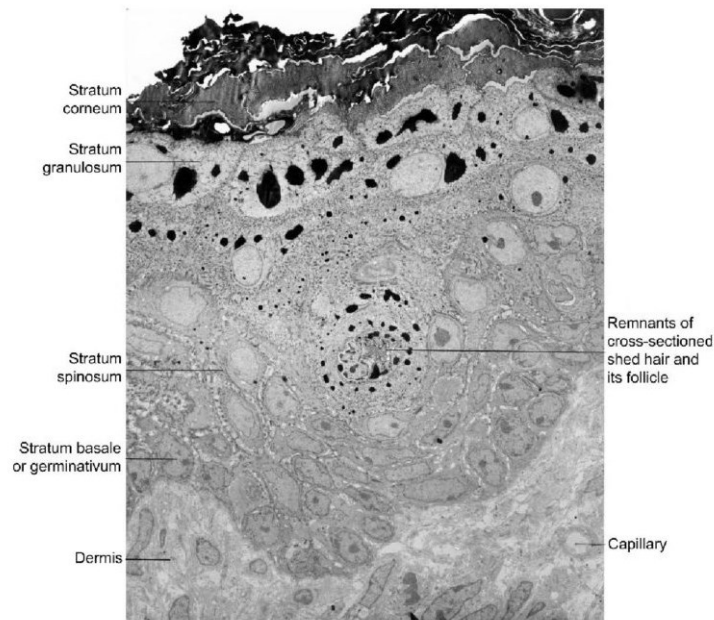
#### 3.1.2 Štruktúra

Koža je rozčlenená do troch hlavných funkčných oblastí – *epidermis* (hlavná ochranná vrstva), *dermis* (hlavná podporná vrstva) a *tela subcutanea*, tvorená väzivovým a tukovým tkanivom.<sup>2</sup>

#### ***Epidermis***

*Epidermis* je najvrchnejšia časť ľudskej kože, ktorá je v priamom kontakte s vonkajším prostredím. Je tvorená viacerými vrstvami keratinocytov so schopnosťou samoobnovy. Jednou z ich úloh je produkcia keratínu (vláknitý proteín), ktorý má protektívnu úlohu a spoluvytvára ochrannú vrstvu (*Stratum corneum*). *Epidermis* u dospelého človeka je zložená z troch základných typov buniek – keratinocytov, melanocytov, Langerhansových buniek a jedným dodatočným typom buniek (Merkelove bunky).<sup>3, 2</sup>

Hlavnými bunkami *epidermis* sú keratinocyty. Na základe ich usporiadania, štruktúry a štádia diferenciacie sa *epidermis* rozdeľuje na vrstvy – *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum lucidum* (len dlane a chodidlá) a *Stratum corneum* (obrázok Obr. 1).<sup>1</sup>



Obrázok 1. Názorné usporiadanie vrstiev ľudskej kože <sup>4</sup>

Vrstva bazálnych buniek, ktorá je trvalo mitoticky aktívna, produkuje dcérske bunky, ktoré podliehajú epidermálnej diferenciácii trvajúcej asi 30 dní (do odlučovania *Stratum disjunctum* – horná odlučujúca sa vrstva *Stratum corneum*). Po delení buniek dochádza k proliferácii, diferenciácii a migrácii bazálnych buniek do vonkajších vrstiev. Počas tohto prechodu dochádza k ich morfológickým zmenám – splošteniu a strate jadra (vznik tzv. korneocytov). V tomto procese vieme rozlíšiť tri štádiá – štádium syntézy, transformačné štádium a štádium terminálne.<sup>3</sup>

Štádium syntézy začína v *Stratum basale* a v dolnej časti *Stratum spinosum* a všeobecne pri ňom dochádza k zväčšeniu objemu buniek, počtu bunecných organel a obsahu proteínov v bunkách. Produktom diferenciácie v *Stratum spinosum* sú lamelárne telieska, ktoré obsahujú dvojlamely lipidov. V *Stratum granulosum* ďalej vznikajú keratohyalinové granulá tvorené profilagrínom bohatým na histidín, ktorých úlohou je spájanie keratínových vlákien. Tieto bunky ďalej exocytózou uvoľňujú do extracelulárneho priestoru lamelárne útvary silno lipofilnej povahy, ktoré sa podieľajú na formovaní lipidovej bariéry. Prechodom korneocytov do hornej časti *Stratum granulosum* a na hranicu *Stratum corneum* je štádium syntézy ukončené.<sup>3</sup>

V transformačnom štádiu dochádza k enzymatickej prestavbe všetkých produktov diferenciacie a bunčných organel.<sup>3</sup>

Terminálne štádium je charakteristické zmenšením obsahu vody v bunkách, čím dochádza k „zahusteniu“ konzistencie epidermálnych štruktúr. Keratohyalinové granuló obaľuje pevná intercelulárna amorfná masa s keratínovými filamentami. Lamelárne telieska vypudzujú do medzibunkového priestoru dvojlamely lipidov, ktoré sú v nich uložené. Extracelulárnymi enzýmami (fosfolipáza,  $\beta$ -glukocerebrozidáza, kyslá sfingomyelináza) dochádza k premene prekursorov ceramidov (sfingomyelinu a glukozylovaného ceramidu) na ceramidy, ktoré sú jednými z hlavných zložiek extracelulárnej lipidovej matrix, a vďaka tomu dochádza k spevneniu povrchu buniek *Stratum corneum*. Pôsobením transglutaminázy (membránový enzým) vznikajú medzi bunkami povrchovej vrstvy *Stratum corneum* tzv. cross links, epidermálne väzby peptidového charakteru. Po dokončení terminálneho štádia sa desmozomálne spoje uvoľňujú a rohové bunky na povrchu sa kontinuálne odlučujú.<sup>3</sup>

V *epidermis* sa nachádzajú pigment-produkujúce bunky, tzv. melanocyty. Veľké množstvo výbežkov, ktoré obsahujú, zabezpečuje ich spojenie s viacerými keratinocytmi. V každom melanocyte sa nachádzajú melanozómy produkujúce pigment melanín, ktorý je následne pomocou dendritických výbežkov uchovávaný v keratinocytoch. Langerhansove bunky sú typom dendritickej bunky, ktoré sa uplatňujú pri imunitných dejoch tým, že patria medzi antigén prezentujúce bunky. Antigény sú následne predkladané T-lymfocytom. Sú taktiež zodpovedné za hypersenzitívnu odpoveď alebo reakciu (hrajú dôležitú úlohu napr. pri kontaktnej dermatitíde). Priamo na bazálnu membránu *epidermis* nasadajú Merkelove bunky, ktoré sú vďaka svojmu synaptickému spojeniu s voľnými nervovými zakončeniami kožnými mechanoreceptormi.<sup>5, 3, 1</sup>

## ***Dermis***

*Dermis* je časť kože nachádzajúca sa medzi *epidermis* a podkožným tkanivom. Od *epidermis* je oddelená bazálnou membránou. Okrem kolagénu, elastických vlákien a extrafibrilárnej matrix obsahuje aj mechanoreceptory a termoreceptory, vlasové folikuly, potné, mazové a apokrinné žľazy. Je inervovaná a bohato krvne zásobená.<sup>1, 3</sup>

### 3.1.3 Funkcia kožnej bariéry

Okrem toho, že ľudská koža patrí medzi najväčší metabolicky aktívny orgán ľudského tela, je aj hraničnou bariérou medzi vnútorným prostredím ľudského organizmu a okolitým prostredím. Aby mohla udržiavať kontinuitu ľudského organizmu, vykonáva viaceré funkcie – ochrannú, metabolickú, regulačnú, imunologickú, sekrečnú, psychosociálnu, depotnú či senzorickú.<sup>1</sup>

#### **Funkcia ochranná (bariérová)**

Fyzikálna bariéra je zabezpečená vďaka súdržnosti, pevnosti a pružnosti ľudskej kože. Tieto vlastnosti sú zabezpečené vďaka mnohým procesom a funkciám, akými sú keratinizácia, funkcia mazových a potných žliaz, hydratácia *epidermis*, prítomnosť hustej siete kolagénových a elastických vlákien s podkožnou tukovou vrstvou, či prítomnosť desmozómov keratinocytov. Medzi jednu z hlavných funkcií je funkcia fotoprotektívna, t.j. ochrana pred škodlivými účinkami ultrafialového (UV) žiarenia. Najvýznamnejšou mierou sa na ochrane voči UV žiareniu podieľa melanín. Je schopný absorbovať UV žiarenie a zabrániť apoptóze melanocytov. V melanocytoch tvorí pigment melanín melanozómy. Na každý melanocyt pripadá v priemere 36 keratinocytov, ktoré sú zásobované melanínom pomocou dendritických výbežkov – tvoria tzv. melanocytárnu jednotku.<sup>6, 7, 1, 3</sup>

Chemická ochrana kože je sprostredkovaná schopnosťou kože selektívne prepúšťať látky na základe ich vlastností, akými je napr. hodnota rozdeľovacieho koeficientu. Látky rozpustné v tukoch, tzn. lipofilnej povahy, budú kožnou bariérou prechádzať ochotnejšie ako látky hydrofilné. Tomuto napomáhajú aj mazové žľazy, ktoré produkujú maz.<sup>1, 3, 7</sup>

#### **Funkcia sekrečná**

Ľudská koža je žľazou holokrinnou, tzn., že sekret, ktorý produkuje, postupne vyplní celú bunku a po jej apoptóze dochádza k uvoľneniu sekretu. Produktom tejto žľazy je keratín. Keratín je vo veľkej miere zastúpený v *Stratum corneum* (až 65 %), v nechtoch a vlasoch, pričom epidermálny keratín obsahuje menej cystínu a viac glycínu.<sup>1, 3</sup>

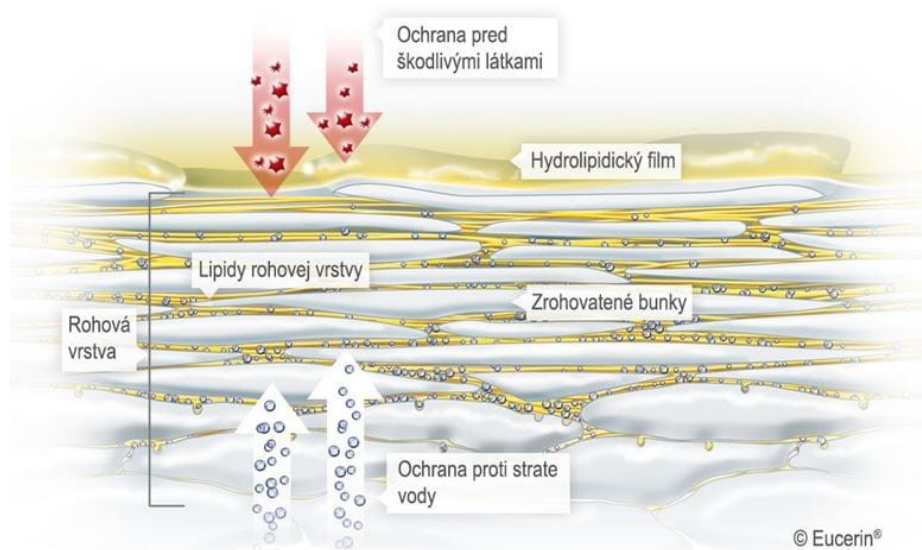
Na povrchu kože sa nachádza zmes dvoch typov látok lipidnej povahy – glandulárne a epidermálne lipidy. Tzv. hydrolipidický obal, ktorý pokrýva povrch kože, je tvorený lipidickými látkami vyskytujúcimi sa v *Stratum corneum*, nad ktorými sa nachádza kyslý plášť obsahujúci kožný maz, odlúčené keratinocyty a ostatné produkty kožného metabolizmu. Glandulárne lipidy (triacylglyceroly, skvalén, vosky) tvoria mazové žľazy, ktoré sa vyskytujú prakticky po celom povrchu tela (okrem dlaní a chodidiel). S vlasovým folikulom sú tieto žľazy spojené vývodom a tvoria tzv. pilosebaceóznú jednotku. Epidermálne lipidy (ceramidy a cholesterol) sú vytvárané kontinuálne, na povrch *epidermis* sa dostávajú v priebehu diferenciácie kožných buniek.

1, 8

### 3.2 Stratum corneum

*Stratum corneum* (SC), najvrchnejšia vrstva *epidermis*, je tvorené korneocytmi, čo sú bezjadrové keratinocyty, ktoré dosiahli svoju konečnú fázu diferenciácie a sú vzájomne spojené desmozómami (obrázok Obr. 2). Korneocyty zadržávajú keratínové vlákna vo filagrínovej matrix a ich korneocytárna obálka nahrádza plazmatickú membránu keratinocytov, na ktorej sa nachádza korneocytárna lipidová obálka, a tá je v priamom kontakte s lipidovou matrix. Medzi týmito plochými bunkami sa nachádza extracelulárna matrix bohatá na lipidy. Tieto dve zložky SC majú rozličné funkcie – korneocyty poskytujú mechanické spevnenie, chránia mitoticky aktívne bunky pred (UV) žiarením, regulujú cytokínmi regulované spustenie zápalu a udržiavajú hydratáciu. Extracelulárna lipidová matrix reguluje permeabilitu, iniciuje deskvamáciu korneocytov, má antimikrobiálnu peptidovú aktivitu, vylučuje toxíny a umožňuje selektívnu chemickú absorpciu. Lipidová extracelulárna matrix zaberá asi 20 % celkového objemu SC a hlavnými zložkami sú najmä ceramidy, cholesterol a vyššie mastné kyseliny (nevetvené, nasýtené, dĺžka uhl'ovodíkového reťazca je okolo 14-34 uhlíkov, ktoré sú zastúpené

ekvimolárne, v menšej miere sa v nej vyskytujú aj estery cholesterolu s organickými kyselinami a iné zložky, ako napr. cholesterol sulfát.<sup>9, 10, 11</sup>



Obrázok 2. Štruktúra *Stratum corneum* (rohovej vrstvy)<sup>12</sup>

### 3.2.1 Typy ceramidov v ľudskej koži

Ceramidy sú štrukturálne N-acylsfingozíny zložené zo sfingoidnej bázy a amidicky pripojenej vyššej mastnej kyseliny. Sú štrukturálne veľmi rozdielne a variabilné a v súčasnosti bolo popísaných 15 podtried ceramidov v ľudskom SC, s rozličnou štruktúrou, lokalizáciou a funkciou. Oproti klasickým fosfolipidom, ktoré tvoria bunkové membrány, majú menšiu polárnu hlavu a aj ich polárnosť je nižšia.<sup>13, 14, 15</sup>

Základom všetkých ceramidov je sfingoidná báza, ktorej reťazec je dlhý amino alkohol, zvyčajne 18-uhlíkatý. Tento základ môže byť buď sfingozín (S), dihydrosfingozín (dS), fytosfingozín (P) či 6-hydroxysfingozín (H). Amidicky viazaná mastná kyselina môže byť nasýtená (N),  $\alpha$ -hydroxy (A) alebo  $\omega$ -hydroxy (O), ktorá môže byť ďalej esterifikovaná linolovou kyselinou (EO). Najnovšie výskumy popisujú taktiež esterifikáciu hydroxyly v polohe 1 (1-O-acylované).<sup>16, 17, 18, 15</sup> Spôsob tvorenia názvov a typy štruktúr ceramidov sú uvedené na obrázku Obr. 3.

	Fatty acid moiety	Non-hydroxyl fatty acid	$\alpha$ -hydroxyl fatty acid	Esterified $\omega$ -hydroxyl fatty acid
<b>Sphingoid base moiety</b>				
<b>Sphingosine</b>				
[S]		[NS], Cer 2 7.4%	[AS], Cer 5 9.6%	[EOS], Cer 1 6.5%
<b>Dihydrosphingosine (sphinganine)</b>				
[dS]		[NdS], Cer 10 9.8%	[AdS], Cer 11 1.6%	[EOdS] 0.4%
<b>Phytosphingosine</b>				
[P]		[NP], Cer 3 22.1%	[AP], Cer 6 8.8%	[EOP], Cer 9 1.1%
<b>6-hydroxy-sphingosine</b>				
[H]		[NH], Cer 8 14.5%	[AH], Cer 7 10.8%	[EOH], Cer 4 4.3%

Obrázok 3. Názvoslovie a štruktúrne typy ceramidov<sup>19</sup>

### 3.2.2 Biofyzika lipidov kožnej bariéry

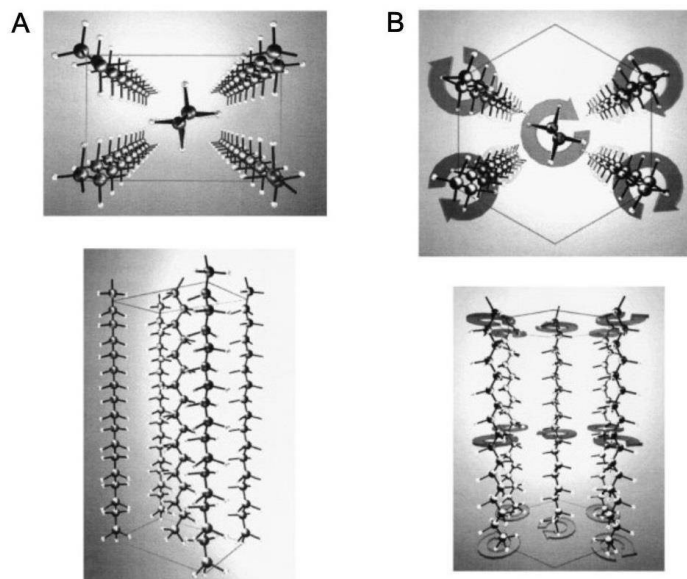
#### **Lamelárne usporiadanie lipidov SC**

Lipidové molekuly v matrix SC tvoria v extracelulárnom priestore predĺžené lamely, ktoré obklopujú korneocyty. Vďaka svojej polárnej hlavici (ktorá je v porovnaní s fosfolipidmi menšia) vedú priľnúť k sebe tesnejšie než lipidy v bežných fosfolipidových dvojvrstvách, čím tvoria pevnejšie usporiadanie. V tomto trojrozmernom usporiadaní vieme rozlíšiť lamelárnu organizáciu (usporiadanie lipidov do dvojvrstiev, tzv. lamiel) a organizáciu latelárnu (vyjadruje pevnosť a tesnosť lipidov vnútri lamely).<sup>14</sup>

Lamely matrix SC sú tvorené opakujúcou sa sekvenciou 3 pásov (široký – úzky - široký/ cca 5 nm - 3 nm - 5 nm), ktorých šírka je cca 13 nm. Tento pás je nazývaný ako fáza s dlhou periodicitou (long periodicity phase – LPP). K sformovaniu tejto fázy je nevyhnutný ceramid typu EO. Predpokladá sa, že jeho dlhý  $\omega$ -hydroxylovaný acylový reťazec prechádza celou šírkou lipidovej dvojvrstvy a spája ju do tejto štruktúry.<sup>20, 21</sup> Skupina prof. Bouwstry publikovala aj, že okrem LPP sa v ľudskom SC vyskytuje aj fáza s krátkou periodicitou (short periodicity phase – SPP), dlhá cca 6 nm, ktorá je však tvorená len 2 pásmi a jej usporiadanie pripomína štruktúru fosfolipidovej dvojvrstvy.<sup>22, 23</sup>

### ***Laterálne usporiadanie reťazcov v rovine lamely***

Vnútri lipidovej lamely (dvojvrstvy) vedľa lipidy v rámci svojej laterálnej organizácie prijať tri typy usporiadania, ktoré môže byť ovplyvnené zmenami vonkajších podmienok (napr. zahrievaním dochádza k rozvoľneniu reťazcov). Ortorombické je najhustejšie a najtesnejšie usporiadanie lipidov, usporiadané v obdĺžnikovej kryštalickej mriežke bez možnosti rotácie a všetky reťazce sú v *all-trans* konformácii (v tzv. cik-cak konformácii). V hexagonálnej fáze sú lipidy usporiadané do šesťuholníkovvej mriežky a sú v tzv. gélovej fáze, pričom počet *gauche* konformérov narastá. V kvapalno-kryštalickej fáze strácajú lipidy svoju laterálnu organizáciu a ich pohyb v rovine je voľný a neusporiadaný, s vysokým podielom *gauche* konformérov.<sup>14, 15</sup>

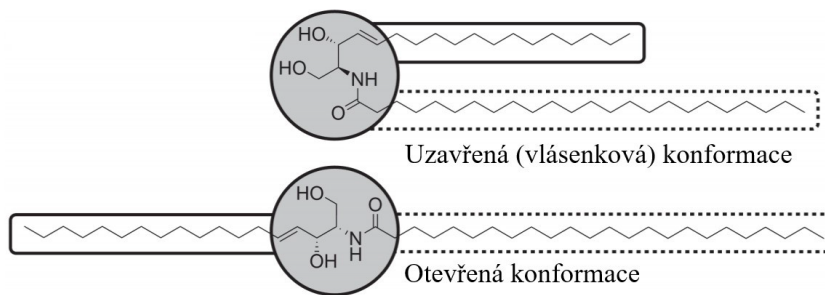


Obrázok 4. Laterálne usporiadanie lipidov SC do ortorombickej (A) a hexagonálnej (B) štruktúry<sup>35</sup>

### ***Molekulové konformácie ceramidov***

Amfifilné vlastnosti ceramidov určujú ich priestorové usporiadanie v SC. V prípade, ak sú alkylové reťazce usporiadané paralelne vedľa seba, hovoríme o tzv. vlásenkovej (uzavretej) konformácii. Reťazce orientované oproti sebe (v rovine) sa nachádzajú v tzv. otvorenej konformácii.<sup>24</sup>





Obrázok 5. Molekulové konformácie ceramidov v SC – hore uzavretá (vlásenková) a dole otvorená konformácia<sup>15</sup>

### 3.2.3 Modely Stratum corneum

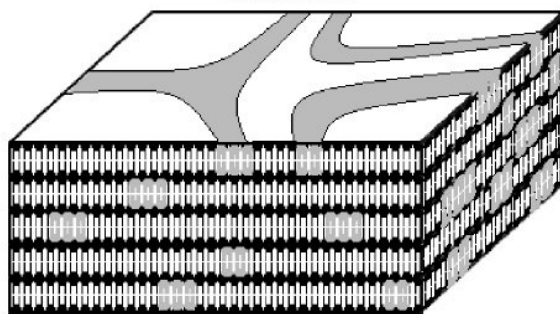
SC je komplexná štruktúra, tvorená rozličnými a rozmanitými druhmi lipidov, ktoré v rámci svojho usporiadania prijímajú rozličné konformačné usporiadania, interagujú spolu, čo sa môže odraziť na celkovej organizácii medzibunkovej hmoty. Popis lamelárnej štruktúry či laterálneho usporiadania lipidov SC nie je stále úplne jasný a postupom času bolo využitím rozličných technológií navrhnutých niekoľko modelov SC.<sup>14</sup>

#### **Model tehál a malty**

Ide o najjednoduchší a základný model štruktúry SC. Hovorí o usporiadaní korneocytov ako „tehál“, medzi ktorými sa nachádza „malta“, t.j. lipidová matrix. Nehovorí však o interakciách medzi nimi, ani o vzájomnom prepojení korneocytov pevnejšími väzbami než sú van der Waalsove sily a vodíkové mostíky, a ich jediným ukotvením je korneocytárna obálka. Neskoršie snahy vedcov a nové poznatky objavujúce sa v súvislosti so štruktúrou, vlastnosťami a funkciou SC viedli k rozporom a snahe modifikovať model SC. Jedným z faktov je aj to, že lipidová matrix nemôže mať čisto funkciu „malty“, vzhľadom k tomu, že sa významnou mierou podieľa na penetrácii kože<sup>25</sup>, a korneocyty sú dostatočne permeabilné<sup>26</sup>, než by mohlo mylne vyplývať z ich označenia ako „tehly“.<sup>27, 28, 29</sup>

### ***Doménový mozaikový model***

Je odvodený od modelu klasickej dvojvrstvy, ale nie je v rozpore s konformáciami naprieč SC. V úvahu berie predpoklad o laterálnej štruktúre a správaní sa lipidových fáz, nie nevyhnutne usporiadanie v axiálnom smere (naprieč lamelami). Keďže boli pri študovaní lipidovej matrix pozorované pri sebe aj kryštalické ortorombické aj fluidnejšie usporiadanie, navrhuje tento model výskyt lipidov v rámci domén s rozdielnym usporiadaním reťazca a fázovým správaním. Lamely by pozostávali z kryštalických zŕn (pevnejšej fázy vo vlásenkovej konformácii) zaliatych v tekutejšej matrix (obsahujúcej lipidy s krátkymi alebo nenasýtenými reťazcami).<sup>30, 29</sup>



Obrázok 6. Doménový mozaikový model SC, kde sú prítomné lipidy v kvapalno-kryštalickej (sivá oblasť) a pevnej kryštalickej (biela oblasť) fáze<sup>29</sup>

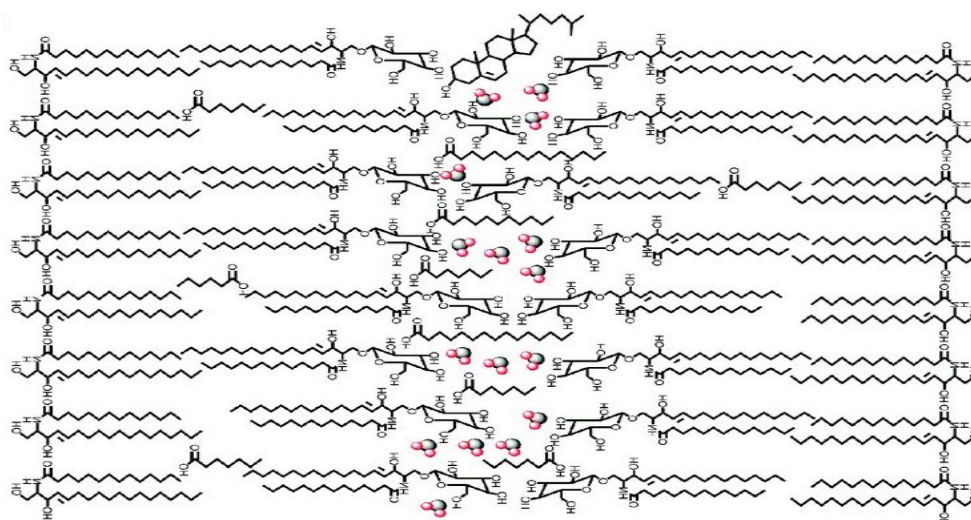
### ***Sandwich model***

Bol pôvodne založený na röntgenových difrakčných analýzach s izolovanou ľudskou kožou, ktoré v prvom rade zohľadňovali teplotu a hydratáciu. Tento model, ako je už bolo spomenuté skôr, hovoril že široké – úzke - široké usporiadanie fáz je výsledkom iného mikroštruktúrneho usporiadania vo forme 12–13 nm LPP. Pre SPP bolo stanovené jednoduché symetrické usporiadanie v dvojvrstve s predovšetkým náhodne rozloženými lipidmi v jednej laterálnej fáze. Prítomnosť fluidnej fázy bol znak pozorovaný a spojený s výskytom LPP. Obecne ide o najviac popisovaný a používaný model.<sup>31, 29</sup>

Obecne teda vychádza z predpokladu, že lipidy SC sú usporiadané v dvoch lamelárnych kryštalických fázach, šírka lamely sa pravidelne opakuje a je približne 6 a 13 nm a organizácia LPP je podmienená prítomnosťou ultra-dlhých ceramidov typu

EO. Vonkajší okraj lamely obsahuje tesne priliehajúce reťazce ceramidov s nasýteným acylom (24-26 uhlíkov) vo vlásenkovej konformácii a cholesterol. Acyl linolovej kyseliny s cholesterolom a krátkymi ceramidmi (s 16-uhlíkatým acylom) by mal vyplňať centrum lamely – vznik usporiadania dvoch kryštalických vrstiev okolo jednej fluidnej domény.<sup>32</sup>

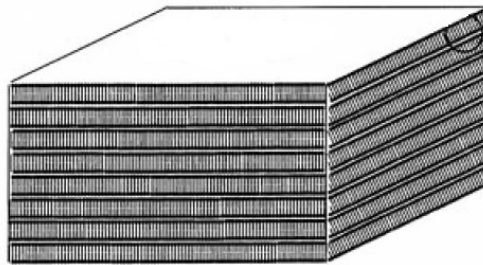
Rozšírením tohto modelu bolo neskôr jeho doplnenie o existenciu a výskyt malého množstva úplne rozvinutých ceramidov, ktoré sa vyskytujú naprieč dvojvrstvou a slúžia ako výstuž pre protiľahlé susedné lamely. Takýmto spôsobom je poskytnutá dostatočná stabilita pre lipidovú matrix.<sup>33, 29</sup>



Obrázok 7. Sandwich model SC s prítomnou fluidnou vrstvou uprostred<sup>34</sup>

### ***Model s jednou gélovou fázou***

Tento model sa opiera o teóriu modelu doménovej mozaiky, popisuje laterálne a fázové správanie lipidov. Predpokladá sa, že aj keď majú lipidy odlišné ortorombické alebo hexagonálne usporiadanie, netvoria odlišné domény. Lipidy radšej tvoria jednu súvislú gélovitú fázu. Obsah vody, rovnako ako aj jej priepustnosť, by bola v tomto usporiadaní nízka, taktiež aj celková mobilita lipidov. Vplyvom deskvamácie na povrchu SC a nižšieho obsahu vody môže dochádzať k fázovej separácii lipidov a oddeľovaniu kryštalickej fázy. Konformácia lipidov by bola spojená s týmto fázovým prechodom a mohla byť úplne otvorená alebo vlásenková.<sup>29, 35</sup>



Obrázok 8. Model SC s jednou gélovou fázou<sup>30</sup>

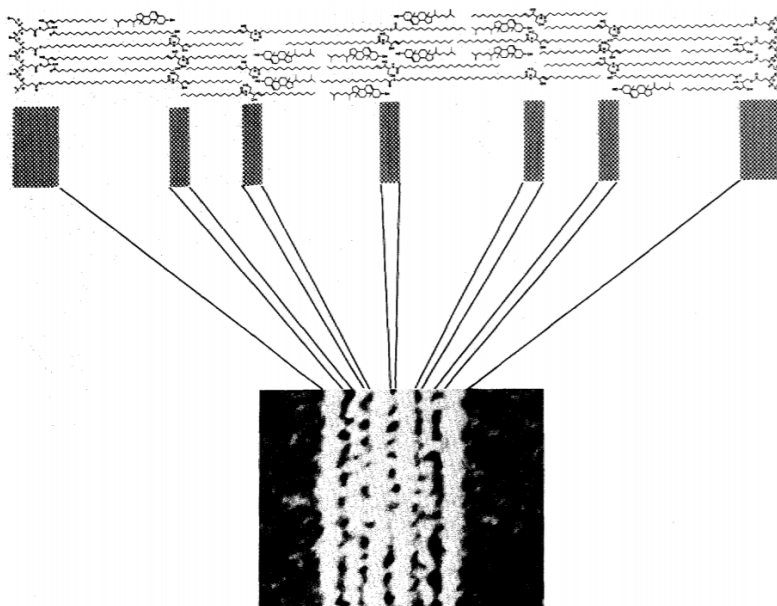
### ***Trojvrstvový model***

Trojvrstvový model vychádza zo sandwich modelu a predpokladá usporiadanie viacerých symetrických dvojvrstiev, no nevyklučuje ani usporiadanie, ktoré je úplne alebo čiastočne tvorené z úplne rozvoľnených ceramidov. Špeciálna vlastnosť modelu je založená na tekutej vrstve pozorovanej v lamelárnej stredovej rovine. Existencia tejto vrstvy je dôsledok dlhších reťazcov ceramidov a vyšších mastných kyselín, ktoré sa v tejto stredovej rovine prekrývajú. Tým, že majú väčšiu voľnosť pohybu a ich reťazce nie sú tak tesne usporiadané, sa správajú fluidnejšie.<sup>36, 29</sup>

### ***Model podľa Swartzendruber***

Tento model vychádza z pozorovania medzibunkového priestoru transmisnou elektrónovou mikroskopiou izolovaného ľudského SC.<sup>37</sup> Tvrdí, že vonkajšie svetlé širšie pásy odpovedajú uhlíkovým reťazcom smerujúcim od buniek k stredu (vrátane kovalentne viazaných  $\omega$ -hydroxylovaných ceramidov a mastných kyselín). Pásy, ktoré sú tmavé a užšie predstavujú oblasť s vyššou elektrónovou hustotou, teda polárne skupiny. Veľmi úzky svetlý pás v centrálnej rovine by obsahoval vzájomne vtesnané sfingozínové reťazce kovalentne viazaných ceramidov v otvorenej konformácii. Molekuly voľných lipidov by kovalentne viazané lipidy obklopovali, cholesterol sa má vyskytovať najmä v okrajových pásoch. V medzibunkovom priestore s dvojnásobným počtom lamiel, ktoré sú v usporiadaní široký-úzky-široký-široký-úzky-široký (tzn. spárovaná dvojvrstva) je toto usporiadanie označované ako tzv. Landmannova jednotka. Medzi spárovanými dvojvrstvami (Landmannovými jednotkami) je pozorovateľný úzky tmavý pás

(elektrónovo bohatá oblasť), ktorý pravdepodobne zahŕňa aj esterový acyl ceramidov typu EO.<sup>30, 38, 39, 40</sup>



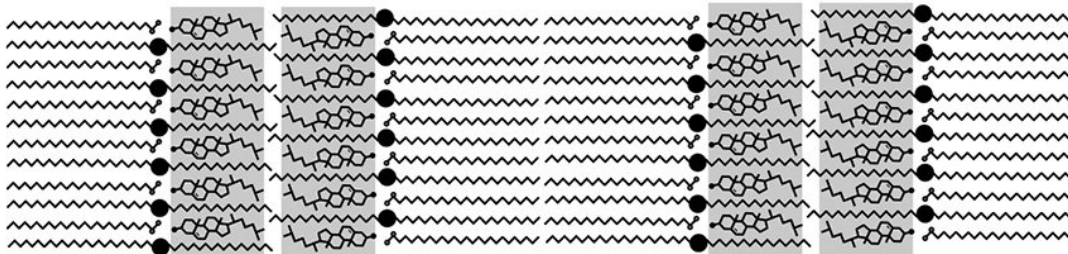
Obrázok 9. Navrhnuté molekulové usporiadanie Landmannovej jednotky v SC, kde dve široké krajné svetlé pásy predstavujú korneocytáru lipidovú obálku<sup>30</sup>

### *Asymetrický model dvojvrstvy*

Tento model opisuje usporiadanie a striedanie širokých-úzkych-širokých pásov, čo je podložené pozorovaním rozličného rozloženia elektrónových hustôt pod elektrónovým mikroskopom. Spočiatku sa tento model pripisoval riadenej asymetrickej distribúcií lipidov. Predpokladalo sa, že dlhé reťazce a krátke reťazce sú zvlášť asociované podjednotky, ktoré tvoria buď dlhé alebo krátke dvojvrstvy, a pri vzájomnej alternácii vzniká usporiadanie širokých-úzkych-širokých pásov.<sup>41, 29, 30</sup>

Neskôr, na základe modelových simulácií sa navrhlo, že opakujúce sa široké a úzke pásy by sa dali vysvetliť tým, že by sa ceramidy s dlhými reťazcami plne rozptyľovali v celej šírke. V rozpore s výsledkami bola predpokladaná prítomnosť izolovaných jednotiek 5–6,5 nm a / alebo 4–4,5 nm v horných vrstvách SC (t.j. v oblasti funkčnej bariéry), takto izolované jednotky sú však prítomné len v dolných vrstvách SC. V týchto vyšších funkčných oblastiach sa skôr navrhuje len prítomnosť párov jednotiek 5,5 + 4,5 nm alebo 6,5 + 4,5 nm, a tie spolu tvoria jednotku 10–11 nm.<sup>42, 43, 44, 45, 46</sup>

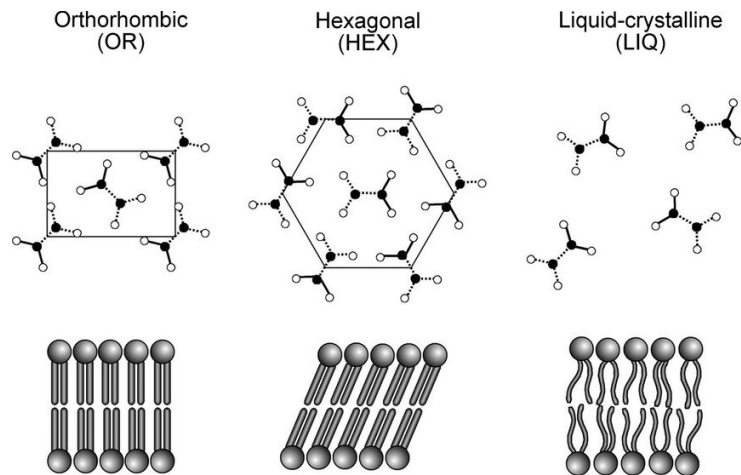
Prítomnosť cholesterolu by vysvetľovala asymetrické usporiadanie tým, že prednostne interaguje s nasýtenými reťazcami mastných kyselín a ceramidov len v krátkej dvojvrstve (kvôli jeho lepšej miešateľnosti s krátkymi reťazcami), a dlhé reťazce vyšších mastných kyselín sa budú vyskytovať v dlhej dvojvrstve. Taktiež sa prikláňa k domnienke, že ultra dlhé ceramidy sú pre vytvorenie LPP zásadné a vyskytujú sa vo vlásenkovej konformácii, ostatné cermiady sa vyskytujú v otvorenej aj vlásenkovej konformácii.<sup>29, 30, 47, 22</sup>



Obrázok 10. Schematické znázornenie usporiadania SC podľa modelu asymetrickej dvojvrstvy<sup>29</sup>

### 3.2.4 Fázové prechody

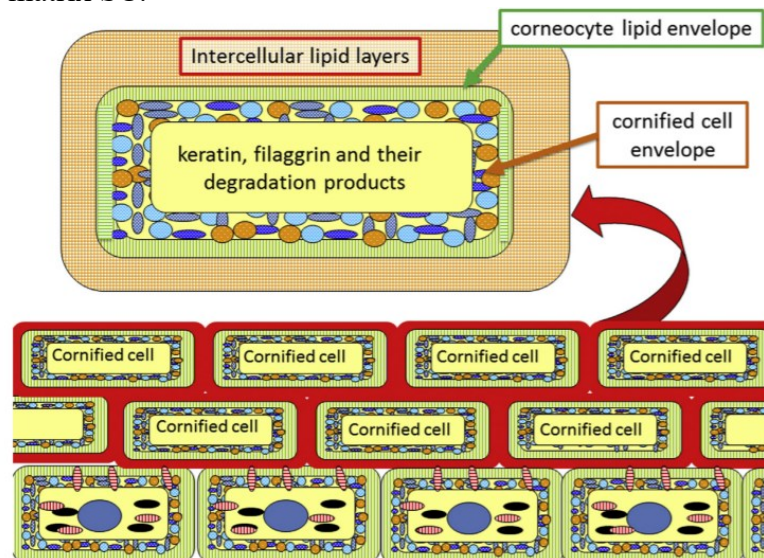
V závislosti od vonkajších podmienok, akými je napr. teplota, môžu ceramidy v SC meniť svoje vzájomné usporiadanie. V ľudskom SC boli identifikované štyri fázové prechody pri 35, 65, 90 a 95 °C, pričom prechod pri prvých troch teplotách je prisudzovaný zmenám v konformácii lipidov. Popisuje sa, že pri teplote 95 °C dochádza k denaturácii korneocytov, vzhľadom na to, že tento prechod bol zaznamenaný aj po extrakcii lipidov zo SC a je termálne nevratný.<sup>48</sup> Hlavným fázovým prechodom je proces topenia, tzn. prechod z usporiadanej gélovej fázy do neusporiadanej fluidnej fázy. Okrem tohto hlavného prechodu vieme zaznamenať aj prechod v rámci tzv. pevnej-pevnej fázy. Prechod medzi ortorombickou a hexagonálnou fázou (prechod v rámci pevnej fázy) môže nastávať pri teplotách relatívne fyziologických (35 – 40 °C). Pri vysokých teplotách (nad 70 °C) alebo pôsobením agresívnych činiteľov na ľudskú kožu (aplikácia chemikálií) môže dochádzať k prechodu z pevnej fázy na kvapalnú, čím sa zmení usporiadanie lipidov na fluidné. Takéto prechody a neusporiadanosť v lamelárnych dvojvrstvách môže výrazne ovplyvňovať vlastnosti SC akými sú permeabilita a priepustnosť vody.<sup>49, 14</sup>



Obrázok 11. Konformácie reťazcov od najpevnějšího (ortorombického) po fluidné usporiadanie<sup>14</sup>

### 3.3 Korneocytárna lipidová obálka (Cornified Lipid Envelope)

Korneocytárna lipidová obálka (CLE) je tvorená jednou tenkou vrstvou ceramidov s ultradlhými reťazcami (predovšetkým EOS) a malým množstvom lipidov s ultradlhým reťazcom. Je kovalentne viazaná k extracelulárnej časti korneocytárnej obálky a oddeľuje ju od lipidovej matrix SC.<sup>50</sup>



Obrázok 12. Štruktúrne usporiadanie SC – korneocytárne bunky obsahujúce keratín a filagrín sú ohraňované korneocytárnou obálkou a následne korneocytárnou lipidovou obálkou, ktorá je v priamom kontakte s lipidovou matrix<sup>50</sup>

Keratíny sú cytoskeletálne proteíny, ktoré tvoria stredné vlákna a slúžia ako lešenie pre tvorbu zrohovatej obálky (cornified envelope, CE). V *Stratum granulosum* sú tieto proteíny zosieťované do CE pôsobením transglutamináz. Špecializované lipidy vytvoria lipidový plášť, ktorý obklopuje každý korneocyt, korneocytárnu lipidovú obálku (CLE). CLE sa skladá z monovrstvy neobvykle dlhých reťazcov,  $\omega$ -acylovaných-hydroxy-ceramidov ( $\omega$ -OH-Cer; OS alebo  $\omega$ -OH-acyl-sfingozín), s menším množstvom  $\omega$ -hydroxy-mastných kyselín ( $\omega$ -OH-FA), ktoré sú kovalentne viazané primárne na glutamátové zvyšky v involukríne, nachádzajúce sa vo vonkajšej časti CE.<sup>51, 10, 53</sup>

CE je ďalej posilnená keratohyalínovými granulami (nachádzajúcimi sa v *Stratum granulosum*), ktoré obsahujú lorikrín, malé proteíny bohaté na prolín a taktiež filagrín. Proteín filagrín agreguje keratínové vlákna a podporuje kolaps keratinocytov. Lamelové granulá sú extrudované z granulovaných buniek, čím sa uvoľňuje ich obsah lipidov a proteínov.<sup>10, 51, 53</sup>

Vznik CLE stále nie je úplne jasný. Predpokladá sa, že CLE sa generuje z menšej zásoby vylučovaného extracelulárneho acyl-(glukozy)ceramidu. Hydrolýza  $\omega$ -acyl linolovej časti pomocou extracelulárnej lipázy by potom vytvorila skupinu  $\omega$ -OH-(glukozy)ceramidu, ktorá by vytvárala a formovala CLE. Lamelárne telieska vylučujú lipázy s kyslou aktivitou do extracelulárneho priestoru SC, rovnako ako ďalšie lipidy a bielkoviny (vrátane glukozylyceramidov). Vzhľadom na to, že lamelárne telieska obsahujú málo alebo žiadne triglyceridy, nie je jasné, aká by mohla byť úloha tejto hojnej aktivity extracelulárnej lipázy. Jednou z možností je, že by v extracelulárnom priestore mohla byť zodpovedná za hydrolýzu  $\omega$ -esterifikovanej (oxidovanej) kyseliny linolovej z acyl-ceramidu za vzniku  $\omega$ -OH-Cer, ktorý sa ďalej viaže kovalentnou väzbou na vonkajšiu stranu CE.<sup>51, 53</sup>

Najnovšia štúdia<sup>52</sup>, ktorá sa zaoberala patofyziologickým podkladom vzniku autozomálne recesívnej kongenitálnej ichtyózy, však ukazuje, že CLE by mohla vznikáť odlišným spôsobom. Poloha lipoxygenázových enzýmov, kyslej lipázy a proteínu LIPN (proteín kódovaný LIPN génom, ktorý je prekursorom špecifickej triedy lipáz) vzhľadom k lamelárnym telieskam ukazuje, že tento zhluk je umiestnený tak, aby potenciálne



odstraňoval oxidované linolové skupiny z acyl-(glukozy)ceramidu. Tento lipid však zostáva i naďalej ukotvený k membráne ohraničujúcej lamelárne telieska. Po lipolýze oxidovaného linolátu by potom nasledovalo zosieťovanie novo uvoľnených  $\omega$ -OH-Cer na CE pomocou alternatívneho transglutaminázového izoméru. Autori sa teda prikláňajú k názoru, že CLE vzniká fúziou membrán lamelárnych teliesok s apikálnou membránou buniek *Stratum granulosum*, táto hypotéza je však i naďalej predmetom skúmania.

Funkcia CLE zatiaľ taktiež nie je úplne jasná. Na základe vlastností, akou je odolnosť  $\omega$ -OH-(glukozy)ceramidu voči ceramidázam, sa predpokladá, že CLE môže prispievať k perzistencii tejto monovrstvy počas počiatočných štádií dozrievania korneocytov. Vďaka tomuto by mohlo CLE fungovať ako „lešenie“ pri organizácii extracelulárnych lamelárnych dvojrvtiev, čo je nevyhnutné pre správnu bariérovú funkciu kože.<sup>51, 53</sup>

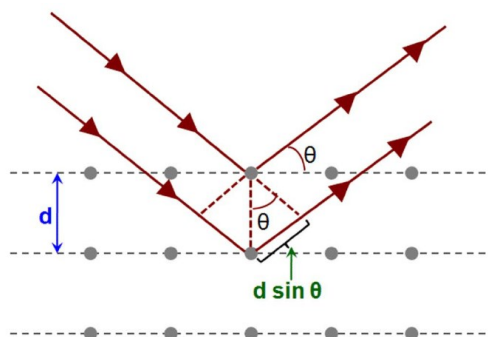
Ďalšou z možných funkcií CLE je zabezpečovanie súdržnosti SC. Podkladom pre túto teóriu je experimentálne pozorovanie lipidovej extrakcie, pri ktorej odstránenie lamelárnej dvojrvtvy vyvolalo kolaps, reorganizáciu a vzájomné pevné spojenie korneocytov, ale nie ich separáciu. Nie je však isté, či sa táto vlastnosť CLE objavuje aj za fyziologických podmienok.<sup>53, 11</sup>

### 3.4 RTG prášková difraktometria

Röntgenová (RTG) prášková difraktometria patrí medzi jeden zo spôsobov analýzy pevných látok a umožňuje analyzovať lipidovú štruktúru. Vlnová dĺžka ionizujúceho žiarenia je porovnateľná s medziatómovou vzdialenosťou vo väčšine lipidových štruktúr. Pri tejto analýze dochádza k interakcii RTG žiarenia s elektrónovým obalom atómov materiálu, ktoré sa v dôsledku tejto interakcie stávajú zdrojom ďalšieho (sekundárneho) koherentného RTG žiarenia. Interferencia tohto žiarenia spôsobí, že na základe interakcie primárneho RTG žiarenia so špecifickou štruktúrou látky dochádza v niektorých smeroch k zosilneniu alebo zoslabeniu intenzity žiarenia (obecne dôjde k ohybu na elektrónoch jednotlivých atómov v látke) – vzniká tzv. difrakčný obrazec.<sup>54</sup> Ak sú jednotlivé atómy rozmiestnené do identických štruktúrnych rovín s totožnou

vzdialenosťou medzi rovinami, dráhový rozdiel rozptýlených lúčov na jednotlivých rovinách sa pri určitých uhloch dopadu žiarenia rovná celočíselnému násobku vlnovej dĺžky žiarenia, ktoré bolo použité. Týmto spôsobom vieme zistiť počet a dĺžku rôznych lamelárnych fáz vďaka tomu, že dochádza ku konštruktívnej interferencii. Tento jav je možné popísať Braggovým difrakčným zákonom, ktorý vychádza z jednoduchej štruktúry, pri ktorej je v každom mriežkovom uzle prítomný jeden atóm. Konštruktívnu interferenciu vieme popísať podľa vzorca 1, kde  $d$  je vzdialenosť medzi atómovými rovinami,  $\theta$  je difrakčný uhol,  $\lambda$  je vlnová dĺžka röntgenového žiarenia a  $n$  je celočíselný násobok vlnovej dĺžky.<sup>55, 56, 57</sup>

$$n \cdot \lambda = 2 \sin \theta d \quad (1)$$



Obrázok 13. Braggov zákon – dopadajúce lúče röntgenového žiarenia sa odrazia pod difrakčným uhlom od rovin štruktúry,  $d$  je vzdialenosť medzi rovinami,  $\theta$  je difrakčný uhol<sup>58</sup>

V praxi potom hodnotíme získaný difrakčný záznam, kedy na ose X je zaznamenaná poloha detektora v stupňoch  $2\theta$  a na ose Y je relatívna intenzita difraktovaného žiarenia. Poloha difrakcií je daná tvarom, veľkosťou a priestorovým usporiadaním štruktúry. Tvar difrakčných pík je závislý na konkrétnom tvare látky a jej fyzikálnych vlastnostiach. Intenzita difrakcií sa odvíja od interakcie fotónov s elektrónovou konfiguráciou štruktúry.<sup>55, 56</sup>

### 3.5 FTIR spektroskopia = Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou

Infračervená spektroskopia, ktorá bola použitá pri štruktúrálnej analýze lipidových vzoriek, je nedeštruktívna analytická metóda slúžiaca k stanoveniu anorganických látok a k charakteristike štruktúry a identifikácii organických látok. Pri tejto analýze dochádza k absorpcii infračerveného žiarenia (t.j. elektromagnetické žiarenie s vlnovou dĺžkou 0,78 – 1000  $\mu\text{m}$ ). Prechod žiarenia vyvolá v skúmanej látke zmeny rotačne-vibračných energetických stavov molekuly, ktoré sú závislé na zmenách dipólového momentu molekuly. Molekulové vibrácie môžu byť buď valenčné (atómy vibrujú v smere molekulových väzieb), alebo deformačné (dochádza k zmene valenčných uhlov). Výstupným analytickým údajom je infračervené spektrum, ktoré zobrazuje najčastejšie závislosť absorpcie od vlnočtu a najväčší význam má oblasť 4000–200  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>59</sup> Počet vlnových dĺžok, ktorý sa vzťahuje na jednotku dĺžky, je charakterizovaný ako vlnočet alebo vlnové číslo. Ak vlnová dĺžka bude mať označenie  $\lambda$ , potom vlnočet bude predstavovať jej obrátenú hodnotu, teda  $1/\lambda$ . Pre odhad polohy absorpčného pásu platí, že pre energetický prechod u valenčných vibrácií je potrebná tým väčšia energia, čím je veľkosť viazaných atómov menšia a silová konštanta väzby väčšia (vzrastá od jednoduchej po násobnú väzbu).<sup>59</sup>

Konformácie uhl'ovodíkových reťazcov a ich laterálne usporiadanie v lipidoch je charakterizované niekoľkými vibráciami a navyše chovanie jednotlivých lipidových zložiek vieme sledovať oddelene. Dosiahneme to tak, že nahradíme protonovanú časť uhl'ovodíkového reťazca v lipidoch časťou deuterovanou. Týmto spôsobom vieme sledovať vzájomnú miesiteľnosť lipidov na základe odlišného posunu C-D a C-H vibrácií v IR spektre.<sup>60, 61</sup>

#### **Valenčné $\text{CH}_2/\text{CD}_2$ vibrácie**

Rozlišujeme symetrické  $\nu_s$  a asymetrické  $\nu_{as}$  valenčné vibrácie metylenových skupín, pričom obe sú citlivé na konformačné zmeny reťazca (*trans/gauche*) a ich laterálne usporiadanie. Valenčné vibrácie protonovaných reťazcov sa nachádzajú pri vlnočte okolo 2920-2850  $\text{cm}^{-1}$ , pri deuterovaných reťazcoch sa zobrazia pri vlnočte

u asymetrických vibrácií pri  $2190\text{ cm}^{-1}$ , u symetrických vibrácií pri hodnotách  $2095\text{ cm}^{-1}$ . Metylenové valenčné vibrácie sú kvalitatívnym ukazovateľom konformácií reťazcov a sú veľmi citlivé na zmeny teploty a vonkajších podmienok (napr. lipid-proteínové interakcie). Na základe tejto citlivosti vieme hodnotiť konformačné zmeny, t.j. *trans-gauche* izomerizáciu v reťazci. Prevažujúca prítomnosť *all-trans* konformácie v protonovaných reťazcoch je vyjadrená u  $\nu_s$  hodnotou vlnočtu pod  $2850\text{ cm}^{-1}$ , s rastúcim podielom *gauche* konformácie (napr. vplyvom zvyšujúcej sa teploty) sa hodnota vlnočtu zvyšuje. Súčasne so zmenou v pozícií absorpčného maxima  $\nu_s$  vibrácie dochádza k rozširovaniu absorpčného pásu, čo je odrazom zvyšujúcej sa rotančnej mobility pozdĺž uhlíkovodíkových reťazcov. Táto zmena je pozorovaná u asymetrických i symetrických vibrácií u protonovaných aj deuterovaných reťazcov. Prechod lipidov fázovými zmenami (napr. zvyšujúcou sa teplotou) je spojený so zmenami v tesnosti usporiadania reťazcov, čo sa v spektre prejaví zvýšením hodnoty vlnočtu  $\text{CH}_2/\text{CD}_2$  valenčných vibrácií.<sup>62, 63, 64, 65</sup>

Symetrické aj asymetrické vibrácie poskytujú, všeobecne, rovnocenné údaje o konformácií, no symetrické vibrácie sú viac citlivé na zmeny vo vzájomnom usporiadaní reťazcov. Podľa polohy tohto pásu ( $\nu_s$ ) vieme rozlíšiť aj to, či je posun vo vlnočte vyvolaný predovšetkým zmenou v geometrii usporiadania reťazcov alebo len obecnou neusporiadanosťou reťazca. Ak je poloha pásu  $\nu_s$  pod  $2850\text{ cm}^{-1}$ , posun je pripisovaný hlavne zmenám vo vzájomnom usporiadaní reťazcov, pochádzajúcim z prechodu z ortorombického na hexagonálne usporiadanie. V prípade, ak hodnota presiahne  $2850\text{ cm}^{-1}$ , sú zmeny pripisované len vzniku neusporiadanosti reťazcov.<sup>62, 65</sup>

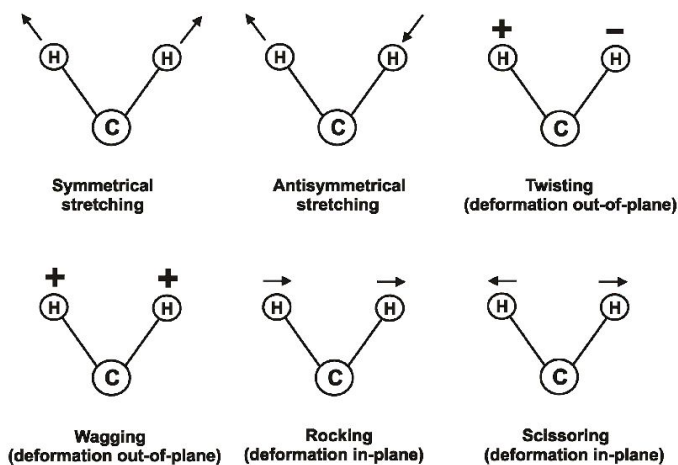
### **Deformačné $\text{CH}_2/\text{CD}_2$ vibrácie**

Usporiadanie lipidových reťazcov do kryštalickej mriežky a určiť prítomnosť oddelených fáz nám umožňuje sledovanie scissoring aj rocking deformačných vibrácií. Pás scissoring vibrácií sa v spektre nachádza u protonovaných reťazcov v oblasti  $1460\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$  (u rocking vibrácií je to  $718\text{-}731\text{ cm}^{-1}$ ), u deuterovaných reťazcov v oblasti  $1086\text{-}1094\text{ cm}^{-1}$ . Pozície vibrácií nám umožňujú sledovať, rovnako ako tvar absorpčného pásu, či sú alkylové reťazce usporiadané do ortorombickej alebo hexagonálnej mriežky, alebo sú neusporiadané. Pre orthorombické usporiadanie je

charakteristický rozštep píkov na dublet u oboch deformačných vibrácií, hexagonálne usporiadanie sa v spektre prejavuje jedným píkom. Štiepenie píkov je spôsobené spojením vibrácií susedných reťazcov tých istých izotopov, pri použití zmesi lipidov s protonovanými aj deuterovanými uhlíkmi vieme teda sledovať aj miesiteľnosť lipidov.<sup>62, 63</sup>

Okrem určenia usporiadania reťazca na základe polohy vibrácií vieme ako parameter k hodnoteniu použiť aj veľkosť šírky absorpčného pásu (plná šírka v polovici výšky píku) vypočítanej z druhej derivácie príslušného spektra. Tento parameter ukázal vysokú rozlišovaciu schopnosť pri určení typu laterálneho usporiadania lipidov v ľudskej a prasacej koži. Maximálna hodnota  $12,0 \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$  je dôkazom prítomnosti ortorombického usporiadania, zatiaľ čo hodnota  $4,0 \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$  je zase dôkazom prítomnosti hexagonálneho a/alebo kvapalno-kryštalického usporiadania.<sup>66, 67</sup>

Pri wagging vibráciách dochádza v usporiadaných fázach, kde sú reťazce po celej dĺžke v *all-trans* konformácií, k štiepeniu pásu a vzniku série (progresie) pásov medzi  $1180\text{-}1350 \text{ cm}^{-1}$ . Počet týchto pásov závisí od počtu metylenových skupín v *all-trans* reťazci. V prípade redukcie *all-trans* konformácie v neusporiadaných systémoch je toto štiepenie značne rušené alebo zoslabené a progresia pásov je nahradená lokalizáciou vibrácií ( $1341 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1353 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1368 \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>68, 69</sup>



Obrázok 14. Typy vibrácií v  $-\text{CH}_2-$  reťazci. V prvom riadku zľava: symetrický a asymetrický stretching, twisting vibrácie. V druhom riadku zľava wagging, rocking a scissoring vibrácie<sup>70</sup>

### *Vibrácie v polárnej oblasti*

K popisu interakcií v oblasti polárnej hlavy ceramidov a mastných kyselín môžeme použiť valenčné vibrácie karbonylu – karboxylové a amidové skupiny v oblasti 1690-1740  $\text{cm}^{-1}$ . Nízke hodnoty vlnočtu karboxylu naznačujú zapojenie skupiny do vodíkových mostíkov, zvýšenie vlnočtu sa prejaví pri ich oslabení. Deformačné vibrácie karbonylu ionizovaných kyselín sa nachádzajú v nižšej oblasti okolo 1395  $\text{cm}^{-1}$ . Amidové vibrácie I (1650-1660  $\text{cm}^{-1}$ ) sú tvorené najmä vibráciami amidového karbonylu, pokles vlnočtu je spojený s tvorbou vodíkových väzieb. V oblasti nižších (1540-1550  $\text{cm}^{-1}$ ) amidových vibrácií II, ktoré vychádzajú z deformačných N-H a valenčných C-N vibrácií, pokles vlnočtu naznačuje oslabenie vodíkových interakcií.<sup>62,</sup>

63, 71

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Prístroje a chemikálie

Ceramidy NP24, AS24, AP24 a NS24 boli zakúpené od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA), ceramidy EOS a EOP boli syntetizované na Katedre organickej a bioorganickej chémie (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové). Lignocerová kyselina a ostatné mastné kyseliny boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). Deuterované mastné kyseliny boli zakúpené od firmy C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Kanada). Tenkovrstvá chromatografia bola vykonaná na TLC doskách Silica gel 60 F254, výrobca Merck. Cholesterol, cholesterol sulfát, trypsín a všetky ďalšie použité činidlá ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ ), rozpúšťadlá a chemikálie ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , NaCl, KCl, gentamicín, acetón,  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ , tuhý parafín, chloroform, metanol, kyselina octová) v HPLC čistote boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). Detekčné činidlo pre HPTLC analýzu bolo v zložení 7,5%  $\text{CuSO}_4$ , 8%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a 10% metanol vo vode, všetky chemikálie boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). Ultračistá voda bola deionizovaná, destilovaná a filtrovaná systémom Millipore Q (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

PBS pufoer s pH 7,4 bol pripravený zmiešaním 10 mmol fosfátového pufru, 137 mmol NaCl a 2,7 mmol KCl, ako mikrobiálna prísada bol pridaný gentamicín v koncentrácií 50 mg/l.

Pre nástrek vzoriek na analýzu lipidov a corneocytov bol použitý Linomat V s prídavným posunom v smere Y-osi, pre kvantitatívnu analýzu lipidov bola použitá horizontálna vyvíjacia komora (oboje Camag, Muttenz, Switzerland). Sklenené sklíčka pre nástrek vzoriek s rozmermi  $22 \times 22 \text{ mm}^2$  boli od výrobcu Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Nemecko).

## 4.2 Izolácia *Stratum corneum* z ľudskej *epidermis*

Na izoláciu *Stratum corneum* (SC) boli použité vzorky kože získané od pacientov (žien) po plastickej operácii v Chirurgickom centre Sanus v Hradci Králové z oblasti brucha a prs a to konkrétne štyri kusy kože z roku 2015 a tri kusy kože z roku 2016. Použitie koží bolo schválené Etickou komisiou centra Sanus (No. 200609 S09P) a bolo s nimi zaobchádzané v súlade so zásadami Helsinskej deklarácie. Skalpelom bol odstránený podkožný tuk, zvyšky kožného mazu a nečistoty (ako stopy po permanentnom popisovači) boli odstránené gázou namočenou v acetóne. Po premytí koží PBS pufrom s gentamicínom boli vzorky skladované pri teplote  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pred izoláciou sme kožu nechali rozmraziť pri izbovej teplote  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení vzoriek sme zohriali destilovanú vodu na varnej platni na teplotu  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a teplota bola monitorovaná laboratórnym teplomerom a udržiavaná konštantná.

Prvá vzorka rozmrazenej ľudskej kože bola ponorená do vytemperovaného vodného kúpeľa na 30 s, vytiahnutá a následne z nej bola pomocou pinzety opatrne oddelená *epidermis*, obsahujúca SC. Oddelená *epidermis* sa rozprestrela vnútornou stranou na petriho misku, ktorá obsahovala malé množstvo destilovanej vody. Týmto spôsobom sa postupne oddelila *epidermis* zo všetkých vzoriek ľudskej kože. Izolovanú *epidermis* na petriho miske sme podliali pripraveným 0,5 % (m/V) roztokom trypsínu z prasačieho pankreasu a vložili do termostatu vyhriateho na teplotu  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky sa nechali pri konštantnej teplote v termostate inkubovať (~ 24 hod).

Na druhý deň bolo SC pomocou vatových tyčiniek zbavené zvyškov ostatných epidermálnych vrstiev, opláchnuté roztokom PBS pufru a acetónom. Po dôkladnom očistení bolo SC rozprestreté na čistú petriho misku a vysušené vo vákuu nad vrstvou  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  a tuhým parafínom. Vysušené SC bolo uchovávané v mrazničke.



### 4.3 Extrakcia lipidov zo *Stratum corneum*

Izolované a vysušené vzorky SC boli zvážené a zistené hmotnosti zaznačené. Následne sa všetky vzorky vložili do erlenmayerovej banky s magnetickou miešačkou. Ku vzorkám sa pridalo 150 ml roztoku chloroformu a metanolu v pomere 2:1. Vzorky sa miešali v roztoku pomocou magnetického miešadla po dobu dvoch hodín. Po skončení miešania sa zmes prefiltrovala cez gázu do varnej banky s objemom 250 ml, ktorú sme si predtým prázdnu zvážili. Filtrát bol úplne odparený na rotačnej vákuovej odparke pri otáčkach 90 ot./min a teplote 25 °C.

Celý postup extrakcie a odparenie sa zopakovali s tými istými vzorkami SC ešte dvakrát, raz s roztokom chloroformu a metanolu v pomere 1:1 a následne s tou istou zmesou rozpúšťadla v pomere 1:2, aby sme dosiahli čo najefektívnejšiu izoláciu lipidov ľudskeho SC. Týmto spôsobom sme získali ~ 1 g lipidov ľudskeho SC.

### 4.4 Kolónová chromatografia ľudských kožných lipidov

Na získanie a vyčistenie frakcie ceramidov bola použitá kolónová chromatografia s gradientovou elúciou zmesami rozpúšťadiel v postupnom zložení (v/v): chloroform a kyselina octová v pomere 99:1, a následne zmes chloroformu a metanolu v pomeroch 100:1 (MF1), 50:1, 20:1, 10:1. Ako stacionárnu fázu bol použitý silikagél 60.

Analyzovaný extrakt bol rozpustený vo vhodnom objeme zmesi chloroform a metanol v pomere 2:1, k zmesi bolo pridané malé množstvo silikagélu (~ 4 g) a po dôkladnom zmiešaní bolo rozpúšťadlo úplne odparené na vákuovej rotačnej odparke. Silikagél (stacionárna fáza) bol zmiešaný so 750 ml MF1 a touto zmesou bola naplnená kolóna vhodnej veľkosti. Na vrch zostavenej a naplnenej kolóny sa umiestnili lipidy adsorbované na silikagél a na vrch sa umiestnil morský piesok. Vyvíjanie sa začalo mobilnou fázou chloroform a kyselina octová v pomere 99:1, vďaka ktorej sa po pretečení oddelili najviac lipofilné a mobilné nečistoty a zároveň došlo k úplnej protonizácii mastných kyselín. Postupne sa menilo zloženie mobilnej fázy, čím sa dosiahlo oddeľovanie jednotlivých frakcií lipidov, vďaka ich rozličnej afinite k mobilným fázam.

Ako prvé boli oddelené nečistoty a následne cholesterol a vyššie mastné kyseliny (FFA), ďalej nasledovali frakcie s obsahom ľudských ceramidov (hCer). Pretečené frakcie s hCer boli odobraté do skúmaviek a prítomnosť konkrétneho ceramidu zistená tenkovrstvou chromatografiou (TLC). Na TLC analýzu bola použitá mobilná fáza chloroform a metanol v pomere 20:1, ako štandardy boli použité kyselina palmitová, CerNS 24, cholesterol a cholesterol sulfát. TLC boli derivatizované roztokom 1 g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , 2 g  $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ , 5 ml 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a zahriatím horúcim vzduchom.

Po skončení a pretečení každej mobilnej fázy sa žiadané frakcie spojili a rozpúšťadlo sa odparilo na rotačnej vákuovej odparke pri teplote 25 °C a otáčkach 90 ot./min.

## 4.5 HPTLC analýza

### *Príprava štandardov*

Na HPTLC analýzu bola pripravená kalibračná zmes. Štandardy uvedené v tabuľke 1 sa osobitne rozpustili v 1 ml roztoku chloroformu a metanolu v pomere 2:1. Z každého štandardu sa odobral príslušný objem do troch vialiek. Zmes pripravených štandardov sa vysušila pod prúdom plynného dusíka. V tabuľke Tab. 1 sú uvedené použité štandardy (lignocerová kyselina – Lig, cholesterol – Chol, príslušné ceramidy - Cer), ich množstvá a odobratý objem na jednu vialku HPTLC analýzy.

*Tab. 1: Hmotnosti a objemy štandardov použitých na kalibráciu HPTLC analýzy*

	<b>Hmotnosť rozpustených štandardov [mg] v 1 ml</b>	<b>Odobratý objem na jednu vialku [μl]</b>
<b>Chol</b>	1,03	49
<b>Lig</b>	1,13	44
<b>Cer NP24</b>	1,13	265
<b>Cer AS24</b>	1,15	87
<b>Cer AP24</b>	1,15	87
<b>Cer NS24</b>	1,18	169
<b>Cer EOS</b>	1,24	40
<b>Cer EOP</b>	1,52	20

Tab. 2: Hmotnosť štandardov použitá na jednu kalibračnú zmes

	Množstvo štandardov v jednej vialke [ $\mu\text{g}$ ]
<b>Chol</b>	51
<b>Lig</b>	50
<b>Cer NP24</b>	299
<b>Cer AS24</b>	100
<b>Cer AP24</b>	100
<b>Cer NS24</b>	199
<b>Cer EOS</b>	50
<b>Cer EOP</b>	30

### ***Príprava a aktivácia HPTLC dosky***

Horizontálna vyvíjacia komora bola nasýtená parami rozpúšťadla t.j. zmesou chloroformu a metanolu v pomere 2:1. Sklenená HPTLC doska sa nasycovala vo vyvíjacej komore po dobu 20 minút. Po nasýtení bola HPTLC doska premytá rovnakou zmesou rozpúšťadla chloroform a metanol, bol na ňu naznačený smer vyvíjania mobilnej fázy a následne bola doska vysušená pri 120 °C v teplovzdušnej rúre po dobu 30 minút.

### ***Nástrek vzoriek a štandardov pomocou Linomatu***

Kalibračná zmes bola rozpustená v koncentrácií 1 mg / ml v zmesi chloroform a metanol v pomere 2:1. Analyzované ceramidy boli rozpustené v koncentrácií 0,5 mg / ml v zmesi chloroform a metanol v pomere 2:1. Pomocou Linomatu V sa nastrekli vzorky analyzovaných ceramidov (8-krát) a kalibračná zmes (10-krát) v čiarach na začiatok HPTLC dosky (v smere vyvíjania). Po nastreknutí sa HPTLC doska nechala vysušiť v digestore po dobu 30 minút.

### ***Vyvíjanie a detekcia***

Vyvíjanie prebehlo v automatickej vertikálnej vyvíjacej komore (Camag, Muttentz, Švajčiarsko). Mobilná fáza pre vyvíjanie bola zložená zo zmesi chloroform, metanol a kyselina octová v pomere 95:4,5:0,75 (v/v/v), a pripravila sa čerstvá v čase jej použitia. Mobilnou fázou sa najprv premyli nálevky HPTLC prístroja (v množstve 2,5 ml pre každú nálevku), následne sa vložila HPTLC doska. Do náleviek sa pridalo 25 ml mobilnej fázy

pre nasýtenie komory a 10 ml mobilnej fáze pre samotné vyvíjanie. Vyvíjanie prebehlo na dvakrát – prvý raz do výšky 8 cm a následne do výšky 6 cm.

Po skončení vyvíjania bola HPTLC doska ponorená na 10 sekúnd do detekčného činidla (7,5% CuSO<sub>4</sub>, 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a 10% metanol vo vode) a nechala sa vypáliť v teplovzdušnej rúre pri 180°C po dobu 30 minút. Po vypálení bola HPTLC doska vyhodnotená denzitometricky pomocou TLC skeneru 3 a VisionCats softwaru (Camag, Muttenz, Switzerland).

#### **4.6 Častice silikagélu ako model korneocytárnej lipidovej obálky**

##### ***Charakteristika použitých silikagélů***

Použité silikagély boli získané z HPTLC dosiek od firmy Merck Glass typ HPTLC Silica gel 60 a Silica gel 60 RP-18. Stredný rozmer častíc u oboch typov HPTLC dosiek bol 5-7 μm, hodnoty ich špecifického povrchu boli 480 - 540 m<sup>2</sup>/g, porozita 0,74 – 0,84 ml/g a hrúbka vrstvy silikagélu bola 150-200 μm.

Silikagél bol z každej dosky opatrne zoškrabaný skalpelom do kadičky a následne ešte premytý zmesou chloroformu a metanolu v pomere 2:1. Premytý silikagél bol dôkladne vysušený vo vákuu nad vrstvou P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> a tuhým parafínom. Silikagél RP-18 obsahuje kovalentne viazané 18-uhlíkaté alkylové reťazce, u ktorých predpokladáme, že budú prostredníctvom hydrofóbných interakcií ovplyvňovať usporiadanie lipidov kožnej bariéry. Silikagél NP, ktorý tieto reťazce neobsahuje, slúži ako negatívna kontrola.

##### ***Príprava lipidov a silikagélu***

Do odmerných baniek objemu uvedeného v tabuľke Tab. 3 sa navážilo príslušné množstvo lipidov (cholesterol sulfát - CholS, mastné kyseliny - FFA, deuterované mastné kyseliny - dFFA, cholesterol – Chol, ľudské ceramidy - hCer), a doplnil sa na daný objem zmesou rozpúšťadla chloroform a metanol v pomere 2:1, CholS sa rozpustil len v čistom metanole. Izolované ľudské ceramidy sa navážili do vialky a doplnili rovnakou zmesou rozpúšťadla chloroform a metanol.

Tab. 3: Hmotnosti lipidov a objemy vialiek použité na prípravu vzoriek

	Hmotnosť lipidov [mg]	Objem vialky [ml]
<b>CholS</b>	1,46	2,00
<b>FFA</b>	4,25	2,00
<b>dFFA</b>	2,51	1,00
<b>Chol</b>	7,77	1,00
<b>hCer</b>	20,61	3,00

Po dôkladnom rozpustení lipidov sa do šiestich označených vialiek napipetovali podľa tabuľky Tab. 4 príslušné objemy lipidových roztokov. Použité množstvá lipidov zodpovedajú mólovému pomeru hCer:FFA:Chol = 1:1:1 s prídavkom 5 hmotnostných % CholS. Pripravené zmesi sa vysušili pod prúdom plynného dusíku a uschovali.

Tab. 4: Objemy a množstvá lipidov obsiahnuté v príslušných vzorkách

	Objem lipidov odobraný do príslušných vzoriek [µl]					Množstvo lipidov obsiahnuté vo vzorkách [mg]				
	FFA	Chol	hCer	CholS	dFFA	FFA	Chol	hCer	CholS	dFFA
<b>LC</b>	586	358	363	370	0	1,24	1,39	2,49	0,27	0
<b>LC_d</b>	0	174	176	185	271	0	0,68	1,21	0,14	0,68
<b>LNP</b>	586	358	363	370	0	1,24	1,39	2,49	0,27	0
<b>LNP_d</b>	0	174	176	185	271	0	0,68	1,21	0,14	0,68
<b>LRP</b>	586	358	363	370	0	1,24	1,39	2,49	0,27	0
<b>LRP_d</b>	0	174	176	185	271	0	0,68	1,21	0,14	0,68

### **Nástrek vzoriek na sklíčka pomocou Linomatu**

Podľa tabuliek a počtu vzoriek sa rozpustili lipidy v príslušnom množstve zmesi hexán a 96% etanolu v pomere 2:1 a podľa tabuliek Tab. 5 a 6 sa pridalo odpovedajúce množstvo silikagélu (buď NP alebo RP-18). Objem rozpúšťadla sa dopĺňal vždy tak, aby koncentrácia lipidu v roztoku bola 4,5 mg/ml. Kontrolné vzorky (LC), ktoré sa nastrekovali ako prvé, neobsahovali žiadny silikagél. Pred samotným nástrekom bolo dôležité skontrolovať, aby sa vo vzorke nenachádzali hrudky silikagélu a prípadné aglomeráty rozrušiť buď pretrepaním alebo vložením do ultrazvukového kúpeľa. Takto pripravená zmes sa následne nabrala do 100 µl striekačky, odkiaľ sa nastrekovala na plochu 1 cm<sup>2</sup> sklíčka pomocou prístroja Linomat V s dodatočným posuvom 1 cm/min

v y-smere pohyblivej platformy prístroja. Na každé krycie sklíčko s rozmermi 22 mm × 22 mm bolo nastreknuté 3 × 100 µl zmesi, každý nástrek predstavoval objem 100 µl, po ktorom sa sklíčko otočilo o 90° a prebehol ďalší nástrek.

Tab. 5: Hmotnosti lipidov a silikagélu v zmesiach nastrekovaných na sklíčka

Vzorka	Lipid [mg]	Silikagél [mg]	Roztok LC [µl]
LC_1	1,35	0	300
LC_2	1,35	0	300
LNP_0,16a	1,35	0,16 (NP)	300
LNP_0,16b	1,35	0,16 (NP)	300
LNP_0,5a	1,35	0,50 (NP)	300
LNP_0,5b	1,35	0,50 (NP)	300
LNP_1a	1,35	1,00 (NP)	300
LRP_0,16a	1,35	0,16 (RP-18)	300
LRP_0,16b	1,35	0,16 (RP-18)	300
LRP_0,5a	1,35	0,50 (RP-18)	300
LRP_0,5b	1,35	0,50 (RP-18)	300
LRP_1a	1,35	1,00 (RP-18)	300

Tab. 6: Hmotnosti deuterovaných lipidov a silikagélu v zmesiach nastrekovaných na sklíčka

Vzorka	Lipid [mg]	Silikagél [mg]	Roztok LC [µl]
LC_d	1,35	0	300
LNP_d 0,16	1,35	0,16 (NP)	300
LNP_d 0,5	1,35	0,50 (NP)	300
LRP_d 1	1,35	1,00 (RP-18)	300
LRP_d 0,16	1,35	0,16 (RP-18)	300
LRP_d 0,5	1,35	0,50 (RP-18)	300

Nastreknuté vzorky sa dali vysušiť na vákuum nad vrstvu P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> a tuhého parafínu, aby sa odstránili zvyšky rozpúšťadla. Následne sa vyhriala teplovzdušná rúra na 70°C, vložili sa do nej vzorky, pri tejto teplote boli temperované 10 min, potom bola rúra vypnutá a vzorky v nej boli ponechané až do vychladnutia na izbovú teplotu (~ 4 hod).

Takto pripravené vzorky boli poslané na RTG analýzu (analýza len protonovaných vzoriek) a následne na FTIR analýzu (analýza protonovaných aj deuterovaných vzoriek).

### ***Vyhodnocovanie***

#### *a. RTG difraktometria = Röntgenova prášková difrakčná analýza*

Meranie röntgenovej difrakcie prebehlo na Vysokej škole chemicko-technologickej v Prahe, v laboratóriu Röntgenovej difraktometrie a spektrometrie. Bol použitý prístroj X'Pert PRO  $\theta$ - $\theta$  práškový difraktometer (PANalytical B.V., Almelo, Netherlands), s parafokusujúcou Bragg – Brentano geometriou pomocou žiarenia Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ,  $U = 40 \text{ kV}$ ,  $I = 30 \text{ mA}$ ), uhlový rozsah  $0,6 - 30^\circ (2\theta)$ . Dáta boli skenované pomocou ultrarýchleho detektora X'Celerator s veľkosťou posunu  $0,0167^\circ$  a časom počítania  $20,32 \text{ s/posun}$ . Dáta boli vyhodnotené pomocou programu Dataviewer (PANalytical B.V., Almelo, Netherlands) a ďalej spracované v programe MS Excel a GraphPad.

#### *b. FTIR = Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou*

Vzorky boli následne merané pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR spektroskopia). Bol použitý prístroj Nicolet 6700 spectrometer (Thermo Scientific, USA) vybavený s jedno-odrazovým MIRacle ATR ZnSe kryštálom (PIKE technologies, Madison, USA). Teplotná závislosť IR spektier bola študovaná v rozmedzí od  $28^\circ\text{C}$  do  $100^\circ\text{C}$  s krokmi  $2^\circ\text{C}$  pomocou modulu riadenia teploty (PIKE Technologies, Madison, USA). Po každom zvýšení teploty sa vzorka nechala stabilizovať 6 minút, potom sa zmeralo spektrum. Dáta boli vyhodnocované v programe OriginPro 2019b, píky boli fitované funkciou Gauss Amp, použili sme lineárnu funkciu na aproximáciu pozadia. Fázové prechody boli vyhodnotené ako inflexné body sigmoidnej funkcie (Boltzmannova funkcia). Funkcia Gauss Amp (rovnica 2) zahŕňa koeficienty:

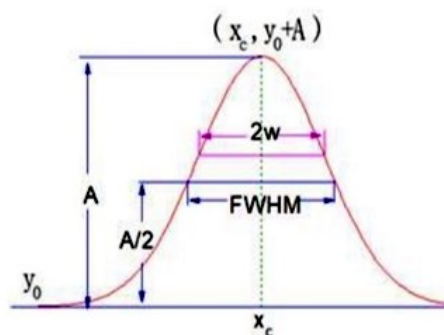
$y_0$  - *offset*, posun na ose Y,

$x_c$  – centrum píku na ose X,

$w$  – pološírka píku definovaná podľa rovnice  $2w = \frac{FWHM}{\sqrt{\ln 4}}$ , kde *FWHM* (angl. *full width at half maximum*) je šírka píku v polovici maxima,

$A$  - amplitúda (výška píku). Na obrázku Obr. 15 je znázornený graf funkcie Gauss Amp použitej na vyhodnocovanie píkov v FTIR spektrách s príslušnými koeficientami.

$$y = y_0 + Ae^{-\frac{(x-x_c)^2}{2w^2}} \quad (2)$$



Obrázok 15. Vyhodnocovaný pík podľa funkcie Gauss Amp s príslušnými veličinami (OriginPro)

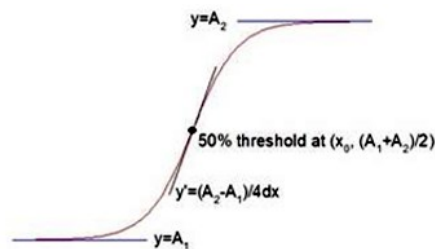
Fázové prechody boli vyhodnotené zo závislostí polohy symmetrickej valenčnej vibrácie na teplote pomocou Boltzmannovej funkcie (rovnica 3). Koeficienty funkcie sú:

$A_1$  - počiatková hodnota na ose Y (počiatok sigmoidy)

$A_2$  - konečná hodnota na ose Y (koniec sigmoidy)

$x_0$  – centrum sigmoidy (inflexný bod). Na obrázku Obr. 16 je znázornená Boltzmannova funkcia s príslušnými koeficientami.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (3)$$



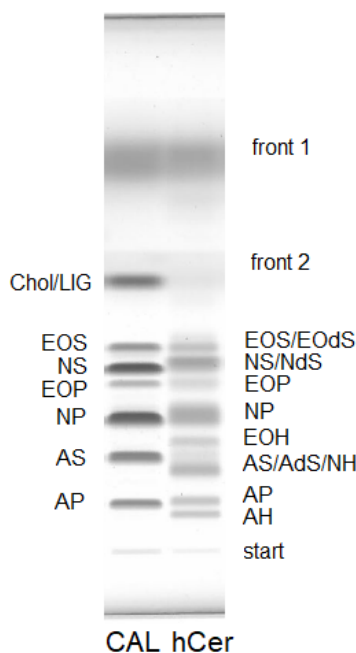
Obrázok 16. Vyhodnocovaná sigmoida podľa Boltzmannovej funkcie s príslušnými veličinami



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 HPTLC analýza

Na obrázku Obr. 17 je reprezentatívna časť chromatogramu HPTLC analýzy použitej pri semikvantitatívnej analýze extrahovaných lipidov zo SC, ktorá bola urobená v programe VisionCats (Camag, Švajčiarsko). V ľavom stĺpci je prítomná kalibračná zmes v zložení (zdola): ceramidy AP24, AS24, NP24, EOP, NS24, EOS, cholesterol a lignocerová kyselina. Vpravo je znázornené zloženie vyextrahovaných lipidov. Vyvíjanie prebehlo na dvakrát, prvý raz do výšky 8 cm (front 1), druhý raz do výšky 6 cm (front 2). Ceramidy, ktoré sa v analyzovanej zmesi objavili (zdola: ceramidy AH, AdS, NH, EOH, NdS, EOdS), no neboli použité ich štandardy, boli vyhodnotené podľa pravdepodobnej afinity ceramidu k mobilnej a stacionárnej fáze a teda predpokladu ich výskytu pri danej hodnote retenčného faktoru ( $R_f$ , pomer vzdialenosti pásu látky od štartovacej čiary a vzdialenosti pásu čela od štartovacej čiary), ktorú prešla látka na HPTLC doske od začiatku vyvíjania. Ich semikvantifikácia prebehla podľa kalibračnej krivky štruktúrne najpodobnejšieho ceramidu. Vyhodnotením v programe VisionCats sme určili nasledujúce zloženie:



Obr. 17. Chromatogram HPTLC analýzy s kalibračnou zmesou (naľavo) a analyzovanými hCer (napravo)

V nasledujúcej tabuľke Tab. 7 je uvedené percentuálne (m/m) zastúpenie jednotlivých zložiek ceramidov v analyzovanej zmesi. Niektoré zložky ceramidov sa nevyeluovali samostatne, preto je ich obsah počítaný a zahrnutý v percentuálnom podiele iných ceramidov, ktoré majú podobné hodnoty  $R_f$ . Celkové zloženie našej zmesi izolovaných hCer odpovedá ich zloženiu v ľudskej koži,<sup>72</sup> čo je indikátor ich efektívnej extrakcie.

Tab. 7. Zastúpenie jednotlivých zložiek ceramidov v analyzovanej zmesi

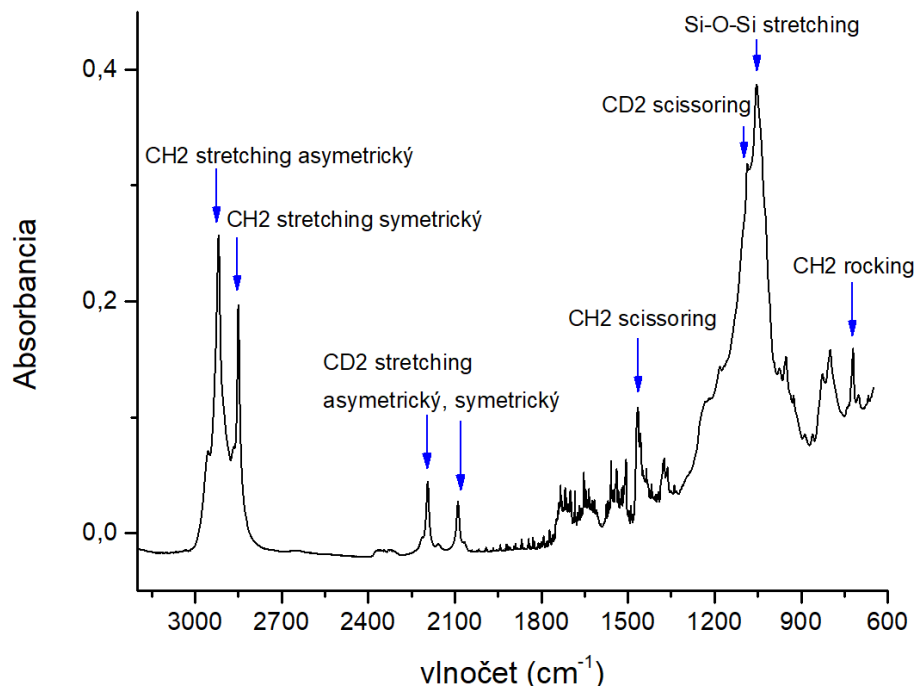
Ceramid - typ	Zastúpenie zložiek v analyzovanej zmesi hCer [%]
<b>Cer AP</b>	8,95
<b>Cer AS/AdS/NH</b>	16,47
<b>Cer EOP</b>	2,60
<b>Cer EOS/EoS</b>	6,54
<b>Cer NS/NdS</b>	22,55
<b>Cer NP</b>	31,97
<b>Cer EOH</b>	3,54
<b>Cer AH</b>	7,39

## 5.2 FTIR spektroskopia

FTIR spektroskopia nám umožnila sledovať polohy vibrácií charakteristických chemických skupín a zmeny v usporiadaní vzoriek na základe charakteristických vibrácií. Na obrázku Obr. 18 je znázornené spektrum vzorky hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5 pri 32°C a ukazuje prítomné a analyzované vibrácie. Vďaka použitiu protonovaných a deuterovaných FFA vieme v spektre pozorovať tieto zložky samostatne a oddelene, vzhľadom k tomu, že obe vykazujú odlišné hodnoty vlnočtov.

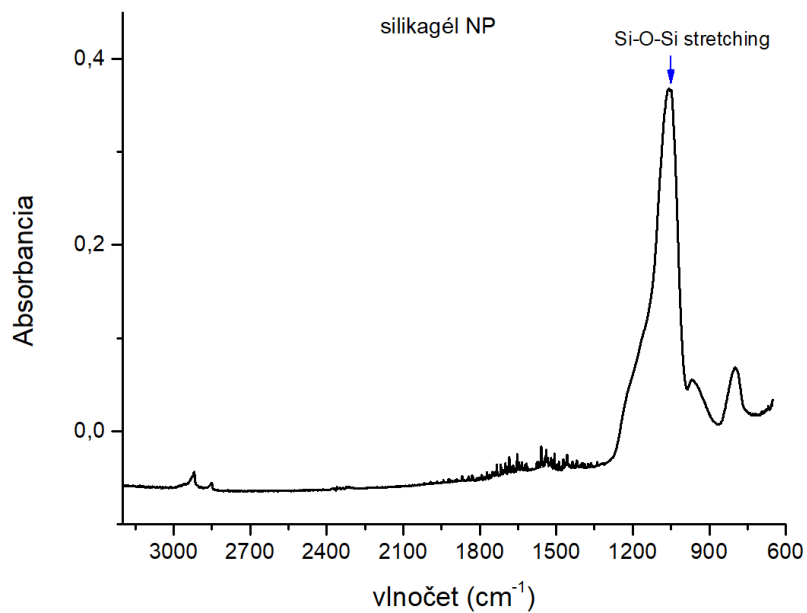
Valenčné vibrácie rozlišujeme symetrické a asymetrické, u protonovaných reťazcov sa nachádzajú pri vlnočtoch 2920-2850  $\text{cm}^{-1}$ , u deuterovaných pri hodnotách 2190-2095  $\text{cm}^{-1}$ . Deformačné typy vibrácií pozorované v spektre sú scissoring a rocking vibrácie, ktoré sú prítomné u protonovaných aj deuterovaných vzoriek. Rocking vibrácia u protonovaných reťazcov má hodnotu vlnočtu okolo 720  $\text{cm}^{-1}$ , scissoring vibrácia

u protonovaných vzoriek má hodnotu vlnočtu okolo  $1468\text{ cm}^{-1}$ , u deuterovaných okolo  $1090\text{ cm}^{-1}$ .

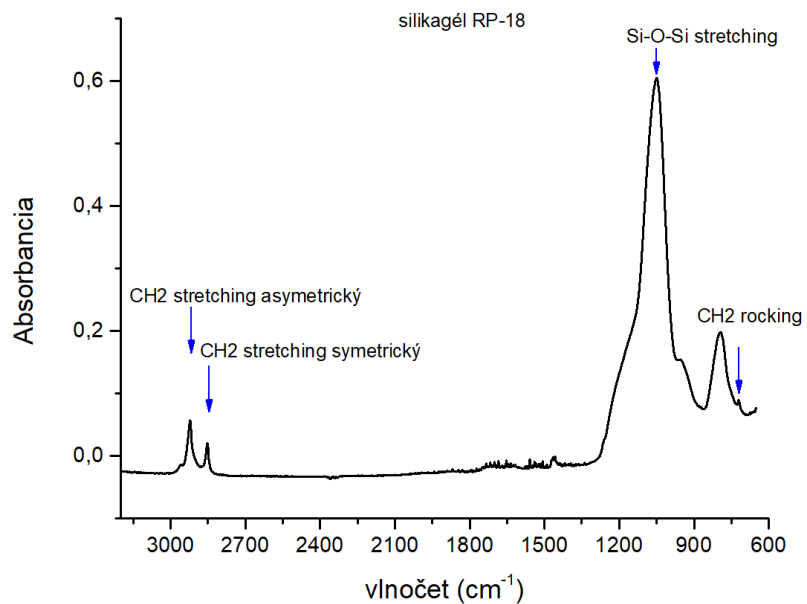


Obr. 18. FTIR spektrum vzorky hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5 pri  $32\text{ °C}$  s príslušnými vibráciami

Silikagél (NP a RP-18) poskytuje výraznú vibráciu okolo vlnočtu  $1058\text{ cm}^{-1}$ , ktorá zodpovedá Si-O-Si valenčným vibráciám (Obr. 19 a 20). Silikagél RP-18 obsahuje (na rozdiel od NP) chemicky naviazané 18-uhlíkaté alkylové reťazce. V jeho FTIR spektre preto pozorujeme CH2 valenčné vibrácie a slabú CH2 rocking vibráciu (Obr. 20). Hodnoty vlnočtov valenčných vibrácií silikagélu RP-18 sú však vyššie ako hodnoty, ktoré sa vyskytujú pri dobre usporiadaných reťazcoch (CH2 symetrický stretching  $2853\text{ cm}^{-1}$ , CH2 asymetrický stretching  $2922\text{ cm}^{-1}$ ), čo je dôsledok neusporiadanosti týchto reťazcov.



Obr. 19. FTIR spektrum silikagélu NP pri 32 °C s príslušnými vibráciami



Obr. 20. FTIR spektrum silikagélu RP-18 pri 32 °C s príslušnými vibráciami

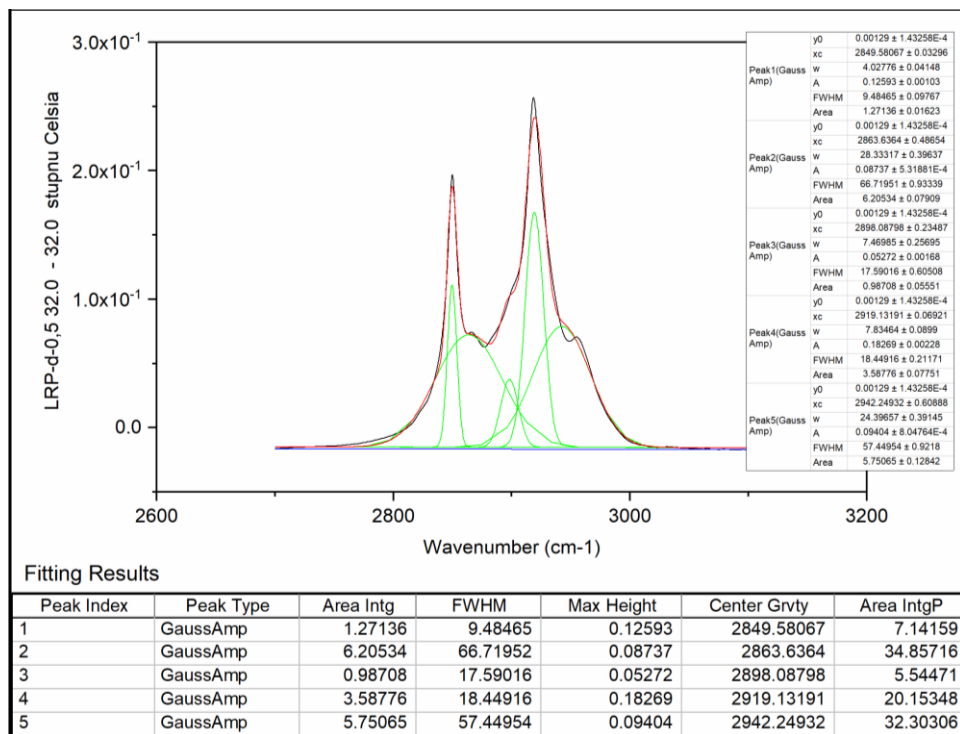
Okrem polohy vibrácií sme vyhodnocovali aj teploty fázového prechodu. Fázový prechod vzoriek je spojený s prechodom z pevnej fázy (ortorombickej, hexagonálnej) na fluidnú fázu. Tento prechod nastáva pri dosiahnutí teploty okolo 70-80 °C.

Každá vzorka bola analyzovaná v teplotnom rozmedzí od 28 °C do 100 °C, pričom teplota sa zvyšovala vždy o 2 °C. Pre každú teplotu bolo vygenerované nové spektrum, takže sme mohli u analyzovaných vibrácií sledovať posuny vlnočtov, ktoré sa menili so zvyšujúcou sa teplotou. Zmena v laterálnom usporiadaní lipidov, ktorá môže byť spojená s pôsobením vysokej teploty, sa prejaví v sledovanom spektre zvýšením hodnôt vlnočtov CH<sub>2</sub> alebo CD<sub>2</sub> valenčných vibrácií.

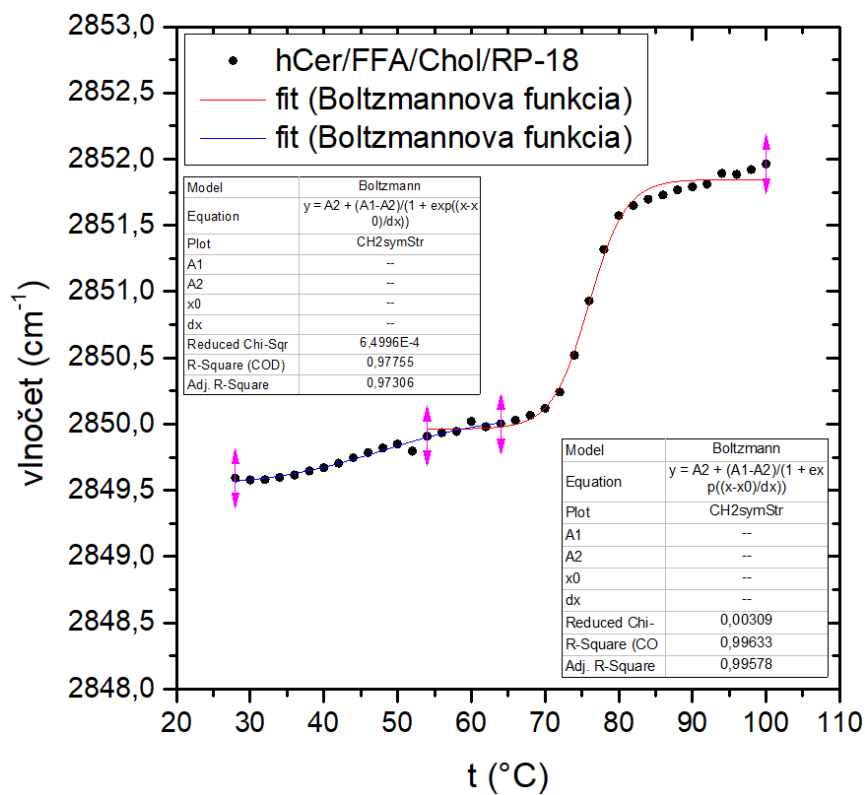
U protonovaných vzoriek sa sledovali hodnoty vlnočtov pri vibráciách CH<sub>2</sub> symetrický stretching a CH<sub>2</sub> rocking, u deuterovaných vzoriek CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub> symetrický stretching, CH<sub>2</sub> rocking a CD<sub>2</sub> scissoring vibrácie. Na analýzu spektier bol použitý program OriginPro. Do programu sa importovali dáta (.spc) každej vzorky zvlášť.

### *5.2.1 Valenčné vibrácie*

Pre každé spektrum sme zvolili určitý rozsah vlnočtov, napr. pre vibrácie CH<sub>2</sub> symetrický a asymetrický stretching sa v spektre zvolila oblasť, ktorá zahŕňa vlnočty oboch vibrácií, v tomto prípade 2850-2924 cm<sup>-1</sup>. Pozadie (background) bolo aproximované lineárnou funkciou. Použitím funkcie fitovania pomocou funkcie GaussAmp sme dekonvoluovali analyzované píky a zistili tak hodnoty vlnočtov pre maximá každého prítomného píku v danej oblasti. Na základe vedomostí o tom, aké vlnočty prislúchajú analyzovaným vibráciám, sme postupne z každého spektra pre každú teplotu dostali prislúchajúce hodnoty vlnočtov (Obr. 21). Na základe toho sme pre každú vzorku vytvorili graf závislosti vlnočtu od teploty (Obr. 22). Graf bol naitovaný pomocou Boltzmannovej funkcie a predstavoval fázový prechod každej vzorky. Z tohto grafu sme získali parameter X<sub>0</sub>, ktorý zodpovedá stredu sigmoidy a umožňuje určiť teplotu fázového prechodu ako miesto, kde dochádza k najväčšej zmene vlnočtu vzhľadom v pomere ku zmene teploty.



Obr. 21. Analyzovaná časť FTIR spektra vzorky hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5, fitovaná funkciou GausAmp s príslušnými polohami vibrácií CH<sub>2</sub> symetrický a asymetrický stretching



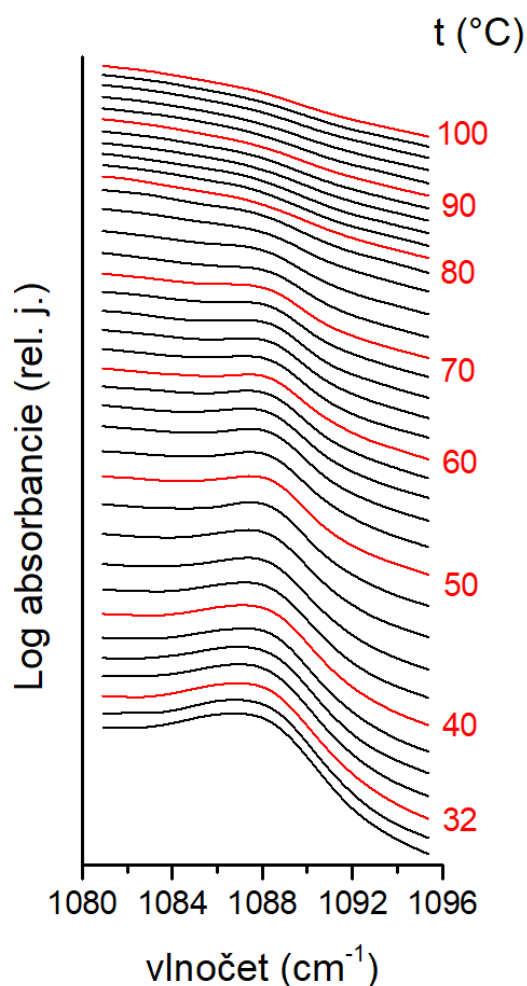
Obr. 22. Graf fázového prechodu vzorky hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5 pre vibrácie CH2 symetrický stretching, fitovaný Boltzmannovou funkciou

### 5.2.2 Deformačné vibrácie

Okrem valenčných vibrácií sme v spektre analyzovali aj vibrácie deformačné, konkrétne CH2 rocking s hodnotou vlnočtu okolo  $720 \text{ cm}^{-1}$ , a CD2 scissoring s hodnotou vlnočtu okolo  $1090 \text{ cm}^{-1}$ .

### *Scissoring vibrácia*

Na obrázku Obr. 23 sú znázornené spektrá CD2 scissoring vibrácie pre vzorku hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5 a ukazujú, ako sa menila prítomnosť deformačnej vibrácie so zvyšujúcou sa teplotou. Na obrázku je znázornená ako závislosť dekadického logaritmu absorbancie od vlnočtu.



Obr. 23. FTIR spektrá CD2 scissoring vibrácie pre vzorku hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5

Pík deformačnej scissoring vibrácie je prítomný ako singlet, ktorý s fázovým prechodom nastávajúcimi pôsobením teploty okolo 78 °C zaniká. Singlet je charakteristický pre hexagonálne usporiadanie lipidov, na rozdiel od dubletu, ktorý je špecifický pre ortorombické usporiadanie. Singlet pozorujeme aj v prípade, keď reťazce síce tvoria ortorombické usporiadanie, ale dôjde k premiešaniu rôznych izotopov – CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub>

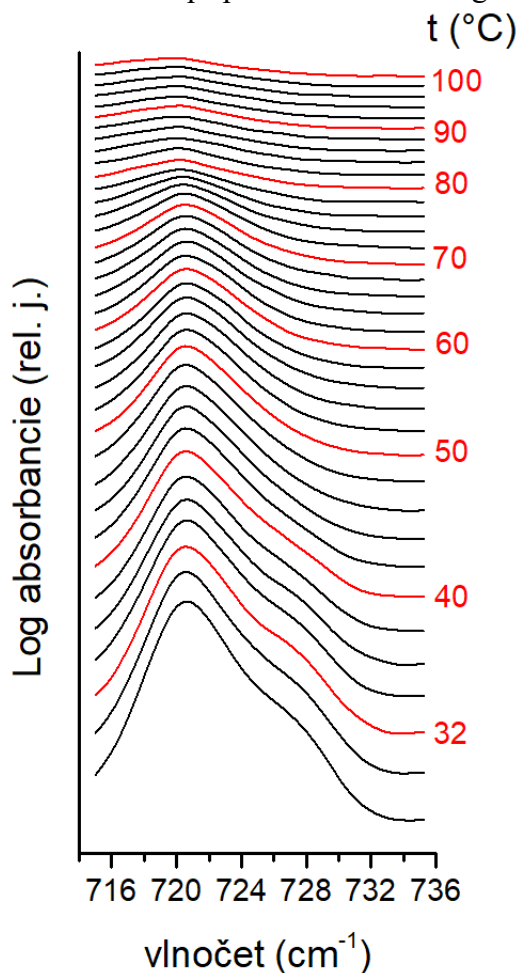


reťazcov. Všeobecne široký a nepravidelný tvar píkov môže byť dôsledkom toho, že vzorky neboli kryštalické a bolo v nich prítomné väčšie množstvo rigidných oblastí. Kryštalické a homogénne zmesi látok sú obecné charakteristické prítomnosťou úzkych píkov s jednoznačnou polohou ich stredu.

Pri dosiahnutí teploty fázového prechodu, tzn. okolo 70-80 °C, môžeme vidieť, že CD2 scissoring vibrácia zaniká, čo je spojené s prechodom lipidov z pevného usporiadania na fluidné.

### ***Rocking vibrácia***

Na obrázku Obr. 24 sú znázornené obdobné spektrá deformačnej vibrácie, tentoraz CH2 rocking, pre tú istú vzorku ako v prípade CD2 scissoring vibrácie.



Obr. 24. FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie pre vzorku hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5

Pík CH<sub>2</sub> rocking deformačnej vibrácie takisto zaniká po dosiahnutí fázového prechodu (pôsobením teploty medzi 70-80 °C), na rozdiel od CD<sub>2</sub> scissoring vibrácie je však čiastočne prítomný ako dublet. Dublet je charakteristický pre ortorombické usporiadanie lipidov a vzniká ako dôsledok medzireťazcových interakcií vo vzorke, tzv. vibračného kaplingu susedných reťazcov. K tomuto kaplingu dochádza v zmesi deuterovaných aj protonovaných lipidov len v rámci tých istých izotopov, nie vzájomne medzi nimi.

Môžeme vidieť, že dublet je vo vzorke prítomný až do teploty približne 40 °C. Pri vyšších teplotách pozorujeme CH<sub>2</sub> rocking vibráciu ako singlet, ktorý zaniká po ukončení fázového prechodu, čo značí prechod lipidov na fluidné usporiadanie. Prítomnosť dubletu vo vzorke je dôsledok nedokonalého zmiešania protonovaných a deuterovaných lipidov.

### 5.2.3 Vplyv modelu CLE na usporiadanie reťazcov

Rovnakým spôsobom sme vyhodnotili vibrácie ostatných vzoriek. Príslušné grafy sú uvedené v prílohe.

### **Vzorky s protonovanými FFA**

#### *a. Valenčné vibrácie*

Referenčná vzorka (hCer/FFA/Chol) bez pridaných častíc silikagélu mala pre valenčné vibrácie CH<sub>2</sub> symetrický stretching hodnotu vlnočtu približne 2848 cm<sup>-1</sup>, čo odpovedá očakávanej hodnote, pri akej sa vibrácia pri teplote 32 °C vyskytuje. V ďalších vzorkách sa pridávali častice silikagélu NP alebo RP-18 vo zvyšujúcich sa množstvách. V tabuľke Tab. 8 sú uvedené hodnoty vlnočtov CH<sub>2</sub> symetrický stretching pri teplote 32 °C. Môžeme vidieť, že s pridaným množstvom silikagélu sa mierne zvyšovala hodnota vlnočtu valenčnej vibrácie, v prítomnosti silikagélu NP aj RP-18. Závislosť vlnočtu od množstva pridaného silikagélu nie je jednoznačná, u oboch typov silikagélu však ukazuje na zhoršenie usporiadania lipidov. Nejednoznačný trend môže byť dôsledkom nehomogenity vzoriek, pretože behom nástreku vzoriek nebolo možné dosiahnuť úplne rovnomerné rozloženie silikagélu vo vzorke. Na meranie FTIR spektroskopie sa, na

rozdiel od RTG difrakcie, odoberá iba časť pripravenej vzorky. Týmto spôsobom by mohlo dôjsť k vneseniu chyby do prezentovaných výsledkov.

Samotné zvýšenie hodnoty vlnočtu CH<sub>2</sub> valenčných vibrácií v porovnaní s kontrolou svedčí o väčšej neusporiadanosti lipidových reťazcov. Silikagél NP aj RP-18 narúša organizáciu hydrofóbných reťazcov. Prítomnosť C18 alkylových reťazcov nevedla k signifikantným rozdielom medzi výsledkami vzoriek s daným typom silikagélu. Pre presné potvrdenie vplyvu silikagélu na lipidové usporiadanie by bolo vhodné experiment zopakovať s väčším počtom vzoriek.

Tab. 8. Hodnoty vlnočtov vzoriek pre CH<sub>2</sub> symetrický stretching pri teplote 32 °C.

Vzorka	Vlnočet [cm <sup>-1</sup> ]
<b>hCer/FFA/Chol</b>	2848,35
<b>hCer/FFA/Chol NP_0,16a</b>	2848,74
<b>hCer/FFA/Chol NP_0,5b</b>	2848,99
<b>hCer/FFA/Chol NP_1a</b>	2848,66
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,16a</b>	2848,43
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,16b</b>	2848,63
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,5b</b>	2848,52
<b>hCer/FFA/Chol RP_1a</b>	2848,71

V tabuľke Tab. 9 sú zobrazené meniace sa hodnoty teploty fázového prechodu lipidov vzoriek. Referenčná vzorka (hCer/FFA/Chol) má túto teplotu približne 68 °C, s pridaným množstvom silikagélu sa jej hodnota mierne zvyšuje, no závislosť na množstve silikagélu nie je lineárna. Pozorujeme, že vplyvom prítomnosti častíc silikagélu dochádza prevažne k zvýšeniu teploty fázového prechodu lipidov. Nejednoznačný trend koreluje s predchádzajúcim pozorovaním v prípade polohy vlnočtu valenčných vibrácií vzoriek, je teda dôležité brať do úvahy možnú nehomogenitu vzorky ako dôsledok iných faktorov spomenutých vyššie.

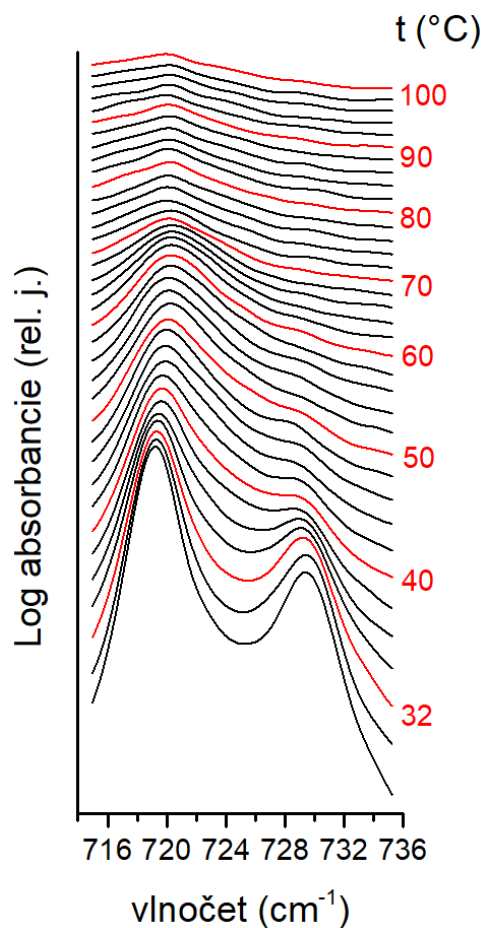
Tab. 9. Teploty fázových prechodov pre CH<sub>2</sub> symetrický stretching

Vzorka	Teplota fázového prechodu [°C]
<b>hCer/FFA/Chol</b>	67,9
<b>hCer/FFA/Chol NP_0,16a</b>	66,7
<b>hCer/FFA/Chol NP_0,5b</b>	74,3
<b>hCer/FFA/Chol NP_1a</b>	67,0
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,16a</b>	70,8
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,16b</b>	70,2
<b>hCer/FFA/Chol RP_0,5b</b>	70,7
<b>hCer/FFA/Chol RP_1a</b>	65,4

*b. Deformačné vibrácie*

V protonovaných vzorkách je pozorovateľná deformačná vibrácia CH<sub>2</sub> rocking. Vibrácia zaniká pri teplote okolo 70-80 °C, čo je teplota fázového prechodu lipidov. U protonovaných vzoriek sa však pík vyskytuje čiastočne vo forme dubletu, ktorý je charakteristický pre ortorombické usporiadanie lipidov (dôsledok medzireťazcových interakcií).

V referenčnej vzorke (hCer/FFA/Chol) môžeme vidieť (Obr. 25), že dublet je prítomný približne do teploty 38-40 °C, kedy zaniká, a do teploty fázového prechodu pokračuje ako singlet. Prídavkom silikagélových častíc sa teplota fázového prechodu ani prítomnosť dubletu výrazne nemení, u oboch typov silikagélu je však dublet menej výrazný v porovnaní s referenčnou vzorkou a jeho zánik vplyvom zvyšujúcej sa teploty nie je ostro ohraničený (viď Príloha).



Obr. 25. Spektrá CH<sub>2</sub> rocking vibrácie pre vzorku hCer/FFA/Chol

### ***Vzorky s deuterovanými FFA***

#### *a. Valenčné vibrácie*

Symetrický stretching CD<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub> vo vzorkách s naviazanými deuterovanými FFA odpovedal u referenčnej vzorky (hCer/dFFA/Chol) predpokladaným hodnotám

výskytu vlnočtu pri teplote 32 °C (Tab. 10). Zvýšenie hodnoty vlnočtu CH<sub>2</sub> symetrickej valenčnej vibrácie (2849,18 cm<sup>-1</sup>) v porovnaní s hCer/FFA/Chol vzorkou (2848,35 cm<sup>-1</sup>) nastáva v dôsledku izotopového zriedenia protonovaných reťazcov.<sup>73</sup> Rovnako, ako pri vzorkách s protonovanými FFA, aj tu dochádzalo prídavkom silikagelových častíc k zvyšovaniu hodnôt vlnočtov valenčnej vibrácie. Tento nárast má jednoznačnejší trend ako v predošlom prípade (najmä v prípade deuterovaných reťazcov), i tu by však bolo vhodné pre potvrdenie vplyvu častíc silikagélu experiment zopakovať s väčším počtom vzoriek. Prídavkom silikagélu hodnota vlnočtu stúpa a tento efekt sa týka silikagélu NP aj RP-18.

Tab. 10. Hodnoty vlnočtov vzoriek pre CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub> symetrický stretching pri teplote 32 °C

Vzorka	Vlnočet protonovaných reťazcov [cm <sup>-1</sup> ]	Vlnočet deuterovaných reťazcov [cm <sup>-1</sup> ]
<b>hCer/dFFA/Chol</b>	2849,18	2089,08
<b>hCer/dFFA/Chol NP 0,16</b>	2849,41	2089,42
<b>hCer/dFFA/Chol NP 0,5</b>	2849,45	2089,44
<b>hCer/dFFA/Chol RP 0,16</b>	2849,47	2089,32
<b>hCer/dFFA/Chol RP 0,5</b>	2849,58	2089,41
<b>hCer/dFFA/Chol RP 1</b>	2849,47	2089,47

Teplota fázového prechodu (Tab. 11) u referenčnej vzorky (hCer/dFFA/Chol) sa u protonovaných a deuterovaných reťazcov výrazne líši. To naznačuje neúplné miešanie Cer a FFA. Prídavkom silikagélu sa táto teplota zvyšovala, vidíme však, že vplyvom silikagélu NP zostáva rozdiel medzi fázovým prechodom protonovaných a deuterovaných reťazcov zachovaný. V prípade silikagélu RP-18 sú teploty fázových prechodov deuterovaných a protonovaných reťazcov porovnateľné. Zvyšovanie teploty prechodu v závislosti od množstva pridaného silikagélu RP-18 v porovnaní s kontrolnou vzorkou nemá jednoznačný trend.

Tab. 11. Teploty fázových prechodov pre CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub> symetrický stretching

Vzorka	Teplota fázového prechodu protonovaných reťazcov [°C]	Teplota fázového prechodu deuterovaných reťazcov [°C]
<b>hCer/dFFA/Chol</b>	71,2	65,3
<b>hCer/dFFA/Chol NP 0,16</b>	74,0	70,5
<b>hCer/dFFA/Chol NP 0,5</b>	74,9	71,7
<b>hCer/dFFA/Chol RP 0,16</b>	72,7	70,2
<b>hCer/dFFA/Chol RP 0,5</b>	76,0	74,4
<b>hCer/dFFA/Chol RP 1</b>	71,3	68,1

*b. Deformačné vibrácie*

U vzoriek s deuterovanými FFA sme vyhodnocovali dva typy deformačných vibrácií – CD<sub>2</sub> scissoring a CH<sub>2</sub> rocking. Oba typy vibrácií zanikajú pri teplote fázového prechodu, okolo 70 °C.

CH<sub>2</sub> rocking vibrácia prítomná u protonovaných reťazcov je, rovnako ako v protonovaných vzorkách, prítomná ako dublet, ktorý je však oveľa menej výrazný už v referenčnej vzorke než v predošlom prípade. Pridaním silikagélu NP je ešte ťažšie identifikovateľný a tento efekt narastá so zvyšujúcim sa množstvom silikagélu vo vzorke. V prítomnosti silikagélu RP-18 je táto závislosť ešte výraznejšia a dublet veľmi ťažko pozorovateľný.

CD<sub>2</sub> scissoring vibrácia je prítomná ako singlet charakteristický pre hexagonálne usporiadanie lipidov, ak sa vyskytuje pri ortorombickom usporiadaní tak je dôsledkom premiešania rôznych izotopov CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub> reťazcov. Prídavkom silikagélu NP aj RP-18 je singlet čoraz menej výrazný v závislosti od zvyšujúceho sa množstva silikagélu, a takisto je širší a nepravidelnejší. Tvar píku sa odvíja od kryštalinity vzorky a prítomnosti rigidných oblastí a všeobecne platí, že čím kryštalickejšia a homogénnejšia vzorka, tým je pík užší a symetrickejší. Aj tu môžeme pozorovať vplyv silikagélu ako zhoršenie usporiadanie lipidov, rovnako ako v predošlých prípadoch.

### 5.3 RTG prášková difraktometria

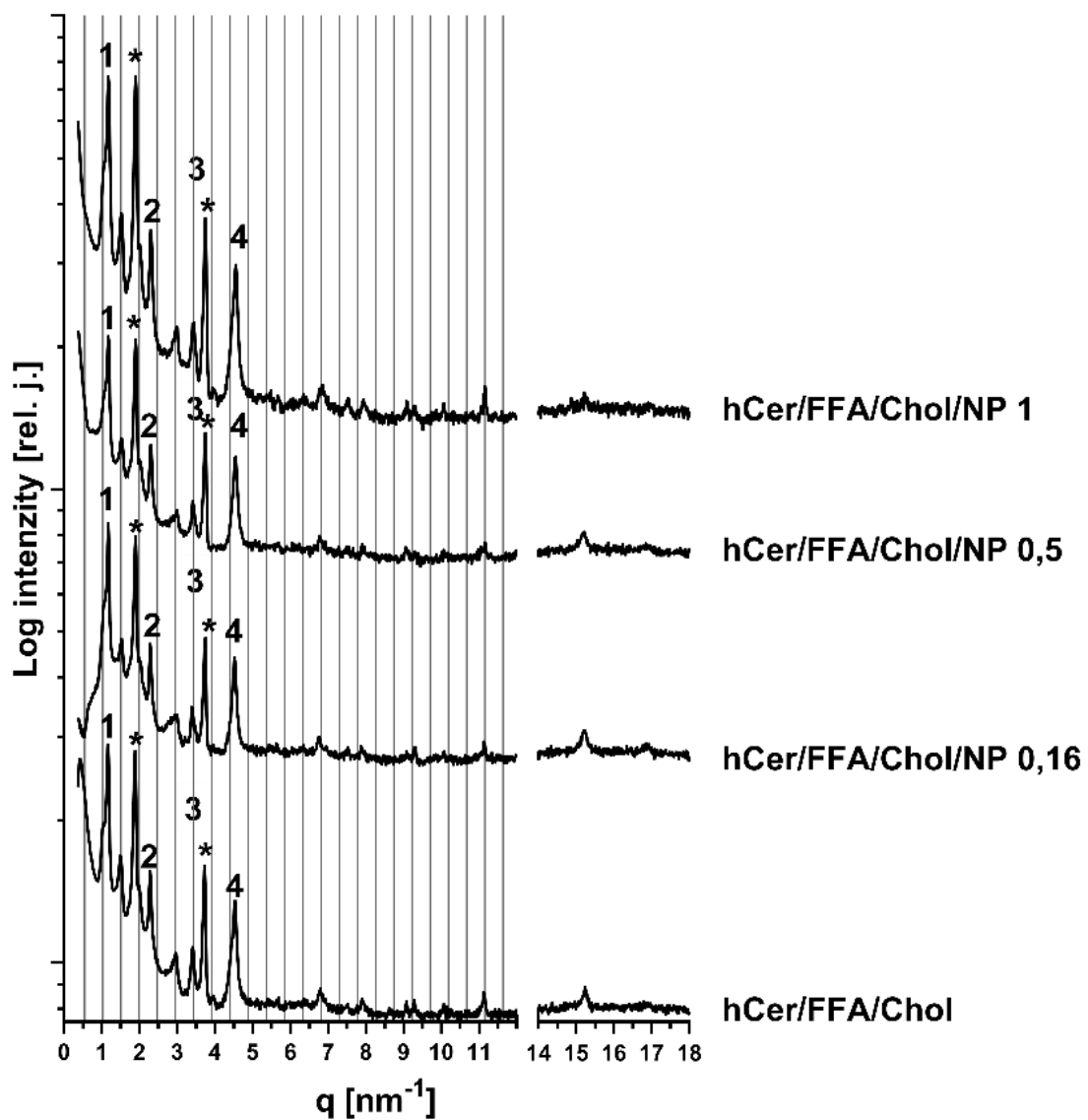
Vďaka RTG práškovej difraktometrii sme určili štruktúru analyzovaných vzoriek lipidov. Lamelárne usporiadanie lipidov v SC je tvorené opakujúcou sa sekvenciou 3 pásov. Dĺžka tejto opakujúcej sa sekvencie je približne 13 nm<sup>20-23</sup>. Táto fáza sa nazýva ako fáza s dlhou periodicitou (long periodicity phase – LPP). Skupina prof. Bouwstry publikovala, že okrem LPP by sa v lamelárnom usporiadaní lipidov SC mala vyskytovať aj fáza s krátkou periodicitou asi 6 nm (short periodicity phase – SPP).

Na základe nameraných a získaných dát sme prepočítali uhol  $2\theta$  na hodnotu rozptylového vektora  $Q$  pomocou vzťahu 4, kde  $\theta$  je difrakčný uhol a  $\lambda$  je vlnová dĺžka röntgenového žiarenia.

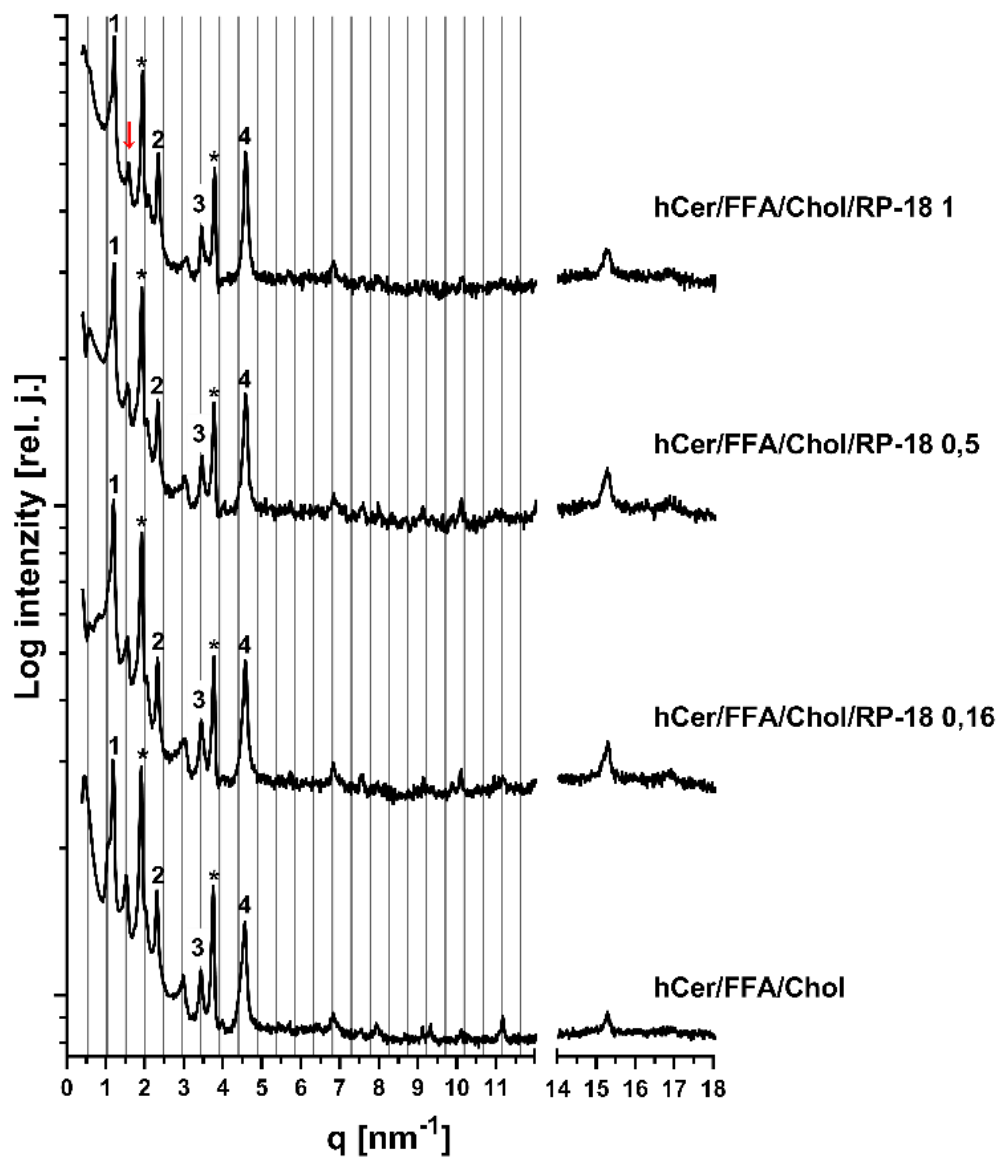
$$Q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (4)$$

Pomocou vzťahu  $1/d=Q/2\pi$  sme získali polohy píkov v závislosti na reciprokej hodnote medzi rovinnej vzdialenosti ( $1/d$ ) v nm<sup>-1</sup>. Výsledkom merania je závislosť relatívnej intenzity difraktovaného žiarenia od rozptylového vektora  $Q$ , príslušné difraktogramy, ktoré sú znázornené na obrázkoch Obr. 26 a 27, zvlášť pre silikagél RP-18 a zvlášť pre silikagél NP.



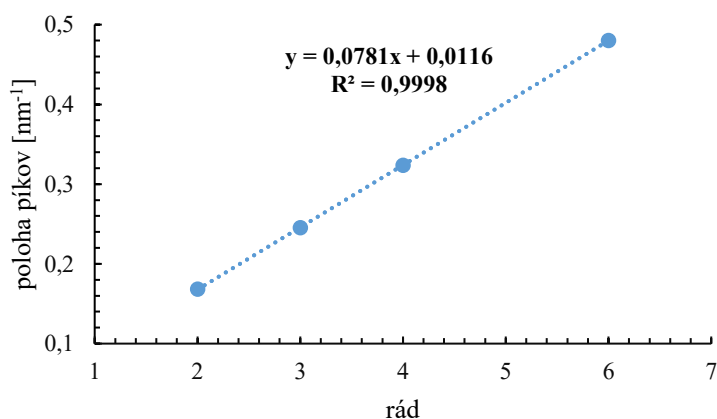


Obr. 26. Difraktogramy vzoriek hCer/FFA/Chol/NP



Obr. 27. Difraktogramy vzoriek hCer/FFA/Chol/RP-18

Pre každú hodnotu polohy píkov sme určili príslušný rád difrakcie. Správnosť priradenia rádov k príslušným polohám píkov sme potvrdili pomocou grafu závislosti polôh píkov od rádu, pričom koeficient determinácie  $R^2$  (ktorý udáva mieru kvality regresívneho modelu) musel byť  $\geq 0.9998$ . Priamka by pri úplne presnom umiestnení vzorky v držiaku prístroja mala prechádzať bodom (0,0), v praxi však pozorujeme posun vzhľadom na bod (0,0), čo sa prejavuje nenulovým absolútnym členom v rovnici priamky. Z príslušného grafu (Graf 1) sme určili smernicu priamky, ktorej prevrátená hodnota  $d$  je opakujúca sa medzirovinná vzdialenosť medzi difraktujúcimi rovinami (periodicita).



Graf 1. Graf závislosti polohy píkov od rádu pre vzorku hCer/d-FFA/Chol/RP-18 0,5

Mriežkové čiary v difraktogramoch (Obr. 26 a 27) ukazujú predikovanú polohu píkov LPP fázy, ich poloha a vzdialenosť sú nastavené podľa kontrolnej vzorky (hCer/FFA/Chol). Píky SPP fázy sú označené arabskými číslami, mriežkové čiary udávajú polohu LPP fázy, znak \* udáva polohu separovaného cholesterolu. Poloha píkov v difraktograme voči mriežkovým čiaram umožňuje sledovať ich prípadný posun, ktorý značí nejakú zmenu v štruktúre. Takýto významný posun je pozorovateľný v spektre vzorky hCer/FFA/Chol/RP-18 (označený červenou šípkou). Relatívna intenzita je vynesená v logaritmickej mierke a intenzity jednotlivých difraktogramov sú škálované tak, aby bolo možné sledovať polohy jednotlivých píkov.

Pri vysokých hodnotách  $Q$  okolo  $14-18 \text{ nm}^{-1}$  sú viditeľné píky charakteristické pre ortorombické a/alebo hexagonálne usporiadanie lipidov. V difraktogramoch (Obr. 26 a 27) sú viditeľné píky zodpovedajúce medziurovinnej vzdialenosti  $\approx 0,41 \text{ nm}$  a  $\approx 0,37 \text{ nm}$  charakterizujúce túto oblasť, píky však nie sú dobre rozlíšené, a to ani v prípade pridania častíc silikagélu NP (hCer/FFA/Chol/NP) alebo RP-18 (hCer/FFA/Chol/RP-18). Rozlíšenie píkov v tejto oblasti súvisí aj s geometrickým usporiadaním lamiel. Pokiaľ sa lamely orientujú prevažne paralelne s podložkou, píky nie sú dobre detekovateľné v meranej oblasti reciprokeho priestoru.

V nasledujúcej tabuľke Tab. 12 sú uvedené periodicity lamelárnych štruktúr v príslušných protonovaných vzorkách. Detekovali sme opakujúcu sa vzdialenosť vrstiev približne  $13 \text{ nm}$ , čo by zodpovedalo prítomnosti fázy s dlhou periodicitou (LPP), no i vzdialenosť vrstiev okolo  $5,6 \text{ nm}$ , ktorá by mohla zase odpovedať fáze s krátkou periodicitou (SPP), takisto bol prítomný aj separovaný cholesterol.

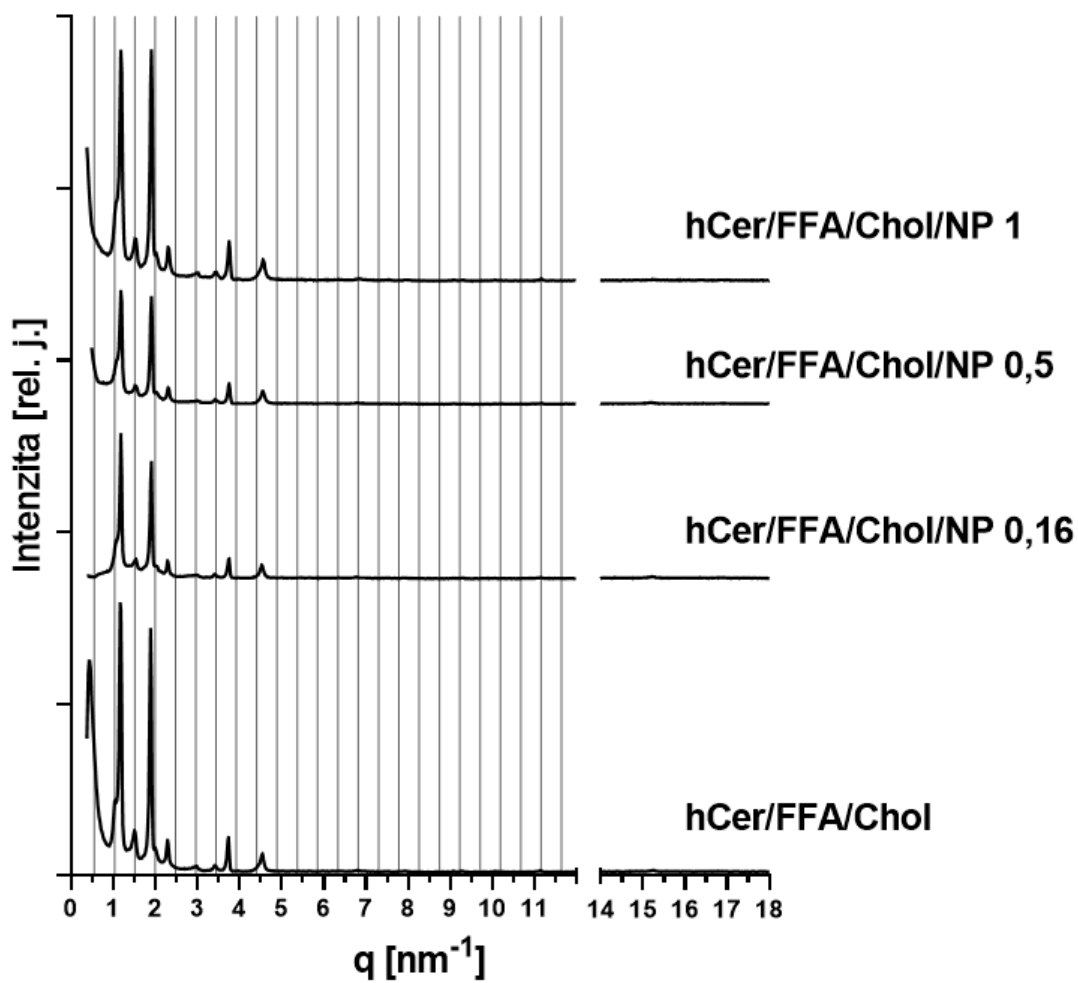
Dĺžka LPP v referenčnej vzorke (hCer/FFA/Chol) bola približne  $13 \text{ nm}$ . Prídavkom častíc silikagélu NP sa významne nezmenila. V prítomnosti silikagélu RP-18 došlo k jej významnému skráteniu. Štatistická významnosť bola potvrdená t-testom s Welchovou korekciou ( $P < 0,05$ ). Štatisticky významné boli aj zmeny v dĺžke LPP medzi vzorkami s obsahom silikagélu NP a silikagélu RP-18 ( $P < 0,05$ ). Nepozorovali sme závislosť skrátenia LPP periodicity na pridanom množstve silikagélu. Prítomná SPP a cholesterol si na rozdiel od LPP zachovali aj v prítomnosti silikagélu porovnateľnú periodicitu, malé zmeny v periodicite SPP neboli štatisticky významné. Možnými príčinami skrátenia LPP sa zaoberáme v časti Diskusia. Presný vzťah a efekt silikagélu na lamelárne usporiadanie lipidov by však bolo vhodné potvrdiť ďalšími experimentami, vzhľadom k tomu, že rovnako ako pri FTIR meraniach, aj tu je nutné brať do úvahy prípravu vzoriek, spôsob merania a ľudský faktor.

Tab. 12: Dĺžka [nm] lamiel LPP, SPP a cholesterolu v lipidových vzorkách

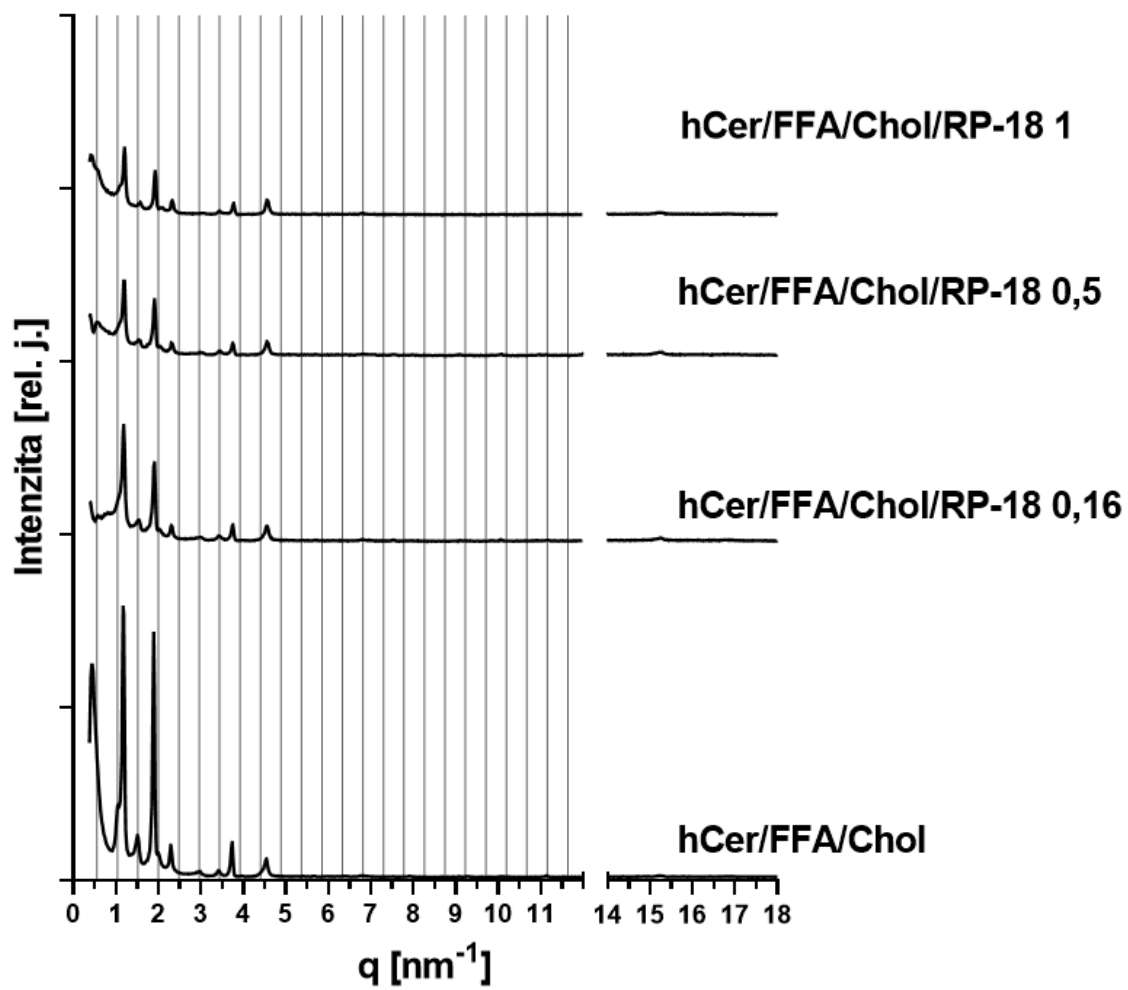
	d [nm]			
	LPP	SPP	Cholesterol	
<b>hCer/FFA/Chol</b>	13,04	5,60	3,33	1,68
<b>hCer/FFA/Chol</b>	13,03	5,61	3,33	1,68
<b>hCer/FFA/Chol NP 0,16a</b>	13,09	5,63	3,31	1,68
<b>hCer/FFA/Chol NP 0,16b</b>	12,96	5,60	3,31	1,68
<b>hCer/FFA/Chol NP 0,5a</b>	12,97	5,55	3,22	1,67
<b>hCer/FFA/Chol NP 0,5b</b>	13,09	5,60	3,30	1,68
<b>hCer/FFA/Chol NP 1a</b>	12,98	5,54	3,30	1,68
<b>hCer/FFA/Chol RP 0,16a</b>	<b>12,84</b>	5,58	3,27	1,67
<b>hCer/FFA/Chol RP 0,16b</b>	13,05	5,59	3,31	1,68
<b>hCer/FFA/Chol RP 0,5a</b>	<b>12,81</b>	5,59	3,30	1,68
<b>hCer/FFA/Chol RP 0,5b</b>	<b>12,70</b>	5,58	3,29	1,67
<b>hCer/FFA/Chol RP 1a</b>	<b>12,86</b>	5,60	3,28	1,67

Na obrázkoch Obr. 28 a 29 sú znázornené difraktogramy, vynesené ako závislosti lineárnej intenzity difraktovaného žiarenia od rozptylového vektora  $Q$ . Intenzity jednotlivých difraktogramov majú rovnakú škálu. RTG prášková difraktometria je za určitých okolností kvantitatívnou metódou (napr. meraná vzorka musí byť rovnomerne umiestnená do držiaka vo forme prášku s definovanou veľkosťou častíc – je polykryštalická). Toto naše vzorky nespĺňajú, pretože lipidy sú vo forme tenkých vrstiev. Nanášame vždy rovnaké množstvo vzorky na rovnakú plochu podložky a meranie sa uskutočňuje pri rovnakom nastavení prístroja. V takomto prípade je možné porovnať aj intenzity jednotlivých vzoriek. Ako môžeme vidieť, hodnoty relatívnej intenzity prídavkom častíc silikagélu klesajú, výraznou mierou sa na tomto poklese podieľa silikagél RP-18, lineárne s jeho zvyšujúcim sa množstvom vo vzorke. Tento jav môže byť dôsledkom buď zhoršenej orientácie lipidov vzhľadom k podložke, alebo zhoršenej kryštalinity vzorky, prípadne kombináciou oboch faktorov. Kryštalinita vyjadruje podiel štruktúrovanej – kryštalickej frakcie v celkovom objeme vzorky, v prítomnosti silikagélu

RP-18 môže dochádzať k tomu, že v niektorých častiach ostanú prítomné amorfne domény, čím sa zníži kryštalinita vzorky.



Obr. 28. Difraktogramy vzoriek hCer/d-FFA/Chol/NP.



Obr. 29. Difraktogramy vzoriek hCer/d-FFA/Chol/NP.

## 6 DISKUSIA

Našou úlohou bola snaha o vytvorenie modelu kožnej bariéry s CLE a preskúmanie správania kovalentne viazaných lipidov na jej povrchu v rámci výskumnej skupiny *Skin Barrier Research Group*, ktorá sa zaoberá skúmaním ľudskej kože a lipidov kožnej bariéry, ich vznikom, štrukturálnym usporiadaním či správaním. Doteraz neexistujú postupy, ako vytvoriť modely *Stratum corneum*, ktoré by okrem voľných lipidov zahŕňali aj modely CLE. My sme pracovali s lipidmi zloženými z izolovaných ľudských ceramidov, mastných kyselín (protonovaných aj deuterovaných) a cholesterolu v ekvimolárnom množstve s 5% (m/m) cholesterol-sulfátom. Namiesto korneocytov sme použili častice silikagélu s hydrofobizovanými 18-uhlíkatými alkylovými reťazcami (RP-18) aj bez nich (NP), ktoré nám slúžili ako kontrola. Miešali sme zmes lipidov s rôznymi obsahmi silikagélových častíc RP-18 a NP. Štrukturálne usporiadanie lipidov v našich modeloch CLE sme merali röntgenovou difraktometriou, termotropné správanie vzoriek infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou. V oboch prípadoch sme zistili, že lipidy sú ovplyvňované prítomnými silikagélovými časticami RP-18 aj NP (kde nie sú na rozhraní lipid-silikagelová častica prítomné 18-uhlíkaté alkylové reťazce), ako bolo bližšie rozoberané v kapitole Výsledky. Pri samotnom meraní vzoriek bolo nutné vo vyhodnocovaných dátach zohľadniť možné technické problémy, ktoré sa mohli pri príprave vzoriek a pred ich meraním objaviť. Pri nastrekovaní vzoriek pomocou Linomatu sme nemohli zabezpečiť rovnomerné rozloženie častíc silikagélu na nastrekovanej ploche vzorky v dôsledku rýchlej sedimentácie silikagélových častíc. Spôsob merania vzoriek prebiehal odlišne – pri RTG difraktometrii sa merala celá plocha nastreknutých vzoriek, no pri FTIR spektroskopii sa odobrala len časť vzorky, preto v dôsledku nerovnomerného rozloženia lipidov a silikagélu vo vzorkách mohol byť ich obsah vo vzorkách iný, než by sme očakávali. Všetky tieto faktory boli zohľadnené pri analýze výsledkov a v ďalších experimentoch by bolo vhodné pokúsiť sa spomenuté technické problémy eliminovať.

Pomocou RTG difraktometrie sme potvrdili prítomnosť lamelárnych štruktúr LPP, SPP a cholesterolu vo vzorkách s protonovanými FFA. Ich výskyt sa zhoduje



s prítomnosťou potvrdenou v iných experimentálnych článkoch,<sup>20-23</sup> v rámci merania bola pozorovateľná zmena v kvantitatívnej aj kvalitatívnej stránke vzoriek a usporiadania lipidov.

Zmena kvality sa prejavila prídavkom silikagélu RP-18 ako zmena dĺžky LPP fázy. Táto zmena bola štatisticky významná, potvrdená t-testom s Welchovou korekciou ( $P < 0,05$ ). K signifikantnému skráteniu došlo v prítomnosti silikagélu RP-18, silikagél NP nevykazoval vplyv na dĺžku LPP fáze. Príčina skrátenia a zmeny dĺžky v LPP môže byť dôsledok interakcie hydrofobizovaných 18-uhlíkatých reťazcov silikagélu RP-18 s prítomnými lipidmi. Hydrofobizované reťazce sú obdobnou štruktúrou prítomnou aj v CLE a niektoré druhy kožných lipidov k nim môžu mať vyššiu afinitu, dôsledkom čoho by mohli interagovať a interkalovať medzi tieto reťazce a tým zmeniť lipidové zloženie v inej oblasti vzorky. Prejav tejto zmeny sa môže prejavíť práve ako skrátenie LPP fázy. Lipidy, ktoré obalili silikagélové častice, môžu týmto spôsobom meniť svoju orientáciu k podložke a zvýšiť neusporiadanosť hydrofóbných reťazcov vo vzorke. Zmena periodicity SPP a cholesterolu nevykazovala štatistickú významnosť, efekt RP-18 sa prejavil zmenou v dĺžke LPP fázy.

Zastúpenie hydrofilných a hydrofóbných častíc v lipidových dvojvrstvách výraznou mierou modifikuje jej usporiadanie. Ukázalo sa, že oba typy reťazcov vplývajú iným spôsobom na usporiadanie v membránach a mohli by byť preto nástrojom, ako prispôsobovať a meniť rozličné membránové vlastnosti. Vedci z University of Colorado a Stockholm University<sup>74</sup> vytvárali lipidovú dvojvrstvu na povrchu silikagélových nanočastíc, ku ktorým následne pridávali hydrofilné a hydrofóbné typy častíc. So zvyšujúcim sa podielom hydrofóbných častíc vo vzorke sa menilo zloženie lipidovej dvojvrstvy na tzv. hybridný typ membrány, ktorá bola tvorená kombináciou lipidov a hydrofóbných častíc. Môžeme vidieť, že zvýšením podielu hydrofóbných reťazcov došlo k odlišnej reakcii lipidov na prítomnosť týchto častíc a následnej štrukturálnej reorganizácii, čo mohlo byť spôsobené odlišnou afinitou lipidov k hydrofóbnym časticiam. Podobný typ interakcie mohol byť prítomný aj v našich skúmaných vzorkách, kde sme pozorovali skrátenie LPP fázy dôsledkom interakcie lipidov s hydrofobizovaným

reťazcom RP-18 (spomenuté vyššie). Pre presné potvrdenie a vysvetlenie tohto vplyvu, prípadne aj vplyvu na iné lamelárne štruktúry (SPP) by boli vhodné ďalšie experimenty s väčším počtom vzoriek.

Kvantitatívna zmena vzoriek je pozorovateľná ako zmena relatívnych intenzít. Vieme sledovať intenzitu pík, ktorá závisí od množstva nanášaného vzorky, od podielu vzorky, ktorý tvorí štruktúru a následne od orientácie tejto štruktúry v priestore, a od nastavenia prístroja. V našich vzorkách by sme teda predpokladali obdobné hodnoty intenzít, prídavkom silikagélových častíc bol však viditeľný pokles intenzity, markantnejší v prítomnosti silikagélu RP-18, klesajúc s jeho zvyšujúcim sa množstvom. Tento efekt by mohol byť dôsledok zhoršenej orientácie lipidov vzhľadom k podložke, alebo zhoršenej kryštalinity vzorky vplyvom zvýšeného množstva amorfných oblastí vo vzorke, prípadne kombináciou oboch faktorov.

FTIR spektroskopia ukázala zhoršenie usporiadania lipidov v prítomnosti oboch typov silikagélu, nebol viditeľný výraznejší vplyv u silikagélu RP-18 v porovnaní so silikagélom NP, na rozdiel od RTG difraktometrie. Táto neusporiadanosť sa prejavila zvýšenou hodnotou vlnočtu sledovaných valenčných vibrácií pri teplote 32 °C. Závislosť však nemá jednoznačný trend a nie je zreteľne vidno, či je tento efekt závislý od množstva alebo druhu silikagélu. Celkový vzhľad pík ukazoval na to, že vzorky neboli homogénne či kryštalické a bolo v nich prítomné množstvo rigidných oblastí. Spektra samotných silikagél, síce tiež vykazovali slabé valenčné vibrácie CH skupín, výraznejšie pozorovateľné u silikagélu RP-18 než u silikagélu NP, no intenzita týchto pík bola oproti intenzite pík lipidových vzoriek nízka (intenzita pík CH skupín spektra samotných silikagél bola veľmi nízka, vid' kapitolu Výsledky), hodnoty vlnočtov valenčných CH<sub>2</sub> vibrácií u silikagélu RP-18 boli vyššie než hodnoty, pri ktorých sa vyskytujú vibrácie dobre usporiadaných reťazcov (CH<sub>2</sub> asymetrický stretching 2922 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub> symetrický stretching 2853 cm<sup>-1</sup>), čo je dôsledok neusporiadanosti reťazcov. Nepredpokladáme preto, že vibrácie od samotných silikagél by mohli výraznou mierou priamo ovplyvňovať píky vibrácií CH<sub>2</sub> skupín.

Sledovaným parametrom bola aj teplota fázového prechodu, ktorá bola u referenčných vzoriek (hCer/FFA/Chol a hCer/dFFA/Chol) okolo 70-80 °C. Pridaním silikagélu NP ani RP-18 sa táto teplota mierne menila, ale jej zmena nemala jednoznačný trend (bližšie opisované v časti Výsledky). Pre presnejšie potvrdenie vplyvu častíc silikagélu na usporiadanie lipidov či modifikáciu teploty fázového prechodu, prípadne upresnenie tohto vzťahu by bolo vhodné experiment zopakovať s väčším počtom vzoriek.

I keď doposiaľ neexistujú spôsoby prípravy modelov ľudských membrán zahŕňajúcich aj model CLE, sú popísané metódy popisujúce snahu o prípravu a modelovanie bunkových membrán. Hlavným problémom je, že nie je k dispozícii univerzálny postup, ako vytvoriť membránové modely, ktoré by spĺňali viaceré požiadavky: všeobecná stabilita, možnosť analyzovať viacero vlastností rôznymi metódami, či modifikovať a pridávať prvky pre špecifické typy skúmania (zmena elektrických vlastností, prítomnosť membránových proteínov). Ako dobrá metóda umožňujúca modelovanie membrán, ktoré by vyhovovali vyššie uvedeným požiadavkám, je skúmanie lipidových dvojvrstiev, ktoré sú ukotvené na pevnej podložke.<sup>74, 75</sup> Tento typ lipidovej dvojvrstvy je predmetom skúmania so snahou o optimalizáciu spôsobu prípravy tak, aby sa jeho použitie stalo čo najrozšírenejšie a najuniverzálnejšie.<sup>76</sup>

Výsledkom našej práce bolo potvrdenie vplyvu častíc silikagélu NP aj RP-18 na správanie a usporiadanie lipidov, ktoré však nie je jednoznačne interpretovateľné. Vhodnou alternatívou do budúcnosti by bolo pri opakovaní experimentu modifikovať častice chemickým naväzovaním lipidov na silikagélkové častice, ako bolo napr. rozoberané v štúdií vedcov z Purdue University v Indiane.<sup>77</sup>

## 7 ZÁVERY

Naším cieľom bolo optimalizovať model ľudskej kože, ktorý by obsahoval aj model CLE a sledovanie správania lipidov v tomto modeli. Potvrdili sme vplyv častíc silikagélu NP aj RP-18 na lipidové usporiadanie v našich vzorkách, ktoré sa v prítomnosti týchto častíc zhoršilo. Mohlo by ísť o dôsledok zhoršeného konformačného usporiadania a geometrickej orientácie lipidov vzhľadom k podložke, zhoršenej kryštalinitu vzoriek, prípadne kombinácia viacerých faktorov.

Röntgenovou difraktometriou sme potvrdili zmenu usporiadania hydrofóbných reťazcov prídavkom silikagélu RP-18, ktoré sa prejavilo ako skrátenie lamelárnej LPP fázy. Taktiež sme pozorovali zníženie intenzity píkov prídavkom častíc silikagélu RP-18, ktoré mohlo byť spôsobené zhoršenou orientáciou lipidov vzhľadom k podložke či zhoršenou kryštalinitou (prípadne kombinácia spomenutých faktorov).

FTIR spektroskopia ukázala zhoršené usporiadanie lipidov vo vzorke v prítomnosti silikagélu, pozorovateľné ako zvýšenie vlnočtov charakteristických vibrácií. Hodnoty teplôt fázového prechodu boli aj po pridaní silikagélu obdobné ako u referenčnej vzorky. Ani u jedného zo sledovaných parametrov nebol pozorovateľný jednoznačný trend a ani viditeľný trend závislosti, ktorá by na dané parametre vplývala.

Do budúcnosti by bolo vhodné experiment zopakovať s väčším počtom vzoriek, aby sme upresnili správanie lipidov a hydrofóbných reťazcov na rozhraní CLE. Vhodný model CLE by umožnil vytvoriť komplexnejšie modely kožnej bariéry na skúmanie molekulárnej úrovne *Stratum corneum* vrátane procesov, vďaka ktorými sú zabezpečované a udržiavané fyziologické bariérové funkcie. Spolu s pochopením biofyziky kožných lipidov je to dôležitý krok k lepšiemu liečeniu chorôb, ktoré sú sprevádzané poruchami práve bariérových funkcií kože, ako napr. atopická dermatitída.

## 9 LITERATÚRA

<sup>1</sup> BERGEROVÁ, Yvonne, BRYCHTA, Pavel a Jan J. STANEK, ed. *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0795-2.

<sup>2</sup> ŠVECOVÁ, Danka a Tibor DANILLA. *Textbook of Dermatology*. 2. dopl. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2014. ISBN 978-80-223-3595-9.

<sup>3</sup> ZÁHEJSKÝ, Jiří. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.

<sup>4</sup> LUMEN LEARNING. *Epidermis* [online]. [cit. 2020-12-08]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/epidermis/>.

<sup>5</sup> MED MUNI: *Histology, MedAtlas, Langerhansovy buňky* [online]. [cit. 2020-10-12]. Dostupné z: [https://www2.med.muni.cz/histology/MedAtlas\\_2/MA\\_txt8-1-1-2.htm](https://www2.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/MA_txt8-1-1-2.htm).

<sup>6</sup> KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.

<sup>7</sup> FINDUROVÁ, Anna. *Melanin a jeho funkce u živočichů i rostlin*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie. Vedoucí práce Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

<sup>8</sup> Macháčková, K. (2012). Bariérová funkce kůže - nový pohled při péči o dětskou pokožku. *Pediatr. praxi*, 13(1), 16-18.

<sup>9</sup> MURPHREY MB, MIAO JH, ZITO PM. Histology, *Stratum corneum*. 2020 Jul 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. PMID: 30020671.

- <sup>10</sup> BOSKO CA. *Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes*. *J Drugs Dermatol*. 2019 Jan 01;18(1s):s63-67.
- <sup>11</sup> VÁVROVÁ, K.; HRABÁLEK, A. *Role ceramidů v kůži*. *Praktické lékařství*. 2006, 2(2), 55-58. ISSN 1801-2434.
- <sup>12</sup> EUCERIN. *Jak kůže funguje*. [online]. [cit. 2019-04-27]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>.
- <sup>13</sup> ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K. R. *Skin barrier*. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0-8247-5815-8.
- <sup>14</sup> BONCHEVA, M. The physical chemistry of the *Stratum corneum* lipids. *Int J Cosmetic Sci* 2014, **36** (6), 505-515.
- <sup>15</sup> VÁVROVÁ, K.; KOVÁČIK, A.; OPÁLKA, L. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, **64**(2), 28-35. ISSN 2453-6725.
- <sup>16</sup> ŠKOLOVÁ, B. *Syntéza a studium analogů ceramidů*. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.
- <sup>17</sup> RABIONET, M.; GORGAS, K.; SANDHOFF, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 422-434. ISSN 13881981.
- <sup>18</sup> WERTZ, P. W.; MIETHKE, M. C.; LONG, S. A.; STRAUSS, J. S.; DOWNING, D. T. The Composition of the Ceramides from Human Stratum-Corneum and from Comedones. *J Invest Dermatol*. 1985, **84** (5), 410-412. ISSN 0022 - 202X.

- <sup>19</sup> TONCIC, R.J.; JAKASA, I.; HADZAVDIC, S.L. *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*, 1958.
- <sup>20</sup> KESSNERA D., BREZESINSKIB G., FUNARIC S. S. Impact of the long chain  $\omega$ -acylceramides on the *Stratum corneum* lipid nanostructure. Part 1: Thermotropic phase behaviour of CER[EOS] and CER[EOP] studied using Xray powder diffraction and FT-Raman spectroscopy. *Chem Phys Lipids*. 2010, Sv. 163, stránky 42-50.
- <sup>21</sup> DE JAGER M. W., GOORIS G. S., PONEC M., BOUWSTRA J. A. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique *Stratum corneum* lipid phase behavior. *J Lipid Res*. 2005, Sv. 46, stránky 2649-2656.
- <sup>22</sup> BOUWSTRA J. A., GOORIS G. S., DUBBELAAR F. E. R., WEERHEIM A. M., IJZERMAN A. P., PONEC M. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res*. 1998, Sv. 39, stránky 186-196.
- <sup>23</sup> GROEN D., POOLE D. S., GOORIS G. S., BOUWSTRA J. A. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim Biophys Acta*. 2011, Sv. 1808, stránky 1529-1537.
- <sup>24</sup> CORKERY, R. W., The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloid Surface B* **2002**, *26* (1-2), 3-20.
- <sup>25</sup> SCHEUPLEIN R.J. Permeability of the skin: a review of major concepts and some new developments. *J Invest Dermatol*. 1976;67:672-6.

- <sup>26</sup> BOUWSTRA JA, GOORIS GS, VRIES MAS-D, VAN DER SPEK JA, BRAS W. Structure of human *Stratum corneum* as a function of temperature and hydration: a wide-angle X-ray diffraction study. *Int J Pharm.* 1992;84:205–16.
- <sup>27</sup> MICHAELS AS, CHANDRASEKARAN SK, SHAW JE. Drug permeation through human skin: theory and invitro experimental measurement. *AIChE J.* 1975;21:985–96.
- <sup>28</sup> ELIAS PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol.* 1983;80:44–9.
- <sup>29</sup> SCHMITT T, NEUBERT R, H, H: State of the Art in *Stratum corneum* Research. Part II: Hypothetical *Stratum corneum* Lipid Matrix Models. *Skin Pharmacol Physiol* 2020;33:213-230. doi: 10.1159/000509019
- <sup>30</sup> BOUWSTRA JA, GOORIS GS, DUBBELAAR FER, PONEC M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J Lipid Res.* 2001;42:1759–70.
- <sup>31</sup> BOUWSTRA JA, GOORIS GS, VAN DER SPEK JA, BRAS W. Structural investigations of human *Stratum corneum* by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol.* 1991;97:1005–12.
- <sup>32</sup> BOUWSTRA, J.; PILGRAM, G.; GOORIS, G.; KOERTEN, H.; PONEC, M., New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl* **2001**, *14*, 52-62.
- <sup>33</sup> KISELEV MA, RYABOVA NY, BALAGUROV AM, DANTE S, HAUSS T, ZBYTOVSKÁ J, et al. New insights into the structure and hydration of a *Stratum corneum* lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J.* 2005;34:1030–40.



- <sup>34</sup> CHAMPAGNE AM, MUÑOZ-GARCIA A, SHTAYYEH T, TIELEMAN BI, HEGEMANN A, CLEMENT ME, WILLIAMS JB. Lipid composition of the *Stratum corneum* and cutaneous water loss in birds along an aridity gradient. *J Exp Biol.* 2012 Dec 15;215(Pt 24):4299-307. doi: 10.1242/jeb.077016. Epub 2012 Sep 12. PMID: 22972881.
- <sup>35</sup> NORLEN, L., Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (4), 830-836.
- <sup>36</sup> MASUKAWA Y, NARITA H, SHIMIZU E, KONDO N, SUGAI Y, OBA T, et al. Characterization of overall ceramide species in human *Stratum corneum*. *J Lipid Res.* 2008;49:1466–76.
- <sup>37</sup> SWARTZENDRUBER, D. C.; WERTZ, P. W.; KITKO, D. J.; MADISON, K. C.; DOWNING, D. T., Molecular-Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum-Corneum. *J Invest Dermatol* **1989**, *92* (2), 251-257.
- <sup>38</sup> IWAI, I.; HAN, H. M.; DEN HOLLANDER, L.; SVENSSON, S.; OFVERSTEDT, L. G.; NORLEN, L. 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.
- <sup>39</sup> LANDMANN, L., Epidermal Permeability Barrier - Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J Invest Dermatol* **1986**, *87* (2), 202-209.
- <sup>40</sup> HILL, J. R.; WERTZ, P. W., Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal *Stratum corneum*. *Bba-Biomembranes* **2003**, *1616* (2), 121-126.

- <sup>41</sup> MADISON KC, SWARTZENDRUBER DC, WERTZ PW, DOWNING DT., et al. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the *Stratum corneum*. *J Invest Dermatol*. 1987;88:714–8
- <sup>42</sup> LUNDBORG M., NARANGIFARD A., WENNBERG CL., LINDAHL E., DANEHOLT B., NORLÉN L., et al. Human skin barrier structure and function analyzed by cryo-EM and molecular dynamics simulation. *J Struct Biol*. 2018;203:149–61.
- <sup>43</sup> LUNDBORG M, WENNBERG CL, NARANGIFARD A, LINDAHL E, NORLÉN L., et al. Predicting drug permeability through skin using molecular dynamics simulation. *J Control Release*. 2018;283:269–79
- <sup>44</sup> NORLÉN L. Skin barrier structure, function and formation: learning from cryo-electron microscopy of vitreous, fully hydrated native human *epidermis*. *Int J Cosmet Sci*. 2003;25:209–26.
- <sup>45</sup> IWAI I, HAN H, DEN HOLLANDER L, SVENSSON S, OFVERSTEDT L-G, ANWAR J, 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;132:2215–25.
- <sup>46</sup> SKOLOVA B, HUDSKA K, PULLMANNOVA P, KOVÁČIK A, PALÁT K, ROH J, 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;118:10460–70.
- <sup>47</sup> MCINTOSH, T. J.; STEWART, M. E.; DOWNING, D. T., X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: Reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry-US* **1996**, 35 (12), 3649-3653.

- <sup>48</sup> GOLDEN, G. M.; GUZEK, D. B.; HARRIS, R. R.; MCKIE, J. E.; POTTS, R. O.,  
Lipid  
thermotropic transitions in human *Stratum corneum*. *J Invest Dermatol* **1986**, *86*  
(3), 255-9.
- <sup>49</sup> MENDELSON, R., FLACH, C.R. and MOORE, D.J. Determination of molecular  
conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 923–933 (2006).
- <sup>50</sup> AKIYAMA M. Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier  
function and ichthyosis pathogenesis. *J Dermatol Sci*. 2017 Oct;88(1):3-9. doi:  
10.1016/j.jdermsci.2017.06.002. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28623042
- <sup>51</sup> ELIAS PM, GRUBER R, CRUMRINE D, et al. Formation and functions of the  
corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):314-318.  
doi:10.1016/j.bbalip.2013.09.011
- <sup>52</sup> CRUMRINE DEBRA, KHNYKIN DENIS, KRIEG PETER, et al. *Mutations in  
Recessive Congenital Ichthyoses Illuminate the Origin and Functions of the  
Corneocyte Lipid Envelope*. *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 139, Issue 4,  
2019, Pages 760-768, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.005>.
- <sup>53</sup> WERTZ PW, SWARTZENDRUBER DC, KITKO DJ, MADISON KC, DOWNING  
DT. The role of the corneocyte lipid envelope in cohesion of the *Stratum corneum*. *J  
Invest Dermatol*. 1989;93:169–172.
- <sup>54</sup> JAN, Filip. *RTG prášková difrakce a RTG fluorescenční spektroskopie v  
(nano)materiálovém výzkumu*. Centrum výzkumu nanomateriálů, PřF UPOL. 2018. s. 4-  
26.

- <sup>55</sup> VALVODA, V.P., M; LUKÁČ, P, *Základy strukturní analýzy*. Nakladatelství Karolinum, 1992.
- <sup>56</sup> FRIEDEL, F., et al., *Material analysis with X-ray microdiffraction*. Crystal Research and Technology, 2005. **40**(1-2): p. 182-187.
- <sup>57</sup> GROEN, D., G.S. GOORIS, and J.A. BOUWSTRA, *New insights into the Stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis*. Biophys J, 2009. **97**(8): p. 2242-9.
- <sup>58</sup> RESEARCH GATE: *Bragg's law*. [online]. [cit. 2020-12-13]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Braggs-law-A-two-dimensional-crystal-lattice-and-a-set-of-imaginary-planes-is\\_fig10\\_47418334](https://www.researchgate.net/figure/Braggs-law-A-two-dimensional-crystal-lattice-and-a-set-of-imaginary-planes-is_fig10_47418334).
- <sup>59</sup> WAISSER, K.P., Milan, *Organická chemie II*. Nakladatelství Karolinum, 2003: p. 29-45.
- <sup>60</sup> GARIDEL, P., et al., The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem*, 2010. **150**(1-3): p. 144-56.
- <sup>61</sup> MENDELSON, R., C.R. FLACH, and D.J. Moore, Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(7): p. 923-33.
- <sup>62</sup> MENDELSON, R.; MOORE, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141-157.

- <sup>63</sup> GARIDEL, P.; FOLTING, B.; SCHALLER, I.; KERTH, A., The microstructure of the *Stratum corneum* lipid barrier: Mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys Chem* **2010**, *150* (1-3), 144-156.
- <sup>64</sup> LAFLEUR, M., Phase behaviour of model *Stratum corneum* lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Can J Chem* **1998**, *76* (11), 1501-1511.
- <sup>65</sup> MACPHAIL, R. A.; STRAUSS, H. L.; SNYDER, R. G.; ELLIGER, C. A., C-H stretching modes and the structure of normal-alkyl chains .2. Long, all-*trans* chains. *J Phys Chem* **1984**, *88* (3), 334-341.
- <sup>66</sup> BONCHEVA, M.; DAMIEN, F.; NORMAND, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact *Stratum corneum* using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778* (5), 1344-55.
- <sup>67</sup> DAMIEN, F.; BONCHEVA, M., The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **2010**, *130* (2), 611-4.
- <sup>68</sup> SENAK, L.; MOORE, D.; MENDELSON, R., CH<sub>2</sub> wagging progressions as ir probes of slightly disordered phospholipid acyl chain states. *J Phys Chem* **1992**, *96* (6), 2749-2754.
- <sup>69</sup> SNYDER, R. G., Vibrational study of chain conformation of liquid n-paraffins and molten polyethylene. *J Chem Phys* **1967**, *47* (4), 1316-&.

<sup>70</sup> NAWROCKA, A., LAMORSKA, J. Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. *Advances in Agrophysical Research*. 2013, *IntechOpen*, DOI: 10.5772/52722.

<sup>71</sup> ARSENEAULT, M.; LAFLEUR, M., Cholesterol sulfate and Ca<sup>2+</sup> modulate the mixing properties of lipids in *Stratum corneum* model mixtures. *Biophys J* **2007**, *92* (1), 99-114.

<sup>72</sup> OPÁLKA L, KOVÁČIK A, PULLMANNOVÁ P, MAIXNER J, VÁVROVÁ K. Effects of omega-*O*-acylceramide structures and concentrations in healthy and diseased skin barrier lipid membrane models. *J Lipid Res*. 2020 Feb;61(2):219-228. doi: 10.1194/jlr.RA119000420. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31857390; PMCID: PMC6997605.

<sup>73</sup> KODATI, V. R.; EL-JASTIMI, R.; LAFLEUR, M. Contribution of the Intermolecular Coupling and Librotorsional Mobility in the Methylene Stretching Modes in the Infrared Spectra of Acyl Chains. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (47), 12191–12197. <https://doi.org/10.1021/j100098a012>.

<sup>74</sup> AUNDREA R. PIPER-FELDKAMP, MARIA WEGNER, et al. Mixtures of Supported and Hybrid Lipid Membranes on Heterogeneously Modified Silica Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013** *117* (7), 2113-2122 DOI: 10.1021/jp308305y

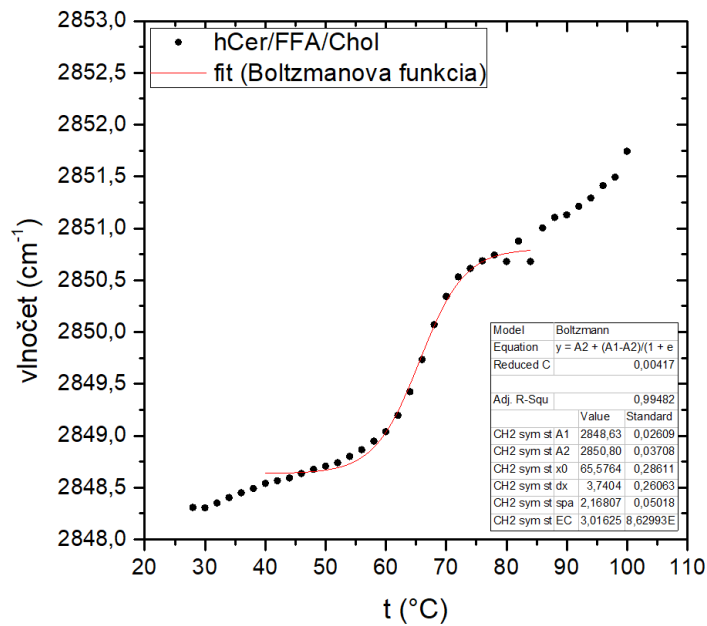
<sup>75</sup> EDWARD T. CASTELLANA, PAUL S. CREMER. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports, Volume 61*, Issue 10, 2006, Pages 429-444, ISSN 0167-5729, <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>.

<sup>76</sup> JAKOB ANDERSSON, PIERLUIGI BILOTTO, LAURA L.E. MEARS, et al. Solid-supported lipid bilayers – A versatile tool for the structural and functional characterization of membrane proteins, *Methods*, Volume 180, 2020, Pages 56-68, ISSN 1046-2023, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.09.005>.

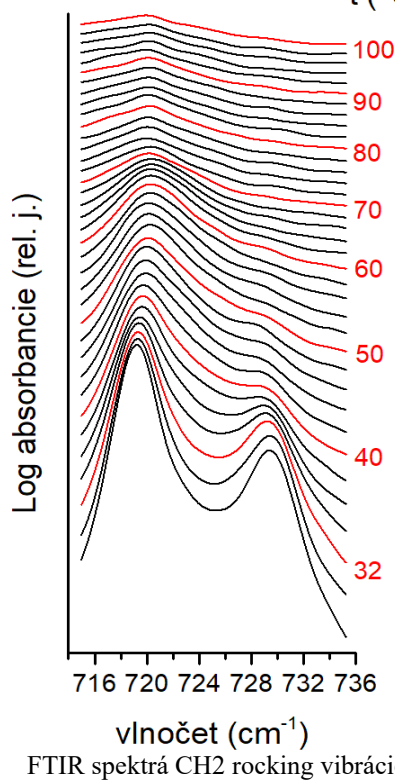
<sup>77</sup> YIN J, LIU H, PIDGEON C. Synthesis and immobilization of ceramide analogs on silica particles. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Jan 20;8(2):179-82. doi: 10.1016/s0960-894x(97)10217-7. PMID: 9871650.

## 8 PRÍLOHA

Vzorka LC1 - hCer/FFA/Chol

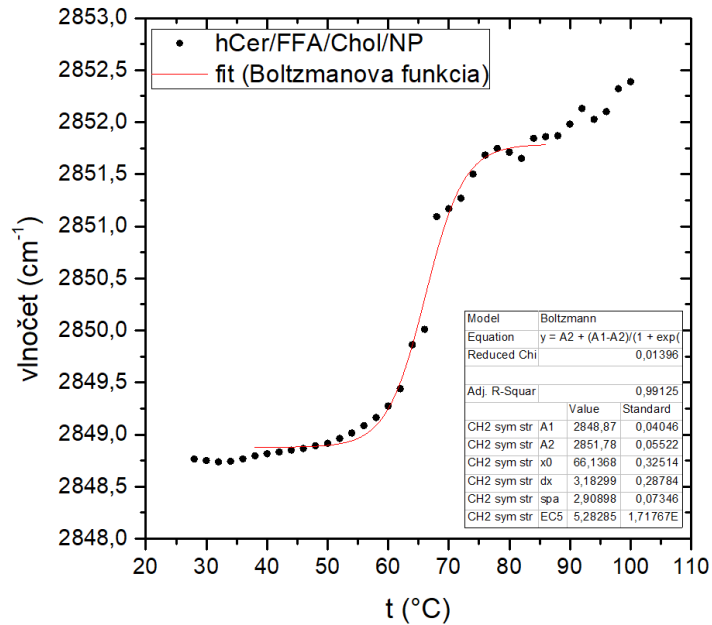


Graf fázového prechodu vzorky pre vibrácie CH2 symetrický stretching  
t (°C)

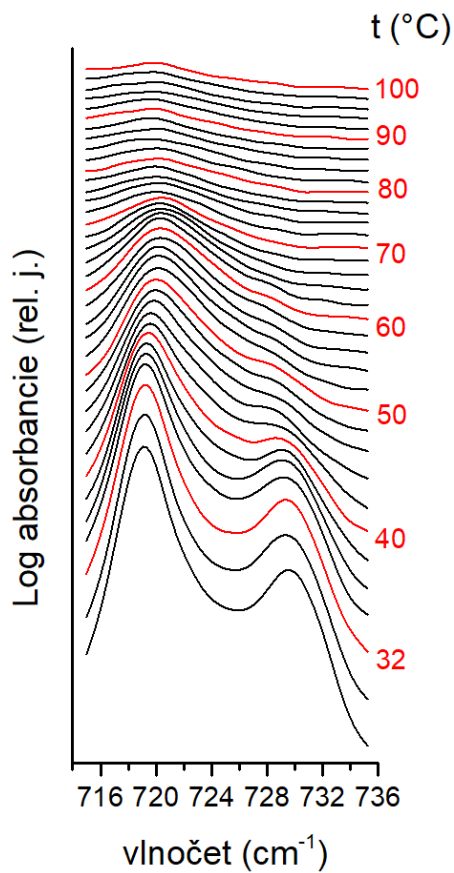




Vzorka LNP\_0,16a - hCer/FFA/Chol/NP 0,16

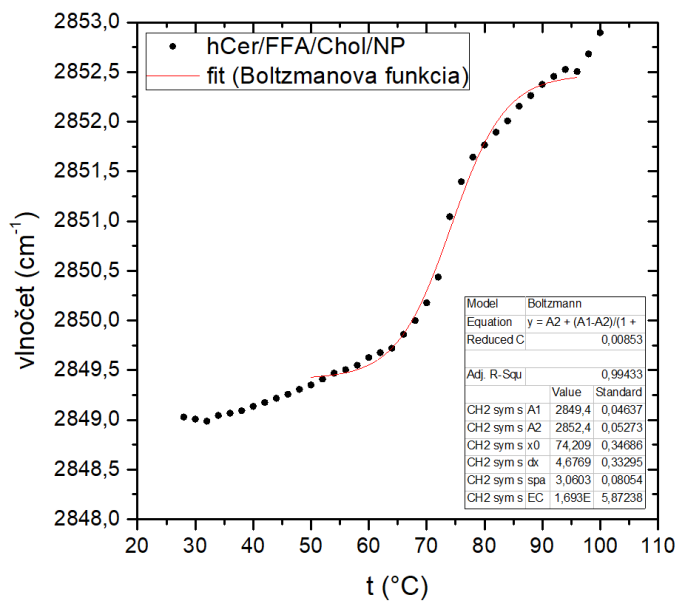


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

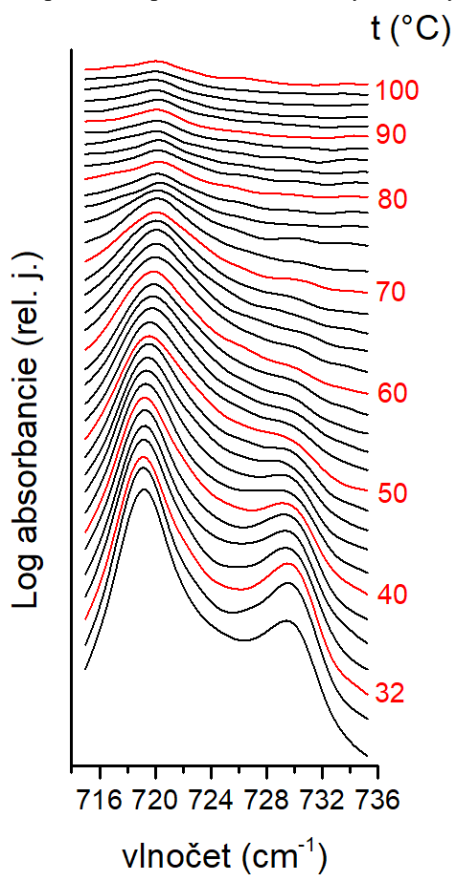


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LNP\_0,5b - hCer/FFA/Chol/NP 0,5

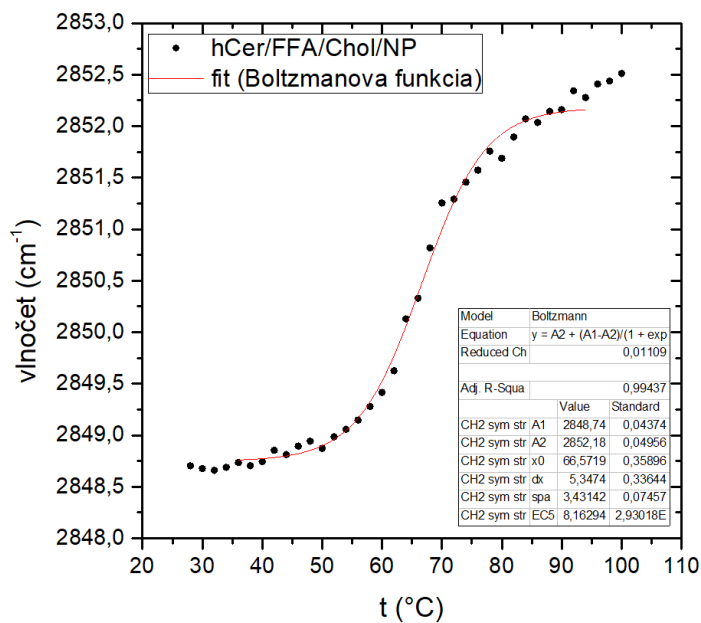


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

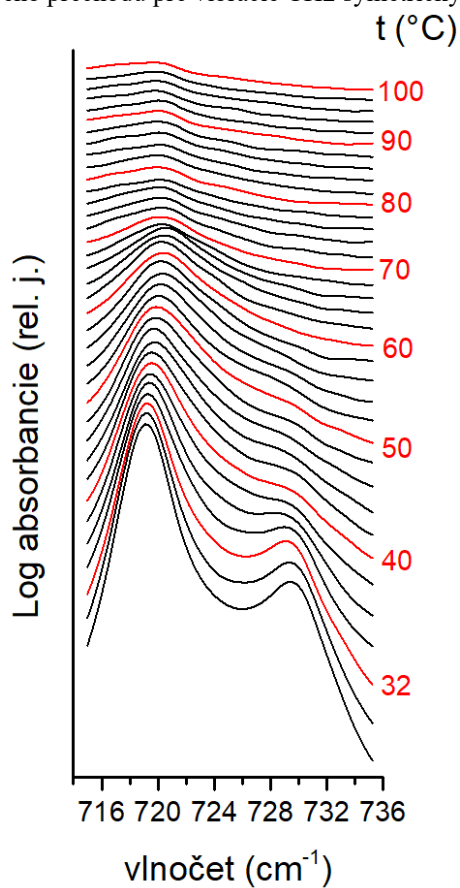


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LNP\_1a - hCer/FFA/Chol/NP 1

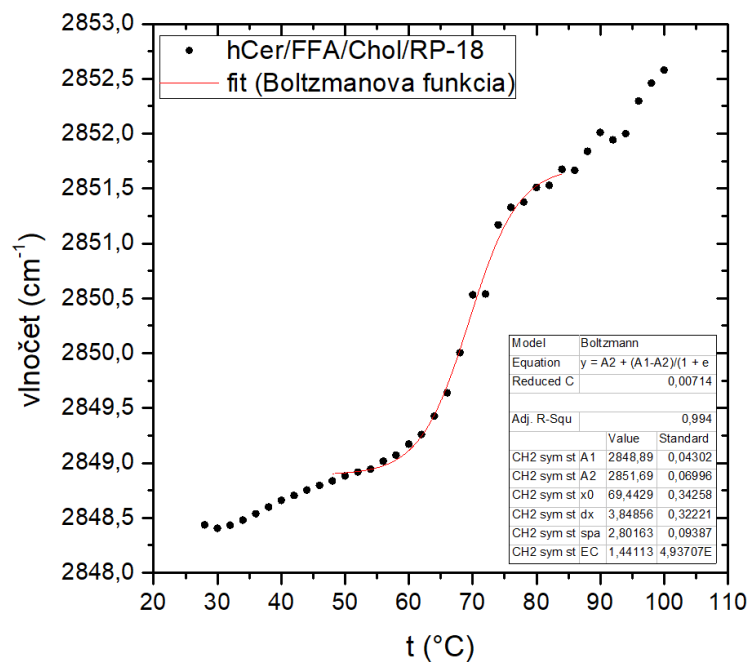


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

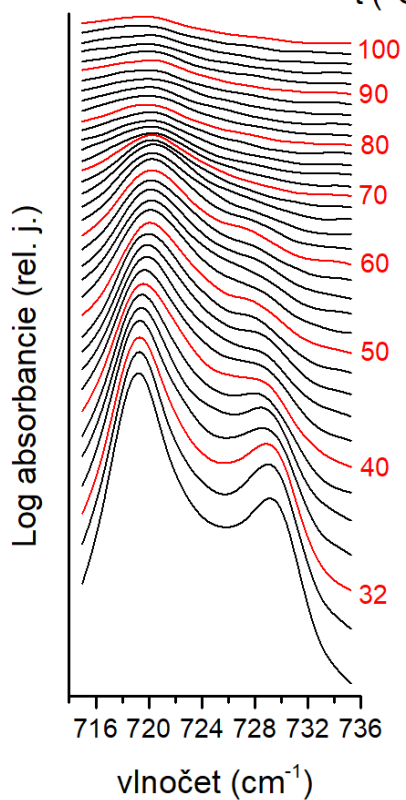


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LRP\_0,16a - hCer/FFA/Chol/RP-18 0,16

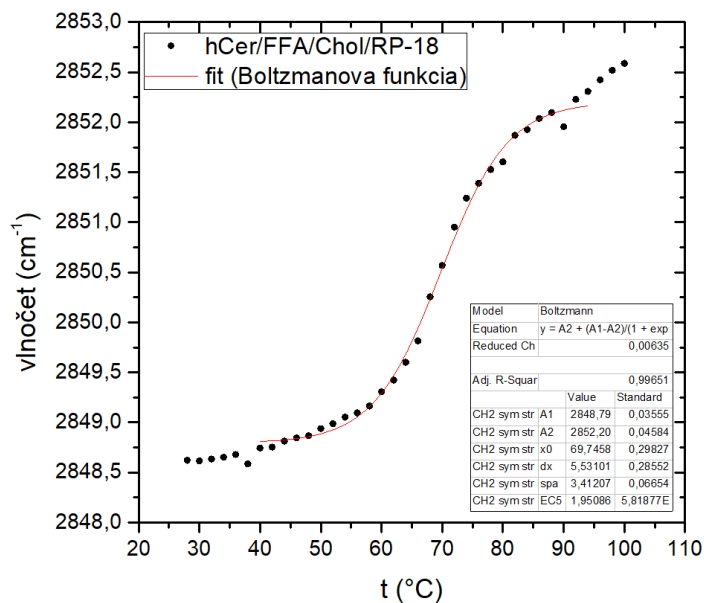


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching  
t (°C)

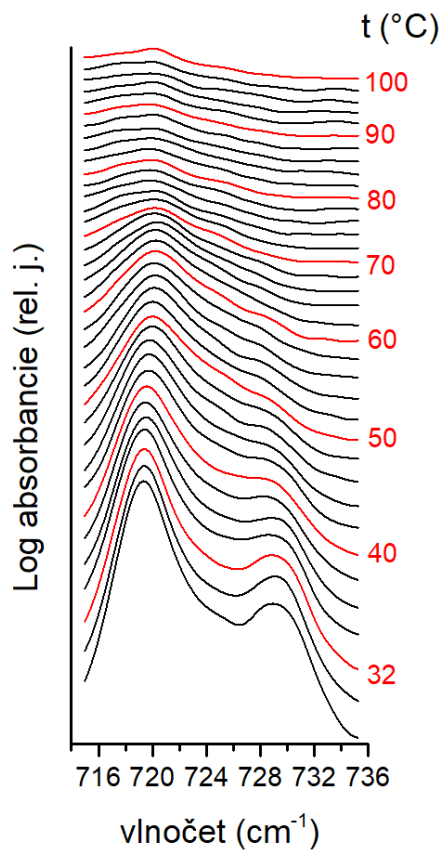


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LRP\_0,16b - hCer/FFA/Chol/RP-18 0,16

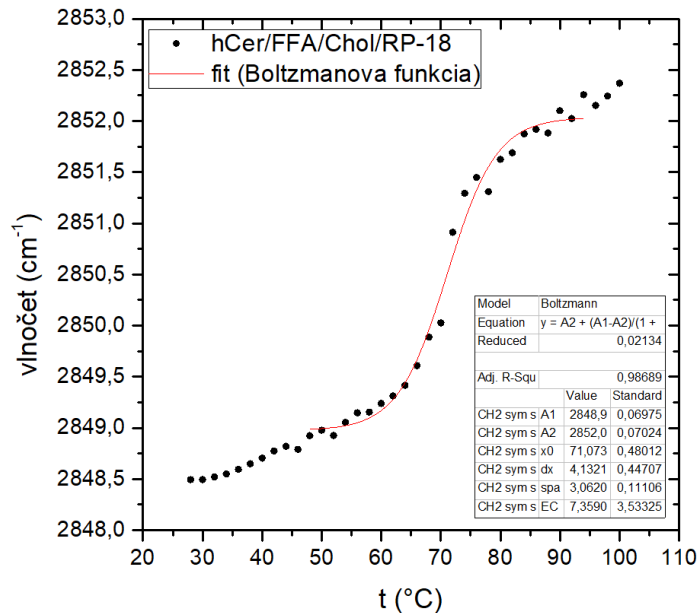


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

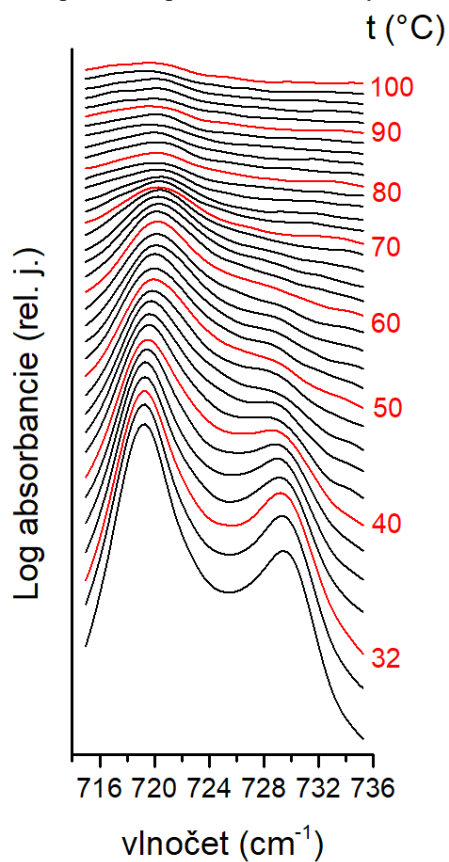


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LRP\_0,5b - hCer/FFA/Chol/RP-18 0,5

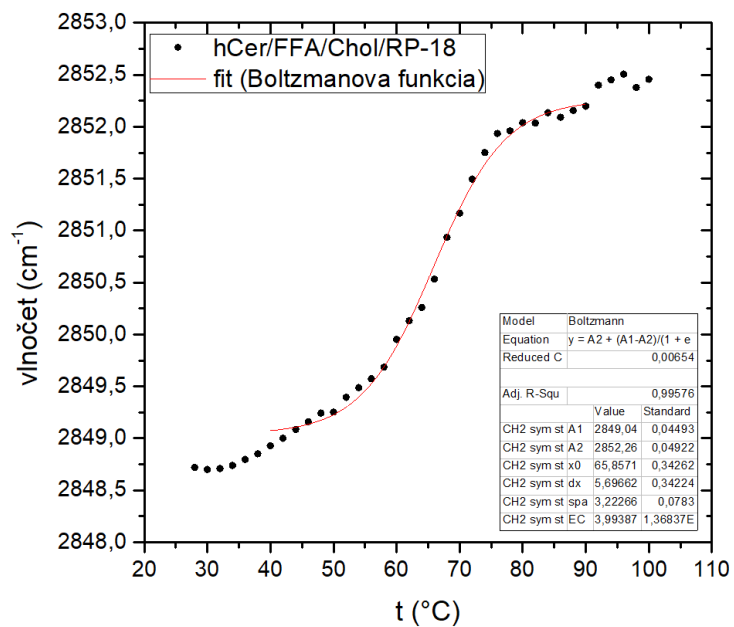


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

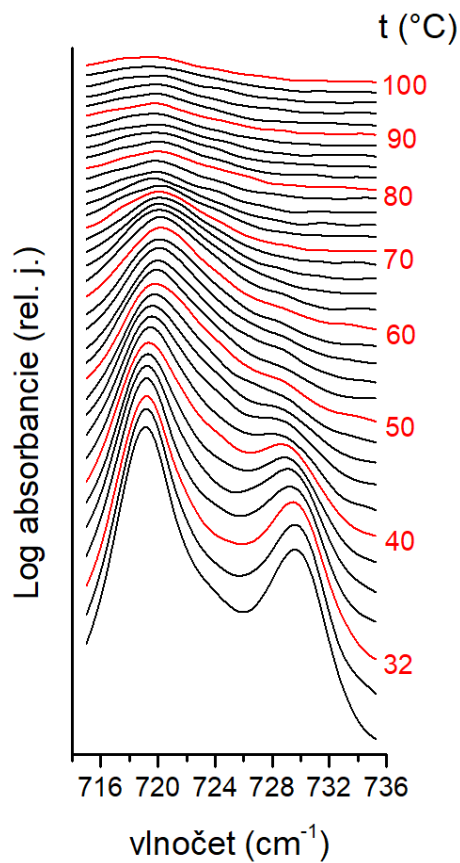


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LRP\_1a - hCer/FFA/Chol/RP-18 1

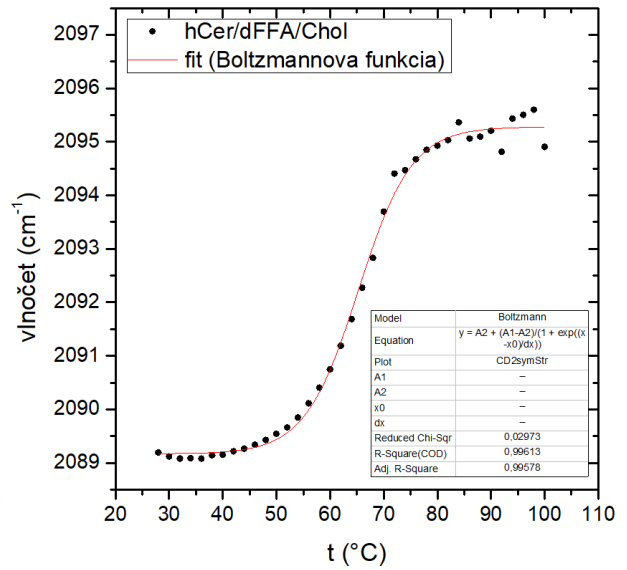
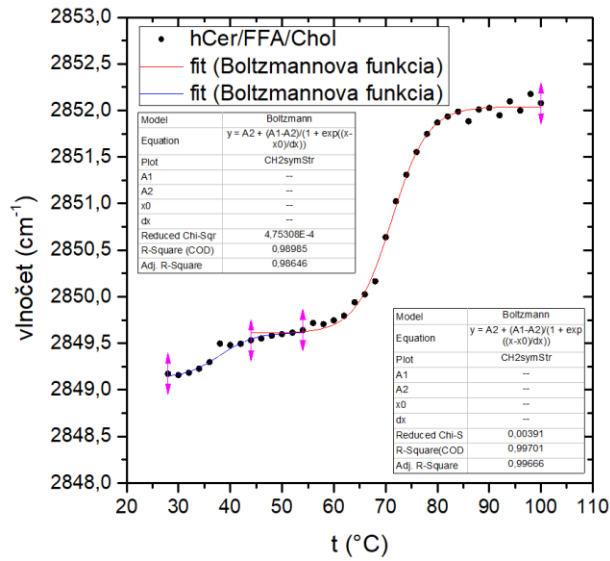


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 symetrický stretching

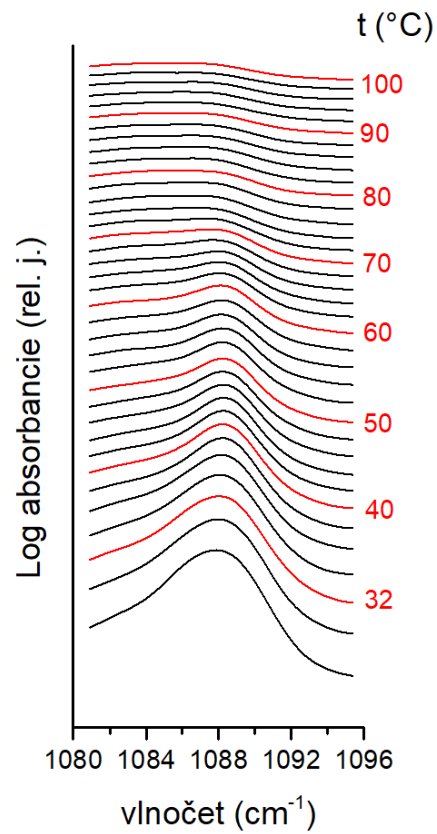
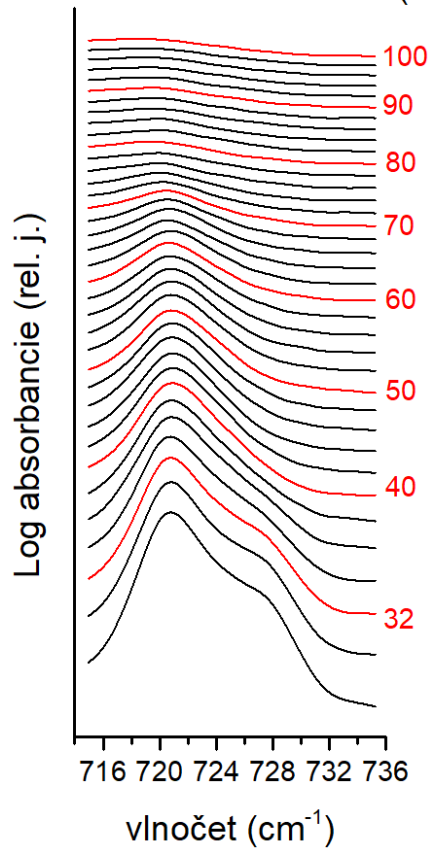


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie

Vzorka LC\_d - hCer/dFFA/Chol



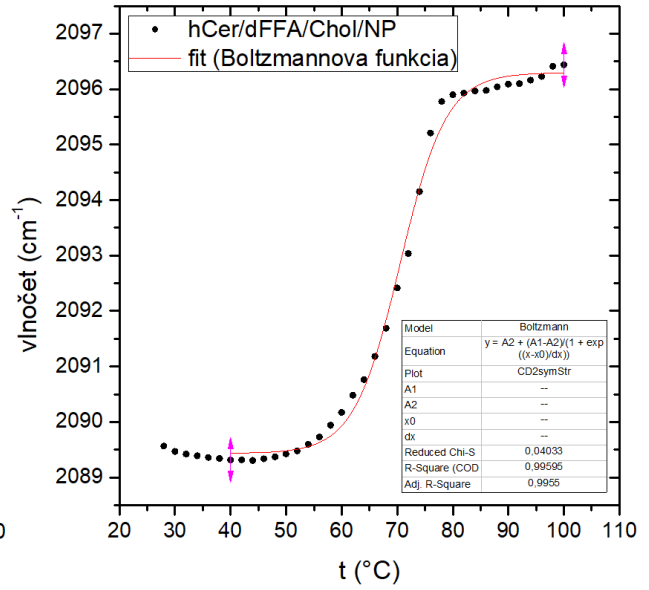
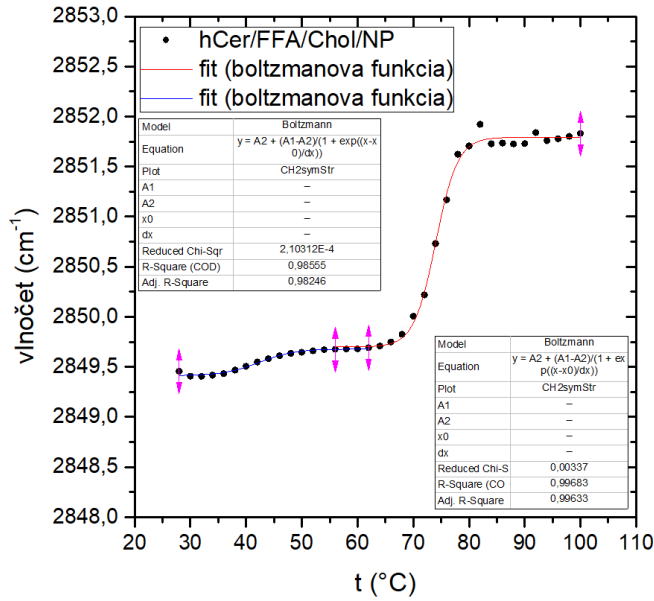
Graf fázového prechodu pre vibrácie CH<sub>2</sub> (vľavo) a CD<sub>2</sub> symetrický stretching (vpravo)  
 t (°C)



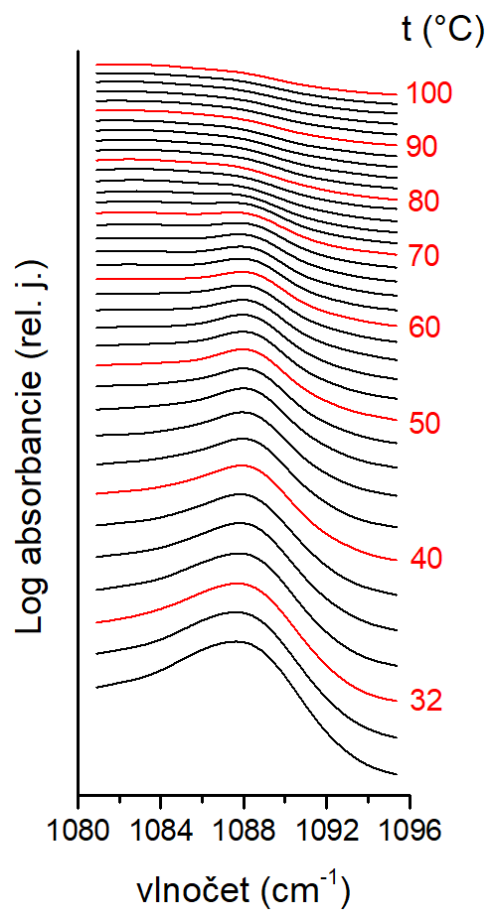
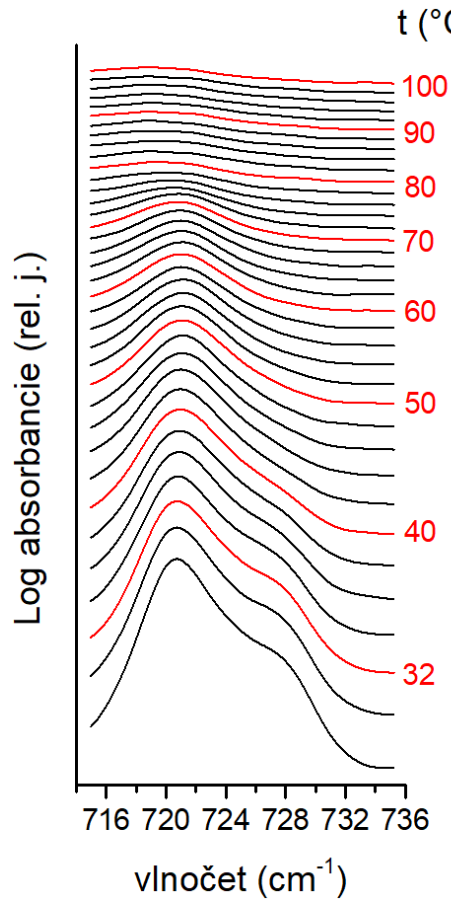
FTIR spektrá CH<sub>2</sub> rocking vibrácie (vľavo) a CD<sub>2</sub> scissoring vibrácie (vpravo)



Vzorka LNP\_d 0,16 - hCer/dFFA/Chol/NP 0,16

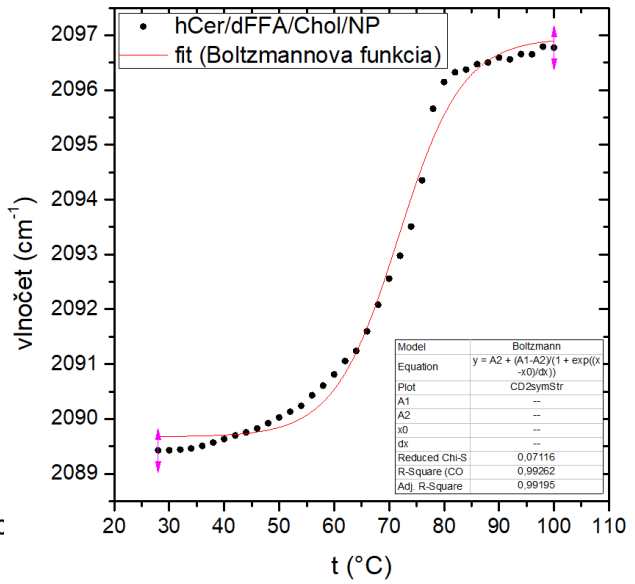
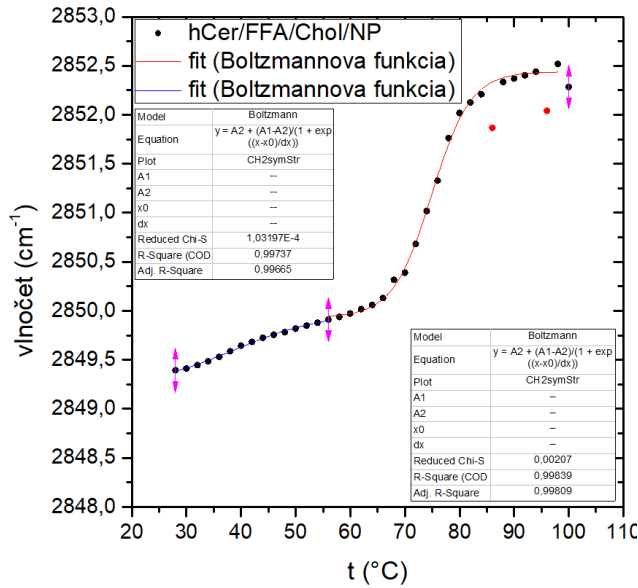


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 (vľavo) a CD2 symetrický stretching (vpravo)

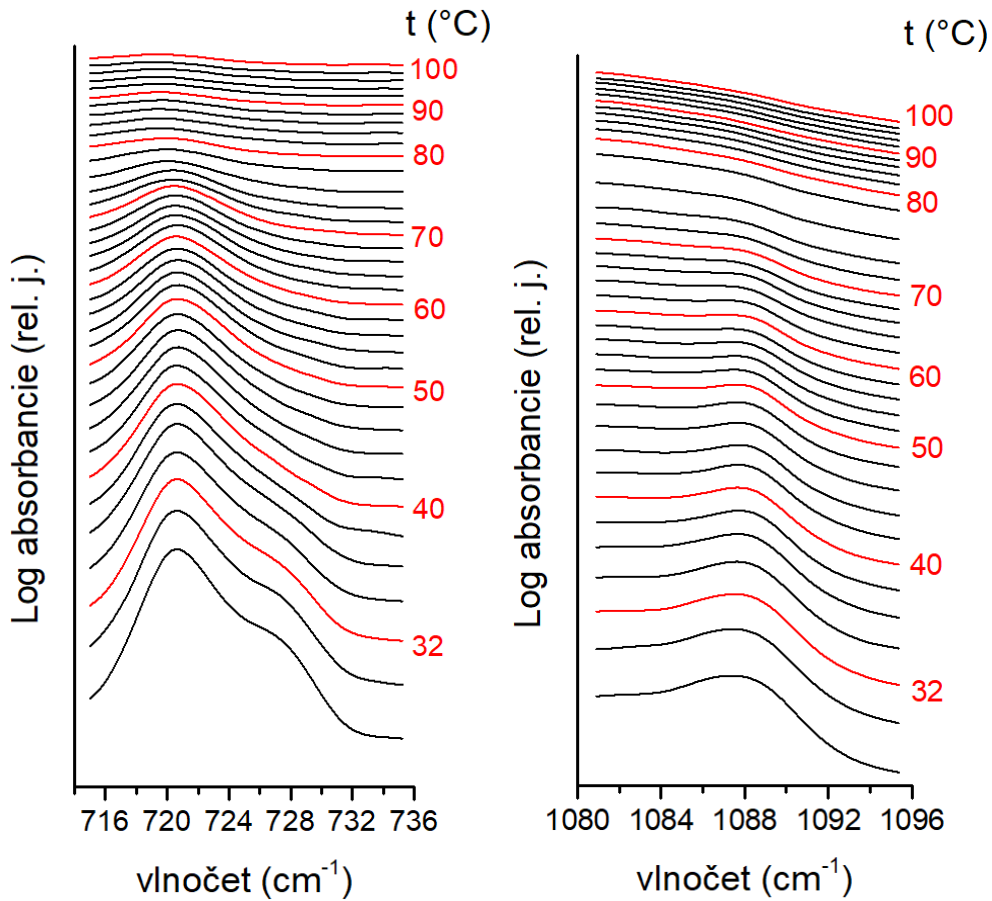


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie (vľavo) a CD2 scissoring vibrácie (vpravo)

Vzorka LNP\_d 0,5 - hCer/dFFA/Chol/NP 0,5

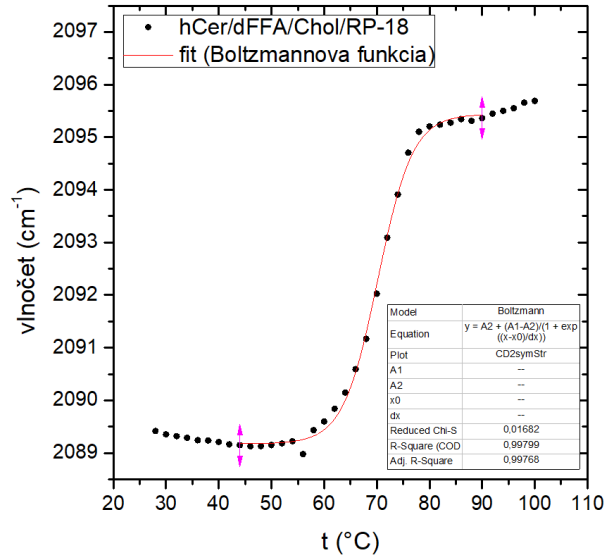
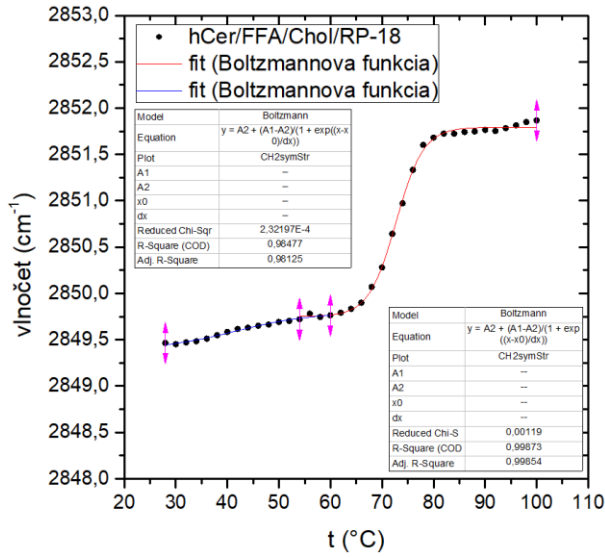


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 (vľavo) a CD2 symetrický stretching (vpravo)

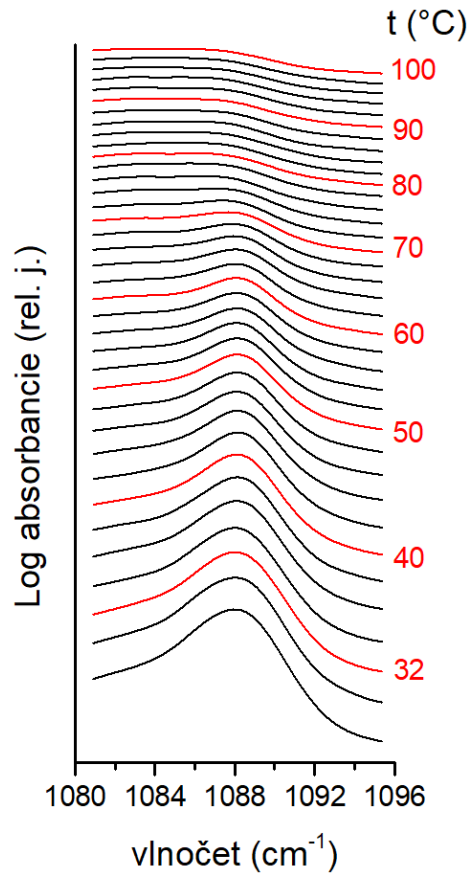
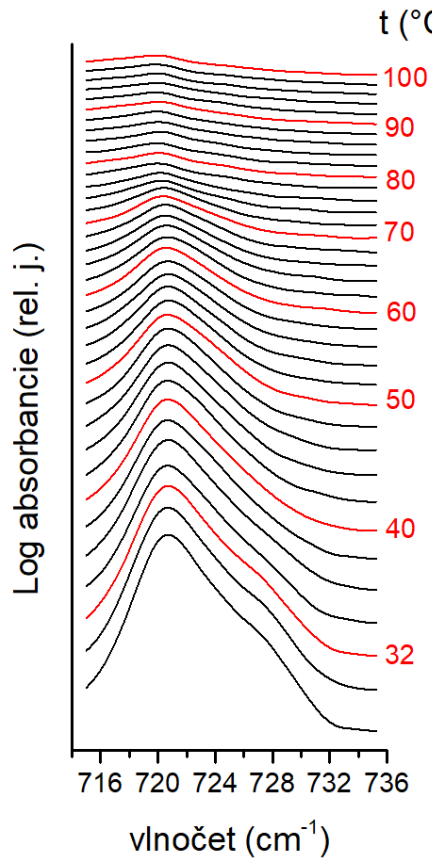


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie (vľavo) a CD2 scissoring vibrácie (vpravo)

Vzorka LRP\_d 0,16 - hCer/dFFA/Chol/RP-18 0,16

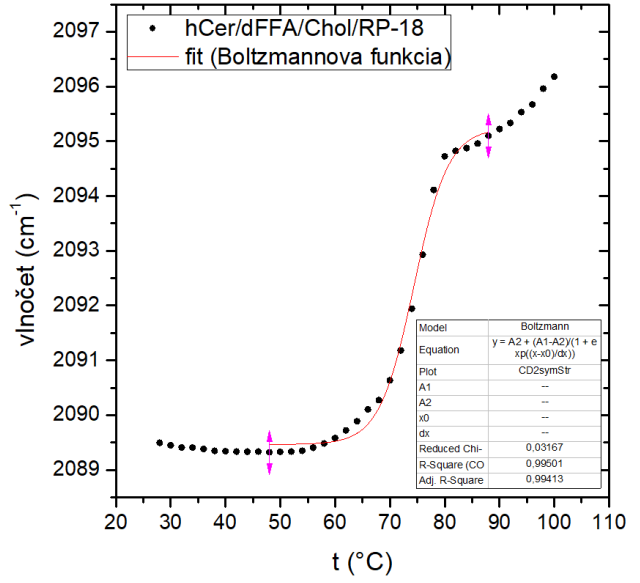
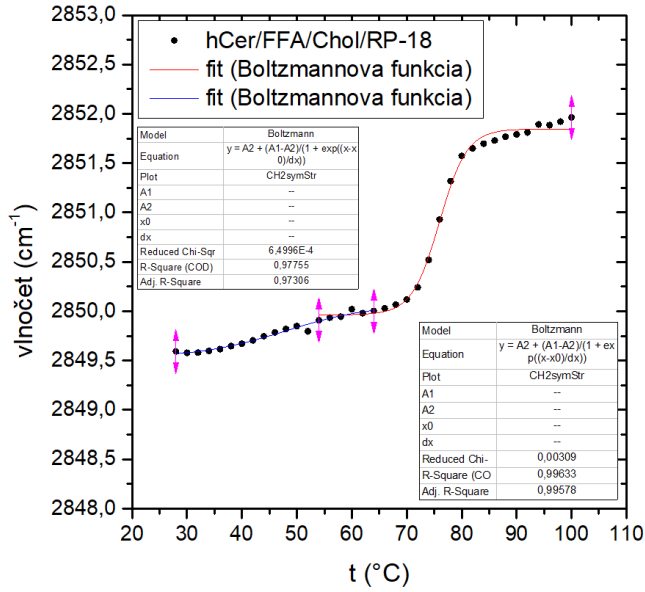


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 (vľavo) a CD2 symetrický stretching (vpravo)

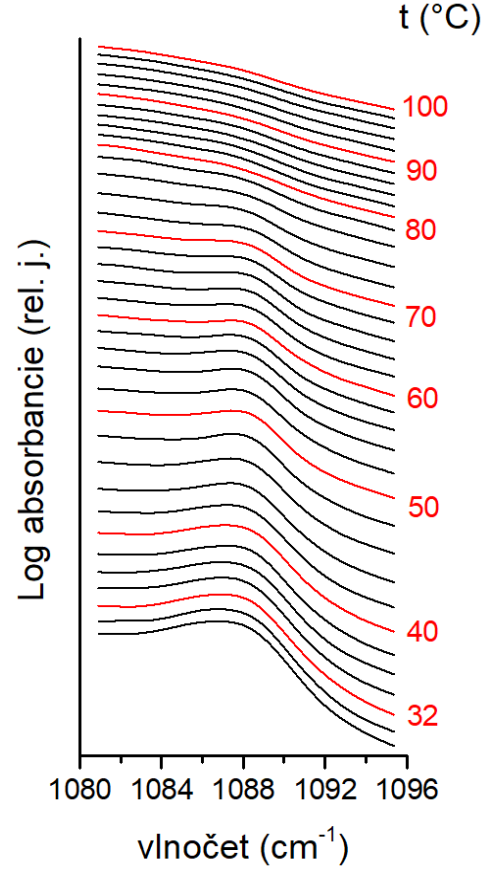
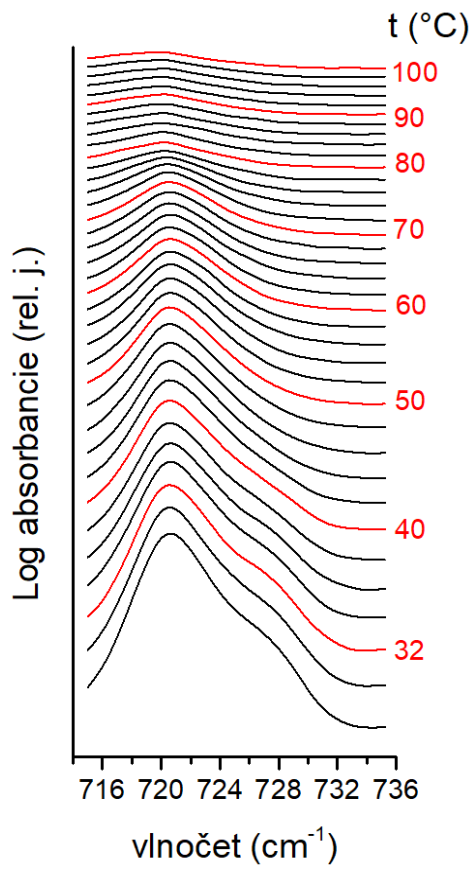


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie (vľavo) a CD2 scissoring vibrácie (vpravo)

Vzorka LRP\_d 0,5 - hCer/dFFA/Chol/RP-18 0,5

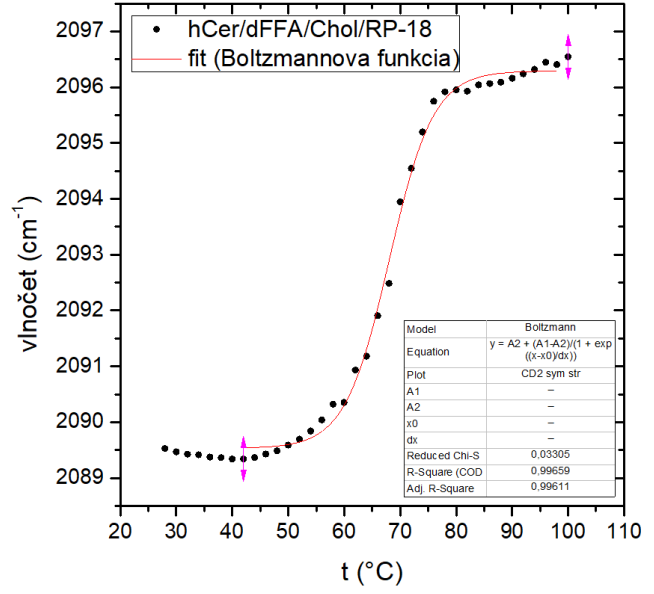
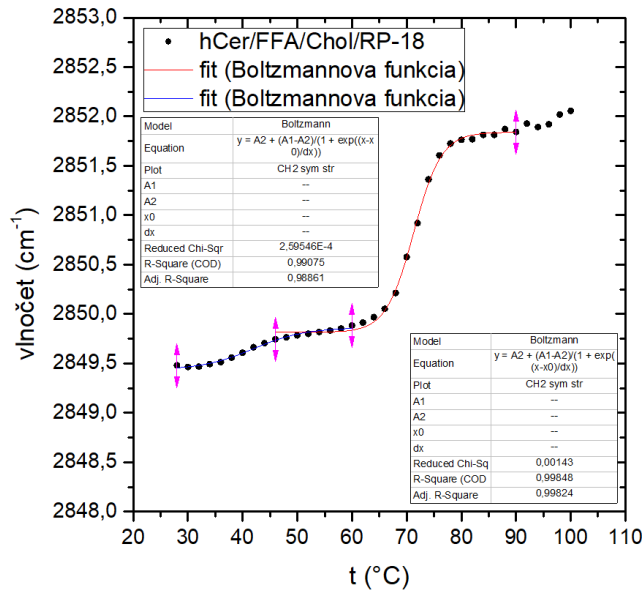


Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 (vľavo) a CD2 symetrický stretching (vpravo)

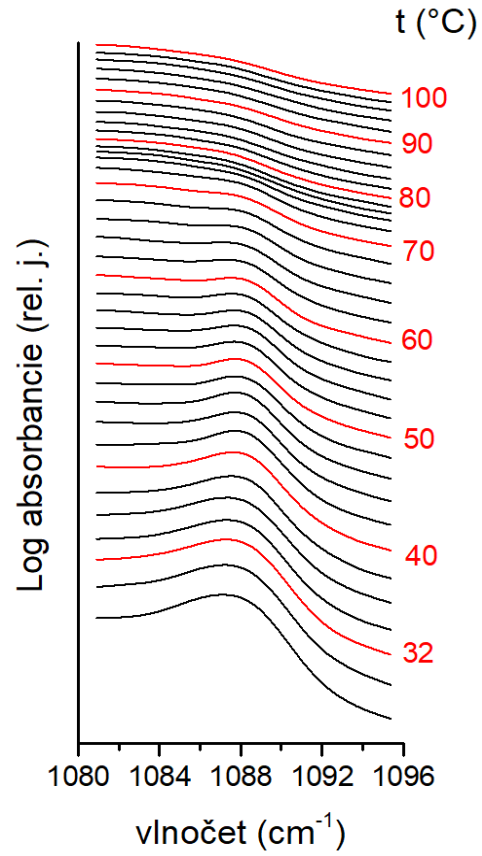
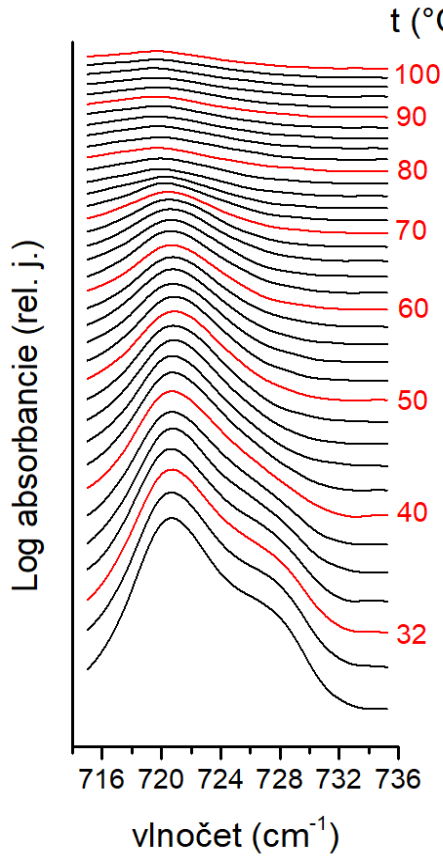


FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie (vľavo) a CD2 scissoring vibrácie (vpravo)

Vzorka LRP\_d 1 - hCer/dFFA/Chol/RP-18 1



Graf fázového prechodu pre vibrácie CH2 (vľavo) a CD2 symetrický stretching (vpravo)



FTIR spektrá CH2 rocking vibrácie (vľavo) a CD2 scissoring vibrácie (vpravo)