

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie



**KVANTIFIKACE KOŽNÍCH CERAMIDŮ U PACIENTŮ
PO ONKOLOGICKÉ LÉČBĚ**

Diplomová práce

Eliška Voláková

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

Hradec Králové 2022

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Eliška Voláková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. za profesionální vedení, odborné rady, trpělivost, ochotu a vstřícné jednání během vypracování této diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry organické a bioorganické chemie za vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a příteli Ing. Jakubu Sýsovi, kteří mi byli velikou oporou.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (19-09135J).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Eliška Voláková

Školitel: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Název diplomové práce: Kvantifikace kožních ceramidů u pacientů po onkologické léčbě

Ceramidy jsou jednou ze tří základních lipidových složek přítomných ve stratum corneum lidské kůže. Změny v poměru zastoupení jednotlivých ceramidů jsou spojeny s narušením bariérové funkce kůže. Takovéto změny byly pozorovány nejen u kožních onemocnění neonkologického typu, ale také jako důsledek rakoviny. Hlavním cílem této práce bylo zjistit rozdíl v zastoupení kožních ceramidů ve stratum corneum u zdravých pacientů a pacientů po prodělaném onkologickém onemocnění. Vzorky byly odebrány od pěti skupin pacientů, z nichž čtyři představovaly onkologické pacienty s různým typem léčby: resekci nádoru, chemoterapií, ozařováním či kombinací chemoterapie a ozařování. Zbývající pátou skupinu tvořily kontrolní vzorky od dobrovolníků bez diagnostikovaného karcinomu.

U každého pacienta probíhal odběr stripovými pásky z identického místa na předloktí, po kterém následovalo stanovení obsahu proteinů. Vzorky onkologických pacientů byly porovnávány s kontrolními vzorky také z pohledu odlišných ztrát vody přes kůži před a po odběru vzorku. Ceramidy byly ze vzorků extrahovány směsí organických rozpouštědel a analyzovány pomocí LC-MS/MS s přidavkem vnitřních standardů. Ceramidy vybraných podtříd byly kvantifikovány a dále hodnoceny z pohledu průměrné délky acylových řetězců, obsahu jednotlivých sfingoidních bazí nebo stupně hydroxylace.

Z výsledků vyplývá, že stratum corneum pacientů s onkologickým onemocněním je propustnější pro vodu a obsahuje přibližně dvakrát méně proteinů než stratum corneum kontrolních pacientů bez karcinomu, avšak naopak vykazuje zvýšenou hladinu ceramidů. Výrazný nárůst byl zjištěn u všech čtyř podtříd ceramidů, avšak nejvýraznější z nich byl pozorován u nesubstituovaných a α -hydroxylovaných ceramidů. Průměrné délky acylových řetězců ceramidů či poměr mezi dlouhými a ultradlouhými acylovými řetězci nevykazovaly

statisticky významné rozdíly.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Eliška Voláková

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

Title of diploma thesis: Quantification of skin ceramides in patients after oncological treatment

Ceramides are one of the three basic lipid components present in the stratum corneum of human skin. Alterations in the ratio of individual ceramides are associated with disruption of skin barrier function. Such changes have been observed not only in skin diseases of the non-cancerous type, but also as a consequence of cancer. The main aim of the present study was to investigate the difference in the representation of skin ceramides in the stratum corneum of healthy patients and patients after cancer. Samples were collected from five groups of patients, four of which represented cancer patients with different types of treatment: tumor resection, chemotherapy, radiation or a combination of chemotherapy and radiation. The remaining fifth group consisted of control samples from volunteers without a diagnosis of cancer.

Samples were obtained by tape-stripping from an identical site on patient forearm, followed by protein determination. Cancer patient samples were compared with control samples in terms of different water loss through the skin before and after sampling. Ceramides were extracted from the samples using a mixture of organic solvents and analyzed by LC-MS/MS with the addition of internal standards. Ceramides of selected subclasses were quantified and further evaluated in terms of average acyl chain length, content of individual sphingoid bases or degree of hydroxylation.

The results show that the stratum corneum of cancer patients is more permeable to water and contains approximately half amount of proteins than the stratum corneum of control patients, but on the contrary shows increased ceramide levels. Significant increases

were found for all four ceramide subclasses, but the most pronounced increases were observed for unsubstituted and α -hydroxylated ceramides. The average acyl chain lengths of ceramides or the ratio between long and ultra-long acyl chains did not show statistically significant differences.

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	11
2. TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Kůže.....	12
2.2 Stratum corneum.....	13
2.3 Ceramidy.....	16
2.3.1 Funkce ceramidů.....	16
2.3.2 Struktura ceramidů.....	16
2.3.3 Biosyntéza ceramidů.....	19
2.3.4 Kvantifikace ceramidů ve stratum corneum.....	21
2.4 Senescence = proces stárnutí.....	23
2.4.1 Senescentní buňky u rakoviny.....	24
2.4.2 Bariérová funkce modelů nemelanomové rakoviny kůže.....	25
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	27
3.1 Rozvržení experimentu.....	27

3.2	Stanovení obsahu proteinů.....	27
3.3	Transepidermální ztráta vody	28
3.4	Celkový obsah ceramidů.....	30
3.4.1	Kvantifikace nesubstituovaných ceramidů (N).....	32
3.4.2	Kvantifikace α -hydroxylovaných ceramidů (A).....	34
3.4.3	Kvantifikace ω -esterifikovaných ceramidů	35
3.4.4	Kvantifikace ω -hydroxylovaných ceramidů.....	36
3.5	Procentuální zastoupení jednotlivých podtříd ceramidů.....	38
3.6	Průměrné délky acylových řetězců vybraných podtříd ceramidů.....	40
3.7	Poměr mezi velmi dlouhými a ultradlouhými ceramidy	42
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1	Odběry vzorků a měření transepidermální ztráty vody	45
4.2	Měření obsahu bílkovin	45
4.3	Extrakce lipidů ze SC	46
4.4	Separace a kvantifikace ceramidů.....	47
4.4.1	Příprava vnitřního standardu.....	47
4.4.2	Příprava vnějšího standardu.....	47
4.5	Zpracování výsledků.....	48
4.6	Statistická analýza dat.....	48
5.	ZÁVĚR	49

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
7. LITERATURA.....	52

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Kůže představuje největší orgán lidského těla. Tvoří bariéru organismu před okolním prostředím a udržuje jeho vnitřní rovnováhu. Za tuto bariérovou funkci je odpovědná její nejsvrchnější vrstva označovaná jako stratum corneum (SC). Zhoršení bariérové funkce kůže spojené se změnami ve složení a uspořádání lipidů je znakem kůže postižené různými typy onemocnění, nejen kožními, ale také jako důsledek rakoviny v těle.

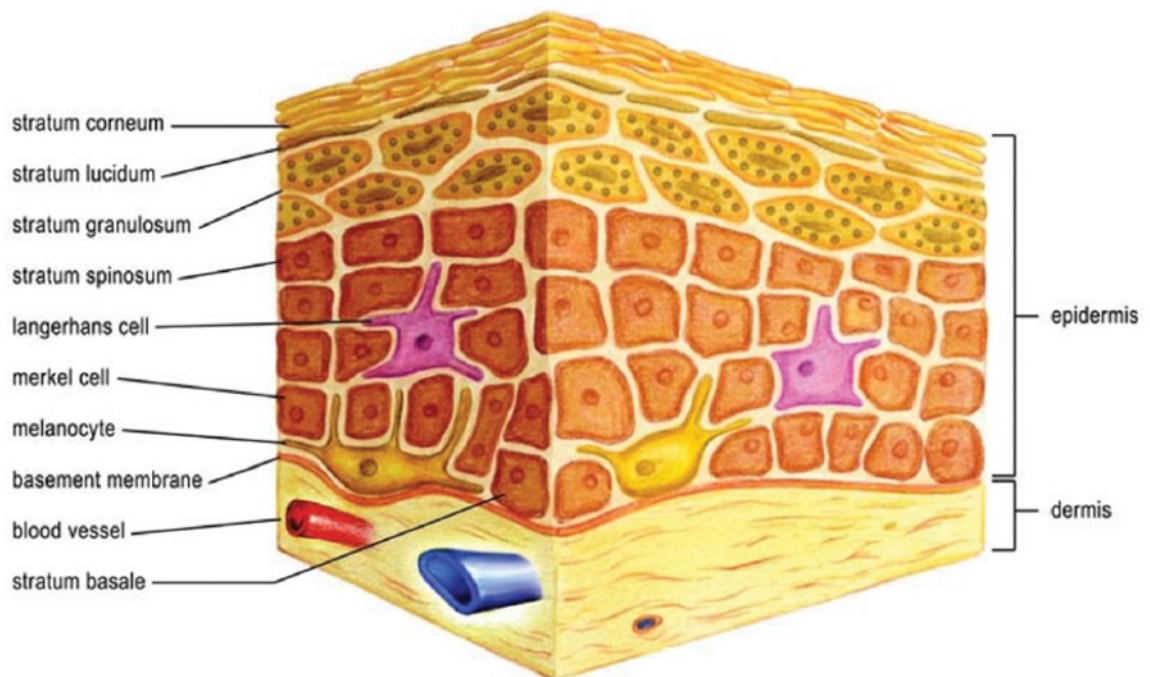
Rakovina patří mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění v lidské populaci, z nichž nejčastěji diagnostikovanými rakovinami jsou nádory plic, prsu a kolorektálního karcinomu.¹ Přesto, že je vyléčení rakoviny velkým úspěchem, postrakovinový stav je doprovázen četnými zdravotními komplikacemi, které souvisejí s předčasným stárnutím organismu. Stárnutí je přirozený a nevyhnutelný proces, který k životu neodmyslitelně patří.² Projevy předčasného stárnutí v důsledku prodělaného karcinomu se mohou projevit také na kvalitě kůže a lze předpokládat jejich častější výskyt u osob které karcinom prodělaly v útlém věku. Spojitosti mezi proděláním rakoviny a předčasným výskytem příznaků stárnutí však nebyly zcela objasněny. Právě kvantifikace kožních lipidů může poskytnout důležité vodítko k predikci stárnutí kůže u osob, které prodělaly karcinom v dětském věku.

Hlavním cílem této práce bylo nalezení vhodného markeru pro predikci předčasného stárnutí, ideálně neinvazivní cestou jako například odběrem kožních vzorků pomocí stripování. Jedním z dílčích cílů bylo ověřit schopnost kůže regenerovat se po odběru vzorku D-squame páskou pomocí metody tape stripping. Dalším cílem bylo porovnat rozdíly v zastoupení kožních ceramidů ve stratum corneum u zdravých dobrovolníků a pacientů po prodělaném onkologickém onemocnění v dětství. Cílem bylo rovněž ceramidy vybraných podtříd kvantifikovat a dále zhodnotit z pohledu průměrné délky aclových řetězců, obsahu jednotlivých sfingoidních bazí nebo stupně hydroxylace.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Největším orgánem lidského těla je kůže, která zastává přibližně 16 % celkové tělesné hmotnosti. Nejdůležitější funkcí kůže je ochrana těla před nepříznivými vlivy okolního prostředí (patogeny, UV zářením, chemickými látkami, mechanickým poraněním) a zabránění nadměrným ztrátám vody z těla. Mezi další funkce kůže patří imunitní a senzorická funkce, termoregulace organismu a schopnost syntetizovat vitamin D.³ Kůže člověka se skládá ze tří vrstev: epidermis, dermis a hypodermis.⁴ Tloušťka a složení vrstev kůže se může lišit v závislosti na tom, o jakou část lidského těla se jedná.⁵



Obr. 1. Schéma průřezu lidské kůže.⁶

Epidermis, svrchní vrstva kůže, je tvořena vícevrstevným epitelem, jehož základem jsou keratinocyty vzniklé dělením buněk v bazální vrstvě, které se postupně diferencovaly, a daly tak vzniknout několika odlišným vrstvám. V důsledku toho ji lze rozdělit do čtyř vrstev (Obr. 1) od nejhlubší po nejsvrchnější, tedy stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum.⁷ Kromě čtyř základních vrstev může být součástí kůže i vrstva stratum lucidum, která je typicky přítomná pouze v silné vrstvě kůže, jako je oblast dlaně a chodidla.⁸ Keratinocyty v nejméně diferencované formě, které jsou uloženy v bazální vrstvě

epidermis, podléhají mitóze a dělí se. Postupně dozrávají a diferencují se, migrují na povrch, produkují keratiny a nakonec ztrácí svá jádra a další buněčné organely. Tyto buňky tvoří stratum corneum neboli zrohovatělou vrstvu kůže.⁸ Součástí epidermis je několik populací buněk, mezi něž patří melanocyty, které dávají pigment keratinocytům, Langerhansovy buňky, které mají imunologické funkce a Merkelovy buňky, které plní smyslovou funkci mechanoreceptorů pro lehký dotyk.⁷ Pokožka nemá vlastní krevní zásobení, místo toho je vyživována z krevních cév uložených v dermis.⁹

Vzniklé rozhraní mezi epidermis a dermis je tvořeno porézní bazální membránou, která umožňuje výměnu tekutin mezi buňkami a drží obě vrstvy pohromadě.⁴

Dermis je vrstva kůže složená převážně z pojivové tkáně a krevního řečiště, která podpírá epidermis a váže ji k podkoží neboli hypodermis.⁶ Nacházejí se zde potní žlázy, vlasové folikuly, svaly, smyslové neurony a cévy.¹⁰ Stejně jako epidermis je i dermis tvořena několika populacemi buněk, které tvoří přibližně 10 % dermálního obsahu. Mezi ně patří monocyty, histiocyty, fibrocyty, Langerhansovy buňky, lymfocyty a eozinofily spolu s vaskulární a lymfaticky spojenými buňkami. Dermis je primárně matrice pojivové tkáně tvořená přibližně z 90 % kolagenem spolu s elastickými vlákny. Dalšími útvary součástí dermis jsou krevní a lymfatické cévy, s některými svalovými vlákny a pilosebaceózními a potními žlázami. Mezi epidermis a dermis neprobíhá pouze obyčejná komunikace, ale epidermis je také zcela závislá na živinách získaných krevním zásobením v dermis. Svým prokrvením dermis podporuje krevní oběh organismu a dodává živiny epidermis, mezi nimiž probíhá neustálá komunikace.⁵

Pod dermis se nachází hypodermis, vrstva volné pojivové tkáně, která spojuje kůži s vnitřními orgány a dopřává tak kůži jistou stabilitu. Tato vrstva obsahuje podkožní tuk, který tlumí podněty z vnějšího prostředí a zajišťuje termoregulaci těla.⁶

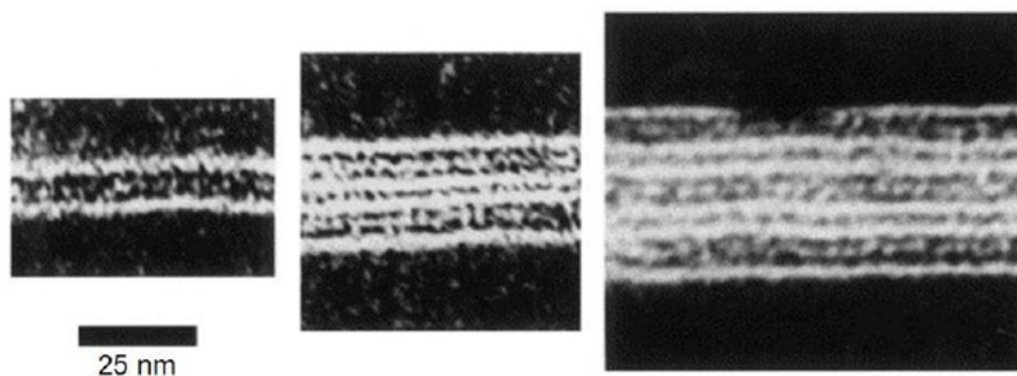
2.2 Stratum corneum

Stratum corneum (SC) je svrchní vrstva epidermis, která je v přímém kontaktu s okolím.¹¹

Skládá se z přibližně 15-25 vrstev zploštělých buněk, korneocytů, které jsou uloženy

v lipidové matrix.¹²⁻¹³ Představuje poslední fázi zrání a vývoje keratinocytů.¹¹ Stavba SC bývá označována jako struktura z cihel a malty, kde lipidy představují maltu a korneocyty cihly.¹² Tyto lipidy jsou do extracelulárního prostoru dodávány sekrecí lamelárních tělísek z keratinocytů ve formě lipidových prekurzorů. Další složky obsažené v lamelárních tělískách jsou fosfolipidy, cholesterol a enzymy. V extracelulárním prostoru jsou prekurzory lipidů z lamelárních tělísek metabolizovány enzymy na lipidy, které tvoří lamelární membrány. Tyto lipidové prekurzory pocházejí jak z epidermální syntézy lipidů, tak z extracelulárních zdrojů.¹⁴

V extracelulárních prostorech mezi korneocyty se nacházejí lipidové lamely¹⁵ (Obr. 2), které zajišťují vlastní bariérovou funkci SC.¹⁶ SC slouží jako ochranná kožní bariéra proti nepříznivým vlivům vnějšího prostředí a chrání tělo před dehydratací tím, že reguluje ztráty vody.¹¹ Slouží jako hlavní překážka pro vstup většiny látek.¹⁷ V této vrstvě vylučují „odumřelé“ keratinocyty defensiny, které jsou součástí první imunitní obrany lidského organismu.¹⁰



Obr. 2. Transmisní elektronové mikrofotografie zobrazující tři, šest nebo devět lipidových lamel v mezibuněčném prostoru rohové vrstvy.¹⁵

Lipidy tvořící extracelulární matrix rohové vrstvy, mají jedinečné složení a velmi se liší od lipidů, které tvoří většinu biologických membrán. V rohové vrstvě je přítomno velmi málo fosfolipidů, což se výrazně liší od toho, co lze pozorovat u většiny ostatních membrán.¹⁸ Oproti těmto typickým biologickým membránám s vysokým obsahem fosfolipidů je SC méně tekutá a propustná. Příčinou vyšší rigidity membrán SC je vysoký obsah lipidových složek s nasycenými velmi dlouhými řetězci jako jsou ceramidy.¹⁶

Pomocí metody tenkovrstvé chromatografie během analýzy lipidů ze SC bylo zjištěno neobvyklé zastoupení lipidů skládající se z přibližně ekvimolárního množství ceramidů (45-50 % hmotnosti), cholesterolu (25 %) a volných mastných kyselin (10-15 %). Mezi složky s minoritním zastoupením pod 5 % patří několik dalších lipidů, z nichž nejvýznamnějším je cholesterol sulfát,¹⁶ který hraje klíčovou roli v regulaci deskvamace.¹⁸

Tento ekvimolární poměr všech zmíněných složek se zdá být velmi důležitý pro epidermální homeostázu, a proto by změny v poměru zastoupení lipidů mohly být spojeny s narušením bariérové funkce kůže.¹²⁻¹³ Problémy se složením byly nalezeny u kožních onemocnění psoriázy, atopické dermatitidy, některých forem ichthyózy, těžké xerózy a dalších.¹⁹ Komplexní profilování a kvantifikace ceramidů SC má tedy velký význam pro hodnocení stavu kůže a její bariérové funkce.²⁰

Na bariérové funkci SC se také podílí přítomné mastné kyseliny a to svým množstvím a vzájemným poměrem, stejně tak jako jsou odpovědné za rozdílné hodnoty pH v různých vrstvách SC.¹⁹ Volné mastné kyseliny, které vznikají rozpadem fosfolipidů, přispívají k okyselení rohové vrstvy. Hodnota pH vnější rohové vrstvy a povrchu kůže se pohybuje v rozmezí 5 až 5,5. Toto kyselé prostředí je velmi důležité, protože reguluje aktivitu mnoha enzymů v rohové vrstvě. Zvýšení pH může nepříznivě ovlivnit aktivitu enzymů ve SC a vést ke snížení propustnosti bariéry, integrity a soudržnosti SC. Následkem toho může být mnoho kožních zánětlivých onemocnění.¹⁸ Volné mastné kyseliny v kožní bariéře jsou většinou nasycené a nerozvětvené s délkou řetězce v rozmezí 14-34 uhlíků^{13, 21} a tvoří asi 10-15 % hmotnosti lipidů SC.¹⁹ Z toho přibližně 50 % mastných kyselin SC tvoří mastné kyseliny, které mají 24 (kyselina lignocerová) a 26 (kyselina cerotová) uhlíků.²¹ Naopak kratší a nenasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny v lipidových membránách SC v menším množství.¹³ Zvýšené zastoupení vykazují kratší mastné kyseliny u atopické dermatitidy.²² V acylceramidech je přítomen linoleát a při nedostatku esenciálních mastných kyselin jej nahrazuje například oleát, což má za následek výrazné abnormality ve struktuře extracelulárních lipidových membrán (způsobené nepřítomností kovalentně vázaných ceramidů, které vytváří templát pro uspořádávání volných lipidů) a vede ke zvýšení propustnosti kožní bariéry. Tato pozorování naznačují, že, ačkoliv množství

esenciálních mastných kyselin není ve SC zvýšeno,¹⁹ jejich přirozený výskyt je nezbytný pro normální strukturu a funkci rohové vrstvy.^{18,23}

Pro správnou funkci kožní bariéry je také nezbytný cholesterol, který přispívá ke správné lamelární a laterální struktuře a fluiditě lipidů.^{13, 24} Hlavním steroidem, který se nachází ve stratum corneum je cholesterol, i když jsou pozorovány i významné hladiny esterů cholesterolu (10 %) a cholesterol sulfátu (3 %).¹⁹ Cholesterol sulfát hraje důležitou roli v přirozeném procesu obnovy kůže, zejména pak v procesu odlupování staré vrstvy kůže neboli deskvamace. Kromě toho má vliv i na pH.¹⁷ Ačkoliv je množství cholesterol sulfátu přítomného v epidermis poměrně nízké, je důležitý pro vzájemnou soudržnost buněk v rámci stratum corneum.¹⁹ Zvýšené množství cholesterol sulfátu důsledkem nedostatečné degradace je spojeno s recesivní ichthyózou vázanou na chromozom X.²⁵⁻²⁶

2.3 Ceramidy

Ceramidy, N-acylsfingosiny představují podtřídu sfingolipidů, která disponuje výraznou rozmanitostí v jejich struktuře.²⁰ Jsou součástí všech tkání lidského těla, ale jejich nejhojnější lokalizace je ve SC.²⁷

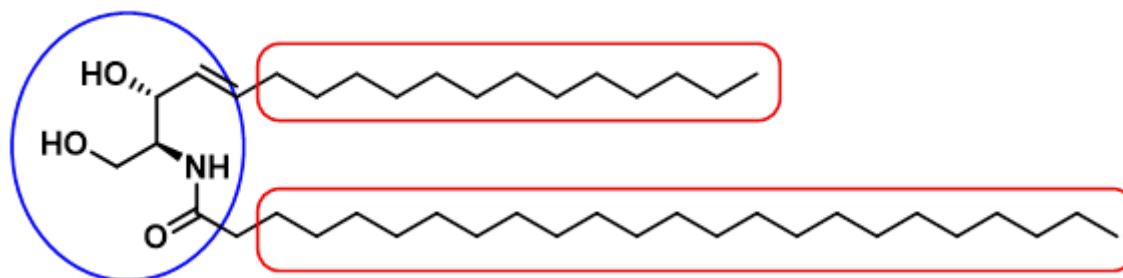
2.3.1 Funkce ceramidů

Ceramidy v extracelulárním prostoru SC formují lipidové lamely společně s volnými mastnými kyselinami a cholesterolem, čímž utvářejí kožní bariéru.²⁸⁻²⁹ Ceramidy hrají důležitou roli také v adhezi buněk a v přenosu signálů významných pro regulaci buněčné diferenciaci, zastavení růstu buněk, apoptózy, stárnutí a imunitní reakce. Ceramidy jsou extrémně hydrofobní, což vysvětluje jejich ústřední roli při prevenci vysychání kůže.³⁰ Kromě toho ceramidy působí jako druhý signální posel při apoptóze vyvolané stresem. Ceramidy mohou indukovat apoptózu nádorových buněk a snižovat rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapeutikům.³¹

2.3.2 Struktura ceramidů

Ceramidy sestávají z mastné kyseliny a sfingoidní báze (aminoalkohol), spojené amidovou

vazbou mezi karboxylovou skupinou mastné kyseliny a aminoskupinou báze. Polární hlavičky ceramidů (Obr. 4) jsou malé a obsahují funkční skupiny, které mohou vytvářet boční vodíkové můstky se sousedními molekulami ceramidů.³¹

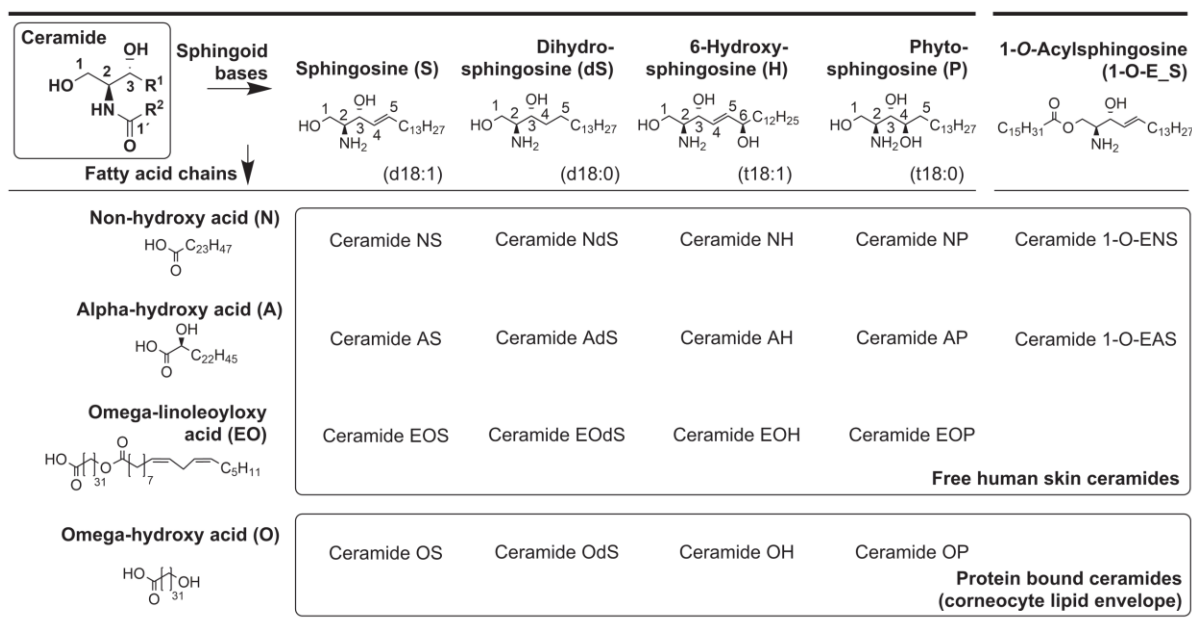


Obr. 4. Polární hlava a dva hydrofobní řetězce ceramidu NS.

Jednotlivé molekuly se liší navzájem počtem hydroxylových skupin a přítomností dvojných vazeb u sfingoidní báze, délkou řetězce a typem funkčních skupin u mastné kyseliny. Typické sfingoidní báze jsou představovány dihydrosfingosinem (také označovaný jako sfinganin), sfingosinem (sfingenin), fytosfingosinem a 6-hydroxysfingosinem²⁷ a později byl objeven ještě 4*E*,14*Z*-sfingadien.³² Sfingosin (S) a dihydrosfingosin (dS) jsou všudypřítomné v lidských tkáních. Dvě další sfingoidní báze, fytosfingosin (P) a jeho deriváty jsou široce rozšířeny v mozku, ledvinách, kůži, játrech a dalších tkáních, zatímco 6-hydroxysfingosin (H) byl nalezen pouze v kůži.³⁰ Variabilita v délce řetězce je v rozsahu počtu uhlíků od 14 do 26, ale nejčastěji se jedná o 18 uhlíkový řetězec. I když na povrchu kůže byly v ceramidech detekovány delší mastné kyseliny, nejčastěji je připojená mastná kyselina s nasyceným řetězcem o délce řetězce 24 nebo 26 uhlíků. Mastné kyseliny v ceramidech lze také rozdělit do pěti typů: nehydroxylované, α -hydroxylované, β -hydroxylované, ω -hydroxylované a ω -esterifikované mastné kyseliny.³² Zatímco poměrně běžné jsou α -hydroxylované a ω -hydroxylované, přítomnost ceramidů s β -hydroxylovanými mastnými kyselinami nebyla v lidské kůži prokázána.^{27, 32}

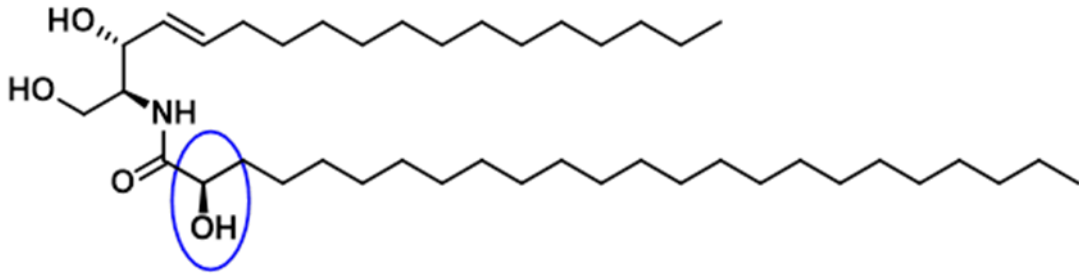
V lidské kůži bylo identifikováno 16 základních podtříd volných ceramidů: kombinace čtyř sfingoidních bází (S, dS, P a H) a čtyř typů acylových řetězců – nesubstituované (N), α -hydroxylované (A), ω -hydroxylované (O), případně ω -substituované (EO; rovněž nazývané jako acylceramidy) mastné kyseliny. Vzhledem k variabilitě délky řetězců byly identifikovány tisíce jednotlivých molekul ceramidů.³⁰

Pro popis ceramidů SC se používá nomenklaturní systém založený na molekulární struktuře ceramidů, který navrhli Motta et al.³³ a následně modifikovali Robson et al.³⁴⁻³⁵ První písmeno v závorce představuje acylový řetězec a poslední písmeno znamená sfingoidní řetězec. Těchto 16 podtříd (Obr. 5) je vyjádřeno jako CER NdS, CER NS, CER NP, CER NH, CER AdS, CER AS, CER AP, CER AH, CER EOdS, CER EOS, CER EOP, CER EOH, CER OdS, CER OS, CER OP A CER OH.²⁰ U jednotlivých sloučenin udává číslo v závorce počet atomů uhlíku a číslo za dvojtečkou pak počet násobných vazeb.³⁶



Obr. 5. Chemické struktury ceramidů lidského stratum corneum. Každá třída ceramidů je reprezentována kombinací zkratk odpovídajících její struktuře mastné kyseliny a sfingoidní báze.¹³

Například CER AS (d18:1/h24:0), což znamená, že sfingoidní báze je sfingosin s 18 uhlíky a 1 dvojnou vazbou a acylem je hydroxylovaná kyselina s 24 uhlíky a žádnou dvojnou vazbou (Obr. 6). Nomenklatura dle Motta et al. nebere v potaz délky jednotlivých řetězců, proto se dnes používá rozšířená nomenklatura, která zahrnuje hydroxylaci, délky řetězců a násobné vazby, běžně užívaná v rámci MS analýz.²⁰

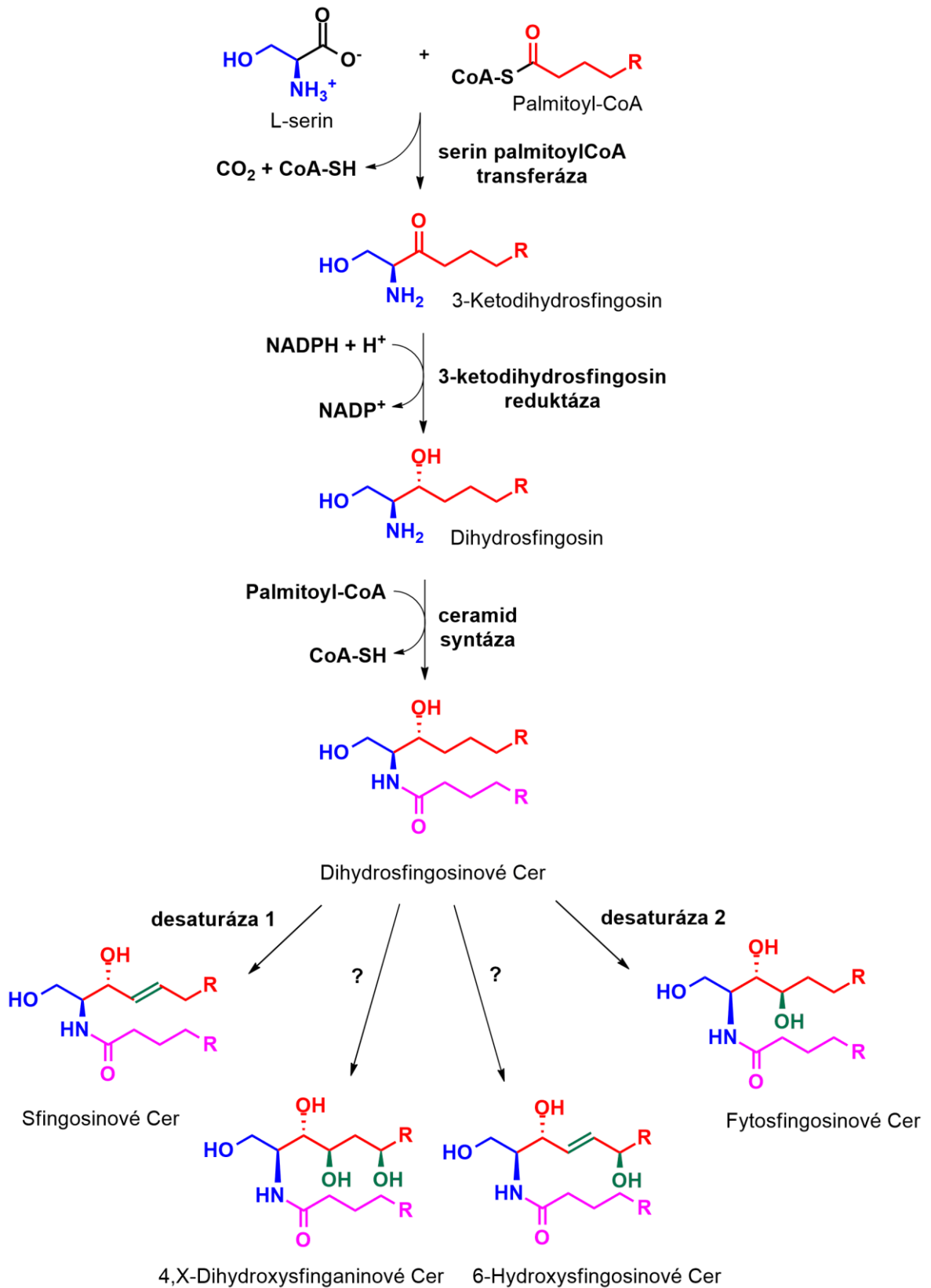


Obr. 6. Znárodnění struktury ceramidu AS.

Nejrozšířenější třída ceramidů u savců se skládá ze sfingosinu a nehydroxylované mastné kyseliny a označuje se jako NS. NS a NdS se vyskytují téměř ve všech tkáních savců, zatímco ostatní třídy ceramidů se vyskytují pouze v určitých typech tkání.

2.3.3 Biosyntéza ceramidů

Biosyntéza ceramidů de novo (Obr. 7) probíhá na membráně endoplazmatického retikula. Prvním krokem syntézy ceramidů je kondenzace L-serinu s palmitoylkoenzymem A. Tuto reakci, jako regulační prvek celého metabolismu ceramidů a sfingolipidů, katalyzuje serin palmitoyltransferáza (SPT) za přítomnosti pyridoxal-5'-fosfátu. Kondenzací L-serinu s palmitoylkoenzymem A vzniká 3-ketodihydrosfingosin, 18 uhlíkatá sfingoidní báze, která se v buňkách nachází v malém množství, protože je ihned dále redukována pomocí NADPH-dependentní 3-ketodihydrosfingosin reduktázy (KDSR) na dihydrosfingosin. K převedení dihydrosfingosinu na ostatní sfingoidní báze nedochází okamžitě, dochází k němu až po acylaci primární aminoskupiny. Následná kondenzace acyl-CoA s dihydrosfingosinem je katalyzována rodinou ceramid syntáz (CerS) a vede k tvorbě dihydroceramidů. Modifikace v polární hlavě ceramidů za vzniku sfingosinu a fytosfingosinu závisí na dihydroceramidových desaturázách 1 (DEGS1) nebo 2 (DEGS2). Reakce katalyzována dihydroceramid desaturázou vyžaduje NAD(P)H a kyslík jako kofaktor. DEGS1 inkorporuje dvojnou vazbu mezi uhlíky č. 4 a 5 a tím zajišťuje přítomnost 4,5-trans-dvojnou vazby v řetězci ceramidů, jinými slovy sfingosinů (S). Pomocí DEGS2 je zavedena hydroxyskupina do pozice 4 uhlíkatého řetězce a dochází ke vzniku fytoceramidů zaožených na fytosfingosinu (P). Enzym zodpovědný za konverzi dihydroceramidů na 6-hydroxyceramidy nebo přeměna samotných bazí na 6-hydroxysfingosiny nebyla dosud objasněna.^{31 14,37}



Obr. 7. Schéma biosyntézy ceramidů de novo.

Po samotné syntéze v keratinocytech se ceramidy začínají hromadit v kožních buňkách v důsledku jejich nerozpustnosti, což má za následek jejich konverzi na glukosylceramidy (GlcCer) a sfingomyeliny (SM) v Golgiho aparátu, jako zásobní formy ceramidů. Z pohledu podtříd ceramidů jsou GlcCer prekurzory pro všechny typy Cer, včetně acylCer, zatímco ze SM vznikají CerNS a CerAS. Ceramidy jsou ze zásobních prekurzorů zpětně syntetizovány hydrolytickým štěpením, které je v případě GlcCer prekurzorů katalyzováno β -glukocerebrosidázou a v případě SM prekurzorů enzymem sfingomyelinázou. Oba tyto enzymy vyžadují pro svoji aktivitu kyselé prostředí.¹⁴

Časná aktivace sfingomyelinázy, tak i pozdější degradace glukosylceramidů jsou nezbytné pro obnovu vodní bariéry kůže. Kromě enzymatické tvorby ceramidů se na jejich tvorbě podílejí také saponiny, proteiny aktivované sfingolipidy.³¹

2.3.4 Kvantifikace ceramidů ve stratum corneum

Každá třída ceramidů zahrnuje různé druhy molekul, které se liší délkou řetězce mastné kyseliny i sfingoidní báze a/nebo stupněm nasycení. V lidském SC proto existuje více než několik tisíc druhů ceramidů.³² První informace o obsahu ceramidů byly získány pomocí HPTLC (vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie). Na základě toho byla vytvořena první nomenklatura (ceramid 1-9), kdy jednotlivé třídy ceramidů byly seřazeny podle eluce v normální fázi na základě jejich polarit a jejich mobility při tenkovrstvé chromatografii, což je z dnešního pohledu nepraktické.³⁴

Metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a HPTLC jsou i v dnešní době nepostradatelnými nástroji moderní analytické chemie. HPTLC je široce používaná, rychlá a relativně levná metoda separace složitých směsí.^{33, 35, 38-39} Je zvláště užitečná pro menší apolární sloučeniny a nabízí některé výhody oproti HPLC (z angl. High performance liquid chromatography).⁴⁰

Složení tříd/druhů ceramidů v lidském SC bylo již dříve analyzováno pomocí LC/MS (kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií). Pomocí této metody je však obtížné odděleně detekovat a přesně kvantifikovat tak obrovské množství druhů ceramidů. Pro specifickou detekci a kvantifikaci zájmových lipidových molekul se standartní technikou stala v poslední době metoda LC/MS/MS (kapalinová chromatografie spojená s tandemovou

hmotnostní spektrometrií) v režimu současného monitorování vícenásobných reakcí (MRM z angl. multiple reaction monitoring). V rámci tohoto přístupu pozorujeme tranzici vybraného specifického prekurzorového iontu na jeho specifický produktový ion generovaný kolizní indukovanou disociací.³²

Před vlastní cílenou hmotnostně-spektrometrickou analýzou kožních ceramidů je nutné provést jejich separaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Separace může probíhat jak na normální,⁴¹⁻⁴² tak i na reverzní fázi.⁴³⁻⁴⁴ Reverzní fáze kapalinové chromatografie rozlišuje ceramidy podle jejich hydrofobních vlastností, v závislosti na délce řetězce mastné kyseliny, délce acylového řetězce sfingoidní báze a počtu násobných vazeb. Normální fáze kapalinové chromatografie umožňuje separaci ceramidů na základě jejich hydrofilních vlastností (struktura polární hlavy). Použití reverzní fáze místo normální fáze však může podstatně zvýšit účinnost separace pro ceramidy, obdobně, jako se podařilo v případě fosfolipidů v rámci jejich „shotgun“ analýzy.⁴⁵ Ceramidy totiž disponují výrazným hydrofobním charakterem díky acylovým řetězcům vázaným na polární část sfingoidní báze.²⁷

V roce 2020 Kawana M. et. al. úspěšně kvantifikovali pomocí LC/MS/MS 21 tříd ceramidů z lidského SC (NS, NdS, NH, NP, NSD, AS, AdS, AH, AP, ASD, BS, OS, OdS, OH, OP, OSD, EOS, EOdS, EOH, EOP a EOSD). Zjistili, že v lidském SC byly hojně zastoupeny NP, NH a AH (24,2 %, 23,7 % resp. 18,0 % z celkových ceramidů), následovaly ceramidy AP, NdS, NS, AS, EOH, EOS, EOP a AdS (v sestupném pořadí 9 % až 1 %). Podíly ostatních tříd ceramidů byly nižší než 1 %. Dále zjistili, že z podtříd ceramidů, které obsahují společnou sfingoidní bázi, byly v lidském SC hojně zastoupeny ceramidy typu 6-hydroxysfingosinu a fytosfingosinu (45,4 %, resp. 34,7 % celkových ceramidů). Z kategorií tříd ceramidů, které mají stejný typ mastné kyseliny, byl v lidském SC nejvyšší podíl nehydroxylované ceramidové třídy (59,4 %), následovaný α -hydroxylovanými ceramidy (32,5 %), ω -esterifikovanými ceramidy (6,3 %) a ω -hydroxylovanými ceramidy (1,6 %). V lidském SC bylo přítomno stopové množství β -hydroxylovaných ceramidů (0,17 %).³² Tyto výsledky jsou nejnovějšími závěry kvantifikace ceramidů ve stratum corneum a odpovídají výsledkům z předchozích studií.^{22, 27, 46-47}

2.4 Senescence = proces stárnutí

Stárnutí je charakterizováno postupným funkčním úpadkem.⁴⁸ Kůže během procesu stárnutí jeví četné klinické projevy a problémy. Komorbidity, jejichž počet se stárnutím těla přibývá, jsou důsledkem dalšího zhoršení fungování tohoto orgánu. V průběhu času funkční změny kůže způsobují mnoho problémů. V porovnání s normální mladou pletí jsou nejlépe pochopitelné změny spojené s procesem stárnutí. Stárnutí, které se projevuje mnoha způsoby, je komplexní proces vedoucí k biologickému opotřebením na buněčné úrovni. Je potvrzeno, že tyto procesy jsou ovlivněny kumulativním poškozením DNA. Nahromaděné buněčné změny přispívají k anatomickým, funkčním a fyziologickým změnám při stárnutí kůže. Stárnutí kůže zahrnuje kromě přirozeného stárnutí pokožky i změny kůže způsobené například opakovaným vystavením ultrafialovému záření (fotostárnutím)⁵, přičemž jsou výraznější a objevují se dříve než u chronologického stárnutí pleti.⁴⁹

Působením vnějších a vnitřních faktorů stárnutí v průběhu lidského života dochází ke zhoršení kožní bariéry a poškození kožní strukturální integrity kůže.⁶

Stárnutím kůže dochází k anatomickým změnám v epidermis, které zahrnují snížení počtu buněk,⁶ zvětšení povrchu korneocytů, zmenšení výšky a snížení adherence keratinocytů. Celková tloušťka kůže se zmenšuje, dochází ke ztenčení pokožky, s poklesem tloušťky stratum spinosum a významným poklesem v maximální tloušťce kůže. Mitotická aktivita v bazální vrstvě je snížena, doba tranzitu z bazální vrstvy do stratum corneum se zvyšuje a dochází ke snížení rychlosti epidermálního obratu. Langerhansovy buňky, melanocyty a Merkelovy buňky v epidermis ubývají. Výpadek funkce a počtu melanocytů vede k šedivění vlasů.⁵ Pokles počtu Langerhansových buněk vede ke zhoršení kožní imunity. Počet enzymaticky aktivních melanocytů klesá o 8-20 % za desetiletí.⁶ Celková lipidová složka je snížena, ale má normální distribuci cholesterolu, ceramidů a volných mastných kyselin. Obsah aminokyselin v korneocytech se snižuje s poklesem přirozené hydratace, pevnosti a pružnosti korneocytů.⁵

V důsledku procesu stárnutí dochází i ke ztenčení dermis. Počet fibroblastů a jejich funkční kapacita se snižuje. Snižuje se produkce nového kolagenu a klesá množství matrix v dermis. Elastická vlákna procházejí nevratnými strukturálními a kompozičními změnami. Kolagenová vlákna jsou dezorganizována a náhodně orientována. Produkce mazu klesá,

i přestože počet mazových žláz zůstává stejný. Potní žlázy se snižují v počtu a vykazují buněčnou degradaci.⁵

Celkový objem podkožního tuku se s věkem obvykle zmenšuje, i když podíl podkožního tuku se přibližně do 70 let věku zvyšuje.⁶

Stárnutí buněk je indukováno řadou různých příčin. Jedním z nejdůležitějších je zkrácení telomer. Stárnutí na buněčné úrovni probíhá v diploidních buňkách, kde dochází k zastavení buněčného cyklu a omezení proliferační schopnosti. Senescentní buňky se mohou hromadit s věkem a v místech patologických stavů souvisejících s věkem. Diploidní buňky mohou také procházet zrychlenou senescencí, známou jako předčasné stárnutí, která je nezávislá na zkrácení telomer. Tento typ senescence nastává okamžitě po určitých podnětech, jako je genotoxický stres nebo metabolický šok. Onkogenní stres spouštěný nadměrnou expresí určitých onkogenů nebo ztrátou tumor supresorových genů v primárních a nádorových buňkách také indukuje senescenci. Bylo prokázáno, že stárnutí nastává in vivo u různých orgánů, kde zastavuje vývoj a progresi nádoru.

2.4.1 Senescentní buňky u rakoviny

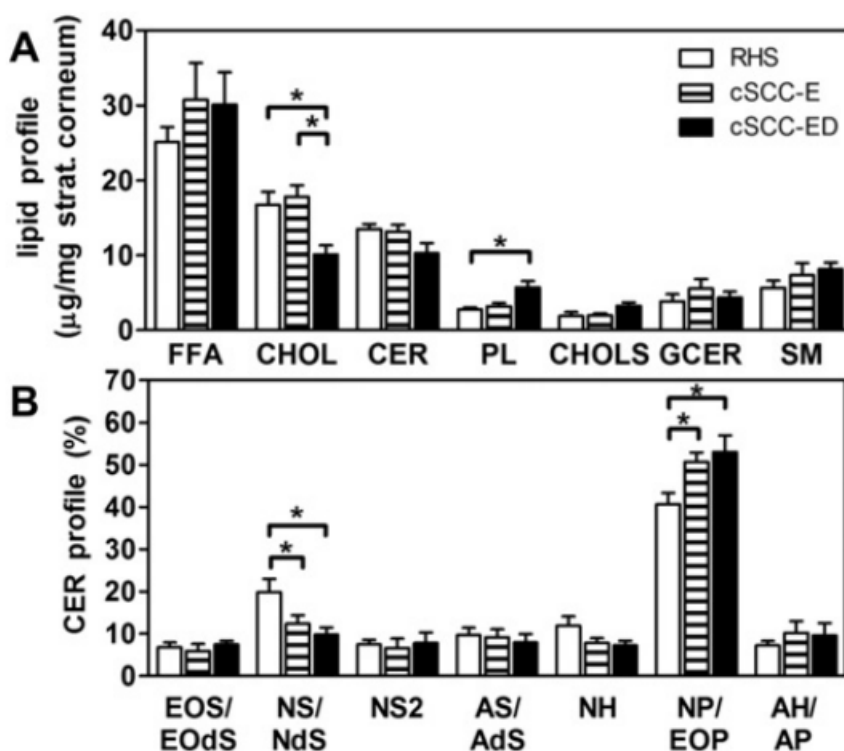
Buněčné stárnutí hraje důležitou roli v prevenci tumorigeneze, a to jak v její iniciaci, vytvoření, tak i úniku tumoru. Mechanismy, které vyvolávají stárnutí rakovinných buněk jsou onkogenem indukovaná senescence, terapií vyvolané stárnutí, senescence vyvolaná ztrátou (nebo inaktivací) tumor-supresorového genu nebo senescence vyvolaná sousedními stárnoucími buňkami. Při onkogenem indukované senescenci dochází k aktivaci onkogenů v savčích buňkách a má za následek proliferativní stres a indukci stárnutí, která omezuje růst nádoru. Senescence je tedy fyziologický mechanismus potlačující vznik nádorů (tumor-supresivní mechanismus), který brání progresi od benigních tumorových lézí k maligním tumorům/nádorům. Dalším mechanismem, kterým je navozena senescence, je terapií vyvolané stárnutí, které může zprostředkovat několik léků používaných v klinické praxi pro léčbu lidských nádorů, včetně docetaxelu, bleomycinu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu, etoposidu a cisplatinu. Ionizující záření může také vyvolat stárnutí v různých rakovinných buněčných liniích. Mechanismy, které nutí nádorové buňky do stárnutí, jsou obecně spojeny se zvýšeným poškozením DNA.⁵⁰

Chemoterapeutika mají významné vedlejší účinky. Cytotoxické látky mohou způsobit nežádoucí účinky na vlasy a nehty, na kožní bariéru a na sliznici.⁵¹

U pacientů s nádorovým onemocněním léčených protinádorovými přípravky se často vyskytují různé kožní problémy, jako je pruritus, suchá kůže, papulopustuly na obličeji, paronychie atd. Jsou vystaveni vysokému riziku kožních problémů, protože protinádorové látky působí nejen na nádorové buňky, ale také na rychle se množící kožní buňky.⁵²

2.4.2 Bariérová funkce modelů nemelanomové rakoviny kůže

Nejčastěji se vyskytující nádorovým onemocněním kůže je nemelanomový karcinom. Skupina vědců Christian Zoschke et al. porovnávala organizaci lipidů SC v organotypovém modelu nemelanomové rakoviny kůže a v normální rekonstruované lidské kůži.⁵³



Obr. 8. Analýza lipidů SC v rekonstruované lidské kůži a modelech karcinomu.⁵³

Analýzu SC provedli pomocí infračervené spektroskopie a HPTLC. První poznatek ukazuje snížený poměr lipidů k bílkovinám o 20 % v modelech SC s melanomem oproti poměru v normálním SC. Za účelem zjištění změn v lipidovém profilu, analyzovali složení

SC pomocí HPTLC. Zatímco hladina cholesterolu v modelu kožního karcinomu epidermis zůstala téměř nezměněna, množství cholesterolu v modelu kožního karcinomu epidermis-dermis se snížilo o 40 % ve srovnání s normální rekonstruovanou lidskou kůží. Model karcinomu epidermis-dermis obsahoval o 20 % nižší celkové množství ceramidů ve srovnání s normální a profil ceramidů odhalil zvýšené množství ceramidů na bázi fytosfingosinu na úkor ceramidů na bázi sfingosinu a dihydrosfingosinu (Obr. 8). Zejména množství velmi dlouhých ceramidů NS/NdS o přibližné délce 20 až 26 uhlíků bylo sníženo o 60 % v případě modelu karcinomu, zatímco množství dlouhých ceramidů NS/NdS o délce 14 až 19 uhlíků zůstalo nezměněno. Studie následujícími poznatky podpořila hypotézu zhoršené funkce kožní bariéry SC u modelů kůže s karcinomem.⁵³

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

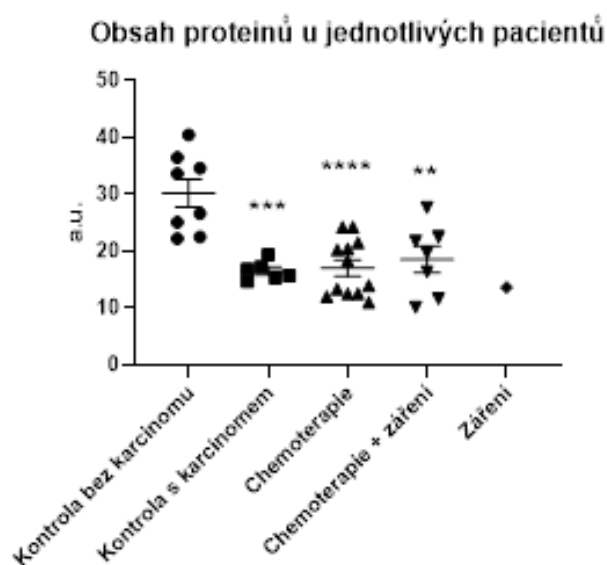
3.1 Rozvržení experimentu

Předmětem práce byla kvantifikace kožních ceramidů u pacientů po onkologické léčbě, tedy porovnání a zjištění rozdílného zastoupení podtříd ceramidů ve SC u zdravých dobrovolníků a pacientů po prodělaném nádorovém onemocnění, mezi které patřily například nádory centrální nervové soustavy (neuroblastom, Hodkingův lymfom, astrocytom), nefroblastomy, osteosarkomy a jiné. Pacienti byly rozděleni do skupin podle typu léčby nádorového onemocnění na pacienty léčené čistě chemoterapií (12 pacientů ve věku $24,7 \pm 1,0$), pacienty léčené kombinací chemoterapie a záření (7 pacientů ve věku $24,3 \pm 3,1$) a pacienty léčené pouze ozářením (1 pacient ve věku 30let, bohužel v této sérii vzorků více pacientů s touto metodou léčby nebylo, proto, pokud není řečeno jinak, nebyla tato skupina zahrnuta do statistické analýzy). Jako kontrolní vzorky posloužily vzorky pacientů s karcinomem (6 pacientů ve věku $26,0 \pm 2,9$), u nichž byl karcinom chirurgicky odstraněn a nebylo provedeno ozáření ani chemoterapie (tyto vzorky budou dále uváděny jako „kontrola s karcinomem“) a vzorky od dobrovolníků bez karcinomu (8 kontrol ve věku $29,5 \pm 4,7$). Vzorky byly odebrány ve Fakultní nemocnici v Motole. Mimo jiné jsme se dále zabývali stanovením obsahu proteinů ve SC, transepidermální ztrátou vody (což je jedna z nejdůležitějších dermatologických metod zjištění funkčnosti kožní bariéry), stanovením celkového obsahu ceramidů ve SC s využitím LC-MS/MS, přičemž jsme se zaměřili zejména na profily ceramidů ve SC, jejich průměrnou délku acylového řetězce a poměr mezi velmi dlouhými a ultradlouhými ceramidy.

3.2 Stanovení obsahu proteinů

Nejprve bylo potřeba stanovit obsah proteinů z D-squame pásek jednotlivých pacientů, neboť při získávání vzorků SC nemuselo být odebráno vždy stejné množství vzorku SC, a to i přesto, že náplasti D-squame jsou pro tuto aplikaci uzpůsobeny. Obsah proteinů sám o sobě může indikovat určité vlastnosti kůže, jako je její soudržnost, ale v tomto případě bylo toto stanovení provedeno zejména proto, abychom jednotlivé náplasti mohli mezi sebou přímo porovnávat. Pomocí přístroje SquameScan, který měří optickou absorpci vzorku s náplastí při 850 nm vlnové délky (infrachervená oblast), bylo zjištěno, že obsah proteinů ve vzorcích pacientů po prodělaném karcinomu a kontrol s karcinomem je výrazně nižší

než u zdravých/negativních kontrol (Obr. 9), ale neliší se vzájemně mezi pacienty s různými druhy léčby. Hodnoty obsahu proteinů u kontrol bez karcinomu ($30,2 \pm 2,5$) byly téměř dvojnásobné oproti kontrolám s karcinomem ($16,6 \pm 0,7$), pacientům léčeným chemoterapií ($17,1 \pm 1,4$), chemoterapií a zářením ($18,6 \pm 2,4$) či samotným zářením ($13,67$). Výsledky mohou odpovídat skutečně sníženému obsahu proteinů ve SC nebo zvýšené kohezi (soudržnosti) korneocytů, která by mohla mít za následek nižší výtěžek materiálu odebraného jedním stripem. V budoucnu by mohla být velice zajímavá detailní inspekce vzorků, která by odhalila konkrétní proteiny jejichž množství se ve vzorcích výrazně mění, jako například proteiny filagrin, involucrin, loricrin či samotné keratiny.



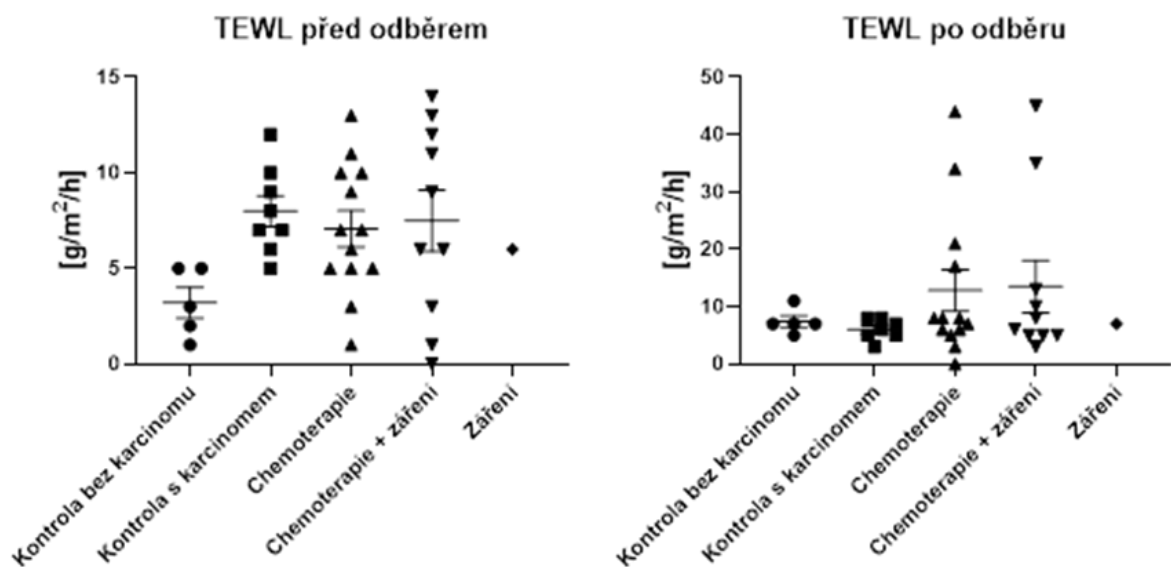
Obr. 9. Obsah proteinů u jednotlivých pacientů zjištěný ze stripovacích pásek pomocí SquameScan přístroje. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrole bez karcinomu $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

3.3 Transepidermální ztráta vody

Jedná se o klíčový dermatologický ukazatel funkčnosti kožní bariéry, který nám mimo jiné poskytuje informaci o schopnosti kůže se regenerovat po jejím poškození. TEWL (transepidermální ztráta vody) byl měřen u pacientů v rámci pravidelné kontroly ve Fakultní nemocnici v Motole. Měření bylo provedeno před odběrem kůže stripováním a poté znovu

přibližně po 3 hodinách odběru vzorků SC, kdy už dochází ke kompenzacím poškození kůže vyvolané samotným odběrem. Bylo zjištěno, že TEWL před odběrem vzorků kůže je obecně u pacientů vyšší než u kontrol bez karcinomu (Obr. 10), ale vzhledem k variabilitě naměřených hodnot není statisticky významný, avšak trend je viditelný na první pohled. Naopak TEWL měřený po určitém časovém intervalu se vesměs vrací k původním hodnotám, kromě několika pacientů po chemoterapii, kde jsou hodnoty vysoké, což je dané pomalejší regenerací kůže po poškození. Příčinou zřejmě variability výsledků může být samotné vyšetření, které je spojeno se stresem a nadměrným pocením, a může tak do určité míry výsledky zkreslovat. Výsledky kontrol získaných na odlišném přístroji byly ze vzájemného porovnání vyloučeny.

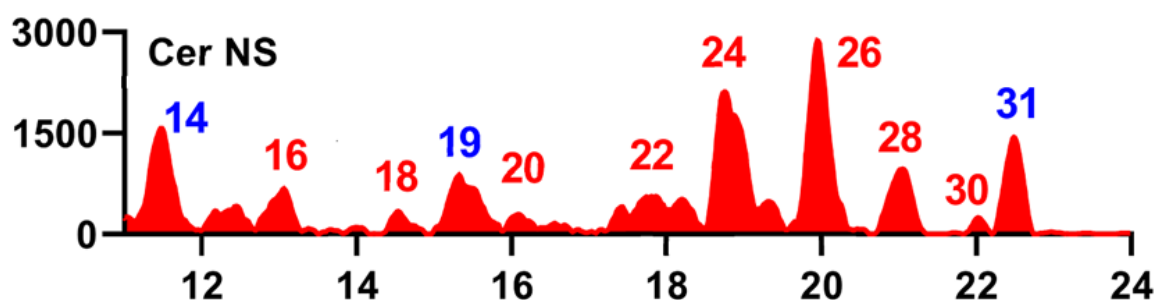
Poškozená kožní bariéra a s tím související zvýšené hodnoty TEWL doprovází většinu kožních onemocnění jako je například atopická dermatitida. Kůže při atopické dermatitidě bývá snadno podrážděná a vypadá suchá. Tyto klinické zvláštnosti odpovídají snížené bariérové funkci a zvýšeným hodnotám TEWL obdobně jako byly pozorovány v rámci našeho projektu u pacientů po prodělaném nádorovém onemocnění.⁵⁴



Obr. 10. Transdermální ztráta vody měřena před a 3 hodiny po odběru vzorků SC. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$.

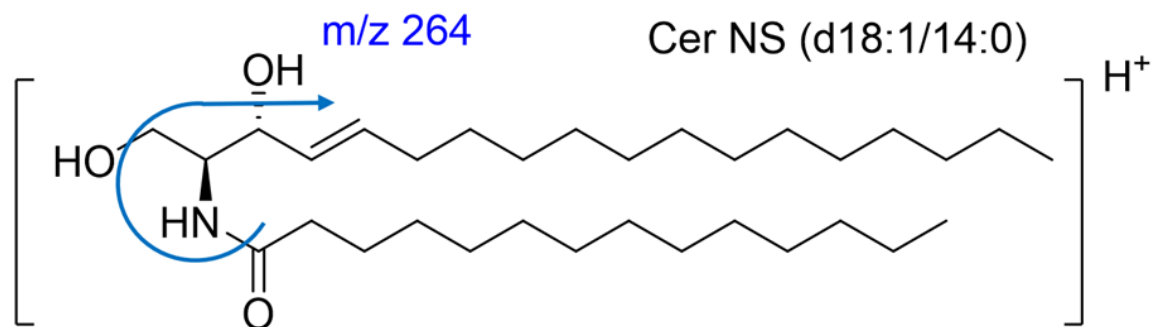
3.4 Celkový obsah ceramidů

Kombinace HPLC na reverzní fázi s detekcí hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu umožňuje separovat od sebe jednotlivé molekuly ceramidů jedné podtřídy na základě rozdílů v jejich délkách řetězce, kdy platí, že čím delší řetězec, tím více narůstá retenční čas (Obr. 11).



Obr. 11. Chromatogram ceramidů NS s konstantní délkou sfingoidní báze 18 uhlíků a s proměnlivou délkou acylového řetězce. Modře jsou uvedeny vnitřní standardy a červeně molekuly detekované v lidském stratum corneum.

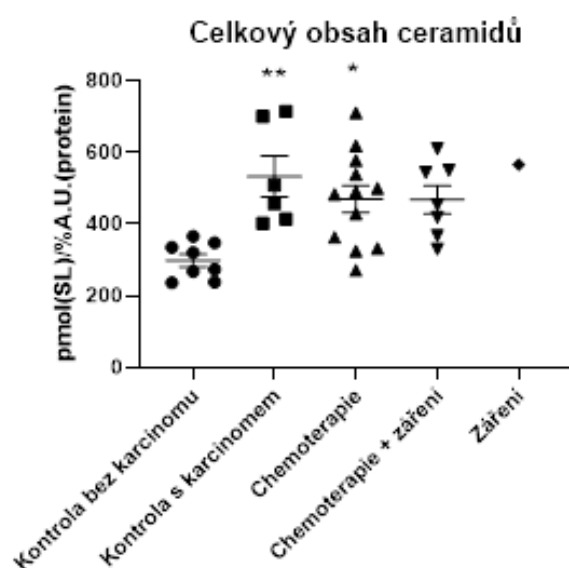
Pro potřeby tohoto projektu byly analyzovány pouze ceramidy, které obsahovaly sfingoidní bázi o délce 18C, i přesto, že v lidském SC byly nalezeny i sfingoidní báze s jinými délkami řetězců, avšak objem měřených dat by poté neúměrně narostl. Uspořádání hmotnostního spektrometru v podobě trojitého kvadrupólu poté umožňuje cíleně detekovat a kvantifikovat jednotlivé molekuly na základě jejich specifické tranzice mezi prekurzorovým a produktovým iontem (v našem případě v pozitivním módu ionizace), přičemž při použití techniky MRM (multi reaction monitoring) můžeme sledovat velké množství těchto tranzicí najednou (v našem případě to bylo 120 a 60 individuálních přechodů najednou). Protonizovaný prekurzorový iont ceramidů $[M + H]^+$ poskytuje několik charakteristických tranzic, ale pro tento projekt jsme zvolili tranzici na produktový iont po ztrátě acylového řetězce a dvou molekul vody $[M + H - (acyl + 2H_2O)]^+$, protože tato tranzice má vysokou intenzitu (Obr. 12). Některé podtřídy ceramidů, obzvláště odvozené od 6-hydroxysfingosinu, poskytují ztrátu molekuly vody ještě ve zdroji ionizace (in source decay), s čímž je potřeba počítat, avšak správné využití vnitřních standardů umožňuje tuto komplikaci zanedbat, jelikož se dá předpokládat, že sledovaná molekula se bude chovat stejně jako molekula vnitřního standardu.



Obr. 12. Tranzice prekurzorového iontu ceramidu NS, kde je pomocí šipky znázorněná fragmentace.

Graf (Obr. 13) obsahuje sečtené všechny podtřídy ceramidů a všechny stanovované délky acylových řetězců. Výsledky měření jsou na ose y znázorněny jako množství pikomolů na vzorek dělené bezrozměrnou jednotkou obsahu proteinů. Tato jednotka byla použita z důvodu normalizace, aby se zajistilo, že lipidy budou stanovovány vždy ze stejného množství, tedy aby výsledky nebyly zkresleny odlišným výtěžkem odběru mezi vzorky. Z měření obsahu ceramidů vyplývá, že vzorky pacientů, u nichž bylo zjištěno snížené množství proteinů v porovnání s kontrolami, obsahují naopak vyšší množství ceramidů. Ze vzájemného poměru proteinů a lipidů je rozdíl v množství ceramidů dokonce dvojnásobný ve prospěch těchto vzorků pacientů. U kontrol bez karcinomu byl celkový obsah ceramidů zjištěn jako $298,7 \pm 17,8$ pmol(SL)/a.u.(protein), u kontrol s karcinomem $533 \pm 57,3$, po chemoterapii $470,3 \pm 37,9$, u pacientů ze skupiny léčené chemoterapií + zářením $468,1 \pm 39,1$ a u pacientů léčených zářením $566,7$.

Je možné provést i kvantifikaci celkového obsahu ceramidů bez započítání obsahu proteinů. V takovém případě získáme množství ceramidů na jednu náplast. V případě tohoto získaného souboru dat (výsledky zde neukázány) je obsah ceramidů pacientů po léčbě karcinomem podobný kontrolním vzorkům bez karcinomu a v závislosti na konkrétní podtřídě ceramidů je buď mírně zvýšený nebo mírně snížený. Avšak takovýto způsob kvantifikace v sobě nese výrazné riziko variability odběru vzorku a výsledky mohou být výrazně zkresleny, proto v dalších částech této práce budou výsledky vždy prezentovány po normalizaci na obsah proteinů.



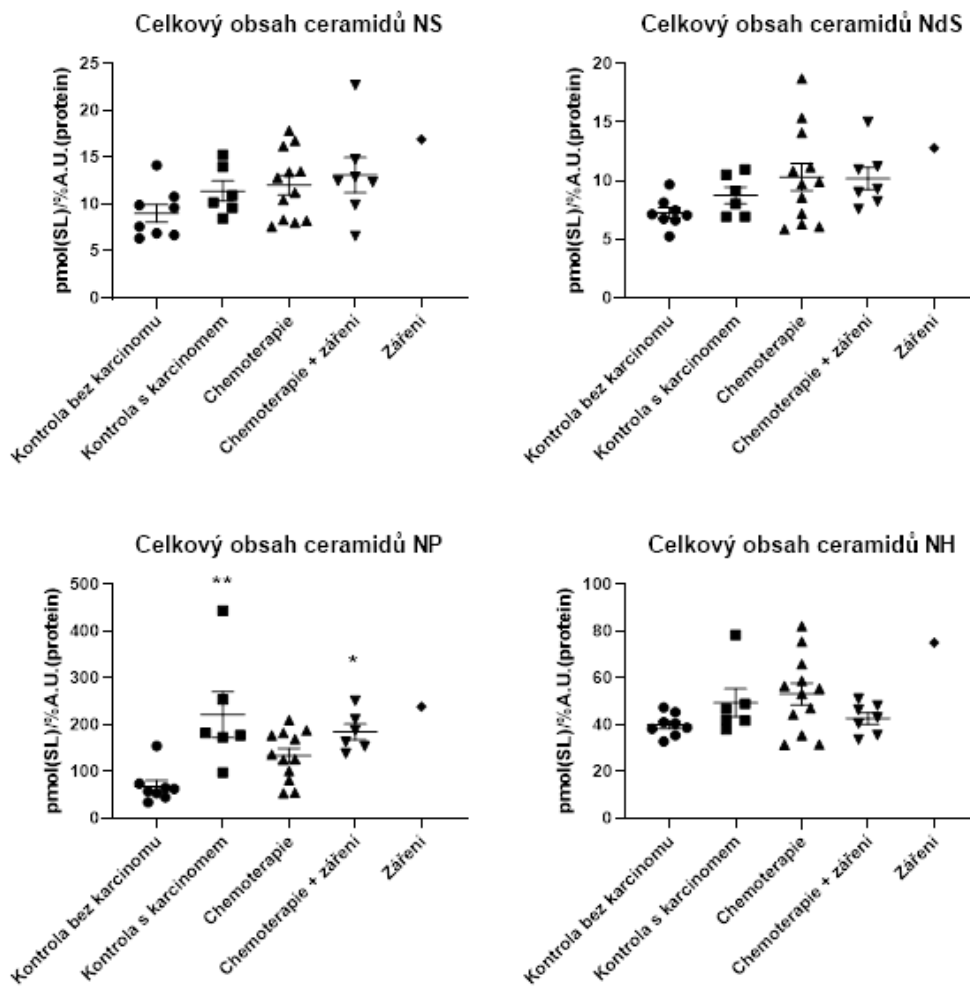
Obr. 13. Celkový obsah ceramidů ve vzorcích pacientů je vyšší než u zdravých kontrol, což koreluje se sníženým obsahem proteinů. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrole bez karcinomu $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

U stárnoucí kůže byla dříve pozorována změna celkového složení lipidů. Ve vzorcích stárnoucí kůže došlo ke dvojnásobnému zvýšení podílu volných mastných kyselin a kompenzačnímu snížení ceramidů, avšak v našem případě byl u pacientů po prodělaném karcinomu pozorován opačný trend, tzn. zvýšení hladin ceramidů.⁵⁵

3.4.1 Kvantifikace nesubstituovaných ceramidů (N)

U každé podtřídy nesubstituovaných ceramidů N se jedná o součet všech stanovovaných délek řetězců, tzn. C18 sfingoidní báze a délky acylového řetězce v rozmezí 16-32 uhlíků. Téměř všechny hodnoty znázorněné v grafech (Obr. 14) vykazují vzrůstající trend. U ceramidů NS, NdS a NH nejsou změny mezi jednotlivými skupinami výrazně viditelné. Statisticky významný je pouze nárůst ceramidů NP, tedy ceramidů odvozených od fytosfingosinu, a to u kontrol s karcinomem a u pacientů léčených kombinací chemoterapie + záření. V porovnání s kontrolou bez karcinomu ($68,5 \pm 13,1$ pmol(SL)/a.u.(protein) zde byly naměřeny hodnoty u skupiny kontroly s karcinomem více než trojnásobné a u skupiny

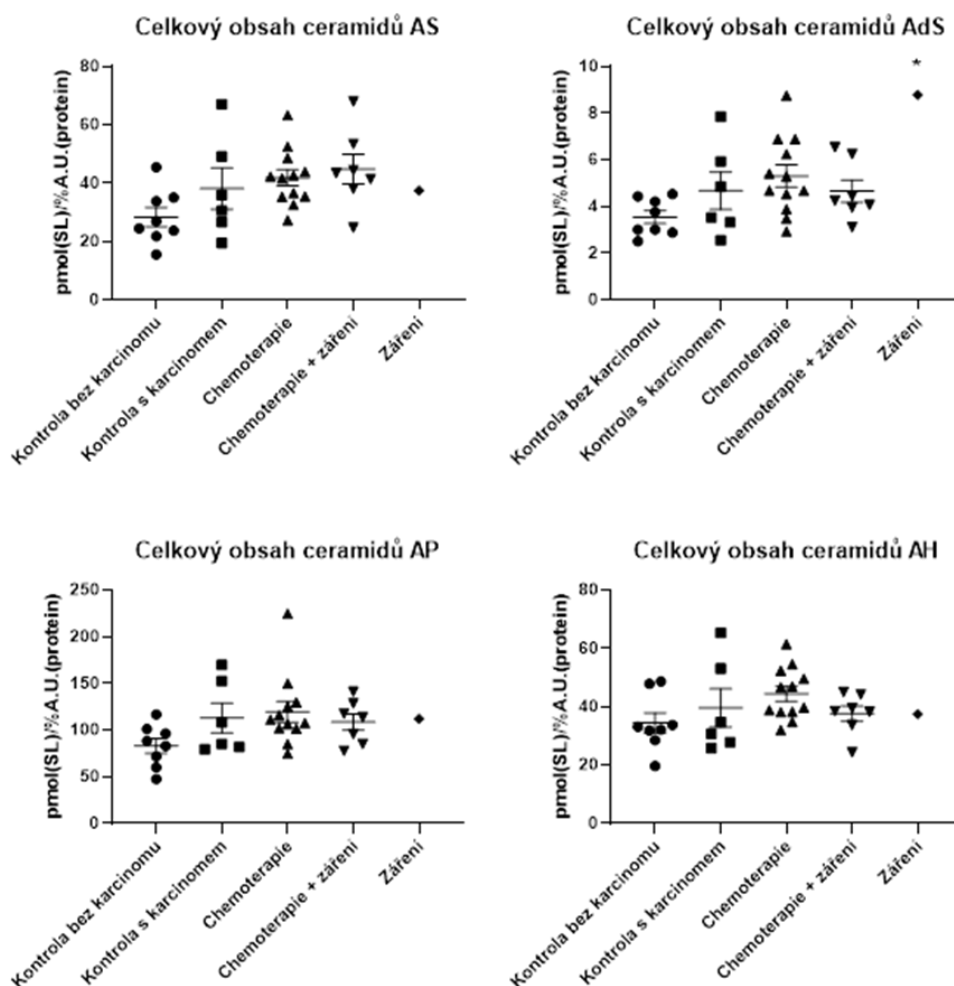
chemoterapie + záření více než dvojnásobně. Jedná se o spekulaci, ale nárůst ceramidů NP, které oproti ceramidům NS a NdS mají o jednu hydroxylovou skupinu navíc, u pacientů může být spojen s tím, že se u senescence vedle dalších efektů objevuje zvýšená hydroxylace některých biomolekul.⁵⁶ Během biosyntézy ceramidů dochází k modulaci struktury polární hlavy v dihydroceramidu, kdy se v tomto případě zdá, že u pacientů, kteří prodělali karcinom, je upřednostněna 4-hydroxylace u fytoceramidů NP před desaturací (vznikem dvojné vazby) u ceramidů NS.



Obr. 14. Zvýšené množství nesubstituovaných ceramidů u pacientů s různými druhy léčby. Statisticky signifikantní nárůst ceramidů NP pouze u kontrol s karcinomem a pacientů po léčbě chemoterapie + záření. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM, n = 6-12. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrole bez karcinomu $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

V práci Školové et al. bylo zjištěno, že fytoceramidy s velmi dlouhými acylovými řetězci (C24) zvyšovaly permeabilitu modelových lipidových membrán ve srovnání s dihydroceramidy nebo s ceramidy založenými na sfingosinu se stejnou délkou řetězce. Obecně tedy nenasytění nebo C4-hydroxylace dihydroceramidů vyvolaly zvýšení propustnosti těchto membrán pro modelová léčiva, což znamená zhoršení bariérové funkce kůže.⁵⁷ V našich výsledcích vidíme obdobný trend, kdy vzorky pacientů po prodělaném karcinomu, které obsahovaly mnohem vyšší zastoupení fytoceramidu NP, zároveň vykazovaly i vyšší hodnoty TEWL, tudíž rovněž zhoršenou funkci kožní bariéry.

3.4.2 Kvantifikace α -hydroxylovaných ceramidů (A)

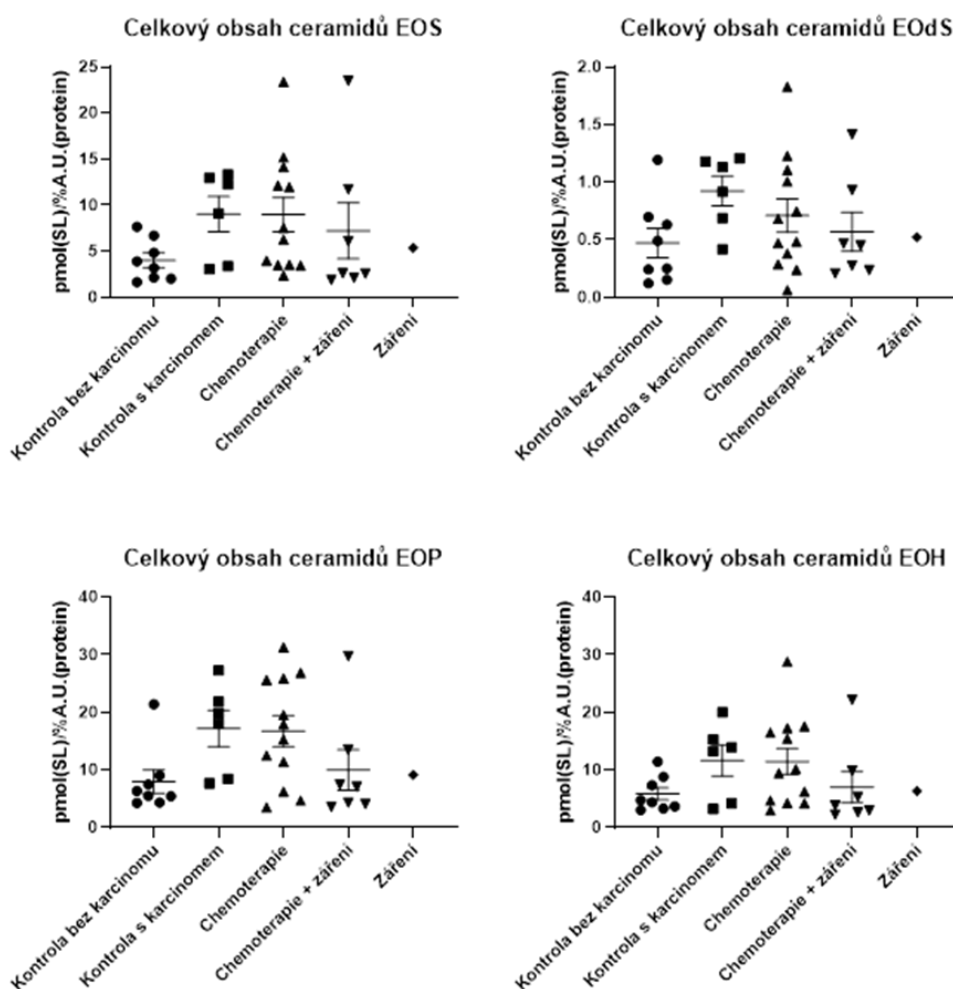


Obr. 15. Zvýšené množství α -hydroxylovaných ceramidů u pacientů s různými druhy léčby,

ale bez statistické významnosti. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrole bez karcinomu $p < 0,05$ (*).

Výsledky kvantifikace α -hydroxylovaných ceramidů se podobají předchozím výsledkům z kvantifikace nesubstituovaných ceramidů. Většina hodnot je zvýšená (Obr. 15), ale zde bez statistické významnosti. Hvězdička je sice u ceramidu AdS ve skupině záření, ale jelikož byl porovnáván pouze jeden vzorek v této skupině a ceramidy podtřídy AdS jsou v lidském SC zastoupeny v poměrně malém množství, je ještě předčasné mluvit o nějakých definitivních výsledcích.

3.4.3 Kvantifikace ω -esterifikovaných ceramidů



Obr. 16. Zvyšující se trend acylceramidů, avšak bez statistické významnosti. Data jsou

zobrazena jako průměr ± SEM, n = 6-12.

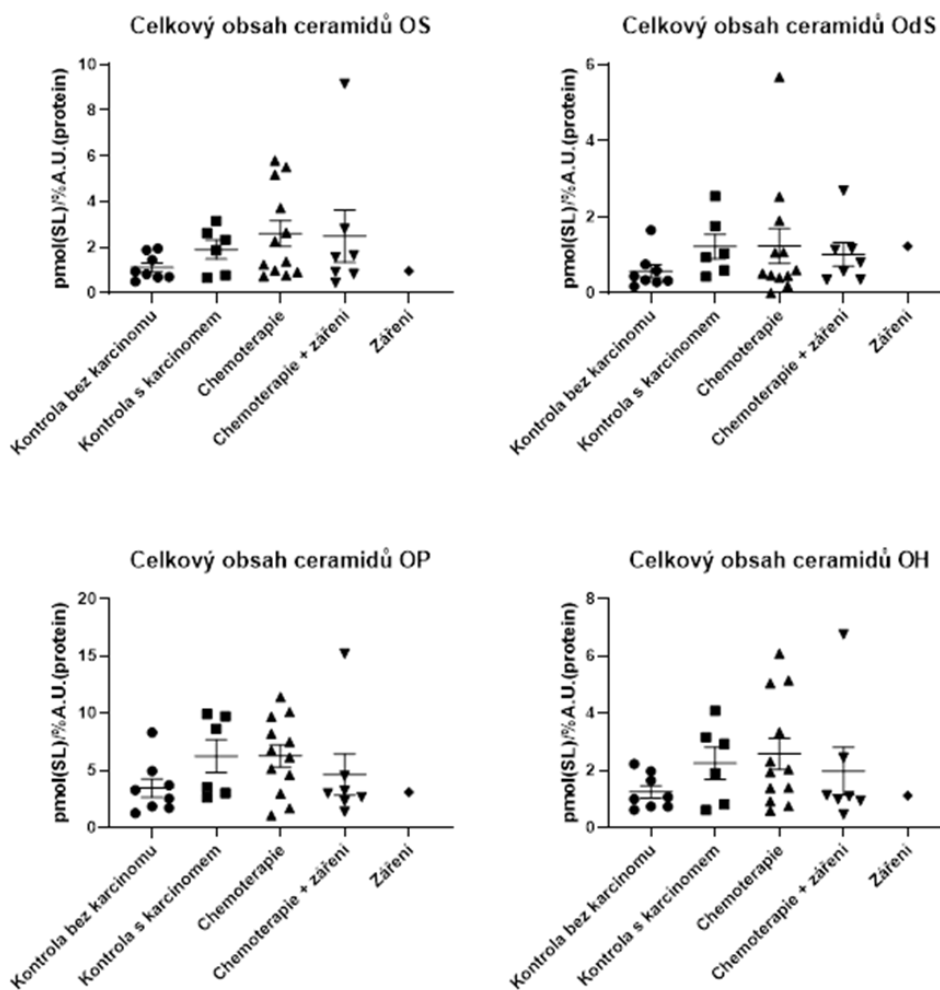
Zde byly kvantifikovány ω -esterifikované ceramidy (acylceramidy), jejichž struktura je tvořena ultradlouhými omega hydroxylovanými řetězci v rozmezí 26-36 uhlíků esterifikovanými kyselinou linolovou. Ačkoliv nejsou výsledné hodnoty statisticky odlišné, z naměřených dat vnesených do grafu (Obr. 16) je patrný zvyšující se trend obsahu acylceramidu. Toto zvýšení je výraznější u kontrol s karcinomem a skupiny chemoterapie. Avšak u skupin chemoterapie a chemoterapie + záření je rozptyl v naměřených hodnotách výraznější.

Vzhledem k některým podobnostem (jako je poškození kožní bariéry a zvýšené hodnoty TEWL) u pacientů po onkologické léčbě a pacientů s rozdílnými kožními onemocněními, byly naše výsledky kvantifikace ω -esterifikovaných ceramidů srovnány s některými dřívějšími studii. Z výsledků experimentu jiné vědecké skupiny vyplývá, že hladiny acylceramidů byly sníženy u pacientů s atopickou dermatitidou^{54, 58} ve srovnání se zdravými dobrovolníky. Toto snížení obsahu acylceramidů bylo zjištěno i u dalších kožních onemocnění např. psoriázy,³³ ichthyózy,⁵⁹ Nethertonův syndrom,⁶⁰ ale i u suché kůže.⁵⁵ Hladiny acylCer v nemocné a zdravé kůži se lišily mezi studii, výsledky závisí na závažnosti onemocnění, oblasti odběru vzorků, analytické metodě a dalších faktorech. Úplný nedostatek nebo závažné vady biosyntézy acylceramidů vedou k novorozenecké smrti v důsledku obrovské ztráty vody prostřednictvím poškozené kůže. Zvýšený obsah acylceramidů nezlepšuje bariérové funkce.⁶¹ Vzhledem k těmto zjištěním jsme i u pacientů po prodělání onkologického onemocnění očekávali snížené acylceramidy, avšak tento předpoklad se nepotvrdil, u některých skupin pacientů se naopak zdá, že se množství těchto lipidů spíše zvyšuje.

3.4.4 Kvantifikace ω -hydroxylovaných ceramidů

Během analýzy byly kvantifikovány prekurzory acylceramidů s ultradlouhými řetězci v rozmezí 26-36 uhlíků. Tyto ceramidy jsou běžně ve zdravém lidském SC zastoupeny v poměrně malém množství, většina je přeměněna na acylceramidy prostřednictvím enzymu PNPLA1, který je zodpovědný za jejich ω -esterifikaci.⁶² Jejich zvýšené množství je spojeno s kožními onemocněními ze skupiny ichthyóz. Z výsledků kvantitativní analýzy omega hydroxylovaných ceramidů vyplývá (Obr. 17), že tyto ceramidy vykazují podobné výsledky

jako omega esterifikované ceramidy, což není překvapivé vzhledem k jejich stejné biosyntéze až ke kroku ω -esterifikace, tzn. ve skupinách kontrol s karcinomem a chemoterapie je pozorovatelný nárůst více než u skupiny chemoterapie + záření. Stejně tak ani u těchto skupin ceramidů nenajdeme žádné rozdíly v naměřených hodnotách, které by byly statisticky významné.



Obr. 17. Mírně zvyšující se množství ω -hydroxylovaných ceramidů u pacientů. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$.

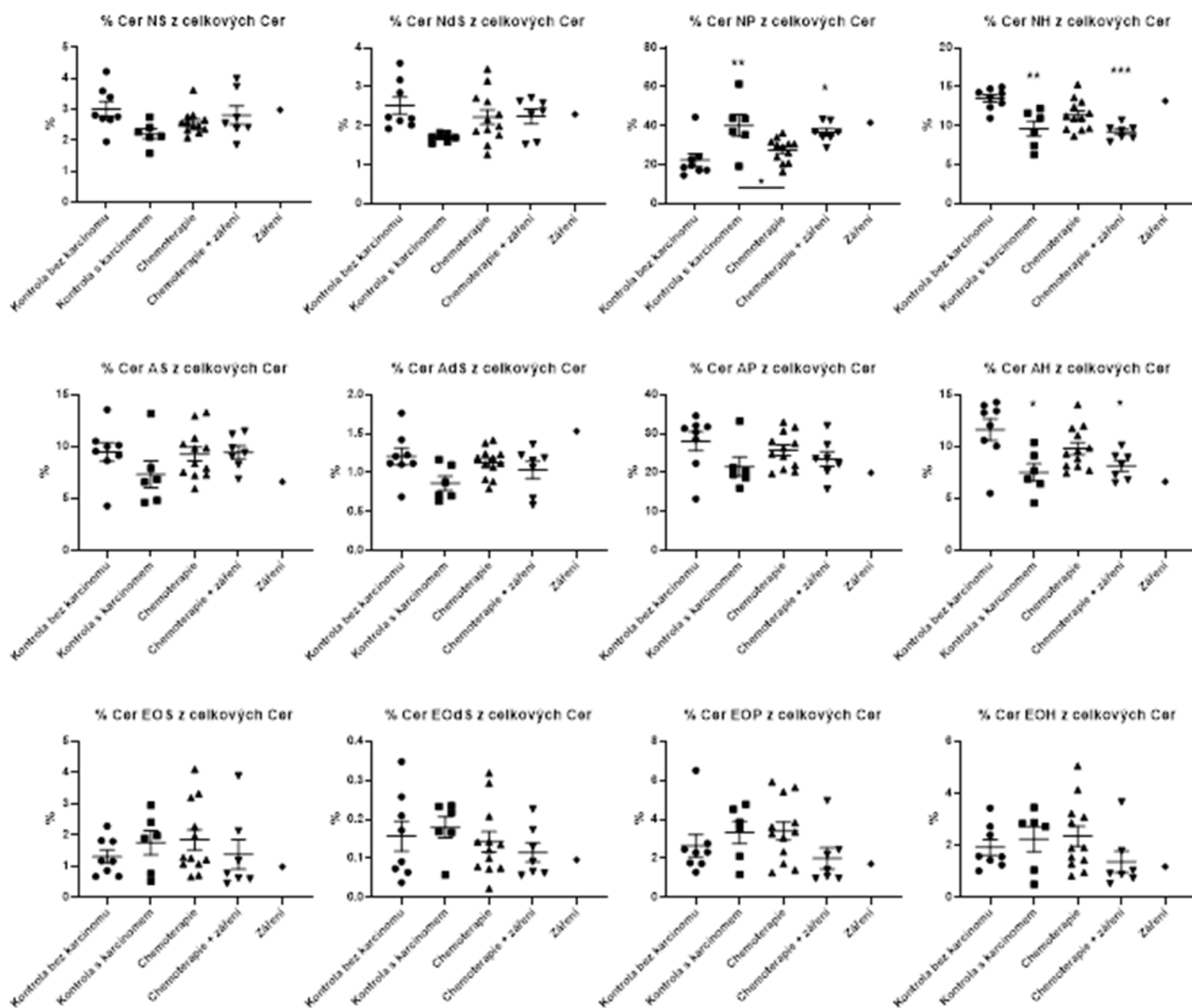
Z výsledků získaných absolutní kvantifikací ceramidů vyplývá, že SC pacientů s onkologickým onemocněním je obecně bohatší na množství ceramidů ve srovnání s dobrovolníky, kterým nebyl diagnostikován karcinom. Výrazný nárůst byl zjištěn u všech čtyř podtříd ceramidů, avšak nejvýraznější z nich byl pozorován u nesubstituovaných

ceramidů.

3.5 Procentuální zastoupení jednotlivých podtříd ceramidů

V tomto případě se už nejedná o absolutní hodnoty jako v předchozích, ale o relativní hodnoty tzn. poměr jednotlivých podtříd k celkovému množství ceramidů u daného pacienta. Důležité je rovněž si uvědomit, že při porovnávání zastoupení jednotlivých podtříd ceramidů v rámci jednoho pacienta nebo dobrovolníka už nehraje žádnou roli obsah proteinů. U pacientů po prodělaném karcinomu je jednoznačně vidět významný nárůst množství ceramidů NP na úkor ostatních tříd. Mezi kontrolami po proděláním karcinomu a skupinou chemoterapie + záření je statisticky významný rozdíl indikovaný hvězdičkou v dolní části grafu ceramidu NP (Obr. 18). Velmi zajímavý je signifikantní pokles ceramidů odvozených od sfingosinu a dihydrosfingosinu, což by opět indikovalo preferenční hydroxylaci dihydroceramidů v poloze 4 za vzniku ceramidů odvozených od fytosfingosinu na úkor kompetitivní desaturace ceramidů vedoucí k ceramidům odvozených od sfingosinu. Výrazně, statisticky signifikantně, také poklesly ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu, ale mechanismus jejich vzniku zatím nebyl jednoznačně prokázán, proto není možné spekulovat o zvýšení nebo snížení aktivity konkrétních enzymů.

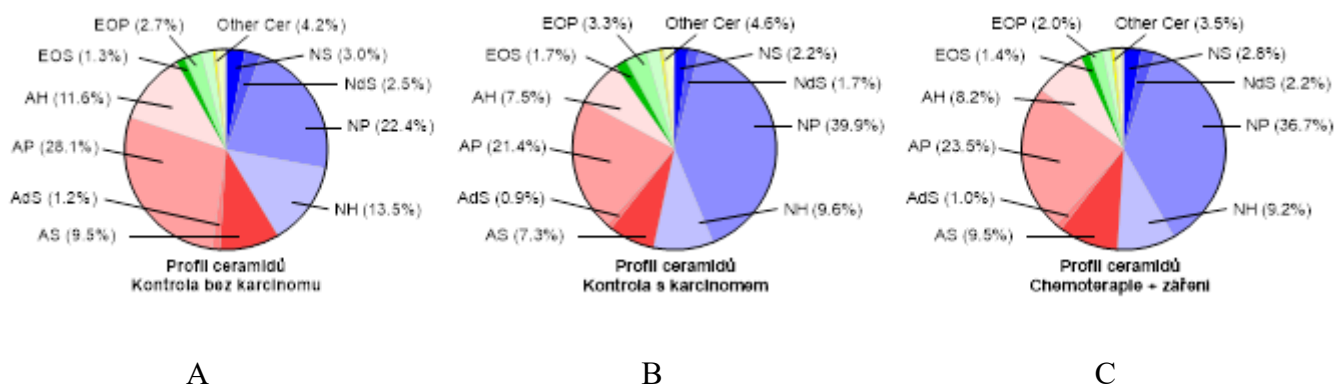
Podobný nárůst ceramidů NP byl pozorován v rekonstruovaných kožních modelech s nemelanomovými nádorovými buňkami. V roce 2016 Zoschke C. et. al. zkoumali profil ceramidů u modelu nemelanomového kožního karcinomu a odhalili zvýšené množství ceramidů na bázi fytosfingosinu NP/EOP na úkor ceramidů NS/NdS na bázi sfingosinu a dihydrosfingosinu. Zejména množství velmi dlouhých ceramidů NS/NdS o přibližné délce 20 až 26 uhlíků bylo sníženo o 60 % v případě modelu nemelanomového kožního karcinomu, zatímco množství dlouhých ceramidů NS/NdS o délce 14 až 19 uhlíků zůstalo nezměněno.⁵³



Obr. 18. Rozdílné procentuální zastoupení mezi jednotlivými třídami ceramidů. Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$. Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly oproti kontrole bez karcinomu $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Ceramidové profily (Obr. 19) zobrazují zastoupení jednotlivých podtříd ceramidů pro vybrané skupiny - kontroly bez karcinomu, kontroly s karcinomem a skupiny chemoterapie + záření. Výsledky jsou stejné jako výsledky, které vyplývají z přechozích grafů (Obr. 18), jedná se tedy pouze o jiný druh zobrazení, kdy jsou veškeré ceramidy porovnány v rámci

jednoho grafu. Z grafu je jednoznačně vidět, že ceramidy NP (světle modrou barvou) jsou u pacientů po prodělání rakoviny výrazně zvýšeny na úkor ostatních ceramidů.



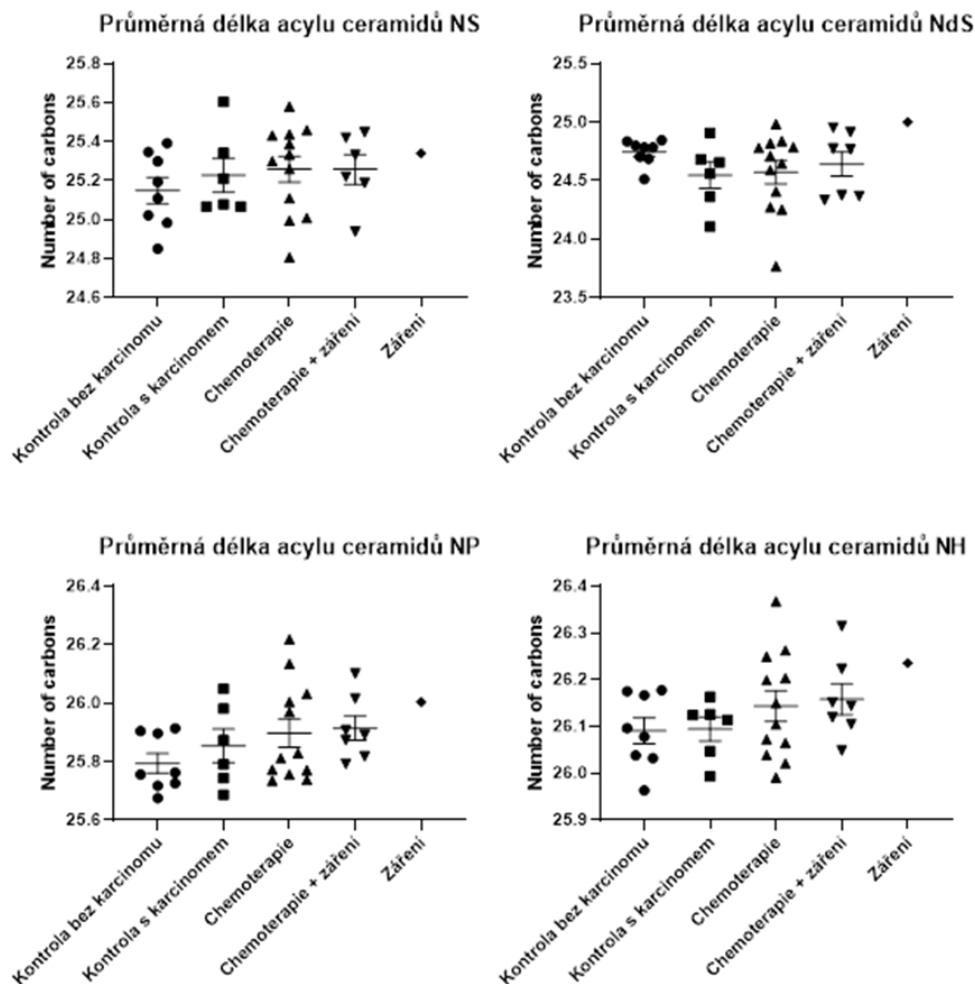
Obr. 19. Procentuální zastoupení všech naměřených ceramidů (ceramidové profily). A: Kontrola bez karcinomu; B: Kontrola s karcinomem; C: Chemoterapie + záření. Hodnoty zobrazené v grafech představují průměrné hodnoty získané zohledněním výsledků všech pacientů v rámci jednotlivých skupin. Zde se jedná vždy o průměr všech pacientů dané skupiny (všechny body z předchozích byly zprůměrovány a použity pro tento graf).

Například změny pozorované u psoriázy spočívaly ve významném snížení procenta ceramidů NP a AP ve srovnání s normální SC. Tento pokles se pohyboval v rozmezí od 27 % v případě ceramidu AP do 66 % v případě ceramidu NP. Celkově tvoří ceramidy nesoucí fytosfingosin 25 % celkového množství SC u pacientů s psoriázou oproti 44 % v normální SC. Současně došlo k výraznému zvýšení podílu ceramidů NS a AS, ceramidů obsahujících sfingoidní bázi sfingosin.³³ V případě našeho experimentu pozorujeme přesně opačný trend, kdy je zvýšený obsah ceramidů na bázi fytosfingosinu a snížení ceramidů odvozených od sfingosinu, tudíž psoriáza není vhodným srovnáním s kůží pacientů po onkologické léčbě.

3.6 Průměrné délky acylových řetězců vybraných podtříd ceramidů

Původní předpoklad byl, že u pacientů po onkologické léčbě by mohl existovat stabilní zánět, který by mohl snižovat hladinu některých enzymů, jako například elongáz nebo ceramid syntáz. Projevem nepřírozené funkce těchto enzymů by mohl být výskyt rozdílných délek acylových řetězců (zkrácení) podobně, jako u atopické dermatitidy.²² Studie zaměřené na tuto chorobu ukázaly, že nedostatečná bariérová funkce může být důsledkem poklesu ceramidů

s velmi dlouhými (zejména 24-26 uhlíků) a ultradlouhými (zejména 30-32 uhlíků) řetězci a zvýšením hladiny ceramidů s krátkým řetězcem (zejména 16-18 uhlíků). Konkrétně je tato změna způsobena sníženou expresí hladiny elongáz ELOVL3 a ELOVL6 u pacientů s atopickou dermatitidou, které se podílejí na tvorbě mastných kyselin s delšími řetězci.⁶³ I pomocí modelových lipidových membrán se podařilo prokázat, že délka acylových řetězců v ceramidech má vliv na propustnost kožní bariéry.^{57, 64} Výsledky studie průměrných délek acylových řetězců ceramidů získané v rámci této diplomové práce (Obr. 20) však výrazné ovlivnění hladiny těchto enzymů nenaznačují. Nicméně, v budoucnu bude tato množnost detailněji prozkoumána. Výsledky jsou zde prezentovány na skupině nesubstituovaných ceramidů, u ostatních podtříd ceramidů byla situace velmi podobná.



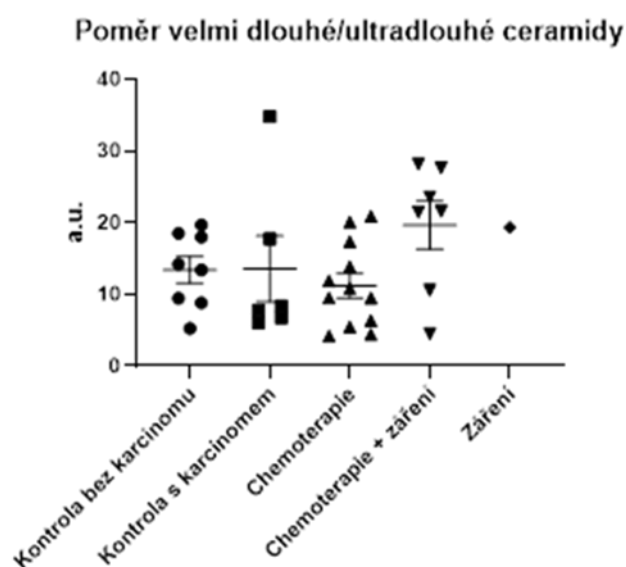
Obr. 20. Délka acylových řetězců nesubstituovaných ceramidů zůstala v podstatě nezměněna.

Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$.

Průměrná délka acylu u ceramidů NS, NP, NH má nepatrně vzrůstající trend. Naopak u ceramidu NdS se počet uhlíků v acylu u pacientů, kteří prodělali onkologické onemocnění mírně snížil. Jedná se opět o spekulaci, ale takovéto rozdíly (i přesto, že jsou malé) by opět mohly souviset s pozměněnou funkcí desaturáz, které v tomto případě preferují delší řetězce pro úpravu dihydroceramidů na ceramidy a fytoceramidy ($>25C$), proto ve skupině dihydroceramidů zůstávají řetězce o něco kratší ($<25C$).

3.7 Poměr mezi velmi dlouhými a ultradlouhými ceramidy

Stanovením tohoto poměru jsme se pokusili zjistit, jestli jsou u pacientů po prodělání karcinomu nějaké změny v syntéze ultradlouhých ceramidů, které mají část biosyntézy společnou s ostatními ceramidy, avšak ve finálních fázích biosyntézy se odlišují.



Obr. 21. Poměr obsahu velmi dlouhých a ultradlouhých ceramidů (bezrozměrná veličina).

Data jsou zobrazena jako průměr \pm SEM, $n = 6-12$.

Rozdíly nejsou statisticky signifikantní, avšak z výsledků je patrný vzrůstající trend (Obr. 21) množství velmi dlouhých (podtřídy N a A-ceramidů) ceramidů na úkor ultradlouhých ceramidů (EO-ceramidy) u skupin pacientů léčených výhradně zářením nebo jeho kombinací s chemoterapií. Tedy skupin léčených chemoterapií + zářením,

kteřá dosahuje hodnoty poměru $19,65 \pm 3,3$ a zářením s hodnotou $19,36$ oproti kontrole bez karcinomu, u níž je vyšší výskyt ultradlouhých ceramidů s poměrem $13,4 \pm 1,8$. Hodnoty, které téměř odpovídaly hodnotám získaným pro kontrolní skupinu bez karcinomu byly pozorovány u kontrolní skupiny s karcinomem ($13,6 \pm 4,6$). U pacientů léčených pouze chemoterapií bylo nalezeno ještě vyšší zastoupení ultradlouhých ceramidů oproti kontrole s hodnotou $11,2 \pm 1,7$. Z výsledků tedy vyplývá, že onkologická léčba ozařováním by mohla mít vliv na biosyntézu ω -esterifikovaných ceramidů, protože jejich množství bylo sníženo u těchto skupin pacientů.

Acylceramidy jsou klíčovými složkami pro správné fungování kožní bariéry. Tvoří 7-12 % z celkového množství ceramidů ve SC. Jsou nezbytné pro tvorbu dlouhé lamelární fáze a korneocytární lipidové obálky, což je důležité pro zabránění ztrát vody z těla. Nižší hladiny acylceramidů a dlouhé lamelární fáze provázejí kožní onemocnění, jako je atopická dermatitida, lamelární ichthyóza a psoriáza.⁶⁵ Rysem ceramidů u pacientů s psoriázou je specifický pokles fyto sfingosinu spojený se zvýšením sfingosinu. Obsah ceramidů EOS u pacientů s psoriázou je ve srovnání s kontrolami o 40 % nižší.³³ Naopak v našem experimentu je množství ceramidů EOS u pacientů po prodělaném onkologickém onemocnění až o 55 % vyšší. Z nichž nejvyšší nárůst byl zaznamenán v rámci skupiny pacientů, kterým byl karcinom odstraněn chirurgicky. Takže se opět ukazuje, že psoriáza není vhodným modelem pro posuzování kůže pacientů po onkologické léčbě.

Snížené množství acylceramidů nebo jejich úplná absence v modelových lipidových membránách, což je jeden z charakteristických znaků kožních onemocnění, např. atopické dermatitidy, vedly k menšímu uspořádaní lipidů, chybějící nebo snížené dlouhé lamelární fázi a zvýšené propustnosti těchto membrán ve srovnání s membránami o fyziologickém složení.⁶¹ U pacientů, kteří podstoupili ozařování jako léčebný postup vidíme podobný trend. Obsah acylceramidů se na úkor ostatních ceramidů mírně snižuje, což je spojeno se zvýšenými hodnotami TEWL, avšak v tomto případě změna na úrovni acylceramidů nebude jedinou příčinou, jelikož zvýšené hodnoty TEWL byly pozorovány i u pacientů po jiných typech léčby, u kterých pokles acylceramidů nebyl pozorován. Imokawa et al. zjistili pokles jak celkových hladin lipidů SC, tak ceramidů v kůži atopických pacientů.⁶⁶ Další vyšetření atopické kůže ukázalo, že pokles ceramidu EOS a NP byl doprovázen významně zvýšeným TEWL. Několik studií dále zaznamenalo u pacientů s atopickým ekzémem zvýšení ceramidu AS a snížení

ceramidu s dlouhým řetězcem EOH. Některé z těchto změn by mohly souviset se změnami bariérové funkce kůže, avšak opět příliš nekorespondují s námi naměřenými výsledky.⁵⁸

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Odběry vzorků a měření transepidermální ztráty vody

Vzorky SC byly odebrány zdravotnickým personálem na základě souhlasu pacientů po prodělaném nádorovém onemocnění ve fakultní nemocnici Motol v Praze. Použití vzorků SC pro výzkumné účely bylo schváleno Etickou komisí a bylo s nimi zacházeno v souladu se zásadami Helsinské deklaráce. Získání vzorků SC z lidské epidermis bylo provedeno metodou tape-stripping pomocí D-squame pásky (Clinical and Derm, Dallas, TX, USA) o průměru 22 mm, která má dvě části, lepicou pro vzorek a nelepivou pro její manipulaci. Páska byla pacientům přiložena na vnitřní neochlupenou část předloktí a mírným tlakem přitlačena po dobu přibližně tří sekund. Doba tlaku byla pro všechny vzorky shodná, jelikož bylo použito zařízení poskytující definovaný tlak. Stejným způsobem bylo odebráno dalších sedm vrstev kůže ze stejného místa, které bylo označeno permanentním fixem. Po odejmutí pásky byla páska vložena pomocí pinzety do Eppendorfovy zkumavky a byla připravena k přepravě do Hradce Králové. Kromě osmi odebraných vzorků SC byly zaslány také dvě kontrolní pásky, které nebyly použity k žádnému odběru. Dohromady bylo získáno deset pásek od každého pacienta.

Před samotným odběrem a přibližně 3 hodiny po odběru vzorku z předloktí byla v identickém místě měřena transepidermální ztráta vody pomocí přístroje „gpskin Barrier“ (GPOWER, Soul, Korea). Přístroj po zapnutí a přiložení na kůži pracuje zcela samostatně a metodou uzavřené měřicí komory během 30 sekund určí transepidermální ztrátu vody. Výhodou přístroje je jednoduchá aplikace, která umožňuje rychlé měření u pacientů, kteří jsou vystaveni zvýšené stresové zátěži z onkologické kontroly, avšak tato výhoda je vykoupena nižší přesností tohoto přístroje.

4.2 Měření obsahu bílkovin

Po vyndání pásek z Eppendorfových zkumavek byly vzorky přendány na plastový držák s kulatými otvory a následně byl změřen obsah bílkovin pomocí přístroje SquameScan (Heiland electronic GmbH, Wetzlar, Německo), který hodnotí optickou absorpci v infračervené oblasti (850 nm) a je přímo navržený pro tuto aplikaci. Před vlastním měřením

bylo zapotřebí přístroj zkalibrovat na referenční hodnotu s přípustnou odchylkou 0,3. Jako referenční vzorek byla před samotným měřením vzorků použita kontrolní páska neobsahující kožní vzorek. Mezi měřením a zapsáním hodnot jednotlivých vzorků byly dodržovány stejné časové úseky. Nakonec vzorky z držáku byly přeneseny do 15 ml skleněných centrifugačních zkumavek lepkavou částí se vzorkem směřovaným dovnitř zkumavky. Do jedné zkumavky byly umístěny vždy 2 vzorky v následujícím pořadí, kontrola + kontrola, vzorek č. 1 + 2, 3 + 4, 5 + 6 a 7 + 8, tedy 5 zkumavek pro každého pacienta nebo dobrovolníka. Pásky se vsunuly do zkumavek co nejnižší, a tak aby se nepřekrývaly.

4.3 Extrakce lipidů ze SC

Do zkumavek se vzorky SC bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu, 8 ml rozpouštědla o složení chloroform/methanol/voda v poměru 30:60:8 a vzorky byly ponechány na třepačce přes noc při pokojové teplotě. Po vypnutí třepačky byly zkumavky odstředěny při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant obsahující lipidy byl převeden do nové zkumavky a částečně odpařen proudem dusíku při teplotě 43 °C. Ke zbylému biologickému materiálu v první zkumavce obsahující disky byl přidán nový podíl rozpouštědla o objemu 7 ml a celý obsah byl vložen do ultrazvukové lázně po dobu 3 minut při teplotě 45 °C. Po uplynutí tří minut byl vzorek ponechán ve vodní lázni po dobu dalších 12 minut při stejné teplotě. Zkumavka byla opět odstředěna při 3500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a přibližně 7 ml supernatantu bylo odebráno stříkačkou a přidáno do druhé zkumavky k odpaření. Zkumavky se zbývajících disky byly uskladněny do mrazničky pro případ, že se v budoucnu budou kvantifikovány kovalentně vázané lipidy. Obsah druhé zkumavky byl odpařen do sucha pod proudem dusíku. Vznikl tak bílý povlak na špičce zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 1,5 ml rozpouštědla (chloroform/methanol 1:9) a zkumavka byla umístěna do ultrazvukové lázně po krátkou dobu cca 30 sekund při pokojové teplotě a poté intenzivně promíchána. Obsah zkumavky byl odebrán pomocí plastové stříkačky (2 ml) s dlouhou kanylou a přefiltrován přes filtr (PTFE, průměr 13 mm, póry 0,2 μ m) do 1,5 ml vialky. Tento konečný vzorek byl uložen do mrazničky do doby LCMS měření. Pro měření bylo výhodné nepoužít celé množství, ale bylo lepší přenést 150 μ l tohoto vzorku do jiné vialky obsahující insert (300 μ l).

4.4 Separace a kvantifikace ceramidů

Získané frakce ceramidů byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Shimadzu Prominence, Kjóto, Japonsko) ve spojení s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (HPLC-MS/MS) na přístroji typu trojitého kvadrupólu LCMS-8050 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Ionizace vzorků byla prováděna elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu.

Separace ceramidů byla provedena na reverzní fázi C18 s elucí ceramidů gradientem polární mobilní fáze B v rozmezí od 43-99 % (A: 50 % methanol, 50 % voda, 0,1% kyseliny mravenčí a 10 mM mravenčanu amonného; B: 99 % isopropanol, 1 % methanol, 0,1 % kyseliny mravenčí a 10 mM mravenčanu amonného). Délka analýzy trvala 32 minut s průtok mobilní fáze 0,2 ml/min. Separace na reverzní fázi byla provedena na chromatografické koloně Ascentis o rozměrech 15 cm × 2,1 mm a velikosti částic 3 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) při teplotě 30 °C. Pro toto měření bylo na kolonu nastříknuto 3 μl vzorku. Detekce proběhla pomocí QqQ MS (LCMS-8050). Hmotnostní spektrometr byl nastaven na následující parametry: nebulizační plyn 3 l/min, sušící plyn 10 l/min, ohřívací plyn 10 l/min, teplota zdroje 300 °C, teplota „desolvation line“ 250 °C, teplota vyhřívání bloku 400 °C, napětí zdroje 4 kV, tlak kolizního plynu 270 kPa, měřeno v módu MRM (z ang. multi-reaction monitoring).

4.4.1 Příprava vnitřního standardu

Připravený vnitřní standard obsahoval ceramidy NS (18:1/14:0), NS (18:1/19:0), NS (18:1/25:0), NS (18:1/31:0), NdS (18:0/14:0), NP (18:0/14:0), EOS (18:1/29:0/18:2) a báze S (14:1), dS (17:0). Jednotlivé složky vnitřního standardu byly připraveny rozpuštěním ve směsi chloroformu a methanolu v poměru CHCl₃:MeOH 1:9 a poté zředěny čistým methanolem na konečnou koncentraci 20 μmol/l. Po naředění jednotlivých ceramidů bylo 50 μl každého roztoku ceramidů smícháno dohromady do jedné zkumavky a doplněno do 5 ml methanolem. Konečná koncentrace vnitřního standardu byla 200 nmol/l. Ke každému vzorku bylo přidáno 100 μl tohoto vnitřního standardu. Konečná koncentrace vnitřního standardu ve vzorku byla 20 pmol/vzorek Tato hodnota byla později využita při kvantifikaci lipidů (ceramidů).

4.4.2 Příprava vnějšího standardu

Připravený vnější standard obsahoval ceramidy NS (18:1/24:0), NdS (18:0/24:0), NP

(18:0/24:0), EOS (18:1/32:0/18:2), EOdS (18:0/32:0/18:2), AS (18:1/24:0), AdS (18:0/24:0), AP (18:0/24:0), NH (18:1/24:0), OS (18:1/32:0), OdS (18:0/32:0), OP (18:0/32:0) a báze S (18:1), dS (18:0), P (18:0). Jeho příprava byla shodná s přípravou vnitřního standardu, tedy i konečná koncentrace byla 200 nmol/l.

4.5 Zpracování výsledků

Data z LC-MS/MS měření byla získána pomocí softwaru LabSolutions, verze 5.96, kde byla rovněž provedena základní úprava chromatogramů, bylo použito vyhlazení křivek (metoda Sawitzky-Golay) a hodnoty ploch pod jednotlivými peaky byly převedeny do programu Microsoft Excel, kde byly provedeny matematické korekce (kvantifikace pomocí vnitřního a vnějšího standardu, úprava odezvy detektoru v závislosti na narůstající délce řetězce, započítání obsahu proteinů). Finální grafy a statistická analýza byly provedeny v programu GraphPad Prism 9.

4.6 Statistická analýza dat

Pro statistickou analýzu dat byl využit ANOVA test s Dunnettovým post hoc testem. Hodnoty byly vyneseny do grafu jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM). P-hodnota * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ byly považovány za statisticky významné.

5. ZÁVĚR

Cílem naší práce bylo nalezení vhodného markeru pro predikci předčasné senescence, ideálně neinvazivní cestou, jako je odběr kožních vzorků pomocí stripování. Dosáhnout tohoto cíle jsme se snažili pomocí kvantifikace kožních ceramidů u pacientů po onkologické léčbě a jejich porovnání se vzorky SC u zdravých dobrovolníků. U pacientů byla zkoumána transepidermální ztráta vody a u vzorků od nich odebraných byl stanoven celkový obsah proteinů a lipidů (ceramidů). Obsah proteinů ve vzorcích byl stanoven za účelem následné korekce množství lipidů na výtěžek odběru. Analýza lipidů poskytla informace o zastoupení jednotlivých podtříd ceramidů a jejich detailní zhodnocení z pohledu průměrné délky acylových řetězců. Na závěr byl tak také stanoven poměr mezi dlouhými (podtřídy N a A-ceramidů) a ultradlouhými ceramidy (EO-ceramidy).

Obsah proteinů ve vzorcích pacientů byl výrazně nižší než u zdravých kontrol, nelišil se ale mezi pacienty s různými druhy léčby. Výsledky mohou odpovídat buď skutečnému snížení obsahu proteinů ve SC nebo jsou důsledkem zvýšené soudržnosti korneocytů a tím pádem vedou ke snížení odebíraného množství stratum corneum pomocí stripovacích pásek. Vzhledem k tomu, že přístroj SquameScan nedokáže rozlišit mezi jednotlivými proteiny, nejsme v tuto chvíli schopni určit, které proteiny byly případně sniženy a proč.

Transepidermální ztráta vody měřená před odběrem vzorků kůže byla u pacientů vyšší než u zdravých kontrol, což naznačuje možný defekt v kožní bariéře. Ztráta vody měřená po určitém časovém intervalu (přibližně 3 hodiny) se u většiny pacientů vracela k původním hodnotám, takže schopnost kůže regenerovat se po poškození nebyla u těchto pacientů výrazně narušena. Variability výsledků mohly být ovlivněny nadměrným pocením spojeným se stresem z pravidelné onkologické prohlídky při měření.

Celkový obsah ceramidů po přepočtu na proteiny ve vzorku byl ve vzorcích pacientů vyšší (téměř dvojnásobně) než u zdravých kontrol. Bylo pozorováno rozdílné zastoupení tříd ceramidů mezi jednotlivými skupinami pacientů rozlišených podle typu léčby. Při porovnání kvantity ceramidů na základě struktury jejich sfingoidní báze byl u pacientů obecně vidět pokles ceramidů odvozených od sfingosinu (S), 6-hydroxysfingosinu (H) a dihydroxysfingosinu (dS). Naopak byl pozorován zvýšený obsah ceramidů na bázi fytosfingosinu (P), a to především u pacientů po chirurgickém odstranění karcinomu.

Při pohledu na acylové řetězce ceramidů byl nejvýraznější nárůst pozorován

u nesubstituovaných (N) a α -hydroxylovaných (A) ceramidů. Ze skupiny nesubstituovaných ceramidů byl pak nejvýrazněji zvýšen NP ceramid, a to nejvíce u osob po chirurgickém odstranění karcinomu. Délky acylových řetězců ceramidů zůstaly téměř nezměněny.

Hlavním cílem bylo najít marker, který by určoval předčasné stárnutí. Tohoto cíle se nepodařilo zcela dosáhnout, nicméně v rámci této pilotní studie se podařilo nalézt zásadní rozdíly v zastoupení ceramidů mezi pacienty po prodělaném onemocnění a zdravými dobrovolníky. Závěry získané pro jednotlivé způsoby léčby se od sebe příliš nelišily.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CerS	ceramid syntáza
DEGS1	dihydroceramidová desaturáza 1
DEGS2	dihydroceramidová desaturáza 2
GlcCer	glukosylceramidy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
KDSR	3-ketodihydrosfingosin reduktáza
LC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MRM	monitorování vícenásobných reakcí
SC	stratum corneum
SM	sfingomyeliny
SPT	serin palmitoyltransferáza
TEWL	transepidermální ztráta vody
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

7. LITERATURA

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**(5), E359-86 (2015).
2. Cupit-Link, M. C.; Kirkland, J. L.; Ness, K. K.; Armstrong, G. T.; Tchkonja, T.; LeBrasseur, N. K.; Armenian, S. H.; Ruddy, K. J.; Hashmi, S. K. Biology of premature ageing in survivors of cancer. *ESMO Open* **2**(5), e000250 (2017).
3. Wickett, R. R.; Visscher, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control* **34**(10, Supplement), S98-S110 (2006).
4. Kolarsick, P. A. J.; Kolarsick, M. A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **3**(4), 203-213 (2011).
5. Fore, J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage* **52**(9), 24-35; quiz 36-7 (2006).
6. Farage, M. A.; Miller, K. W.; Elsner, P.; Maibach, H. I. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol* **26**(4), 343-57 (2007).
7. McGrath, J. A.; Eady, R. A. J.; Pope, F. M., Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology*, 2004; pp 45-128.
8. Freeman, S. C.; Sonthalia, S., Histology, Keratohyalin Granules. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2021.
9. Chambers, E. S.; Vukmanovic-Stejic, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **160**(2), 116-125 (2020).
10. Yousef, H.; Alhajj, M.; Sharma, S., Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2021.
11. Murphrey, M. B.; Miao, J. H.; Zito, P. M., Histology, Stratum Corneum. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2021.
12. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**(3), 295-313 (2014).
13. Vavrova, K.; Kovacik, A.; Opalka, L. Ceramides in the skin barrier. *Eur. Pharm. J.* **64**(2), 28-35 (2017).
14. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**(3), 422-434 (2014).
15. Hill, J. R.; Wertz, P. W. Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* **1616**(2), 121-6 (2003).
16. Madison, K. C. Barrier Function of the Skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **121**(2), 231-241 (2003).
17. Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E.; Gooris, G. S.; Ponc, M. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **208**, 23-30 (2000).
18. Feingold, K. R. Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* **48**(12), 2531-2546 (2007).
19. Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* **4**(2), 107-29 (2003).
20. Jia, Z. X.; Zhang, J. L.; Shen, C. P.; Ma, L. Profile and quantification of human stratum corneum ceramides by normal-phase liquid chromatography coupled with dynamic multiple reaction monitoring of mass spectrometry: development of targeted lipidomic method and application to human stratum corneum of different age groups. *Anal Bioanal Chem* **408**(24), 6623-36 (2016).
21. van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1841**(1), 70-79 (2014).

22. Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* **130**(10), 2511-4 (2010).
23. Wertz, P. W.; Cho, E. S.; Downing, D. T. Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **753**(3), 350-5 (1983).
24. Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; Deme, B.; Bouwstra, J. A. Skin lipids: localization of ceramide and fatty acid in the unit cell of the long periodicity phase. *Biophys. J.* **108**(11), 2670-9 (2015).
25. Zettersten, E.; Man, M. Q.; Sato, J.; Denda, M.; Farrell, A.; Ghadially, R.; Williams, M. L.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Recessive x-linked ichthyosis: role of cholesterol-sulfate accumulation in the barrier abnormality. *J Invest Dermatol* **111**(5), 784-90 (1998).
26. Elias, P. M.; Williams, M. L.; Choi, E. H.; Feingold, K. R. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**(3), 353-61 (2014).
27. t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**(1), 403-11 (2012).
28. Cha, H. J.; He, C.; Zhao, H.; Dong, Y.; An, I. S.; An, S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med* **38**(1), 16-22 (2016).
29. van Smeden, J.; Bouwstra, J. A. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol* **49**, 8-26 (2016).
30. Kováčik, A.; Roh, J.; Vávrová, K. The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family. *Chembiochem* **15**(11), 1555-62 (2014).
31. Choi, M. J.; Maibach, H. I. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol* **6**(4), 215-23 (2005).
32. Kawana, M.; Miyamoto, M.; Ohno, Y.; Kihara, A. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.* **61**(6), 884-895 (2020).
33. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta* **1182**(2), 147-51 (1993).
34. Breiden, B.; Sandhoff, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**(3), 441-52 (2014).
35. Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* **35**(11), 2060-8 (1994).
36. Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* **49**(7), 1466-76 (2008).
37. Michel, C.; van Echten-Deckert, G.; Rother, J.; Sandhoff, K.; Wang, E.; Merrill, A. H., Jr. Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* **272**(36), 22432-7 (1997).
38. Bleck, O.; Abeck, D.; Ring, J.; Hoppe, U.; Vietzke, J. P.; Wolber, R.; Brandt, O.; Schreiner, V. Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* **113**(6), 894-900 (1999).
39. Selvam, R.; Radin, N. S. Quantitation of lipids by charring on thin-layer plates and scintillation quenching: Application to ceramide determination. *Anal. Biochem.* **112**(2), 338-345 (1981).
40. Fuchs, B.; Süß, R.; Teuber, K.; Eibisch, M.; Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J. Chromatogr. A* **1218**(19), 2754-74 (2011).
41. Norlén, L.; Nicander, I.; Lundsjö, A.; Cronholm, T.; Forslind, B. A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch Dermatol Res* **290**(9), 508-16 (1998).
42. Farwanah, H.; Nuhn, P.; Neubert, R.; Raith, K. Normal-phase liquid chromatographic

separation of stratum corneum ceramides with detection by evaporative light scattering and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **492**(1), 233-239 (2003).

43. Vietzke, J. P.; Brandt, O.; Abeck, D.; Rapp, C.; Strassner, M.; Schreiner, V.; Hintze, U. Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* **36**(3), 299-304 (2001).

44. Yano, M.; Kishida, E.; Muneyuki, Y.; Masuzawa, Y. Quantitative analysis of ceramide molecular species by high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **39**(10), 2091-8 (1998).

45. Houjou, T.; Yamatani, K.; Imagawa, M.; Shimizu, T.; Taguchi, R. A shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**(5), 654-66 (2005).

46. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Kezic, S.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A. Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *J Invest Dermatol* **131**(10), 2136-8 (2011).

47. Masukawa, Y.; Narita, H.; Sato, H.; Naoe, A.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* **50**(8), 1708-19 (2009).

48. McHugh, D.; Gil, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* **217**(1), 65-77 (2018).

49. Rittié, L.; Fisher, G. J. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**(1), a015370 (2015).

50. Calcinotto, A.; Kohli, J.; Zagato, E.; Pellegrini, L.; Demaria, M.; Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev* **99**(2), 1047-1078 (2019).

51. Fabbrocini, G.; Cameli, N.; Romano, M. C.; Mariano, M.; Panariello, L.; Bianca, D.; Monfrecola, G. Chemotherapy and skin reactions. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **31**(1), 50 (2012).

52. Lee, J.; Lim, J.; Park, J. S.; Kim, M.; Kim, T.-Y.; Kim, T. M.; Lee, K.-H.; Keam, B.; Han, S.-W.; Mun, J.-H.; Cho, K. H.; Jo, S. J. The Impact of Skin Problems on the Quality of Life in Patients Treated with Anticancer Agents: A Cross-Sectional Study. *Cancer research and treatment* **50**(4), 1186-1193 (2018).

53. Zoschke, C.; Ulrich, M.; Sochorová, M.; Wolff, C.; Vávrová, K.; Ma, N.; Ulrich, C.; Brandner, J. M.; Schäfer-Korting, M. The barrier function of organotypic non-melanoma skin cancer models. *J Control Release* **233**, 10-8 (2016).

54. Di Nardo, A.; Wertz, P.; Giannetti, A.; Seidenari, S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* **78**(1), 27-30 (1998).

55. Schreiner, V.; Gooris, G. S.; Pfeiffer, S.; Lanzendörfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Proksch, E.; Bouwstra, J. Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* **114**(4), 654-60 (2000).

56. Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**(6809), 239-47 (2000).

57. Školová, B.; Kováčik, A.; Tesař, O.; Opálka, L.; Vávrová, K. Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1859**(5), 824-834 (2017).

58. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijsen, A. P.; Bouwstra, J. A. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* **53**(12), 2755-66 (2012).

59. Paige, D. G.; Morse-Fisher, N.; Harper, J. I. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *Br J Dermatol* **131**(1), 23-7 (1994).

60. van Smeden, J.; Janssens, M.; Boiten, W. A.; van Drongelen, V.; Furio, L.; Vreeken, R. J.; Hovnanian, A.; Bouwstra, J. A. Intercellular skin barrier lipid composition and organization in

Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol* **134**(5), 1238-1245 (2014).

61. Opálka, L.; Kováčik, A.; Pullmannová, P.; Maixner, J.; Vávrová, K. Effects of omega-O-acylceramide structures and concentrations in healthy and diseased skin barrier lipid membrane models. *J Lipid Res.* **61**(2), 219-228 (2020).

62. Pichery, M.; Huchencq, A.; Sandhoff, R.; Severino-Freire, M.; Zaafour, S.; Opálka, L.; Levade, T.; Soldan, V.; Bertrand-Michel, J.; Lhuillier, E.; Serre, G.; Maruani, A.; Mazereeuw-Hautier, J.; Jonca, N. PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Hum Mol Genet* **26**(10), 1787-1800 (2017).

63. Berdyshev, E.; Goleva, E.; Bronova, I.; Dyjack, N.; Rios, C.; Jung, J.; Taylor, P.; Jeong, M.; Hall, C. F.; Richers, B. N.; Norquest, K. A.; Zheng, T.; Seibold, M. A.; Leung, D. Y. Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight* **3**(4), (2018).

64. Skolová, B.; Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepíčka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir* **29**(50), 15624-33 (2013).

65. Opálka, L.; Kováčik, A.; Maixner, J.; Vávrová, K. Omega-O-Acylceramides in Skin Lipid Membranes: Effects of Concentration, Sphingoid Base, and Model Complexity on Microstructure and Permeability. *Langmuir* **32**(48), 12894-12904 (2016).

66. Imokawa, G.; Abe, A.; Jin, K.; Higaki, Y.; Kawashima, M.; Hidano, A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* **96**(4), 523-6 (1991).