

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu na model lidské
kožní bariéry**

Aneta Kelemanová

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Petry Pullmannové, Ph.D. 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, květen 2022

Aneta Kelemanová

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat především své školitelce Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D. za její odborné vedení, veškerou pomoc, čas, trpělivost, cenné rady a konzultace při vypracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Eleni Panoutsopoulou a dalším kolegům ze skupiny Skin Barrier Research Group za pomoc s experimentální částí práce. Velké díky rovněž patří doc. RNDr. Milošovi Steinhartovi, CSc. a Evě Miškovské jr. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, kteří provedli rentgenovou difrakční analýzu vzorků.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Autor: Aneta Kelemanová

Školitel: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu na model lidské kožní bariéry

Struktura a složení nejsvrchnější vrstvy *epidermis*, *stratum corneum*, tvoří kožní bariéru proti transepidermální ztrátě vody. Hlavními složkami *stratum corneum* jsou korneocyty a mezibuněčná lipidová matrix. Mezibuněčná lipidová matrix je směsí ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin. Estery cholesterolu, jako je cholesteryl sulfát, jsou také přítomny. Tato unikátní lipidová směs tvoří multilamelární vrstvy s krátkou a dlouhou krystalickou fází s periodicitou zhruba 6 a 13 nm. Oddělená fáze cholesterolu s periodicitou okolo 3,4 nm se také nachází ve *stratum corneum*. Nejčastější laterální uspořádání lipidové směsi je orthorombické. Hexagonální nebo fluidní uspořádání je méně časté.

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro spontánní uspořádání izolovaných lidských kožních lipidů ve vodném prostředí s přidavkem Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu. Model lidské kožní bariéry byl vytvořen z připravené lipidové disperze a byl použit pro sledování vlivu přídatku Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu na lamelární fáze a laterální uspořádání lipidů.

Lipidy použité pro experimentální část této práce byly získány z izolovaného lidského *stratum corneum*. Nejprve bylo *stratum corneum* izolováno z *epidermis* a lipidy byly extrahovány organickými rozpouštědly, poté následovala purifikace pomocí kolonové chromatografie. Získané lipidy byly dále analyzovány vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografií pro semikvantitativní a kvalitativní stanovení. V dalším kroku byl proveden pilotní experiment umožňující vytvoření disperze izolovaných lipidů ve vodném prostředí. Následně byla připravena disperze izolovaných lipidů ve vodném prostředí s přidavkem Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu. Agregáty vznikaly změnou pH z alkalického na kyselé anebo změnou teploty (ochlazením). Agregace indukovaná změnou pH vedla ke vzniku

nedostatečně kompaktních agregátů. Mikrostruktura těchto agregátů byla studována rozptylem rentgenového záření.

Rozptyl rentgenového záření odhalil, že přítomnost Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu umožňuje tvorbu dlouhé fáze s periodicitou ~ 13 nm i v nefyziologickém prostředí (pH 7,4 a 8,5). Kromě toho byly nalezeny další fáze s periodicitou $\sim 5,8$ nm (v kyselém a neutrálním pH) a ~ 9 nm (v neutrálním a alkalickém pH) v přítomnosti Ca^{2+} kationtů a cholesteryl sulfátu. Současně byla zachována struktura laterálního orthorombického uspořádání.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Author: Aneta Kelemanová

Supervisor: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate on the human skin barrier model

The structure and composition of the outermost layer of the *epidermis*, the *stratum corneum*, form a skin barrier to transepidermal water loss. The main components of the *stratum corneum* are corneocytes and the intercellular lipid matrix. The intercellular lipid matrix is a mixture of ceramides, cholesterol, and free fatty acids. Cholesterol esters, such as cholesteryl sulfate, are also present. This unique lipid mixture forms a multilamellar layer with short and long crystalline phases with periodicities of approximately 6 and 13 nm. A separated cholesterol phase with a periodicity of about 3,4 nm can also be found in the *stratum corneum*. The most common lateral packing of the lipid mixture is orthorhombic. Hexagonal or fluid packing is less common.

The aim of this diploma thesis was to optimize the conditions for spontaneous arrangement of the isolated human skin lipids in an aqueous medium with the addition of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate. A human skin barrier model was created from the prepared lipid dispersion and used to monitor the impact of the addition of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate on the lamellar phases and lateral packing of the lipids.

The lipids used for the experimental part of this diploma thesis were obtained from the isolated human *stratum corneum*. First, the *stratum corneum* was isolated from the *epidermis* and the lipids were extracted with organic solvents, followed with purification by column chromatography. The acquired lipids were then analysed by high-performance thin-layer chromatography for semiquantitative and qualitative determination. In the next step, a pilot experiment was performed to enable the formation of a dispersion of isolated lipids in an aqueous medium. Subsequently, a dispersion of isolated lipids was prepared in an aqueous medium with the addition of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate. Aggregates were created by changing the pH from alkaline to acidic or by changing the temperature (cooling).

Aggregation induced by a change of pH led to insufficiently compact aggregates. The microstructure of these aggregates was studied by X-ray scattering.

X-ray scattering revealed that the presence of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate allows the formation of a long phase with a periodicity of ~ 13 nm even in a non-physiological environment (pH 7,4 and 8,5). Furthermore, other phases with periodicity of $\sim 5,8$ nm (at acidic and neutral pH) and ~ 9 nm (at neutral and alkaline pH) were found in the presence of Ca^{2+} cations and cholesteryl sulfate. At the same time, the structure of the lateral orthorhombic packing was maintained.

Obsah

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 STAVBA A FUNKCE KŮŽE	11
2.2 HYPODERMIS.....	12
2.3 DERMIS	12
2.4 EPIDERMIS	13
2.5 STRATUM CORNEUM – KOŽNÍ BARIÉRA	15
2.5.1 Struktura stratum corneum.....	15
2.6 USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ V EXTRACELULÁRNÍM PROSTORU	18
2.6.1 Lamelární uspořádání.....	18
2.6.2 Laterální uspořádání.....	18
2.7 CERAMIDY.....	20
2.7.1 Chemická struktura ceramidů	20
2.7.2 Názvosloví ceramidů.....	21
2.8 CHOLESTEROL	22
2.9 VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY.....	22
2.10 CHOLESTERYL SULFÁT	23
2.11 CA²⁺ KATIONTY V EPIDERMIS	24
2.12 VLIV CA²⁺ KATIONTŮ A CHOLESTERYL SULFÁTU NA USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ KOŽNÍ BARIÉRY	24
2.13 RENTGENOVÁ DIFRAKTOMETRIE	26
2.14 DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA.....	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 CHEMIKÁLIE, MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	28
3.2 IZOLACE LIPIDŮ Z LIDSKÉHO STRATUM CORNEUM	30
3.2.1 Oddělování epidermis z lidské kůže	30
3.2.2 Extrakce lipidů z vysušeného stratum corneum.....	30
3.2.3 Purifikace lipidů	30
3.2.4 Provedení HPTLC analýzy.....	32
3.3 PILOTNÍ EXPERIMENT	33
3.3.1 Příprava lipidového filmu ve zkumavkách	33

3.3.2 Příprava pufrů	33
3.3.3. Příprava vzorků k analýze pomocí metody dynamického rozptylu světla	35
3.4 EXPERIMENT Č. 1 S VYUŽITÍM TENKÝCH VRSTEV STRATUM CORNEUM	36
3.4.1 Saponifikace stratum corneum	36
3.4.2 Umístění vrstev stratum corneum do vialek a na stripovací náplasti	36
3.4.3 Příprava lipidového filmu s přidavkem cholesteryl sulfátu	36
3.4.4 Příprava pufrů o pH 5,5 a 8,5 a přidání Ca ²⁺ kationtů do pufrů	36
3.4.5 Přidání pufrů do zkumavek s lipidovým filmem	37
3.5 EXPERIMENT Č. 2 – OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO SPONTÁNNÍ USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ V PŘÍTOMNOSTI CA ²⁺ KATIONTŮ	39
3.5.1 Příprava pufru o pH 7,4	39
3.5.2 Příprava lipidového filmu ve zkumavkách	39
3.6 MĚŘENÍ ROZPTYLU RTG ZÁŘENÍ U VZORKŮ	41
3.6.1 Podmínky a parametry měření	41
3.6.2. Postup při vyhodnocování dat	41
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1 HPTLC ANALÝZA	44
4.1.1 Kvalitativní analýza	44
4.1.2 Zastoupení jednotlivých složek v analyzované směsi lipidů	46
4.2 PILOTNÍ EXPERIMENT	49
4.2.1 Analýza lipidových disperzí	49
4.2.2 Difraktogramy pilotního experimentu	51
4.3 AGREGACE LIPIDŮ A VZNIK USPOŘÁDANÝCH STRUKTUR – MODEL LIDSKÉ KOŽNÍ BARIÉRY	54
4.3.1 Experiment č. 1	54
4.3.2 Experiment č. 2 - optimalizace podmínek pro vznik disperze v přítomnosti Ca ²⁺ kationtů	59
4.3.3 Shrnutí výsledných uspořádaných struktur ve zvolených podmínkách	69
5. ZÁVĚR	72
6. SEZNAM ZKRATEK	74
7. LITERATURA	75

1. Úvod a cíl práce

Kůže představuje složitý a životně důležitý orgán lidského těla. Správná funkce kožní bariéry se odráží od stavby kůže, především její nejsvrchnější vrstvy – *stratum corneum* (SC), která je součástí *epidermis*. Hlavními složkami SC jsou korneocyty obklopené hydrofobní mezibuněčnou matrix, která obsahuje jedinečnou směs kožních lipidů. Tuto směs tvoří z 50 % ceramidy (Cer), z 25 % cholesterol (Chol), z 15 % volné mastné kyseliny (VMK) a zbytek několik dalších složek, např. cholesteryl sulfát (ChS) a další estery Chol. Tyto lipidy se seskupují do pravidelných struktur. Směs lipidů SC vytváří mezi korneocyty spojitou multilamelární vrstvu s dvěma fázemi – dlouhou fází s periodicitou okolo 13 nm a krátkou fází s periodicitou zhruba 6 nm. Laterálně, tedy v rovině lamely, zaujímají lipidy buď uspořádání fluidní (amorfni), hexagonální anebo orthorombické (husté, rigidní).

Z předešlých publikací je známo, že ChS a Ca^{2+} kationty vyskytující se napříč *epidermis* upravují mnoho fyziologických procesů a můžeme mezi ně zařadit i ovlivňování vlastností směsi lipidů v mezibuněčné matrix SC.

V této práci chceme sledovat vliv ChS a Ca^{2+} kationtů na chování složitěho modelu lidské kožní bariéry. Pro pozorování je důležité zjistit a optimalizovat podmínky, při kterých budou schopné složky (lipidy lidského SC, přídavek ChS a Ca^{2+} kationtů) mezi sebou interagovat. Naváže se tak na starší práce, ve kterých se studijní skupiny zabývaly přípravou liposomů z lipidů SC. Cílem této práce je pozorovat tvorbu uspořádaných struktur z izolovaných lipidů SC v přítomnosti přídavku ChS a Ca^{2+} kationtů a dále zkoumat, o jaké struktury se jedná.

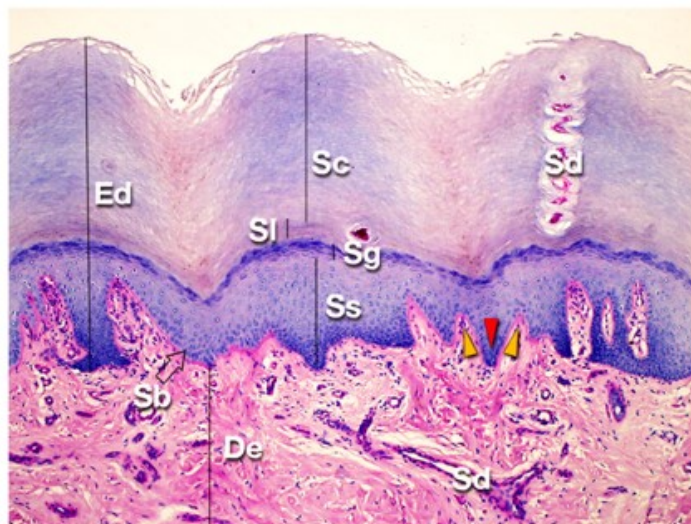
2. Teoretická část

2.1 Stavba a funkce kůže

Kůže, lat. *cutis*, řec. *derma*, je orgán tvořící zevní povrch lidského organismu. Nachází se na rozhraní vnějšího a vnitřního prostředí a představuje tak důležitý prvek homeostázy.^{1,2,3} Jedná se o jeden z nejtěžších a největších orgánů lidského těla, který tvoří zhruba 16 % celkové tělesné hmotnosti a zaujímá plochu 1,2-2,3 m².⁴

Kožní reliéf je členitý, různě hluboké rýhy a záhyby definují tzv. polygonální políčka. Na ploskách nohou a dlaních tvoří vrásky jemné paralelní lišty (dermatoglyfy), které jsou pro každého jedince unikátní a během života neměnné.^{2,5,6} Na různých krajinách těla nacházíme kůži v odlišné tloušťce, která může být od 0,5 mm do 4 mm.¹

Kromě ochranné funkce před chemickými (např. ve vodě rozpustné chemické látky), fyzikálními (např. UV záření, teplo a chlad) a mikrobiologickými vlivy zastává kůže další nepostradatelné funkce. Jedná se o funkci sekreční (tvorba mazu, potu, pigmentu melaninu a keratinu), metabolickou (přeměna provitaminu vlivem UV záření na vitamin D), regulační (řízení termoregulace), depotní (slouží např. jako rezervoár vody, krve, lipidů, glukózy anebo depo farmakologicky účinných látek) a senzorkou (přítomnost receptorů pro chlad, teplo, bolest nebo dotyk). Jelikož se zde nachází Langerhansovy buňky, makrofágy, mastocyty a další imunokompetentní buňky, představuje kůže i důležitý prvek imunitního systému člověka.^{2,5}



Obrázek 1. Histologická stavba kůže. Ed – epidermis, De – dermis, Sb – stratum basale, Ss – stratum spinosum, Sg – stratum granulosum, Sl – stratum lucidum, Sc – stratum corneum a Sd – vývod potní žlázy.⁶

Na kůži popisujeme 3 hlavní vrstvy, nejhluběji posazenou vrstvu – podkožní vazivo (*hypodermis, subcutis*), střední vrstvu – škáru (*dermis, corium*) a nejsvrchnější vrstvu – pokožku (*epidermis*).^{3,4} Jednotlivé vrstvy kůže lze pozorovat na obr. 1.

2.2 Hypodermis

Podkožní vazivo se nachází pod *dermis* a spojuje kůži s přilehlými strukturami, jako jsou svalové fascie nebo okostice. *Hypodermis* obsahuje řídké kolagenní vazivo a tukovou tkáň složenou z tukových buněk (adipocytů), které vytváří různě silnou vrstvu v závislosti na pohlaví, stavu výživy a anatomické lokalizaci. Tuková tkáň působí jako tepelný izolant, energetické depo a ochrana před nárazy.⁶

2.3 Dermis

Škára je vrstva lokalizovaná mezi *hypodermis* a *epidermis*. Má podpůrnou funkci a vyživuje *epidermis*.⁶ Obsahuje dvě hlavní vrstvy, které mezi sebou nemají zřetelnou hranici.⁴ Zevní tenká vrstva se nazývá *stratum papillare* a je tvořena řídkým kolagenním vazivem, které vybíhá v papily směřující k *epidermis*. Hluběji uloženou vrstvu představuje *stratum reticulare*, jenž obsahuje husté neuspořádané kolagenní vazivo.^{4,7}

V *dermis* nacházíme mnoho typů buněk s různými funkcemi. Nejčetnější jsou fibroblasty (produkují kolagen, elastin a glykosaminoglykany), histiocyty (vznikají z monocytů, do *dermis* se dostávají z krevního oběhu), makrofágy (enzymaticky aktivní formy histiocytů, mají schopnost fagocytózy a syntetizují cytokiny) a mastocyty (obsahují histamin, serotonin, heparin a mají hlavní úlohu při zánětlivých a alergických reakcích).^{2,5}

Škára má vláknitou strukturu a najdeme zde čtyři typy vláken – kolagenní, elastická, retikulínová a kotvící fibrily. Kolagenní vlákna jsou uspořádaná do vazivových snopců a udávají kůži pevnost, zatímco elastická vlákna tvoří síť a zodpovídají za pružnost kůže. Kolem cév, potních žláz a bazální membrány nacházíme jemná retikulínová vlákna. Kotvící fibrily vystupují ze *stratum papillare* a vážou *dermis* k *epidermis*.^{2,4,5}

V *dermis* rozlišujeme dva cévní plexy, které mezi sebou tvoří spojky – anastomózy. Najdeme zde i síť lymfatických cév, vlasové folikuly, mazové žlázy, volná nervová zakončení a speciální receptory. Buňky, vlákna a ostatní struktury spojuje v *dermis* amorfní mezibuněčná

matrix. Hlavní složkou této základní substance jsou kyselé mukopolysacharidy (kyselina hyaluronová) a glykosaminoglykany (dermatansulfát).^{5,7}

2.4 Epidermis

Epidermis je nejsvrchnější vrstva kůže a od *dermis* ji odděluje bazální membrána.⁴ Podle tloušťky *epidermis* dělíme kůži na dva typy – tlustý a tenký. Kůži tlustého typu nacházíme na dlaních a ploskách nohou a popisujeme na ní směrem od *dermis* zevně pět vrstev *epidermis* – *stratum basale* (SB), *stratum spinosum* (SS), *stratum granulosum* (SG), *stratum lucidum* (SL) a *stratum corneum* (SC). Tenký typ kůže pokrývá ostatní části těla a na rozdíl od tlustého typu kůže se zde vyskytují vlasové folikuly. V tenkém typu kůže není SL zřetelné, a proto zde popisujeme zbylé čtyři vrstvy.^{6,7}

Nejpočetnější epidermální buňky, keratinocyty, jsou uspořádané do vrstevnatého dlaždicového rohovějícího epitelu. Dále se v *epidermis* nachází melanocyty, Langerhansenovy buňky a Merkelovy buňky.^{1,3}

Stratum basale

Ve vrstvě SB jsou keratinocyty kubického až cylindrického tvaru. Buňky jsou mezi sebou spojeny pomocí desmozomů a hemidesmozomy je připojují k bazální membráně. Přítomné buňky jsou mitoticky aktivní a zajišťují zdroj keratinocytů pro další vrstvy *epidermis*. Směrem od SB totiž nově vzniklé řady buněk migrují do zevních vrstev a diferencují se (mění svůj tvar a buněčný obsah).^{3,6,7,8}

Ve SB a ve vlasových folikulech nacházíme systém pigmentových buněk, melanocytů. Melanocyty mají sférické tělo s několika výběžky, které prochází mezi keratinocyty ve vrstvách SB a SS.⁷ Melanocyty produkují a hromadí melanin v melanosomech. Finálním produktem jsou melaninová granula a pomocí výběžků melanocytů dochází k jejich přesunu do keratinocytů, kde ochraňují dělící se buňky před škodlivým UV zářením. Syntetizované množství melaninu a přesun melaninových granul do keratinocytů pak určuje stupeň zbarvení kůže.^{4,6}

Merkelovy buňky jsou ve SB a vlasových folikulech přítomné v malém počtu. Jedná se o mechanoreceptory s vysokou citlivostí na jemný dotyk.^{5,6}

Stratum spinosum

Keratinocyty ve SS mají polyedrický tvar, ostnatý povrch, tvoří několik řad a jsou spojené pomocí desmozomů. Spodní řady keratinocytů vykazují mitotickou aktivitu, zatímco řady keratinocytů umístěné blíže k povrchu se diferencují, oplošťují a obsahují větší množství cytokeratinových filament, které se seskupují do svazků a tvoří tonofibrily.^{4,6} Filamenta se připojují k desmozomům a pomáhají tak udržovat odolnost buněk a celé vrstvy proti oděru.^{4,7}

Ve SS jsou přítomné dendritické Langerhansovy buňky s původem z kostní dřeně a plní úlohu v prezentování antigenů buňkám imunitního systému.^{2,7}

Stratum granulosum

SG je tvořeno 1-5 řadami oploštěných polygonálních keratinocytů, které spojují desmozomy. Uvnitř buněk jsou uložena neohrazená keratohyalinová granula, jež obsahují *profilaggrin* a další proteiny bohaté na aminokyseliny cystein a histidin. *Profilaggrin* se v dalších vrstvách přeměňuje na *filaggrin*, a nakonec se ve SC rozkládá na volné aminokyseliny.^{2,5,9} V cytoplazmě buněk se dále nachází membránou ohraničená lamelární granula s obsahem cholesterolu, fosfolipidů, glukosylceramidů, sfingomyelinů a dalších látek. Lamelární granula vznikají aktivitou Golgiho aparátu keratinocytů a jejich obsah se pomocí exocytózy dostává do mezibuněčného prostoru SG, kde podléhá metabolickým změnám a působí jako bariéra proti ztrátám vody z organismu.^{6,7,9,10}

Stratum lucidum

Tato tenká vrstva *epidermis*, patrná v kůži tlustého typu, se vyznačuje 1-3 vrstvami značně oploštěných buněk. Buňky jsou spojeny pomocí desmozomů a jejich jádra i buněčné orgány nejsou téměř patrné. Keratohyalinová granula se přeměňují na keratin.^{4,5}

2.5 *Stratum corneum* – kožní bariéra

Nejsvrchnější vrstva *epidermis* sestává zhruba z 15-25 řad korneocytů, které spojují korneodesmozomy. Korneocyty jsou hexagonální, ploché, bezjaderné a keratinizované buňky obklopené mezibuněčnou hydrofobní lipidovou matrix. Představují finální stádium keratinocytů a celý proces diferenciaci keratinocytů v korneocyty trvá průměrně 4 týdny (na pokožce hlavy asi polovinu času).^{2,4,5,7,9,10}

Svrchní řady korneocytů SC, podléhající olupování neboli deskvamaci ve formě jemných šupinek, nazýváme *stratum disjunctum*. Deskvamace korneocytů probíhá na základě degradace korneodesmozomů pomocí proteáz. Spodní řady SC jsou kompaktnější, stále drží pevně u sebe a označujeme je jako *stratum conjunctum*.^{2,5,9}

Nejdůležitějšími fyziologickými funkcemi SC jsou ochrana organismu před působením škodlivých vlivů a ochrana před nadbytečnou ztrátou vody a elektrolytů.¹¹ Voda ve SC je klíčová pro vzhled, pružnost, celistvost a fyziologické funkce, protože se účastní enzymatických procesů, které jsou nezbytné např. pro deskvamaci. Při nedostatečné hydrataci SC totiž dochází k narušení procesu deskvamace a korneocyty se akumulují na povrchu kůže, což se projeví na pohled suchou a šupinatou pokožkou. Důležitou úlohu v udržování dostatečné hydratace mají nejen lipidy ve SC, ale i soubor látek přirozeného zvlhčujícího faktoru (NMF) obsaženého v korneocytech. Složky NMF působí jako humektanty a řadíme mezi ně aminokyseliny a jejich deriváty, např. degradační produkty epidermálního *filaggrinu*, tedy kyselinu urokanovou a kyselinu pyrrolidonkarboxylovou, dále také laktát, glycerol nebo močovinu.¹³

2.5.1 Struktura *stratum corneum*

Jak již bylo výše zmíněno, SC je tvořeno několika vrstvami korneocytů uložených v hydrofobní lipidové matrix.¹⁰ Tento systém se často znázorňuje nejjednodušším modelem SC, tedy modelem cihel a malty, kde právě „cihly“ představují korneocyty a „malta“ hydrofobní lipidová matrix organizovaná do lipidových lamel.^{11,12}

Korneocyty

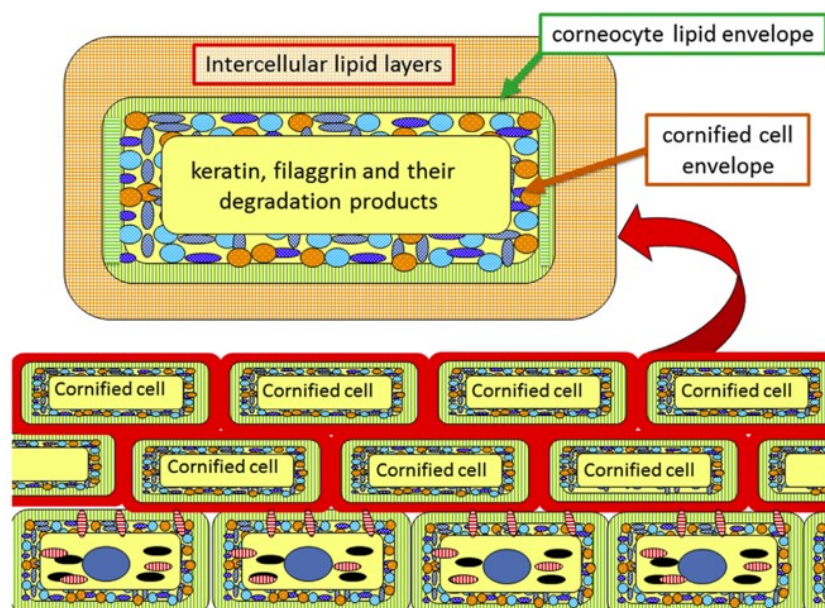
Korneocyty jsou vyplněny zejména vodou, NMF a cytoskeletálními keratinovými vlákny, která jsou prostřednictvím proteinu *filaggrinu* agregována do pevných svazků. Tento proces agregace vláken začíná již na úrovni SG v keratohyalinových granulích a vede k terminální změně

keratinocytů v korneocyty. Svazky keratinových vláken jsou v korneocytech z velké části uloženy paralelně s povrchem kůže, čímž je umožněn vznik oploštěných buněk.^{9,10,11,13}

Korneocytární lipidová obálka

Povrch každého korneocytu pokrývá korneocytární obálka (CE), která nahrazuje fosfolipidovou membránu. CE má dvě hlavní části a je připojena k cytoskeletu, tedy svazkům keratinových vláken. Cytoplazmatickou část obálky tvoří proteiny, jako jsou *involucrin*, *loricrin*, *cystatin A*, *periplakin*, *envoplakin* a další, zesíťované Ca^{2+} dependentní transglutaminázou I.^{11,14,16} Periferní část CE je lipidového charakteru a nazývá se korneocytární lipidová obálka (CLE). Jedná se o lipidovou monovrstvu složenou z Cer a mastných kyselin (MK) s ultradlouhými řetězci, konkrétně z ω -hydroxy-Cer a ω -hydroxy-MK. Substráty pro kovalentní připojení CLE k proteinové části představují *involucrin*, *envoplakin* a *periplakin*. Jedná se o vazbu ω -hydroxylových skupin Cer a MK obsažených v CLE s glutamátovými zbytky proteinů. Předpokládá se, že toto spojení vzniká aktivitou Ca^{2+} dependentní transglutaminázy I.^{10,15,16} Schéma CE je popsáno na obr. 2.

Prekurzorem ω -hydroxy-cer jsou pravděpodobně glukosylceramidy pocházející z lamelárních granúl SG.¹⁷ Dále se předpokládá, že CLE je nejen důležitá pro soudržnost SC a zabránění nadměrné ztrátě vody, ale i pro uspořádání lipidů v lipidových lamelách mezi korneocyty.¹⁵



Obrázek 2. Schéma uspořádání korneocytů s korneocytární obálkou v mezibuněčné matrix. Obsah korneocytů, CE, CLE i mezibuněčná lipidová matrix se podílí na funkci kožní bariéry.¹⁶

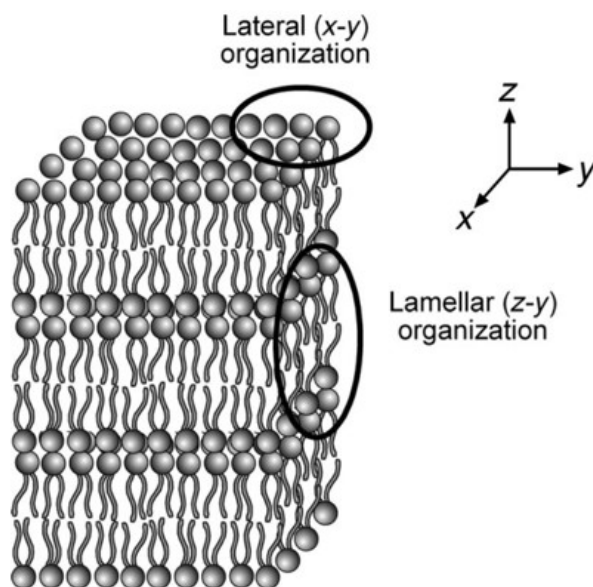
Extracelulární lipidová matrix

V mezibuněčné matrix SC se nachází unikátní směs lipidů, která se liší od směsi lipidů tvořící většinu biologických membrán. Z celkové hmotnosti lipidů SC tvoří zhruba 45-50 % Cer, 25 % Chol, 10-15 % VMK a 5 % několik dalších složek, z nichž je nejvýraznější ChS a další estery Chol.^{18,19} Prekurzory těchto nepolárních lipidů jsou polární lipidy s původem z lamelárních granul SG. Jak již bylo výše zmíněno, obsah lamelárních granul (fosfolipidy, glukosylceramidy, sfingomyeliny, Chol, enzymy a další složky) se uvolňuje do mezibuněčného prostoru exocytózou a následně tento obsah podléhá enzymatickým změnám.^{9,20}

2.6 Uspořádání lipidů v extracelulárním prostoru

2.6.1 Lamelární uspořádání

Po vzniku příslušných Cer, Chol, VMK a dalších složek dochází v mezibuněčném prostoru k tvorbě spojitě multilamelární vrstvy, která je charakteristická právě pro SC.²¹ Směs lipidů v jednotlivých lamelách je uspořádána do dvou krystalických koexistujících lamelárních fází, které označujeme jako fázi s dlouhou periodicitou (LPP) s opakovací vzdáleností zhruba 13 nm a fázi s krátkou periodicitou (SPP) s opakovací vzdáleností zhruba 6 nm. Pro tvorbu LPP je nezbytná přítomnost acylceramidů (EO Cer) v určitém množství. Během experimentů *in vitro* se zjistilo, že při nadbytku EO Cer je snížena tvorba SPP a při nedostatku EO Cer je naopak snížena tvorba LPP.^{22,23,24,25} Dále byla identifikována i oddělená část Chol, která není do tvorby LPP nebo SPP zapojena a je součástí fáze s opakovací vzdáleností zhruba 3,4 nm.²⁶ Na obr. 3 je znázorněn rozdíl mezi lamelárním a laterálním uspořádáním.

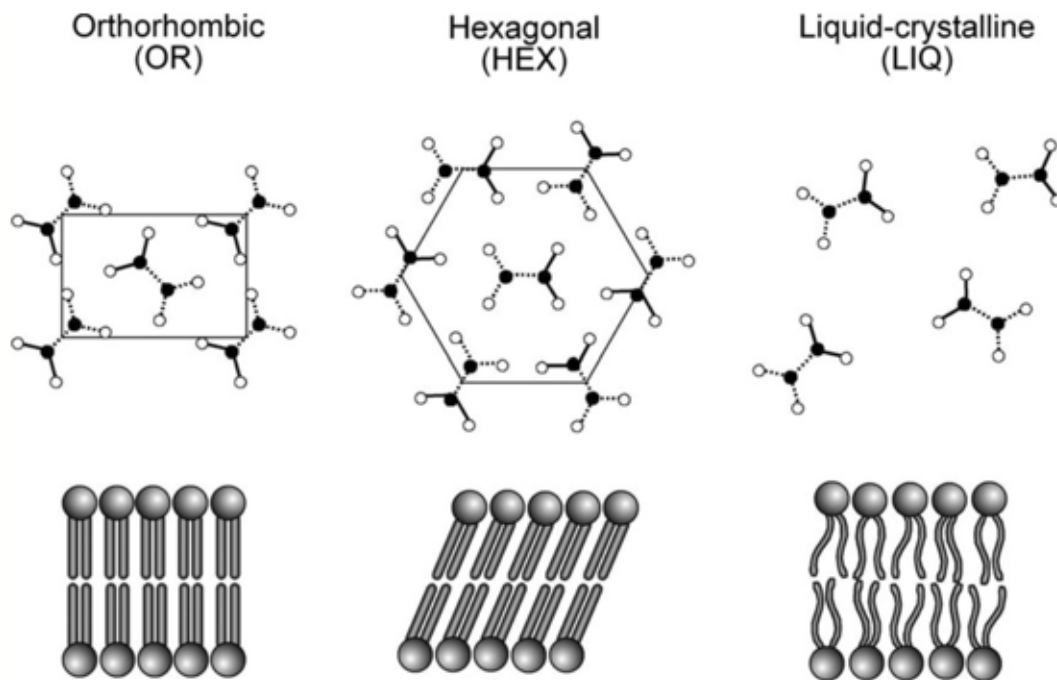


Obrázek 3. Schéma lamelárního a laterálního uspořádání molekul lipidů ve SC.²⁵

2.6.2 Laterální uspořádání

V rovině jednotlivých lamel mohou molekuly lipidů zaujmout 3 typy uspořádání – orthorombické, hexagonální anebo fluidní (obr. 4). Ve zdravém SC převládá nejhustší a nejméně propustné orthorombické uspořádání, ve kterém zaujímají řetězce molekul *all-trans* konformaci a nemohou se volně pohybovat okolo své osy. Vzdálenost řetězců ve směru *x* a *y* se liší, na difrakčním obrazci jsou typické 2 silné reflexe poskytující meziorovinné vzdálenosti 0,37 nm a 0,41 nm. V hexagonálním uspořádání je ve směru *x* a *y* vzdálenost molekul totožná, v difrakčním

obrazci pozorujeme dominantní pík odpovídající mezivinné vzdálenosti 0,41 nm. Řetězce molekul zaujímají zejména *all-trans* konformaci a mohou se volně otáčet kolem své osy. Toto uspořádání se označuje jako gelová fáze a je propustnější než orthorombické. Nejvíce permeabilní a nejméně husté je uspořádání fluidní, označované jako kapalná fáze. Zde lze u řetězců pozorovat vysoký stupeň *gauche* izomerace a řetězce mají možnost rotačního i translačního pohybu.^{8,25,27}



Obrázek 4. Typy laterálního uspořádání molekul lipidů ve SC. Zleva orthorombické, hexagonální a fluidní.²⁵

2.7 Ceramidy

Cer se řadí do rodiny sfingolipidů a jsou nejen důležitou součástí biologických membrán a funkční kožní bariéry, ale jsou klíčové i pro další fyziologické funkce. Intracelulárně se účastní buněčné signalizace, které vede např. k zastavení růstu buněk, diferenciaci buněk, apoptóze buněk nebo imunitní odpovědi.^{24,28} Ve většině lidských tkání se Cer vyskytují spíše minoritně, zatímco ve SC tvoří hmotnostně zhruba polovinu všech přítomných lipidů. V lidském SC nacházíme velice složité Cer, které mohou být volné, anebo vázané na proteiny v CE.^{10,28,29}

2.7.1 Chemická struktura ceramidů

Chemicky se jedná o molekuly obsahující sfingoidní bázi navázanou prostřednictvím amidové vazby na acyl MK.³⁰ Délky uhlovodíkových řetězců sfingoidních bází i acylových zbytků jsou různorodé, nejběžnější jsou však délky 18-22 uhlíkových atomů pro řetězce sfingoidní bází, 24-26 atomů uhlíku pro velmi dlouhé acylové zbytky MK a 30-32 atomů uhlíku pro ultradlouhé acylové zbytky MK.^{24,25} Acylové zbytky MK mohou navíc vykazovat různý stupeň nasycení, různou míru hydroxylace anebo rozdílné rozvětvení uhlovodíkového řetězce. Tyto rozdíly vedou k pestré biologické rozmanitosti epidermálních Cer, nejčastěji se však jedná o nasycené, nerozvětvené a velice dlouhé uhlovodíkové řetězce.^{24,29}

Sfingoidní báze

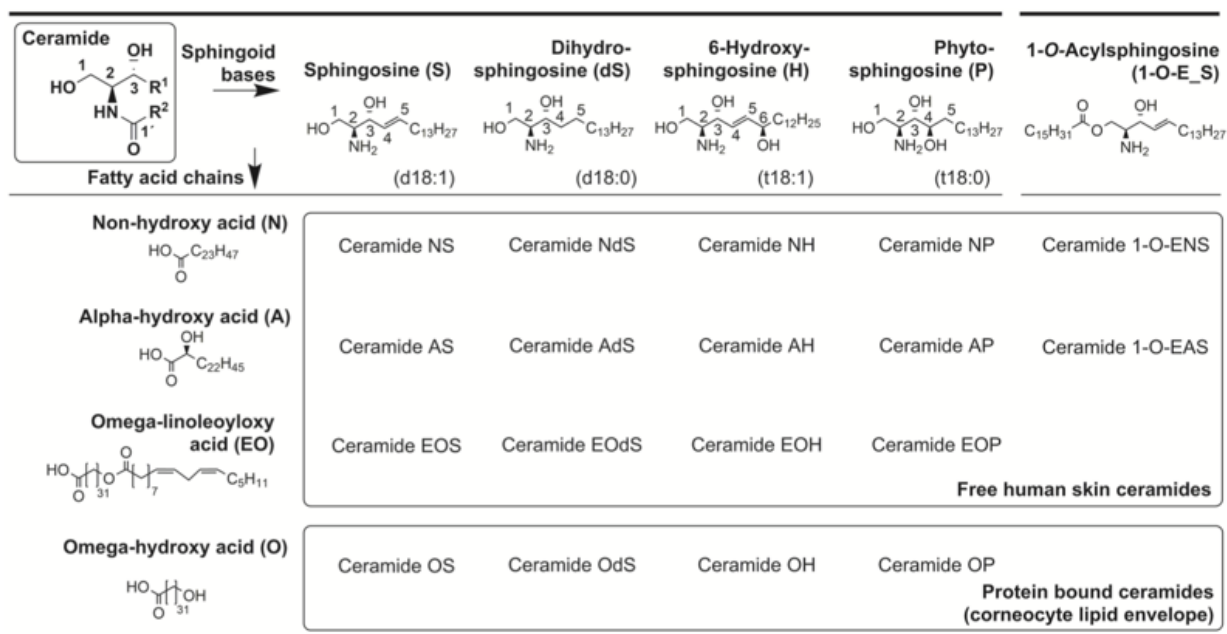
Sfingoidní báze jsou aminoalkoholy s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem a řadí se mezi ně hlavně sfingosin (S), 6-hydroxysfingosin (H), dihydroxfingosin (dS), fytosfingosin (P) a také dihydroxysfinganin (T). SC obsahuje i volné sfingoidní báze, hlavně S, dS a H.^{21,25,29}

Zbytek mastné kyseliny

Acylový řetězec může být nesubstituovaný (N), α -hydroxylovaný (A) anebo ω -hydroxylovaný (O).^{27,29} Dále jsou některé Cer běžně označovány jako acylceramidy (EO), protože na ω -hydroxy skupinu acylového zbytku MK je esterově navázaná kyselina linolová nebo glutamátové zbytky proteinů CE.^{24,31} Nejpozději objevená třída Cer se vyznačuje esterově vázaným acylovým zbytkem na hydroxyl sfingoidní báze v poloze 1 (1-O-acylceramidy) a mají tedy v molekule celkem 3 uhlovodíkové řetězce.^{24,29}

2.7.2 Názvosloví ceramidů

Běžně užívaný systém pro označení názvů Cer byl prvně uvedený Mottou. Jedná se o přehledný systém, ve kterém se spojují výše uvedené písmenkové zkratky sfingoidní báze a acylu MK.³² Příklady názvů jsou na obr. 5.



Obrázek 5. Princip tvorby názvů ceramidů.²⁴

2.8 Cholesterol

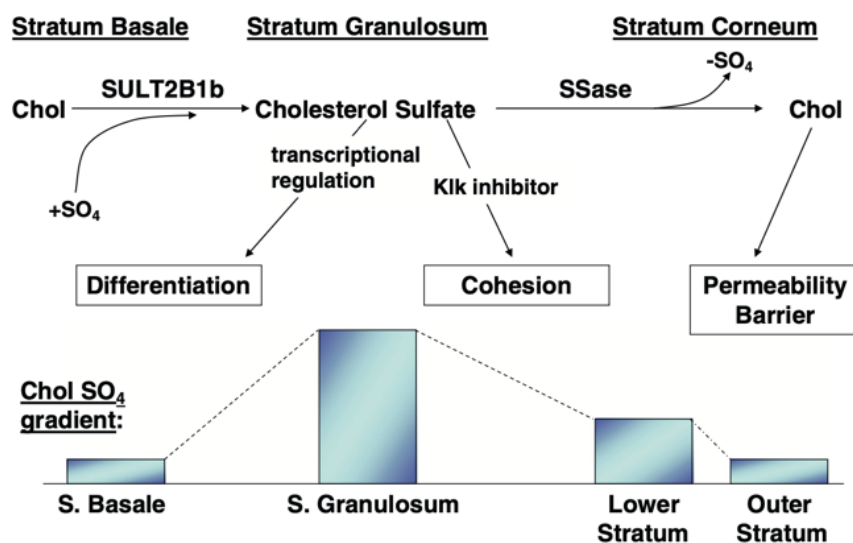
Chol je lipid obsažený ve všech buněčných membránách, ve kterých je důležitý hlavně pro udržení pevnosti (rigidity), tekutosti (fluidity) a orientaci lipidů. Ve SC představuje Chol nejvíce zastoupený individuální lipid a v dostupné literatuře převažují důkazy o nutnosti jeho přítomnosti pro vznik LPP a SPP. Dále přítomnost Chol ve SC přispívá k tvorbě hustého orthorombického laterálního uspořádání lipidů, a tím je nezbytný pro správnou funkci kožní bariéry.^{33,34,35}

2.9 Volné mastné kyseliny

Vedle Cer, Chol a ChS jsou VMK další nepostradatelnou složkou lipidové matrix. Převážně se jedná o nasycené a nerozvětvené MK, jejichž uhlovodíkový řetězec může obsahovat 12-30 atomů uhlíku. Příkladem může být kyselina palmitová (C16:0), kyselina stearová (C18:0), kyselina behenová (C22:0), kyselina lignocerová (C24:0) nebo kyselina hexakosanová (C26:0). V menším množství ve SC najdeme i mononenasycené a polynenasycené VMK, např. kyselinu olejovou (C18:1, n-9), kyselinu eikosapentaenovou (C20:5, n-3) nebo kyselinu linolovou (C18:2, n-6).^{34,35} VMK způsobují na povrchu SC kyselé pH okolo 4-5,5 a jsou spolu s ChS jediné lipidy, které mají při vyšším pH ionizovatelnou skupinu, a proto je pravděpodobně jejich přítomnost důležitá pro tvorbu lipidových lamel.¹²

2.10 Cholesteryl sulfát

ChS je nejvíce zastoupený ester Chol, který tvoří zhruba 2-5 % všech lipidů SC. Na úrovni SB a SS dochází k syntéze ChS z Chol pomocí sulfotransferázy (SULT2B1b), která zároveň hladinu ChS v *epidermis* reguluje. Nejvyšší hladiny dosahuje ChS ve SG a směrem ke SC následně hladina klesá, protože při přechodu ze SG do SC dochází za účasti steroidní sulfatázy k odbourávání ChS zpět na Chol. V *epidermis* tedy existuje určitý gradient ChS a přeměna Chol – ChS – Chol se označuje za tzv. cholesterol sulfátový cyklus, viz obr. 6.^{35,36,37,38,41}



Obrázek 6. Schéma výskytu a metabolismu ChS v epidermis.⁴¹

ChS se účastní procesu diferenciaci keratinocytů a podílí se na soudržnosti SC. Vývoj keratinocytů ovlivňuje zvýšením exprese *involucrinu*, časného markeru diferenciaci keratinocytů. Taktéž indukuje transkripci genu pro transglutaminázu I, enzymu nutného k zesílení proteinů v CE. Dále se ukázalo, že ovlivňuje proces deskvamace inhibicí serinových proteáz, které jsou zodpovědné za degradaci korneodesmozomů.^{10,35,36,38,39,40}

Delece v genu přítomného na chromozomu X, zodpovědného za syntézu steroidní sulfatázy, způsobuje X-vázanou recesivní ichthyózu.⁴¹ Kvůli nedostatku steroidní sulfatázy se ve SC hromadí ChS, ale obsah Chol je snížen. Nahromaděný ChS může narušovat fyziologickou deskvamaci již zmíněnou inhibicí serinových proteáz a dále stabilizací lamelárních fází v hlubokých vrstvách SC, což se pak projeví přítomností velkých suchých šupin na pokožce.^{10,41,42}

2.11 Ca²⁺ kationty v *epidermis*

V *epidermis* jsou Ca²⁺ kationty nepostradatelnou složkou, protože se účastní hned několika fyziologických procesů, jako je extracelulární signalizace anebo bariérová funkce. V *epidermis* se nachází tzv. kalciový gradient. Množství Ca²⁺ kationtů stoupá směrem od SB a nejvyšší hladiny dosahují Ca²⁺ kationty v okolí keratinocytů ve SG. Ve SC pak hladina Ca²⁺ kationtů znatelně klesá.^{10,42} Při poškození kožní bariéry dochází ke zvýšenému přesunu vody a Ca²⁺ kationtů směrem ze SG do SC. Snížená koncentrace Ca²⁺ kationtů v SG pak indukuje sekreci lamelárních granul do extracelulárního prostoru a je zahájena reparace kožní bariéry. Reparační proces však pravděpodobně ovlivňují i další látky, např. K⁺ kationty nebo cytokiny. Dále se Ca²⁺ kationty podílí na regulaci syntézy proteinů CE (např. *filaggrinu* a *loricrinu*), jsou důležité pro diferenciaci keratinocytů, deskvamaci a adhezi mezi buňkami.^{10,18,42} Distribuce a hladiny Ca²⁺ kationtů se v *epidermis* mění v závislosti na věku, což koreluje se změnami ve složení CE u starších osob (snížená exprese *filaggrinu* a *loricrinu*).¹⁴

2.12 Vliv Ca²⁺ kationtů a cholesteryl sulfátu na uspořádání lipidů kožní bariéry

Napříč *epidermis* existuje velmi podobný gradient pro ChS a pro Ca²⁺ kationty. Kombinace jejich účinků moduluje vlastnosti lipidové matrix, konkrétně mísitelnost a uspořádání lipidů v lamelách.^{42,43}

Pomocí rentgenové (RTG) difrakce se zjistilo, že v ekvimolární směsi Chol : Cer : VMK zvyšuje ChS solubilitu Chol a snižuje tvorbu krystalických domén. K tomu nejspíše dochází vlivem elektrostatických repulzních sil mezi nabitými sulfátovými skupinami a vzniká tak více fluidní uspořádání. To znamená nižší hustotu molekul lipidů v mřížce a možnost většího pohybu řetězců molekul. Zvýšená fluidita v uspořádání lipidů byla detekována u pacientů s X-vázanou ichtyózou, u kterých je přítomný právě nadbytek ChS ve SC. Naopak nepřítomnost ChS v ekvimolární směsi Chol : Cer : VMK vede k orthorombickému uspořádání v lamelách. Snížená fluidita by mohla způsobovat nižší elasticitu lipidových fází, bránit vzniku lamel okolo korneocytů, snižovat soudržnost mezi korneocyty a podpořit tak proces deskvamace. Přítomnost vyšších hladin ChS v hlubších vrstvách *epidermis* nejspíše zvyšuje pohyblivost lipidů a stabilizuje lamelární fáze, v povrchových vrstvách pak snížená hladina ChS vede k fyziologické deskvamaci destabilizací lamelárního uspořádání a snadnější degradací korneodesmózomů.⁴⁴

Dále bylo zjištěno, že v ekvimolární směsi Chol : Cer : VMK s přídavkem ChS podporuje přítomnost Ca^{2+} kationtů vznik separovaných krystalických fází Chol a vykazuje tím protichůdný účinek vůči ChS. Ca^{2+} kationty nejspíše snižují hustotu povrchového náboje sulfátové skupiny anebo disociovaných VMK, čímž se snižují elektrostatické repulzní síly a udrží se vyšší hustota lipidů v mřížce.⁴⁴

2.13 Rentgenová difraktometrie

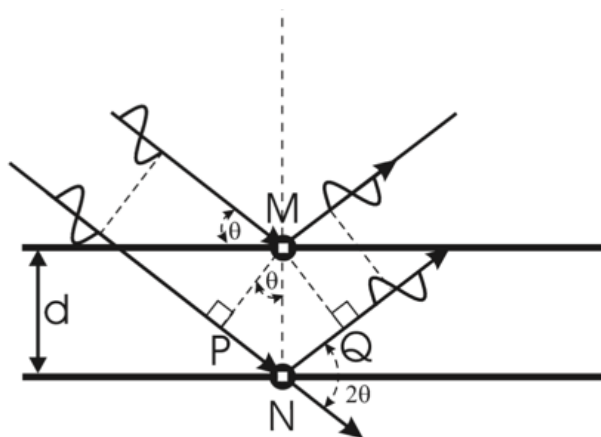
Vliv Ca^{2+} kationtů a ChS na uspořádání lipidů SC byl analyzován metodou SAXS (angl. small angle X-ray scattering) a WAXS (angl. wide angle X-ray scattering). Měření SAXS, tedy s malým úhlem dopadu RTG záření, poskytuje informace o vzdálenosti opakujících se lamelárních fází. Informace o laterálním uspořádání lze získat pomocí WAXS, měřením s větším úhlem dopadu RTG záření.²⁷

Na obr. 7 lze pozorovat, že při dopadu RTG záření pod úhlem θ na vzorek s pravidelnou strukturou s obsahem rovnoběžných rovin dochází k difrakci (ohybu) a pružnému rozptylu. Lipidy se pak stávají zdrojem elektromagnetického záření, kdy vlnová délka λ dopadajícího a difraktovaného záření je totožná. RTG paprsky se zrcadlově odrážejí od povrchu jednotlivých rovin. Pokud je dráhový rozdíl RTG paprsků totožný s vlnovou délkou λ nebo s celočíselným násobkem vlnové délky λ , může dojít k interferenci těchto paprsků a vzniká difrakční obrazec. Tento jev vyjadřuje Braggova rovnice (1):

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

ve které d je mezivinná vzdálenost (vzdálenost mezi sousedními atomovými rovinami, v tomto případě vzdálenost mezi lipidovými lamelami), θ značí difrakční úhel (úhel dopadu záření na rovinu struktury), n je řád reflexe a λ je vlnová délka dopadajícího a difraktovaného záření.^{43,45,46}

Obrázek 7. Schéma Braggova zákona. Z obrázku lze vyčíst, že druhá vlna urazí delší vzdálenost – vzdálenost PN (před tím, než dojde k odrazu) a vzdálenost NQ (po odrazu).⁴⁵



2.14 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. dynamic light scattering) je metoda, kterou lze charakterizovat velikost částic v disperzní soustavě. Na částicích v disperzi dochází k rozptylu světla z laserového zdroje, avšak intenzita rozptýleného světla kolísá v důsledku Brownova pohybu částic v disperzi. Rozptýlené světlo je zachyceno fotodetektozem. Analýza fluktuace intenzity rozptýleného světla přímo souvisí s rychlostí Brownova pohybu a lze tak odvodit velikost částic v disperzi. Pro výpočet velikosti částic platí Stokesův-Einsteinův vztah (2):

$$d(H) = kT/3\pi\eta D \quad (2)$$

ve kterém $d(H)$ značí hydrodynamický průměr částice, k Boltzmannovu konstantu, T absolutní teplotu, η viskozitu a D je translační difúzní koeficient.⁴⁷

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie, materiály a přístroje

Použitá rozpouštědla a chemikálie byly v HPLC nebo analytické čistotě a spolu s dalšími materiály byly zakoupeny od několika firem. Mořský písek na kolonovou chromatografii, aceton a kyselina octová 99% byly zakoupené od firmy Lach-ner (Neratovice, Česká republika). Octan sodný, H_3BO_3 a CaCl_2 byly získané od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Etanol 96%, chloroform, H_3PO_4 , NaOH a HCl 35% byly zakoupené od firmy Penta Chemicals (Praha, Česká republika). Cholesterol, cholesteryl sulfát, kyselina lignocerová, trypsin, složky detekčního činidla pro tenkovrstvou chromatografii (H_2SO_4 , $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ a $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$) a složky detekčního činidla pro vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografii ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 85%, CH_3OH) byly použity od firmy Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo). Ceramid AP byl zakoupen od firmy Avanti Polar Lipids (Birmingham, Alabama, USA), ceramid EOS byl syntetizován na Katedře organické a bioorganické chemie. Od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo) byl použit hexan, silikagel 60 na kolonovou chromatografii, deska na tenkovrstvou chromatografii TLC Silica gel 60 F₂₅₄ a skleněná deska na vysoce účinnou tenkovrstvou chromatografii HPTLC Silica gel 60 s rozměrem 20 x 10 cm. Použitý membránový polyamidový filtr s velikostí pórů 0,45 μm a průměrem 47 mm byl od výrobce Whatman (Maidstone, Kent, USA). Stripovací náplasti D-Squame byly použity od firmy Cuderm Corporation (Dallas, Texas, USA). Křemenné a borosilikátové kapiláry o tloušťce 1,5 a 2 mm pro rozptyl RTG záření byly od firmy WJM-Glas Müller GmbH (Berlín, Německo). Také byl využit systém Millipore Q pro získání ultračisté, destilované, filtrované a deionizované vody od firmy Merck Millipore (Billerica, MA, USA). Na zmrazování vzorků byl použit tekutý dusík od firmy Linde Gas.

Pufr, který byl použit při oddělování *epidermis* byl připraven z PBS tablet od firmy Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo). Pufr použitý pro přípravu finálních vzorků byl připraven z Hepes (kyselina *N*'-2-hydroxyethylpiperazin-*N*'-2 ethansulfonová), minimum 99,5% titration od firmy Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo).

K získání *epidermis* se použila lidská kůže celkem od 6 subjektů (muž 28 let, 2 ženy 41 let, 2 ženy 48 let a žena bez známého roku narození). Kůže byly získané z oblasti břicha nebo prsou od pacientů po zákrocích ze Sanatoria Sanus v Hradci Králové.

Na měření pH pufrů byl použit pH metr od firmy Hanna Instruments (Woonsocket, Rhode Island, USA) a později novější pH metr SevenCompact od firmy Mettler Toledo (Švýcarsko).

Pro nástřik vzorku a standardu na skleněnou desku pro vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografii (HPTLC) byl použit Linomat 5 (Camag, MuttENZ, Švýcarsko), na kvantitativní analýzu lipidů pak automatická vertikální vyvíjecí komora (Camag, MuttENZ, Švýcarsko).

Na odpaření rozpouštědel byla použita rotační vakuová odparka od výrobce Heidolph Instruments GmbH & Co. (Schwabach, Německo). Dále byl využíván vakuový exsikátor s obsahem P₂O₅ a parafínu.

Pro stanovení velikosti lipidových částic byl použit přístroj Zetasizer Nano Series od firmy Malvern Panalytical (Malvern, Velká Británie) a měření se provedlo na Katedře farmaceutické technologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Analýza vzorků proběhla na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze pomocí metody měření RTG rozptylu, za pomoci přístroje Rigaku Micromax-003 (Rigaku, Japonsko) a detektoru Pilatus3 300K (Dectris, Švýcarsko).

3.2 Izolace lipidů z lidského *stratum corneum*

3.2.1 Oddělování *epidermis* z lidské kůže

Při laboratorní teplotě se nechaly rozmrazit vzorky kůže. Skvrny od lihového fixu a zbytky kožního mazu byly odstraněny pomocí gázy s acetonem.

Připravila se vodní lázeň s destilovanou vodou. Lázeň byla temperovaná na 60 °C, teplota se monitorovala pomocí laboratorního teploměru. Připravené vzorky kůže se postupně ve vodní lázni spařily a poté se pomocí pinzety *epidermis* oddělila a vložila do Petriho misky s PBS pufrem o pH 7,4. Petriho misky se uložily do lednice a druhý den se vložily do termostátované trouby na dobu 24 hodin při 32 °C s 0,5% roztokem trypsinu.

Po inkubaci se pomocí vatových tyčinek vzorky SC očistily od ostatních vrstev *epidermis* a potom se opláchly v PBS pufru o pH 7,4 a nakonec v acetonu. Takto očištěné vzorky SC se pokládaly do čistých Petriho misek a nechaly se vysušit v exsikátoru po dobu 24 hodin. Po vysušení se SC uložilo do mrazáku.

3.2.2 Extrakce lipidů z vysušeného *stratum corneum*

Extrakce lipidů byla provedena v Erlenmeyerově baňce na míchačce bez zahřívání. Vysušené vzorky SC se zvažily, získalo se 1,0987 g. Zvažila se i suchá čistá destilační baňka s kulatým dnem, která vážila 184,2 g. Do Erlenmeyerovy baňky se přidaly vysušené vzorky SC a 150 ml směsi hexanu a etanolu 96% v poměru 2 : 1 (v/v). Dále se do baňky umístilo magnetické míchadlo a 2 hodiny se směs nechala míchat na míchačce v digestoři. Přes gázu se extrakt zfiltraval a přenesl do destilační baňky, která se pak připojila na vakuovou odparku a rozpouštědlo se nechalo odpařit. Oddělená *epidermis* se přenesla do další Erlenmeyerovy baňky, přidala se směs hexanu a etanolu 96% v poměru 1 : 1 (v/v). Směs se znovu nechala míchat 2 hodiny na míchačce v digestoři. Druhý extrakt se zfiltraval přes gázu, spojil se s prvním extraktem a umístil na vakuovou odparku odpařit. Zbývá *epidermis* a izolované lipidy se nechaly vysušit v exsikátoru a následně byly uloženy do mrazáku. Celkem jsme z našich vzorků SC izolovaly 414 mg extraktu.

3.2.3 Purifikace lipidů

Purifikaci se podrobilo celkem 414 mg získaných lipidů. Purifikace lipidů byla provedena sloupcovou chromatografií.

Postup sloupcové chromatografie

Nejdříve se sestavila aparatura na provedení sloupcové chromatografie. Připravený sloupec se naplnil stacionární fází – silikagelem. Dále se 414 mg lipidů rozpustilo ve 100 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v) a přidalo se k nim 1,6 g silikagelu, což je čtyřnásobek hmotnosti lipidů. Směs se nechala odpařit na vakuové odparce, kdy došlo k vysušení lipidů a adsorpci na silikagel. Vysušená směs se pak navrstvila na stacionární fází, a nakonec se přidala tenká vrstva mořského písku.

První mobilní fází tvořila kyselina octová 0,1% v chloroformu, druhou mobilní fází tvořila směs chloroformu a metanolu v poměru 10 : 1 (v/v) a byla použita až po odebrání 18. frakce. Sloupec nesmí nikdy vyschnout, proto se mobilní fáze neustále doplňovala a pod sloupcem se postupně odebíraly jednotlivé frakce. Celkem se odebralo 30 frakcí.

Postup tenkovrstvé chromatografie

Odebrané frakce se podrobily tenkovrstvé chromatografii (TLC), aby se zjistilo, kde se nachází nečistoty. Použilo se několik standardů – Chol, lignocerová kyselina (Lig), Cer AP a Cer EOS. Standardy měly koncentraci 1 mg/ml a připravily se rozpuštěním 0,002 g dané látky ve 2 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v). Mobilní fáze použitá pro TLC byla směs chloroformu, metanolu a etanolu v poměru 95 : 4,5 : 0,75 (v/v/v). Stacionární fází tvořila deska TLC Silica gel 60 F₂₅₄.

Připravilo se několik malých destiček, na které se nanosily standardy a průběžně odebrané vzorky z jednotlivých frakcí. Připravené destičky se vyvíjely v komoře nasycené mobilní fází. Poté se destičky ponořily v detekčním činidle připraveném na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Činidlo bylo připraveno z 1g Ce(SO₄)₂, 2g H₃[P(Mo₃O₁₀)₄], 5 ml H₂SO₄ a 100 ml H₂O. Destičky se pak vysušily teplým vzduchem, čímž se aktivovalo činidlo a vizuálně se detekovaly nanosené vzorky a standardy.

Pomocí TLC se zjistilo, že frakce č. 1-9 obsahuje nečistoty a frakce č. 10 obsahuje Chol a nečistoty. Frakce č. 11-30 se kvantitativně spojily do jedné baňky, která se umístila na vakuovou odparku a rozpouštědla se nechala odpařit. Poté byly lipidy umístěny do exsikátoru na dosušení a následně byly skladovány v mrazáku.

3.2.4 Provedení HPTLC analýzy

Připravila se mobilní fáze, kterou tvořil chloroform a metanol v poměru 2 : 1 (v/v), skleněná HPTLC deska se promyla touto mobilní fází v horizontální komoře. Horizontální komora se nejdříve pomocí vodováhy vyrovnala, potom se do velkého prostoru a do menšího žlábků nalila mobilní fáze. Deska se vložila silikagelovou vrstvou směrem dolů do komory a nechala se 15 minut nasytit. Poté se posunula přepážka ve žlábků a deska se nechala promýt mobilní fází. Deska se vyndala a uložila do papíru.

Navázilo se 1,1 mg lipidů, které se rozpustily v 1 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v). Dále se použil standard s předpokládaným spektrem látek na kalibraci HPTLC analýzy. Standard byl připravený na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a obsahoval Chol, ChS, Lig, palmitovou kyselinu (Pal) a Cer (NP, AS, AP, NS, EOS a EOP).

Připravená HPTLC deska se umístila do Linomatu 5 a přístroj na desku nastříkl vzorek s izolovanými lipidy a kalibrační směs. Počet drah a objem nanášeného vzorku a kalibrační směsi se nastavilo předem v programu VisionCATS. HPTLC deska se po nastříknutí nechala vysušit a pak se umístila do automatické vertikální komory s mobilní fází složenou z chloroformu, metanolu a kyseliny octové v poměru 95 : 4,5 : 0,75 (v/v/v). Komora se automaticky nasýtla za 20 minut, poté probíhalo vyvíjení.

Po dokončení vyvíjení se deska vyndala z komory a ponořila se do detekčního činidla připraveného na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, tvořeného ze 126 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 76 ml H_3PO_4 85%, 40 ml CH_3OH a 684 ml H_2O . Deska se vložila na 20 minut do předem vyhřáté trouby na 160 °C. Vypálená deska byla vyhodnocena v přístroji TLC scanner 3 denzitometricky a poté manuálně v programu VisionCATS.

3.3 Pilotní experiment

3.3.1 Příprava lipidového filmu ve zkumavkách

Použité lipidy pro pilotní experiment byly izolovány 22.4.2020 na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy totožným způsobem popsáním v kapitole 3.2. Navážilo se 12,32 mg izolovaných lipidů do vialky a rozpustily se ve 3 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v). Vzaly se 3 zkumavky a do každé se přeneslo 0,5 ml rozpuštěných lipidů, to odpovídá obsahu 2 mg lipidů v každé zkumavce. Zkumavky se umístily pod proud dusíku a neustálým otáčením zkumavek se vytvořil tenký lipidový film. Takto připravené zkumavky s lipidovým filmem se nechaly dosušit ve vakuovém exsikátoru nad P₂O₅ a parafínem a poté byly uskladněny v mrazáku.

3.3.2 Příprava pufrů

Příprava univerzálního pufru

Připravil se 1 l základního pufru dle H.T.S. Brittona a R.A.Robinsona⁵⁶ s obsahem 0,04 M H₃PO₄, 0,04 M CH₃COOH a 0,04 M H₃BO₃ a také se připravil 1 l 0,2 M roztoku NaOH.

Nejdříve se provedl výpočet množství surovin na přípravu 1 l základního pufru a 1 l roztoku NaOH, poté proběhla samotná příprava pufru a roztoku NaOH rozpuštěním látek v ultračisté vodě. Pufr byl přefiltrován přes membránový polyamidový filtr.

Výpočet

$$M = c \times V \times M$$

- H₃BO₃ (M.v. = 61,84)

$$m(\text{H}_3\text{BO}_3) = 0,04 \times 1 \times 61,84 = 2,47 \text{ g}$$

- CH₃COOH 99% (M.v. = 60,05; 1 l odpovídá 1,05 kg)

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,04 \times 1 \times 60,05 = 2,40 \text{ g CH}_3\text{COOH 100\%}$$

$$m(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{2,4 \times 100}{99} = 2,43 \text{ g CH}_3\text{COOH 99\%}$$

$$V(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{2,43}{1,05} = 2,31 \text{ ml CH}_3\text{COOH 99\%}$$

- H_3PO_4 85% (M.v.=98,00; 1 l odpovídá 1,7 kg)
 $m(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,04 \times 1 \times 98,00 = 3,92 \text{ g H}_3\text{PO}_4 \text{ 100\%}$
 $m(\text{H}_3\text{PO}_4) = \frac{3,92 \times 100}{85} = 4,61 \text{ g H}_3\text{PO}_4 \text{ 85\%}$
 $V(\text{H}_3\text{PO}_4) = \frac{4,61}{1,7} = 2,71 \text{ ml H}_3\text{PO}_4 \text{ 85\%}$
- NaOH pecky p.a. (M.v.=40,00)
 $m(\text{NaOH}) = 0,2 \times 1 \times 40,00 = 8 \text{ g (naváženo bylo 8,25 g NaOH)}$

Připravil se 0,113 M roztok HCl a byla provedena titrace pro stanovení přesné koncentrace roztoku NaOH. Připravený roztok NaOH byl v byretě, 20 ml 0,113 M roztoku HCl v kádince. Průměrná spotřeba NaOH byla 12,3 ml. Přesná koncentrace připraveného roztoku NaOH byla 0,184 mol/l.

Výpočet

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$0,113 \times 20 = 12,3 \times c_2$$

$$c_2 = 0,184 \text{ mol/l}$$

Příprava pufrů o specifickém pH

Roztok 0,184 M NaOH byl postupně přidáván k 50 ml univerzálního pufru, dokud se nedocílilo chtěného pH. Přidaný objem roztoku NaOH k univerzálnímu pufru je uveden v tab. 1. Průběžně se měřilo pH pomocí pH metru.

Tabulka 1. Objemy přídatku NaOH pro docílení příslušných pH.

V (univerzální pufr)	Cílové pH	V (0,184 M NaOH)	Dosažené pH
50 ml	5,5	18,57 ml	5,46
50 ml	8,0	30,20 ml	8,03
50 ml	9,0	33,80 ml	8,97

3.3.3. Příprava vzorků k analýze pomocí metody dynamického rozptylu světla

Zkumavky s lipidovým filmem se vyndaly z mrazáku, nechaly rozmrazit při laboratorní teplotě a přidaly se do nich 2 ml příslušných pufrů (tab. 2). Lipidy se nechaly hydratovat 18 hodin v lednici. Další den se připravila vodní lázeň temperovaná na 75-80 °C, do které se zkumavky vložily. Dále se připravila termoska s tekutým dusíkem, ve kterém se nahřáté zkumavky nechaly po nahřátí v lázni zmrazit. Takto se střídalo ohřívání a zmrazování zkumavek. Celkem se provedlo 10 cyklů pro každou zkumavku.

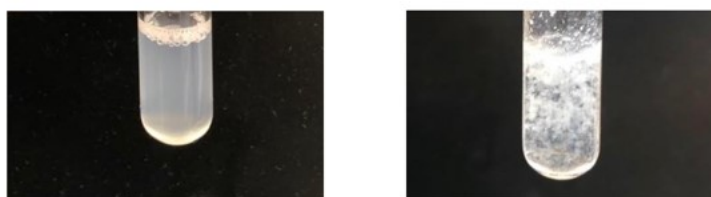
U zkumavek s obsahem zásaditého pufru (HSL_8/5.5 a HSL_9/5.5) došlo již po 2. cyklu k vytvoření téměř homogenní disperze. Po 4. a 10. cyklu se u těchto zkumavek provedlo měření zeta potenciálu a velikosti částic pomocí metody DLS. Vzorek HSL_5.5 nebyl analyzován, jelikož nedošlo k vytvoření homogenní disperze vhodné k měření. Po změření metodou DLS bylo ke vzorkům přidáno malé množství 2M roztoku HCl, kdy došlo k okyselení vzorků na pH 5,5 a lipidy se vysrážely (viz obr. 8 a 9). Takto připravené vzorky se dále nechaly analyzovat metodou RTG rozptylu.

Tabulka 2. Označení vzorků a změna pH.

Označení zkumavky	Přídavek pufru	pH přidaného pufru	Konečné pH
HSL_5.5	2 ml	5,5	5,5
HSL_8/5.5	2 ml	8	5,5
HSL_9/5.5	2 ml	9	5,5



Obrázek 8. Dispergované lipidy v pufru o pH 8 a vysrážené lipidy po okyselení.



Obrázek 9. Dispergované lipidy v pufru o pH 9 a vysrážené lipidy po okyselení.

3.4 Experiment č. 1 s využitím tenkých vrstev *stratum corneum*

3.4.1 Saponifikace *stratum corneum*

Extrahované SC se vyndalo z mrazáku a nechalo se rozmrazit při laboratorní teplotě. Celkem se navážilo 0,6545 g delipidizovaného SC. Z toho se 0,1252 g saponifikovalo, 0,2432 g se použilo v delipidizovaném stavu a 0,2861 g se uložilo do mrazáku jako zásobní delipidizované SC.

Delipidizované SC se vložilo do Petriho misky a přidala se k němu směs 10 M NaOH a metanolu v poměru 1 : 9 (v/v). Petriho miska se pak dala do trouby vyhřáté na 45 °C na 60 minut. Hotové saponifikované SC se okyselilo 2 M HCl do kyselé reakce s pomocí pH papírku a po okyselení se SC opláchlo metanolem. Celkem se získalo 0,1028 g saponifikovaného SC.

3.4.2 Umístění vrstev *stratum corneum* do vialek a na stripovací náplasti

Připravené delipidizované SC a saponifikované SC se umístilo do vialek – přichystaly se 2 vialky pro delipidizované a 2 vialky pro saponifikované SC.

Dále proběhlo stripování delipidizované i saponifikovaného SC. Delipidizované SC se nalepilo na obyčejnou lepicí pásku, která se zafixovala a z ní se potom pomocí stripovací náplasti D-squame sejmulo několik vrstev buněk. Saponifikované SC se nalepilo na stripovací náplast a pomocí další stripovací náplasti se sejmuly dvě vrstvy SC. Stripovací náplasti se uložily na sklíčko a umístily do komůrek.

3.4.3 Příprava lipidového filmu s přidavkem cholesteryl sulfátu

Navážilo se 16,575 mg izolovaných a purifikovaných lipidů a 0,425 mg cholesteryl sulfátu sodného a přidaly se 4 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v). Dále se přichystaly kontrolní vzorky v malých zkumavkách, do kterých se odebralo 470 µl této směsi (odpovídá 2 mg lipidů) a zbytek se nechal v jedné větší zkumavce. Všechny 3 zkumavky se umístily pod proud dusíku a pomalým otáčením zkumavek se vytvořil lipidový film.

3.4.4 Příprava pufrů o pH 5,5 a 8,5 a přidání Ca²⁺ kationtů do pufrů

První pufr o pH 5,5 byl acetátový, připravený z 0,0806 ml kyseliny octové 99% a 1,4288 g octanu sodného. Tyto látky se přemístily do odměrné baňky o 100 ml a baňka se doplnila

ultračistou vodou po rýsku. Druhý pufr o pH 8,5 byl připraven z 2,859 g HEPES, minimum 99,5% titration a ultračisté vody. Cílové pH se docílilo přidáním 30 kapek 10 M NaOH. Do 20 ml pufru o pH 5,5 a do 20 ml pufru o pH 8,5 se přidalo 0,01111 g CaCl₂. Výsledná koncentrace Ca²⁺ byla 0,005 mol/l.

3.4.5 Přidání pufrů do zkumavek s lipidovým filmem

Do velké zkumavky s obsahem 13 mg lipidů se přidal pufr o pH 8,5 s přidavkem Ca²⁺ kationtů o objemu 2,6 ml (vzorek HSL_ChS_8.5_Ca_1). Do kontrolních malých zkumavek (vzorek HSL_ChS_5.5_Ca_1 a HSL_ChS_5.5_Ca_2) s obsahem 2 mg lipidů se přidal pufr o pH 5,5 s přidavkem Ca²⁺ kationtů o objemu 0,4 ml. Složení vzorků je uvedeno v tab. 3. Výsledná koncentrace lipidů ve zkumavkách byla 5 mg/ml. Zkumavky byly podrobeny sedmi cyklům ohřívání ve vodní lázni vyhřáté na 75-80 °C a zmrazování v tekutém dusíku. Mezi cykly byly zkumavky vkládány do ultrazvukové vany pro lepší rozpuštění lipidů.

Lidské kožní lipidy (HSL) v alkalickém pH 8,5 však nebylo možné dispergovat, pravděpodobně vlivem přítomnosti Ca²⁺ kationtů a ChS. Na obr. 10 lze pozorovat vzniklé shluky, které byly z velké části nalepeny na stěnu zkumavky. Tyto agregáty nebylo možné přenést na připravené saponifikované a delipidizované SC. Připravené vzorky byly dále měřeny metodou RTG rozptylu. Chování lipidů v alkalickém prostředí s přidavkem Ca²⁺ kationtů a ChS bylo překvapivé, a tak jsme se rozhodli pozměnit původní cíl práce. Připravil se tedy další set vzorků s cílem optimalizovat podmínky pro spontánní uspořádání lipidů v přítomnosti Ca²⁺ kationtů (přehled je uveden v tab. 4).



Obrázek 10. Shluky lipidů v pufru o pH 8,5 s obsahem Ca²⁺ kationtů – vzorek HSL_ChS_8.5_Ca_1.

Tabulka 3. Plánované složení jednotlivých vzorků s využitím tenkých vrstev SC. Vzorky označené šedou barvou nebyly připraveny.

Vzorek	ChS (%)	lipidy (mg)	DSC (mg)	SapSC (mg)	počáteční pH	konečné pH	liposomy (ml)	Ca²⁺
HSL_ChS_5.5_Ca_1	2,5	2			5,5	5,5	0,4	ano
HSL_ChS_5.5_Ca_2	2,5	2			5,5	5,5	0,4	ano
HSL_ChS_8.5_Ca_1	2,5	2			8,5	8,5	0,4	ano
HSL_ChS_8.5_Ca_2	2,5	2			8,5	5,5	0,4	ano
DSC_5.5_1			6		5,5	5,5		ano
DSC_5.5_2			6		5,5	5,5		ano
DSC_8.5_1			6		8,5	5,5		ano
DSC_8.5_2			6		8,5	5,5		ano
SapSC_5.5_1				6	5,5	5,5		ano
SapSC_5.5_2				6	5,5	5,5		ano
SapSC_8.5_1				6	8,5	5,5		ano
SapSC_8.5_2				6	8,5	5,5		ano
HSL_ChS_DSC_8.5_1 kapilára	2,5	1	6		8,5	5,5	0,2	ano
HSL_ChS_DSC_8.5_2 kapilára	2,5	1	6		8,5	5,5	0,2	ano
HSL_ChS_DSC_8.5_1 D-squame náplast	2,5	0,25			8,5	5,5	0,05	ano
HSL_ChS_DSC_8.5_2 D-squame náplast	2,5	0,25			8,5	5,5	0,05	ano
HSL_ChS_SapSC_8.5_1 kapilára	2,5	1		6	8,5	5,5	0,2	ano
HSL_ChS_SapSC_8.5_2 kapilára	2,5	1		6	8,5	5,5	0,2	ano
HSL_ChS-SapSC_8.5_1 D-squame náplast	2,5	0,25			8,5	5,5	0,05	ano
HSL_ChS-SapSC_8.5_2 D-squame náplast	2,5	0,25			8,5	5,5	0,05	ano

3.5 Experiment č. 2 – optimalizace podmínek pro spontánní uspořádání lipidů v přítomnosti Ca²⁺ kationtů

3.5.1 Příprava pufru o pH 7,4

Připravil se nový pufr z HEPES, minimum 99,5% titration rozpuštěním 2,859 g látky v ultračisté vodě. Dále se pomocí několika kapek 10 M NaOH pufr nastavil na pH 7,37. Část pufru se odebrala a upravila přidávkem CaCl₂ na koncentraci Ca²⁺ kationtů 0,005 mol/l.

Tabulka 4. Složení a obsah jednotlivých zkumavek v experimentu č. 2. HSL značí lidské kožní lipidy a ChS cholesteryl sulfát.

	Označení	počáteční pH	výsledné pH	Ca ²⁺	lipidy
1	HSL_7.4	7,4	7,4	ne	4 mg HSL
2	HSL_7.4_Ca	7,4	7,4	ano	4 mg HSL
3	HSL_5.5_Ca	5,5	5,5	ano	4 mg HSL
4	HSL_8.5_Ca	8,5	8,5	ano	4 mg HSL
5	HSL_ChS_5.5	5,5	5,5	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
6	HSL_ChS_8.5/5.5	8,5	5,5	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
7	HSL_ChS_7.4	7,4	7,4	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
8	HSL_ChS_7.4_Ca	7,4	7,4	ano	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS

3.5.2 Příprava lipidového filmu ve zkumavkách

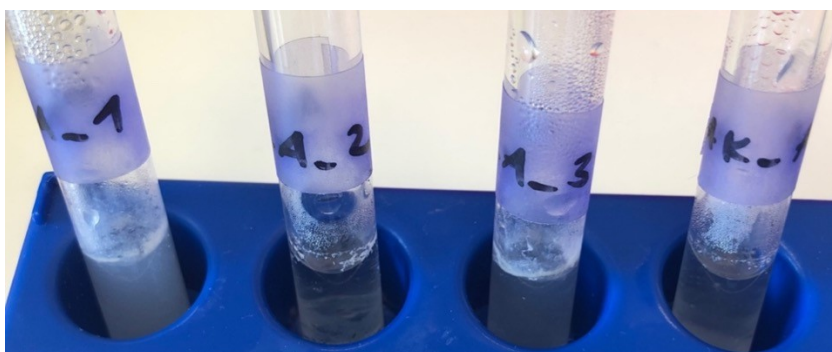
Zbylé množství lipidů s hmotností 41,63 mg se rozpustilo ve 2 ml směsi chloroformu a metanolu v poměru 2 : 1 (v/v). Připravilo se celkem 8 malých zkumavek, přehled je uveden v tab. 4. Do zkumavek HSL_7.4, HSL_7.4_Ca, HSL_5.5_Ca a HSL_8.5_Ca bylo použito 0,1922 ml – to odpovídá 4 mg lipidů. Do zbylých zkumavek se použilo 0,1873 ml – to odpovídá 3,9 mg lipidů. Dále se připravil roztok cholesteryl sulfátu sodného o koncentraci 1 mg/ml a ke vzorkům s obsahem 3,9 mg lipidů se přidalo 0,1 ml tohoto roztoku – to odpovídá 0,1 mg cholesteryl sulfátu sodnému. V každé zkumavce se vytvořil pomocí proudu dusíku tenký lipidový film, který se nechal dosušit v exsikátoru. Dále se do zkumavek přidaly pufrы o objemu 0,8 ml podle rozpisu v tab. 4. Výsledná koncentrace lipidů byla 5 mg/ml.

Připravila se vodní lázeň vyhřátá na 75-80 °C a termoska s tekutým dusíkem. Každá zkumavka se podrobila 5 cyklům zahřívání a zmrazování a mezi cykly byly zkumavky vkládány do ultrazvukové vany pro lepší dispergování lipidů. Shrnutí výsledného chování a

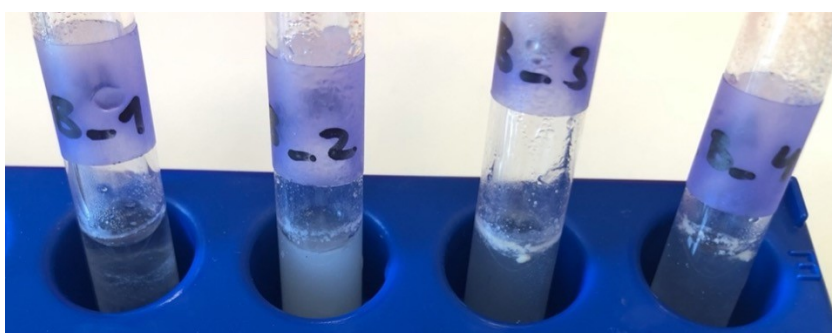
vzhledu jednotlivých vzorků je v tab. 5 a také na obr. 11 a 12. Vzorek HSL_ChS_8.5/5.5 byl okyselen pomocí 2 M HCl na pH 5,5. Obsahy zkumavek byly dále měřeny metodou rozptylu RTG záření.

Tabulka 5. Výsledky pozorování obsahu zkumavek po 5 cyklech zahřívání a zmrazování.

	Označení zkumavky	Výsledek pozorování obsahu zkumavek
1	HSL_7.4	část lipidů dispergována, část agregována na stěně zkumavky
2	HSL_7.4_Ca	agregáty lipidů na stěně zkumavky
3	HSL_5.5_Ca	část lipidů dispergována, část agregována na stěně zkumavky
4	HSL_8.5_Ca	agregáty lipidů na stěně zkumavky
5	HSL_ChS_5.5	agregáty lipidů na stěně zkumavky
6	HSL_ChS_8.5/5.5	nejlépe dispergované lipidy (před okyselením)
7	HSL_ChS_7.4	agregáty lipidů na stěně zkumavky
8	HSL_ChS_7.4_Ca	agregáty lipidů na stěně zkumavky



Obrázek 11. Set vzorků 1-4.



Obrázek 12. Set vzorků 5-8.

3.6 Měření rozptylu RTG záření u vzorků

3.6.1 Podmínky a parametry měření

Vzorky byly vpraveny do borosilikátových nebo křemenných kapilár o tloušťce 1,5 a 2 mm a analyzovány při pokojové teplotě metodou RTG difrakce s malými a většími úhly dopadu RTG záření na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky, se sídlem Heyrovského náměstí 2, Praha 6 – Břevnov, 162 06.

Svazek záření $\text{CuK}\alpha$ o vlnové délce 0,154 nm byl generován pomocí přístroje Rigaku Micromax-003, který je vybaven RTG optikou pracující při napětí 50 kV a proudu 0,6 mA. Rozptyl byl detekován 2D detektorem Pilatus3 300K (Dectris, Švýcarsko) ve vzdálenostech 0,541 a 0,052 m od vzorku. Data z těchto vzdáleností byla sloučena a bylo dosaženo spolehlivého intervalu q od 0,13 do 35 nm^{-1} .

Kapiláry se vzorky byly před měřením vzduchotěsně uzavřeny plamenem z plynového kahanu. Vzdálenost vzorku od detektoru byla kalibrována pomocí standardu behenátu stříbra a křemíku. Rozptýlená intenzita byla azimutálně zprůměrovaná a data se převedla na absolutní jednotku pomocí skelného uhlíku. Vyhodnocování získaných dat bylo provedeno v programu OriginPro.

3.6.2. Postup při vyhodnocování dat

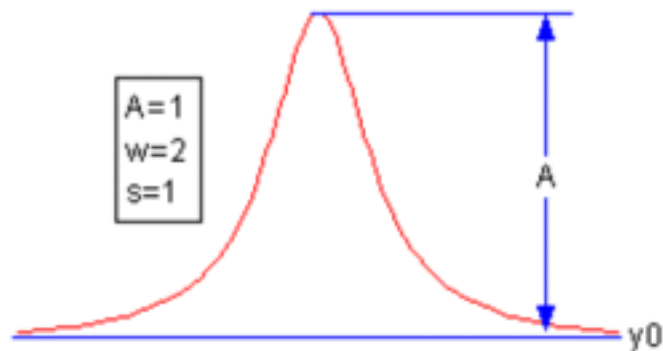
Cílem měření bylo studium mikrostruktury izolovaných lipidů SC v prostředí o různém pH a v přítomnosti či nepřítomnosti přídavku Ca^{2+} kationtů a ChS. Za fyziologických podmínek jsou v extracelulárním prostoru lipidy SC uspořádány do multilamelární vrstvy, ve které lze dále pozorovat LPP s periodicitou zhruba 13 nm a SPP s periodicitou okolo 6 nm.^{21,22}

Metoda je vhodná pro analýzu fází s periodicky se opakující strukturou. SAXS a WAXS je měření rozptylu RTG záření na vzorku v oblasti malých a velkých úhlů. Závislost relativní rozptýlené intenzity na velikosti rozptylového vektoru se nazývá difraktogram. Velikost rozptylového vektoru q , který v sobě zahrnuje vlnovou délku λ použitého RTG záření, se vypočítá podle rovnice (3):

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (3)$$

kde θ představuje polovinu úhlu mezi dopadajícím a rozptýleným zářením. Pozadí v difraktogramu bylo fitováno pomocí exponenciální nebo lineární funkce a píky byly fitovány za použití funkce Gaussian-LorenCross v programu OriginPro. Gaussian-LorenCross funkci představuje rovnice (4), kde y_0 – posun na ose Y, x_c – centrum píku na ose X, A – amplituda, w – šířka píku a s – tvar píku. Graf této funkce je na obr. 13.⁵²

$$y = y_0 + \frac{A}{1 + e^{0.5(1-s)\left(\frac{x-x_c}{w}\right)^2} s\left(\frac{x-x_c}{w}\right)^2} \quad (4)$$



Obrázek 13. Graf použité Gaussian-LorenCross funkce pro fitování píků v programu OriginPro.⁵²

Výpočtem ze vztahu (4) jsme získali parametr x_c , který charakterizuje polohu píku v q . Podle Braggova difrakčního zákona platí vztah (5):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (5)$$

Ze vztahu (5) lze odvodit vztah (6) pro mezivzrostovou vzdálenost d :

$$d = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} \quad (6)$$

Vztah (3) lze také uvést ve tvaru rovnice (7) a (8):

$$q = 2\pi \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad (7)$$

$$\frac{2\pi}{q} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (8)$$

Spojením předchozích rovnic získáme vztah (9) a z něj vztah (10):

$$\frac{d}{n} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} = \frac{2\pi}{q} \quad (9)$$

$$q = \frac{2\pi}{d} n \quad (10)$$

Pro $n = 1$ získáme hodnotu d , která odpovídá mezirovinné vzdálenosti, podle vztahu (11):

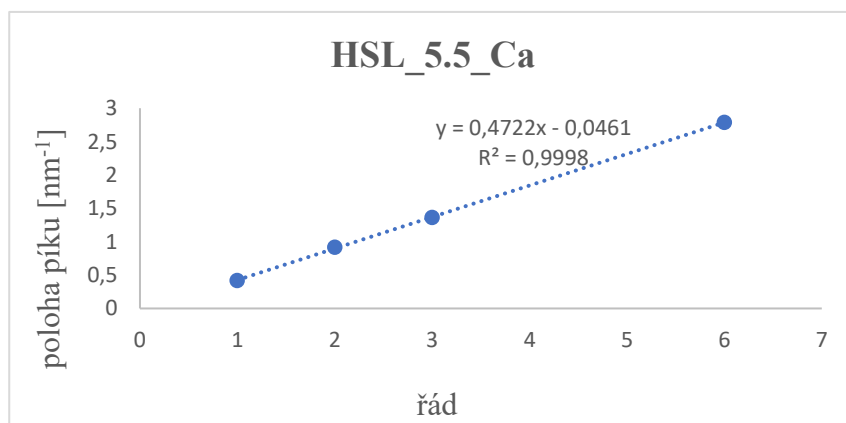
$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (11)$$

Hodnota q je podle vztahu (10) lineární funkcí řádu n se směrnicí $\frac{2\pi}{a}$, která by měla procházet bodem (0,0). Pro všechny řády jsme vynesli hodnotu q jako funkci n . V případě, že je závislost lineární a přibližně prochází počátkem (0,0), difrakční řády náleží jedné struktuře. Závislost byla proložena regresní lineární funkcí a opakující se mezirovinná vzdálenost mezi lamelami d (periodicita) se vypočítala podle vztahu (12), ve kterém a představuje zjištěnou směrnicí regresní přímky:

$$d = \frac{2\pi}{a} \quad (12)$$

Příklad regresní přímky se směrnicí a a absolutním členem b je na obr. 14.

Koeficient determinace vyjadřuje míru kvality regresivního modelu a měl by se pohybovat okolo hodnoty 0,9999. Nenulový absolutní člen rovnice přímky by měl mít co nejmenší hodnotu, odpovídá posunu vzorku na vzdálenosti vzorek – detektor a experimentální chybě.



Obrázek 14. Určení rovnice regresní přímky pro vzorek HSL_5.5_Ca s přesností koeficientu determinace R^2 0,9998.

4. Výsledky a diskuze

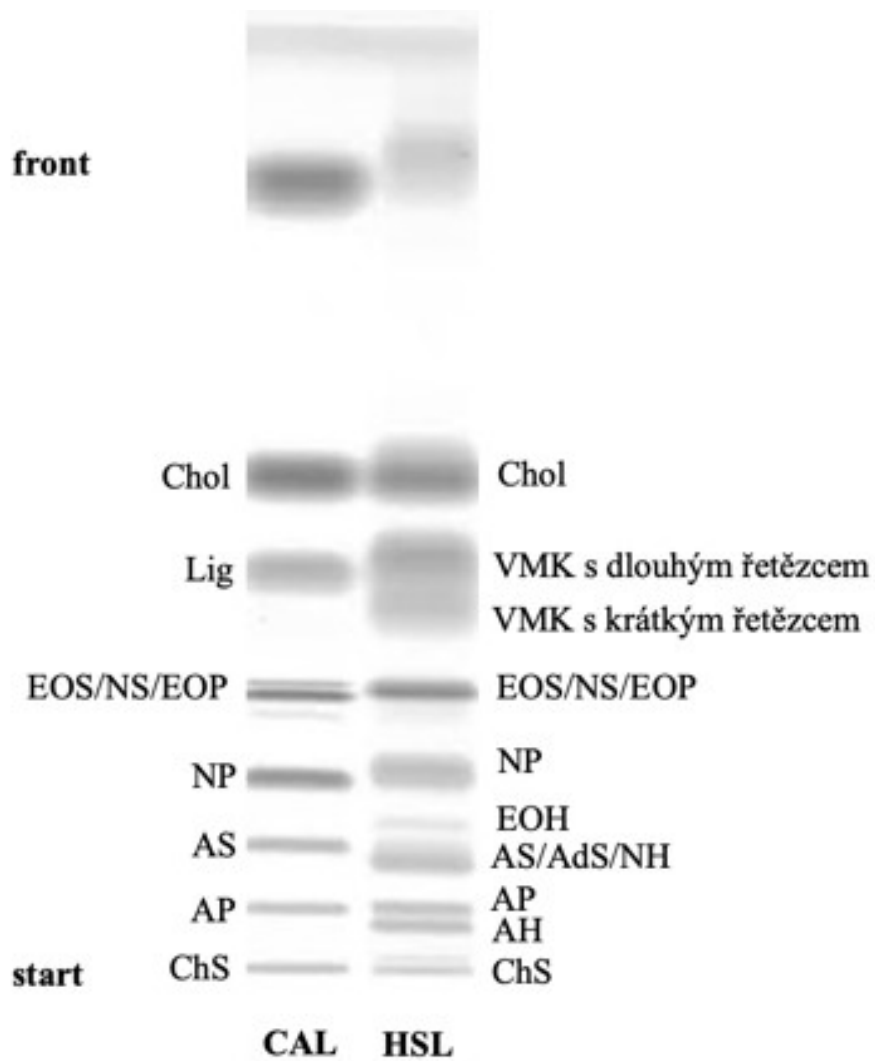
4.1 HPTLC analýza

Na HPTLC analýzu byly použity lipidy, které jsme získali z lidského SC. Nejdříve jsme oddělili *epidermis* z lidské kůže, izolovali SC a poté provedli extrakci lipidové směsi SC pomocí organických rozpouštědel. Získaný extrakt jsme pomocí sloupcové chromatografie purifikovali (odebrali jsme frakce, které obsahovaly nečistoty). Následně proběhla samotná HPTLC analýza – příprava HPTLC desky, nanesení kalibrační směsi a vzorku na desku pomocí Linomatu 5, vyvíjení v automatické vertikální komoře, detekce skvrn na chromatogramu ponořením desky do detekčního činidla a vypálení desky ve vyhřáté troubě. TLC scanner byl použit pro denzitometrické vyhodnocení.

Zvolenou metodou jsme ověřili, že se v purifikované směsi nachází lipidy přítomné ve SC a je možné směs použít na přípravu modelu lidské kožní bariéry v experimentu č. 1 a 2.

4.1.1 Kvalitativní analýza

Na obr. 15 lze pozorovat denzitometricky vyhodnocenou HPTLC desku s popisem lipidů obsažených ve standardu (CAL, sloupec vlevo) a lipidů obsažených ve směsi extrahovaných lipidů (HSL, sloupec vpravo). Na přípravu standardu byl použit Chol, ChS, Lig, Pal a Cer – EOS, NS, EOP, NP, AS, AP. V pravém sloupci jsou zobrazeny jednak složky shodující se se standardem, ale i další složky lipidového extraktu – Cer EOH a AH, které byly určeny na základě jejich retenčního faktoru (R_f) a jejich polarity, respektive podle jejich afinity k mobilní a stacionární fázi.



Obrázek 15. Chromatogram HPTLC analýzy.

4.1.2 Zastoupení jednotlivých složek v analyzované směsi lipidů

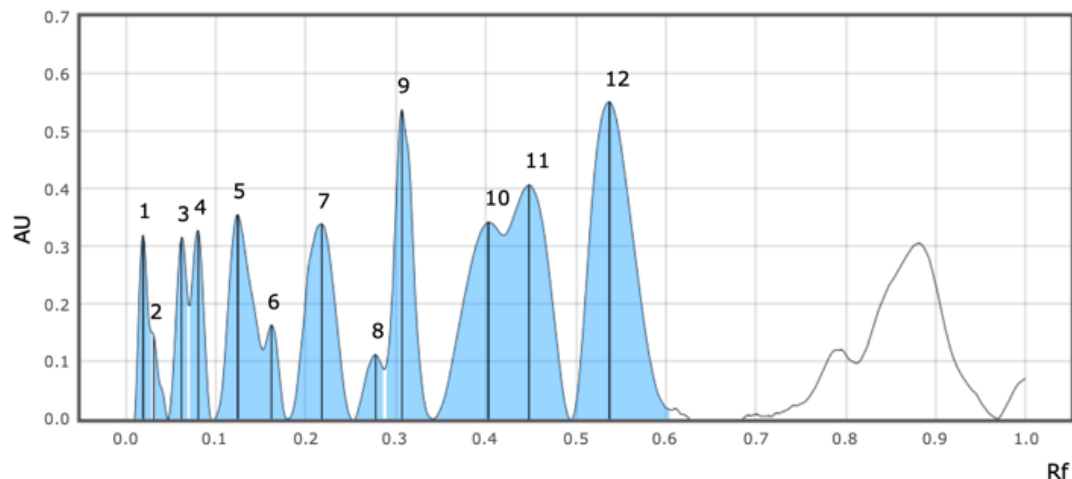
Hodnocení HPTLC analýzy probíhalo v programu VisionCATS. Z dostupných dat se určilo hmotnostní procentuální zastoupení jednotlivých složek v analyzovaném vzorku, uvedené v tab. 6.

Tabulka. 6. Procentuální (hmotnostní %) zastoupení složek v analyzovaném vzorku extrahovaných a purifikovaných lipidů ze SC.

Složka	Obsah ve směsi (%)
Chol + estery	16,84
Dlouhé VMK	27,52
Krátké VMK	16,40
EOS/NS	8,92
EOP	1,05
NP	11,14
AS/AdS/NH	8,26
AP	3,55
Ostatní Cer	4,68
ChS	1,64

Analýzou výsledků v programu VisionCATS jsme zjistili hmotnostní procenta – pro Cer 38 %, pro Chol 17 % a pro VMK 44 % ve vzorku. Obsah VMK v analyzované směsi lipidů je vyšší ve srovnání s fyziologickým zastoupením. Fyziologicky je směs lipidů v mezibuněčné matrix SC tvořena zhruba 45-50 % Cer, 25 % Chol, 10-15 % VMK a 5 % dalšími složkami (ChS a další estery Chol).^{18,19} Mohlo by to být způsobeno vyšším obsahem VMK ve vzorku, anebo může být množství VMK nadhodnocené vůči skutečnému obsahu. Předpokládáme, že se jedná o nadhodnocení v důsledku toho, že provedená analýza je pouze semikvantitativní (v kalibrační směsi není pro všechny lipidy SC standard). V analyzovaném vzorku kožních lipidů se nachází bohaté spektrum strukturně heterogenních VMK. Během chromatografického vyvíjení nedošlo k jejich dostatečné separaci a VMK s dlouhým a s krátkým řetězcem vytvořily jednu skvrnu s velkou plochou. V kalibrační směsi byla použita pouze Lig a Pal. Pal se nepodařilo samostatně vyhodnotit, jelikož se na získaném chromatogramu dala pozorovat málo čitelná skvrna ve sloupci CAL. Nebylo proto možné sestavit kalibrační křivku pro Pal a ostatní VMK byly hodnoceny podle kalibrační křivky Lig.

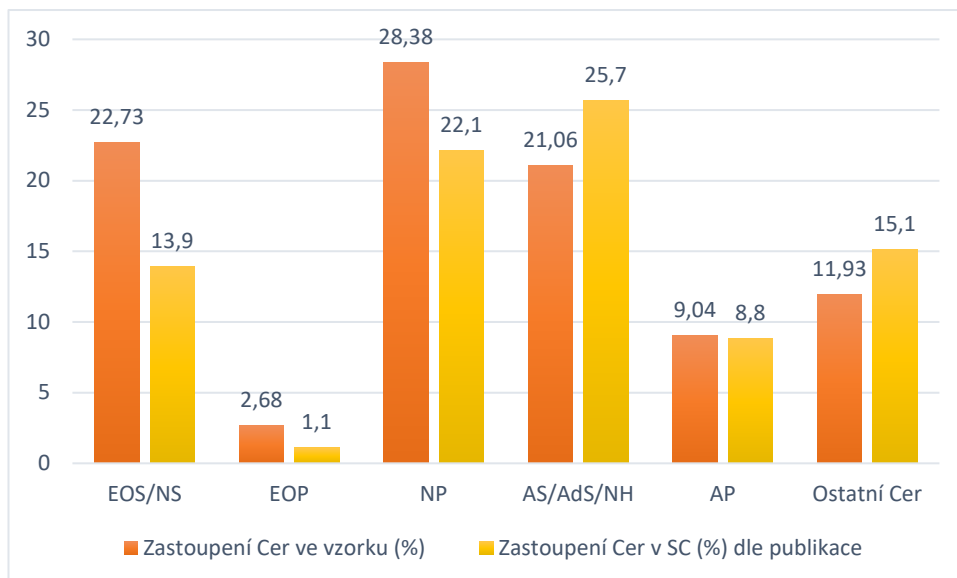
Všechny tyto faktory pravděpodobně přispěly k přítomnému nadhodnocení VMK v analyzovaném vzorku. Ostatní Cer odpovídají určeným Cer EOH a AH. Ukázka z vyhodnocování v programu VisionCATS je na obr. 16.



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.009	-0.022	0.019	0.3194	8.16	0.030	0.1502	0.00397	3.25	Yes	PP ChoIS
2	0.031	0.1445	0.031	0.1445	3.69	0.047	0.0000	0.00096	0.79	Yes	PP polar lipid
3	0.047	0.0000	0.062	0.3155	8.06	0.070	0.1980	0.00431	3.53	No	PP AH
4	0.071	0.1972	0.081	0.3279	8.37	0.095	0.0000	0.00482	3.95	No	PP AP
5	0.099	0.0000	0.124	0.3553	9.07	0.152	0.1206	0.01074	8.81	No	PP AS
6	0.152	0.1206	0.162	0.1633	4.17	0.179	0.0000	0.00276	2.26	No	PP EOH
7	0.179	0.0000	0.218	0.3392	8.66	0.251	0.0000	0.01244	10.20	No	PP NP
8	0.255	0.0000	0.278	0.1117	2.85	0.287	0.0863	0.00239	1.96	No	PP EOP
9	0.289	0.0946	0.307	0.5383	13.75	0.341	0.0003	0.01269	10.40	Yes	PP NS
10	0.342	0.0000	0.403	0.3422	8.74	0.420	0.3200	0.01643	13.46	No	PP PAL
11	0.420	0.3200	0.448	0.4071	10.40	0.493	0.0000	0.02060	16.88	No	PP LIG
12	0.496	0.0000	0.537	0.5516	14.09	0.605	0.0157	0.02990	24.51	No	PP Chol

Obrázek 16. Reprezentativní ukázka z vyhodnocování v programu VisionCATS, na kterém lze pozorovat plochy píků jednotlivých složek a jejich R_f .

Na obr. 15 můžeme pozorovat, že eluce některých složek neproběhla odděleně. Proto je jejich obsah počítán dohromady s Cer, které mají podobné retenční faktory. Relativní zastoupení jednotlivých Cer nebo skupin Cer ve vzorku je porovnáváno s jiným publikovaným zastoupením Cer ve SC na obr. 17. Skladba Cer ve vzorku poměrně dobře odpovídá zastoupení Cer publikovanému v literatuře.⁴⁸



Obrázek 17. Zastoupení jednotlivých Cer nebo skupin Cer vůči celkovému množství Cer ve vzorku (oranžový sloupec vlevo) a zastoupení Cer ve SC dle literatury (žlutý sloupec vpravo).

4.2 Pilotní experiment

4.2.1 Analýza lipidových disperzí

V pilotním experimentu jsme potřebovali zjistit, jak se lipidy chovají v prostředí o různém pH, tedy ve kterém pH tvoří disperze, které bychom mohli dále použít v experimentu č. 1. Pro pilotní experiment byly použity HSL z předešlé izolace a purifikace směsi lipidů provedené na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Z těchto lipidů byl pomocí proudu dusíku vytvořen suchý lipidový film, který se nechal hydratovat pufrů o různém pH – pufr o pH 5,5, 8, a 9. Fyziologická hodnota ve SC se pohybuje okolo kyselého pH, přibližně 5,5.¹² Po hydrataci lipidového filmu byla provedena homogenizace pomocí cyklického zmrazování v tekutém dusíku a ohřívání ve vodní lázni temperované na 75-80 °C.

Tato metoda patří mezi nejčastější postupy na přípravu multilamelárních fosfolipidových liposomů, které představují disperzní systém. Plnou hydrataci lipidů lze zajistit nadbytkem pufrů. Během zmrazování fosfolipidů dochází k rozrušení lamelárních struktur vlivem vzniku ledových krystalů a při ohřívání nad teplotu hlavního fázového přechodu daného systému dochází k tranzici do fluidního uspořádání. Tento postup byl zvolen pro dosažení homogenizace vzorku – rovnoměrné hydrataci a vzniku jedné lipidové fáze (jeden typ uspořádání v nadbytku pufru). Chování HSL se však od fosfolipidů odlišuje a při tomto postupu nevede homogenizace lipidů v kyselém pH ke vzniku disperze ani při nadbytku pufru. Při fyziologickém pH 5,5 dochází pouze k omezené hydrataci lipidů a tyto zůstávají kompaktní a ulpělé na stěně zkumavky. Odlišné chování lipidů jsme zaznamenali v alkalickém pH 8 a 9. V alkalickém prostředí došlo k významné hydrataci lipidů, jejich odloučení od stěny zkumavky a vzniku disperze. Tyto vzniklé disperze byly po 4. a 10. cyklu zmrazování a ohřívání charakterizovány měřením zeta potenciálu a velikosti částic.

Tabulka. 7. Průměry a zeta potenciály částic po 4. a po 10. cyklu ohřívání a zmrazování.

pH	Diameter (nm) po 4. cyklu	Diameter (nm) po 10. cyklu	Zeta potenciál (mV) po 4. cyklu	Zeta potenciál (mV) po 10. cyklu
8	1229	13247	-53	-29
9	4017	10615	-47	-46

Po 4. a 10. cyklu jsme získali údaje uvedené v tab. 7. Po navýšení počtu cyklů nepozorujeme zmenšení částic v disperzi, a tak jsme nezískali ani více homogenní disperzi. Směs lipidů SC, která je tvořena převážně Cer, Chol a VMK, netvoří za fyziologicky relevantních podmínek disperze. Hydratace lipidů je v kyselém prostředí velmi omezená. V dostupné literatuře se udává, že na 1 molekulu lipidu připadá pouze 1-2 molekuly vody.⁴⁹ Při přípravě disperzí jsme vycházeli z dostupné literatury – Wertz, P.W. et al.⁵⁰ a Hatfield, R. M. & Fung, L. W.⁵¹

Pozorovali jsme, že lipidy z izolované směsi se v alkalickém pH významně hydratují a dochází tak ke vzniku disperze ve vodném prostředí. K takovému chování dochází vlivem přítomnosti VMK, které jsou součástí izolované směsi lipidů SC. V alkalickém prostředí dochází k odštěpení protonu vodíku z karboxylové skupiny VMK a vzniká ionizovaná forma této skupiny. Ionizovaná forma VMK nese v alkalickém prostředí záporný náboj, přitahuje molekuly vody a lépe se rozpouští nebo hydratuje. Ve směsi lipidů tak vznikají částice, které jsou na rozhraní koloidní a hrubé disperze. Záporný náboj ionizovaných forem VMK vede ke vzniku záporného zeta potenciálu, který vzniklou disperzi stabilizuje.

Po charakterizaci částic připravených disperzí metodou DLS byly vzorky (HSL_8/5.5 a HSL_9/5.5) okyseleny postupným přidáváním 2M HCl na pH přibližně 5,5. Přechod do kyselé fyziologické oblasti byl kontrolován indikátorovým papírkem. VMK přešly tímto přidávkem na neionizovanou formu, došlo k destabilizaci disperze, k precipitaci a vzniku agregátů. Předpokládali jsme, že tyto agregáty budou vzhledem k radikální změně pH prostředí vytvářet silné hydrofobní interakce a vzniknou kompaktní agregáty. Došlo však ke vzniku agregátů menších rozměrů s hustotou menší, než má voda a hromadily se na hladině vodného roztoku pufru. Část agregátu spolu s částí pufru byla přenesena do kapilár a provedlo se měření rozptylu RTG záření.

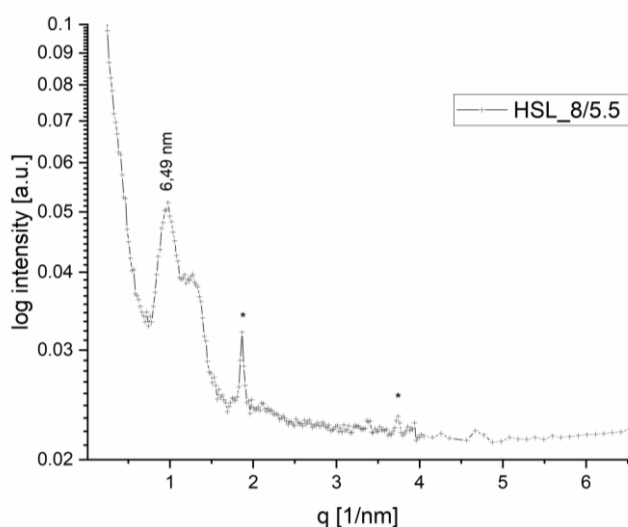
Pilotní experiment pomohl zjistit podmínky, za kterých lze HSL dispergovat ve vodném roztoku. Na základě těchto zjištění jsme pro další pokračování experimentu zvolili pro dispergaci HSL alkalické prostředí o pH 8,5 a dále fyziologické kyselého prostředí o pH 5,5 pro kontrolní vzorky.

4.2.2 Difraktogramy pilotního experimentu

Část záření procházející kapilárou se vzorkem mění směr a takto rozptýlené záření detekujeme jako exponenciální pozadí v oblasti SAXS a jako široký pík v oblasti WAXS. Pokud vzorek obsahuje pravidelně se opakující strukturální prvky, část dopadajícího záření splňuje podmínku difrakce a dochází k zesílení při úhlech, které vyhovují Braggově difrakčnímu zákonu. Toto detekujeme jako difrakční píky.

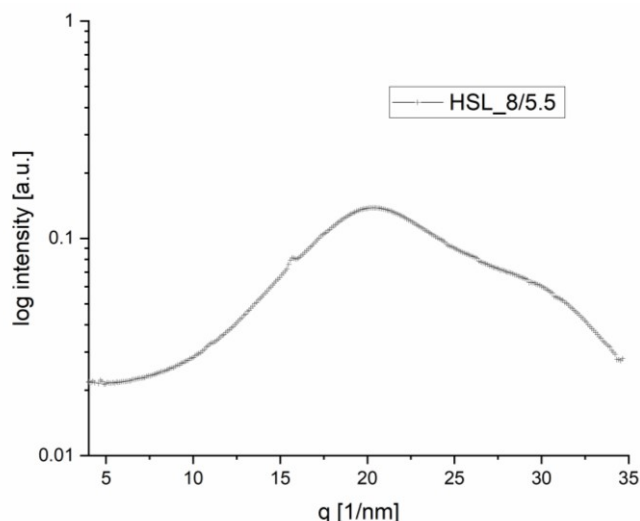
Na obr. 18 vidíme difraktogram vzorku HSL_8/5.5 v oblasti SAXS. Difrakční píky v oblasti malých úhlů odpovídají podle Braggova difrakčního zákona velkým mezivzrostům. Z měření v oblastech SAXS získáváme informace o vzdálenosti opakujících se jednotek lamelárních fází.²⁷ Dominantní pík, který poskytuje většina lipidů v tomto vzorku, odpovídá mezivzrostům $\sim 6,5$ nm. Dále si můžeme povšimnout poměrně širokého píku, který tvoří tzv. raménko (z angl. shoulder). Tento pík je připojený k píku detekovanému při 6,5 nm. Dochází zde tedy ke konvoluci píků. Přítomnost raménka svědčí o tom, že se ve vzorku nachází více typů strukturálních fází. Další výrazné píky, které bychom mohli k předešlým píkům přiřadit, se na difraktogramu nenachází, a tak nelze přesně určit, jakou fázi představuje dominantní pík nebo jeho raménko.

Na difraktogramu se dále nachází dva ostré píky označené hvězdičkou. Poloha těchto píků odpovídá mezivzrostům 3,4 nm a tato je typická pro separovaný krystalický Chol. Tato vzdálenost odpovídá již dříve publikovaným nálezům.⁵³



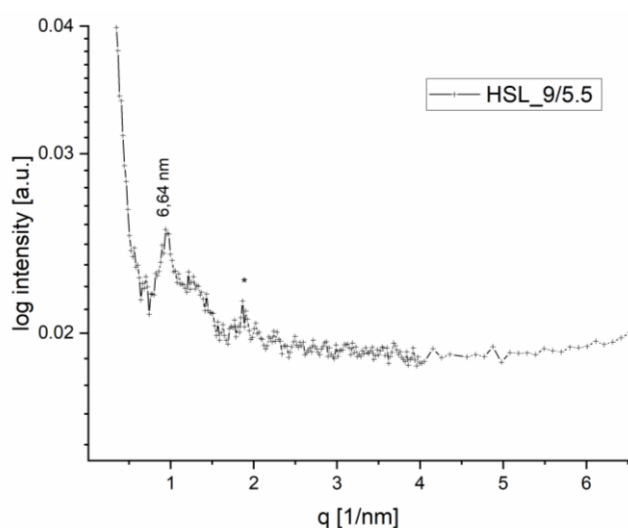
Obrázek 18. Difraktogram vzorku HSL_8/5.5, SAXS. Hvězdičky značí píky separovaného Chol.

Na obr. 19 je zobrazený difraktogram vzorku HSL_8/5.5 v oblasti WAXS. Můžeme zde pozorovat široký pík, který částečně vzniká rozptylem záření na materiálu kapiláry, ale i rozptylem na lipidech ve vzorku. Tyto lipidy však nemají příliš pravidelné uspořádání, převažuje uspořádání fluidní. Na širokém píku lze určit malý ostřejší pík, který by mohl představovat krystalickou subdoménu orthorombické fáze, ve které jsou řetězce lipidů rigidní.⁵⁴ Orthorombická fáze se řadí mezi laterální uspořádání lipidů – v oblasti WAXS tedy získáváme informace o uspořádání v rovině jedné lamely.²⁷



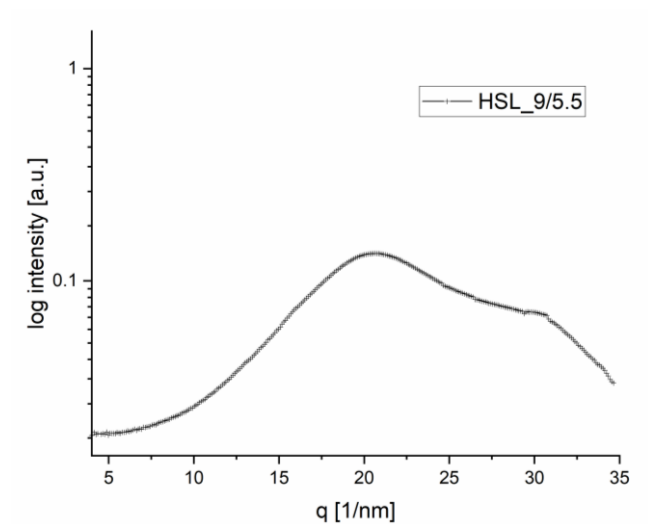
Obrázek 19. Difraktogram vzorku HSL_8/5.5, WAXS.

Obr. 20 je difraktogramem pro vzorek HSL_9/5.5 v SAXS oblasti. Dominantní pík v tomto případě představuje mezirovinná vzdálenost $\sim 6,64$ nm. Stejně jako v předešlém vzorku HSL_8/5.5 k němu nelze přiřadit žádné další výrazné píky, a proto nelze předpokládat, jakou fázi tento pík představuje. Pík označený hvězdičkou lze přiřadit separované krystalické fázi Chol.



Obrázek 20. Difraktogram vzorku HSL_9/5.5, SAXS. Hvězdička značí pík separovaného Chol.

Na obr. 21 se nachází difraktogram z oblasti WAXS pro vzorek HSL_9/5.5. Můžeme zde pozorovat pouze široký pík, který vznikl rozptylem záření na materiálu kapiláry a na přítomných lipidech. Řetězce těchto lipidů nevytváří plně pravidelné struktury (tvoří amorfní fáze).⁵⁴ Malé ostré píky, které by signalizovaly přítomnost orthorombické fáze lipidů, se zde oproti difraktogramu na obr. 19 nenachází.



Obrázek 21. Difraktogram vzorku HSL_9/5.5, WAXS.

4.3 Agregace lipidů a vznik uspořádaných struktur – model lidské kožní bariéry

4.3.1 Experiment č. 1

Původním cílem této práce bylo zjistit, jaký má vliv přidavek ChS a Ca^{2+} kationtů na chování modelu lidské kožní bariéry s využitím tenkých vrstev SC. Na přípravu disperze HSL s přidavkem ChS a pufru s obsahem Ca^{2+} kationtů bylo zvoleno pH 8,5 na základě výsledků pozorování pilotního experimentu. Kontrolní vzorek byl připraven při pH 5,5. Přídavek ChS byl zvolen podle zjištěných hmotnostních procent z HPTLC analýzy. V našem vzorku jsme určili 1,64 % ChS z celkového množství lipidů. V mezibuněčné matrix SC je však fyziologicky množství ChS vyšší (pohybuje se kolem 2-5 %)³⁵, a tak jsme jeho množství ve vzorku navýšili ještě o 2,5 % (m/m).

K purifikovaným HSL byl přidán ChS a směs byla použita na přípravu suchého lipidového filmu, který se pak nechal hydratovat pufrů s obsahem Ca^{2+} kationtů o pH 8,5 a 5,5. Následně se provedlo 7 cyklů zmrazování v tekutém dusíku a ohřívání ve vodní lázni temperované na 75-80 °C. Tento postup pro homogenizaci směsi však při pH 8,5 neumožnil vznik disperze. Lipidový film se od stěny zkumavky odloučil, ale ve vodném roztoku vznikly agregáty, které se následně přichytily zpět na stěnu zkumavky.

Předpokládaný vznik disperze HSL v alkalickém prostředí měl umožnit přenos lipidů ve formě disperze na připravené saponifikované a delipidizované SC. Přenesením disperze směsi lipidů na tkáň jsme chtěli pozorovat, jestli dojde po okyselení směsi lipidů na tkáních ke vzniku pravidelného uspořádání. Pro vznik modelu lidské kožní bariéry je totiž nutné převést směs lipidů do agregovaného – fyziologického stavu. Záporný náboj karboxylových skupin VMK umožňuje v alkalickém prostředí vznik stabilní disperze a přechod do kyselé oblasti by měl zajistit destabilizaci tohoto systému a vést k precipitaci směsi lipidů. Použití delipidizovaného a saponifikovaného SC mělo být využité pro porovnání chování směsi lipidů na tkáních se zachovalou korneocytární lipidovou obálkou a na tkáních bez této obálky.

Agregáty ze vzorků, uvedené v tab. 8, byly spolu s částí pufru přeneseny do kapilár a provedlo se u nich měření rozptylu RTG záření.

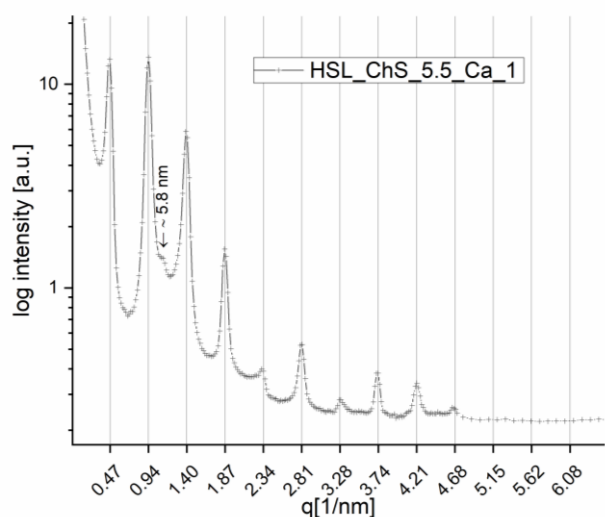
Tabulka 8. Analyzované vzorky z experimentu č.1.

Označení	Počáteční pH	Konečné pH	Ca ²⁺	lipidy
HSL_ChS_5.5_Ca_1	5,5	5,5	ano	1,95 mg HSL a 0,05 mg ChS
HSL_ChS_5.5_Ca_2	5,5	5,5	ano	1,95 mg HSL a 0,05 mg ChS
HSL_ChS_8.5_Ca_1	8,5	8,5	ano	1,95 mg HSL a 0,05 mg ChS

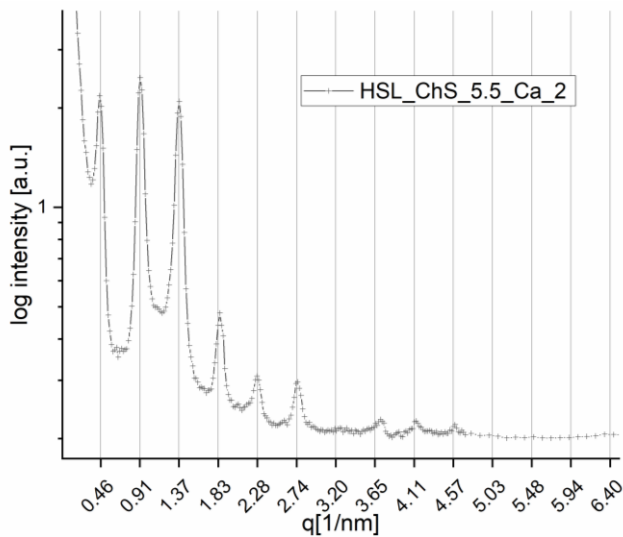
Difraktogramy z experimentu č. 1

Na obr. 22 a 23 se nachází difraktogramy paralelních vzorků HSL_ChS_5.5_Ca_1 a HSL_ChS_5.5_Ca_2 s totožným složením v oblastech SAXS. Na obou obrázcích lze pozorovat, že v kyselém prostředí s přidavkem Ca²⁺ kationtů a ChS tvoří systém vysoce uspořádané struktury. Jsou zde patrné poměrně úzké píky, jejichž poloha se nachází ve vyznačených svislých čárách na difraktogramu. Je zde až 9 patrných píků, které značí přítomnost opakující se pravidelné struktury. Určená mezirovinná vzdálenost je 13,44 nm pro vzorek na obr. 22 a 13,75 nm pro vzorek na obr. 23. Tyto vzdálenosti jsou srovnatelné se vzdáleností LPP ~ 13 nm, uváděnou v dostupné literatuře.^{21,22}

Na obr. 22 dále pozorujeme malý pík s mezirovinnou vzdáleností 5,8 nm, který připisujeme přidavku Ca²⁺ kationtů a ChS. Odpovídá přibližně tomu, co bylo v literatuře popsáno jako SPP.^{22,23}



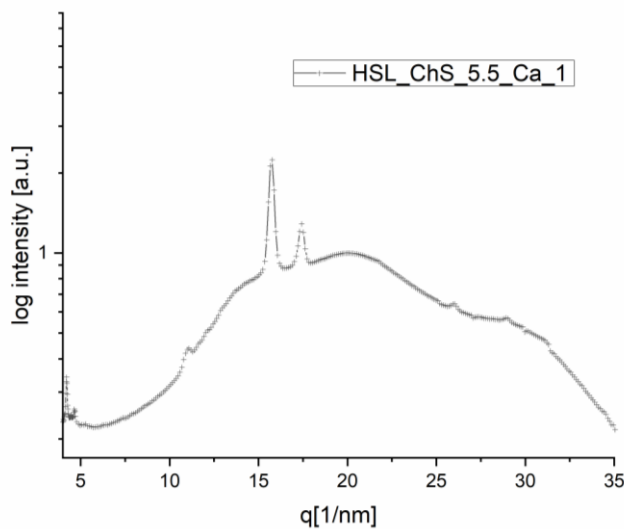
Obrázek 22. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5_Ca_1, SAXS.



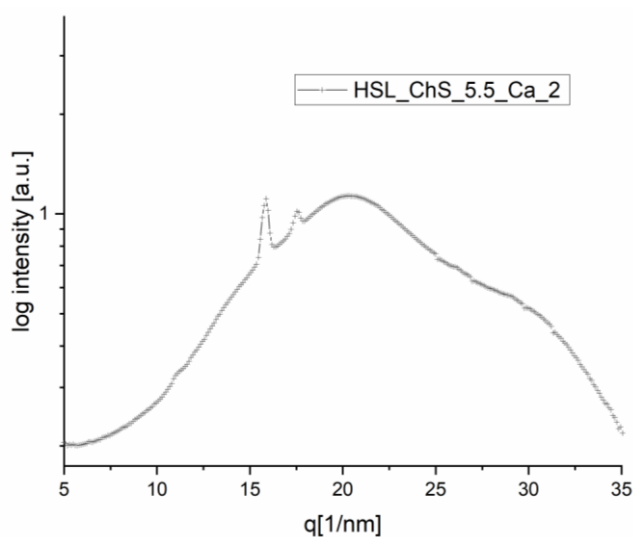
Obrázek 23. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5_Ca_2, SAXS.

Na obr. 24 a 25 jsou vyobrazeny difraktogramy vzorků s totožným složením jako v předešlých difraktogramech na obr. 22 a 23, ale nachází se v oblastech WAXS. Na obou lze pozorovat široký pík, odpovídající rozptylu záření na málo uspořádaných lipidech a na materiálu kapiláry.⁵⁴

Na širokém píku jsou na obou obrázcích 2 dominantní píky, jejichž přítomnost svědčí o orthorombickém uspořádání lipidů v rámci roviny jednotlivých lamel. Na obr. 24 jsou více patrné i další 2 menší píky v oblasti $q = 20\text{-}35 \text{ nm}^{-1}$, které pravděpodobně také náležejí k rigidní krystalické orthorombické mřížce řetězců.

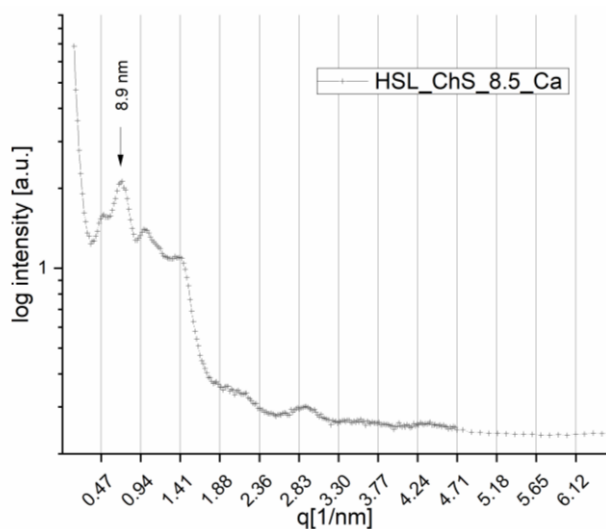


Obrázek 24. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5_Ca_1, WAXS.



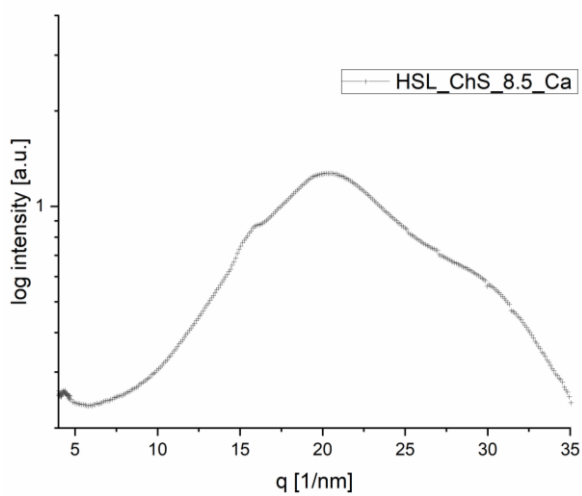
Obrázek 25. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5_Ca_2, WAXS.

Na obr. 26 můžeme sledovat difraktogram v oblasti SAXS pro vzorek HSL_ChS_8.5_Ca_1. Kombinace přídavku Ca^{2+} kationtů a ChS v zásadité oblasti nám neumožnila předpokládaný vznik disperze, ze které by pak při přechodu do oblasti kyselé vznikaly pravidelné struktury. V zásadité oblasti se u toho vzorku vytvořily nekompaktní agregáty. Přídavek Ca^{2+} kationtů nejspíše vedl ke vzniku vápenatých solí s disociovanými karboxylovými skupinami VMK a zajistila se tak stabilizace lipidů. Ca^{2+} kationty mohou interagovat stejným způsobem i s přítomným ChS. Pro tento vzorek byla určena mezivinná vzdálenost $\sim 13,3$ nm, která představuje dlouhou opakovací vzdálenost a je opět srovnatelná s výsledky jiných publikací.^{21,22} Zvolené podmínky, které nereflektují fyziologické kyselé prostředí však vedly k udržení poměrně pravidelné struktury. Na difraktogramu se dále objevuje pík s mezivinnou vzdáleností $\sim 8,9$ nm. Taková struktura zatím popsána nebyla a nepodařila se nám určit.



Obrázek 26. Difraktogram vzorku HSL_ChS_8.5_Ca_1, SAXS.

Obr. 27 je difraktogramem vzorku HSL_ChS_8.5_Ca_1 v oblasti WAXS. Píky, které by svědčily o přítomnosti krystalické orthorombické fáze jsou málo patrné a v laterální struktuře převažuje pravděpodobně fluidní, více permeabilní a pohyblivé uspořádání lipidů.



Obrázek 27. Difraktogram vzorku HSL_ChS_8.5_Ca_1, WAXS.

4.3.2 Experiment č. 2 - optimalizace podmínek pro vznik disperze v přítomnosti Ca²⁺ kationtů

Vzhledem k zajímavému chování HSL v alkalickém pH 8,5 s přidavkem Ca²⁺ kationtů s ChS byl cíl práce dále zaměřen na zjištění vlivu tohoto přídatku na chování modelu lidské kožní bariéry, avšak bez přítomnosti tenkých vrstev SC. Podmínky experimentu byly upraveny a využili jsme vodné prostředí o pH 5,5, 7,4 a 8,5. V některých vzorcích byl použit přídatek ChS anebo Ca²⁺ kationtů, do některých byly přidány složky obě. Přehled nově připravených vzorků, jejich složení a přechod do kyselého pH přidavkem 2M HCl jsou uvedené v tab. 9. Příprava vzorků a princip vzniku agregátů probíhaly stejným způsobem jako v kapitole 4.3.1.

Tabulka 9. Nový set vzorků.

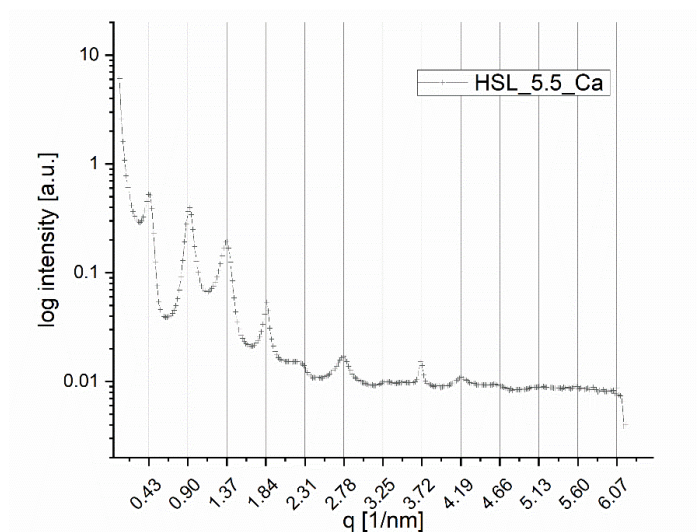
Označení	Počáteční pH	Konečné pH	Ca ²⁺	lipidy
HSL_7.4	7,4	7,4	ne	4 mg HSL
HSL_7.4_Ca	7,4	7,4	ano	4 mg HSL
HSL_5.5_Ca	5,5	5,5	ano	4 mg HSL
HSL_8.5_Ca	8,5	8,5	ano	4 mg HSL
HSL_ChS_7.4	7,4	7,4	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
HSL_ChS_5.5	5,5	5,5	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
HSL_ChS_8.5/5.5	8,5	5,5	ne	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS
HSL_ChS_7.4_Ca	7,4	7,4	ano	3,9 mg HSL a 0,1 mg ChS

Připravené agregáty lipidů byly spolu s částí pufru přeneseny do kapilár a provedlo se měření rozptylu RTG záření. V kapilárách byla měřena pouze malá část vnitřního objemu kapilár a měření je z velké části ovlivněno i pracovníkem, který přístroj obsluhuje. Pracovník vybírá konkrétní místo v kapiláře pro měření a může se stát, že nezvolí v kapiláře nejvhodnější oblast s dostatečnou koncentrací lipidů. Dále může dojít k tomu, že se ve zvoleném místě lipidy vůbec nenacházejí a tímto je celá analýza ovlivněna.

Difraktogramy experimentu č. 2

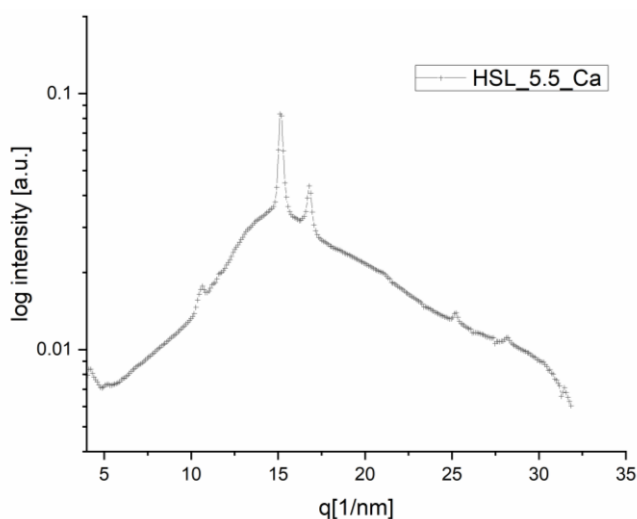
Kyselá oblast – pH 5,5

Difraktogram na obr. 28 patří vzorku HSL_5.5_Ca v oblasti SAXS. Úzké píky nacházející se na difraktogramu značí vznik vysoce uspořádané lamelární struktury s vypočítanou opakovací vzdáleností 13,39 nm. Můžeme konstatovat, že vzorek ve zvoleném kyselém pH (reflektující pH fyziologické) s přidavkem Ca^{2+} kationtů vykazuje podobnou opakovací vzdálenost pro uspořádání lipidů jako má LPP (~ 13 nm).^{21,22} Struktura vzorku na obr. 28 je srovnatelná se strukturou vzorků na obr. 22 a 23.



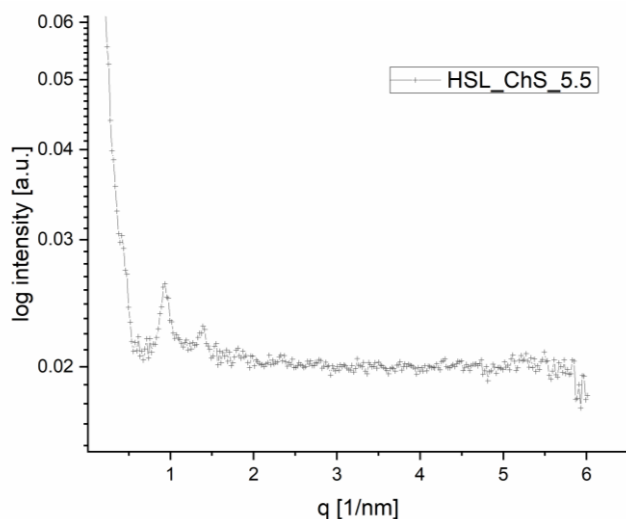
Obrázek 28. Difraktogram vzorku HSL_5.5_Ca, SAXS.

Na obr. 29 se nachází difraktogram z oblasti WAXS pro vzorek HSL_5.5_Ca. Ostré píky na širokém píku dokazují krystalické orthorombické uspořádání molekul lipidů v rovině jednotlivých lamel.



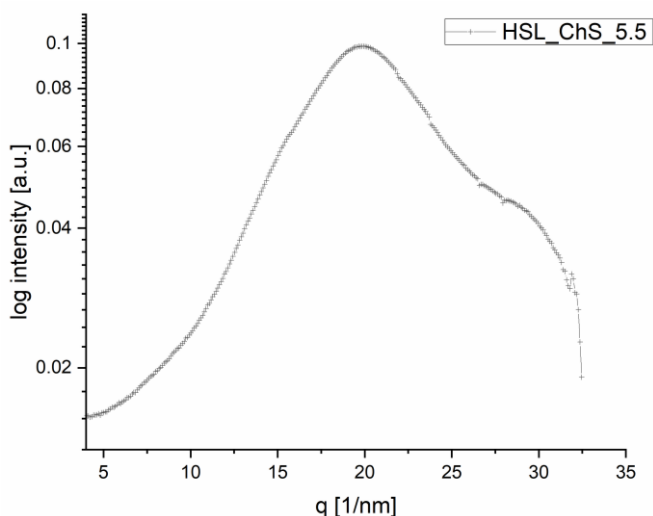
Obrázek 29. Difraktogram vzorku HSL_5.5_Ca, WAXS.

Na obr. 30 je difraktogram z oblasti SAXS pro vzorek HSL_ChS_5.5, ze kterého nebylo možné určit přesnou strukturu kvůli absenci dominantních píků. Při měření mohlo dojít k nepřesnému míření záření na místo v kapiláře, kde se nachází dostatečné množství odebraných agregátů ze vzorku anebo množství agregátů nebylo dostatečné. Přesto se při malých hodnotách q na ose X nachází několik špatně rozlišených píků poukazujících na možnou přítomnost fáze s pravidelně se opakující vzdáleností, kterou u vzorku v kyselé oblasti pH předpokládáme.



Obrázek 30. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5, SAXS.

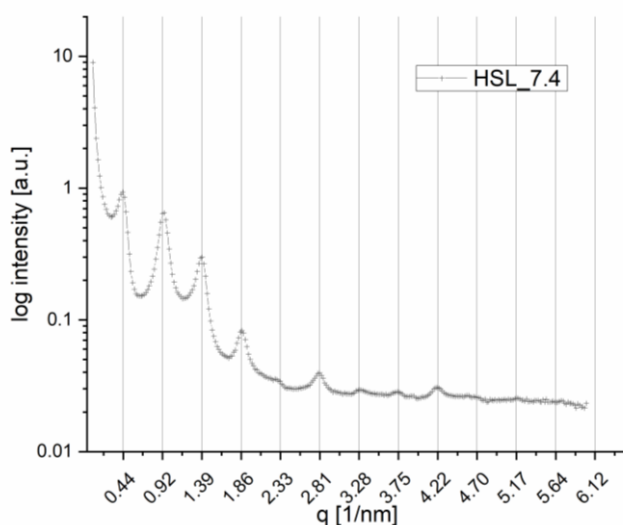
Na difraktogramu pro oblast WAXS vzorku HSL_ChS_5.5 (obr. 31) se na širokém píku vzniklého od rozptylu záření na materiálu kapiláry a fluidní fázi lipidů nenachází žádné menší ostré píky poukazující na orthorombické rigidní uspořádání v rámci jedné lamelární roviny.



Obrázek 31. Difraktogram vzorku HSL_ChS_5.5, WAXS.

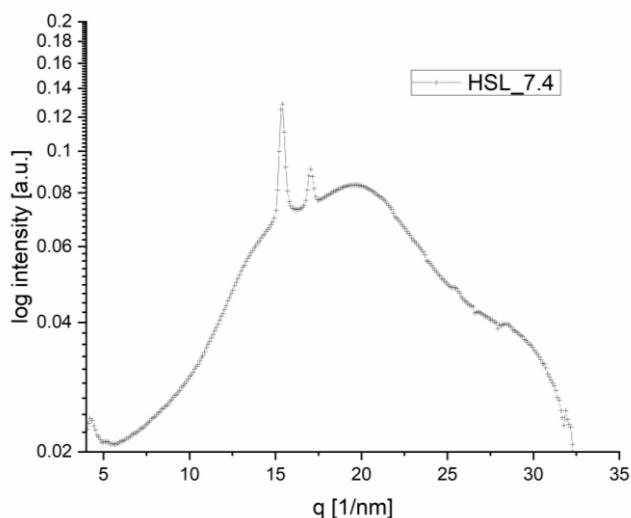
Neutrální oblast – pH 7,4

Na difraktogramu vzorku HSL_7.4 v oblastech SAXS na obr. 32 lze pozorovat až 9 píků, které značí tvorbu pravidelně uspořádané struktury s vypočítanou opakující se mezirovinnou vzdáleností 13,33 nm. Tuto vzdálenost můžeme přiřadit lamelární fázi s dlouhou periodicitou (LPP).^{21,22} Zjistili jsme, že pufr o neutrálním pH 7,4 umožňuje vznik a zachování pravidelné struktury lipidů. Distribuce relativní intenzity napříč jednotlivými řády se mírně liší od podobných vzorků připravených při pH 5,5.



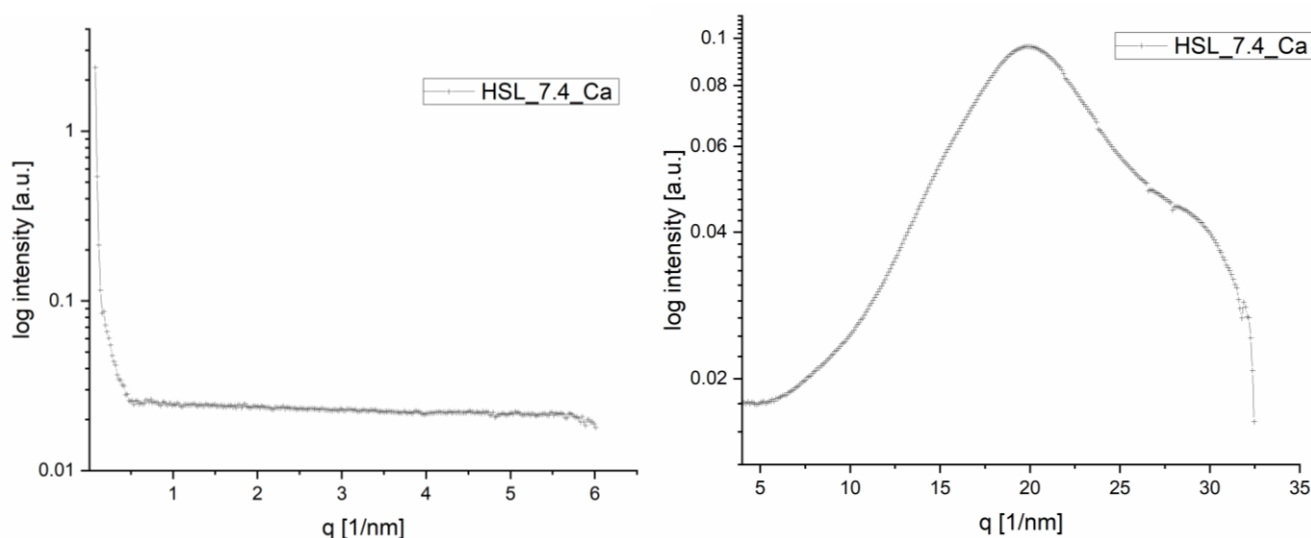
Obrázek 32. Difraktogram vzorku HSL_7.4, SAXS.

Difraktogram pro vzorek HSL_7.4 z oblasti WAXS na obr. 33 značí orthorombické laterální uspořádání lipidů na základě 2 ostrých píků na širokém píku. Jak bylo již výše zmíněno, jedná se o husté rigidní uspořádání dlouhých lipidových řetězců.



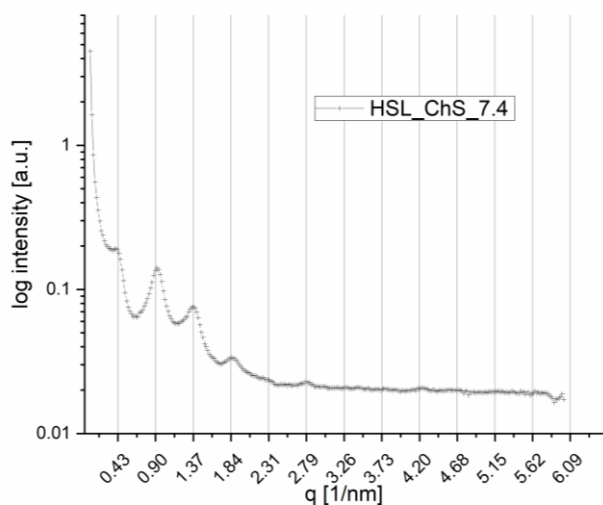
Obrázek 33. Difraktogram vzorku HSL_7.4, WAXS.

Na obr. 34 a 35 jsou vyobrazeny difraktogramy pro vzorek HSL_7.4_Ca v oblasti SAXS (vlevo) a v oblasti WAXS (vpravo). Nepřítomnost piků pravděpodobně poukazuje na chybu při přenosu vzorku do kapiláry nebo při měření vzorku v kapiláře. RTG záření mohlo být mířeno na část kapiláry, kde se nevyskytoval vzorek. Z důvodu vysoké vytíženosti přístroje a technické náročnosti měření nebylo měření tohoto vzorku bohužel opakováno. Nepředpokládáme, že by zvolené podmínky nevedly k tvorbě pravidelné struktury s opakující se vzdáleností vzhledem k ostatním výsledkům z této neutrální oblasti.



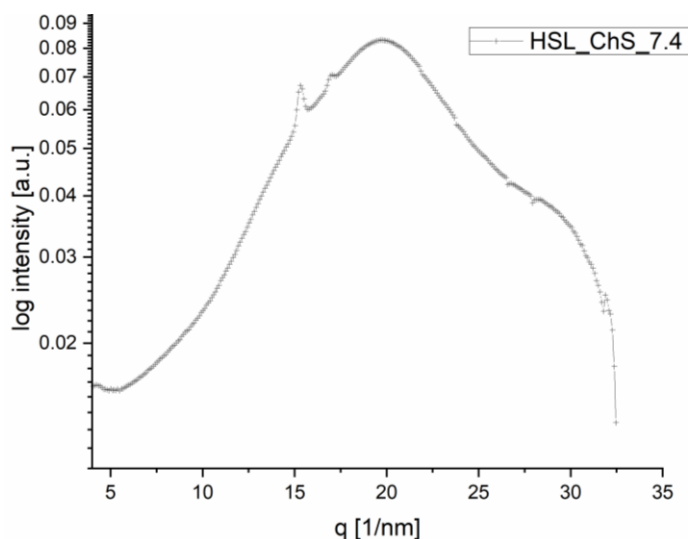
Obrázek 34. a 35. Difraktogramy vzorku HSL_7.4_Ca, SAXS (vlevo) a WAXS (vpravo).

Obr. 36 obsahuje difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4 z oblasti SAXS. Je zde až 6 piků naznačujících vznik dlouhé fáze s vypočítanou opakující se vzdáleností 13,31 nm. Můžeme tedy konstatovat, že pravidelná struktura se v neutrální oblasti udržela i s přidavkem ChS.



Obrázek 36. Difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4, SAXS.

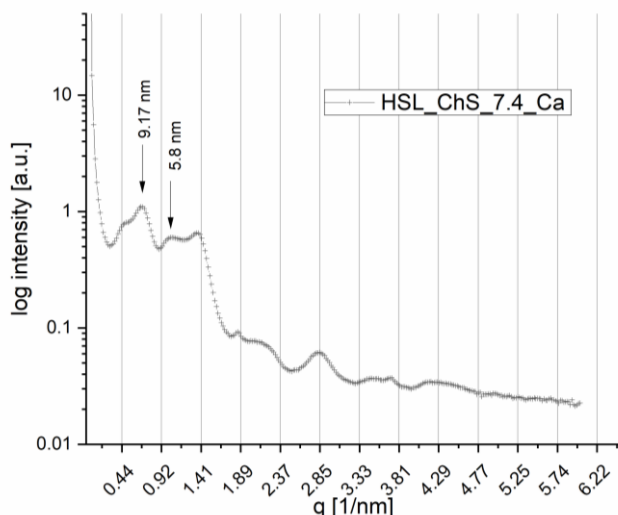
Difraktogram z oblasti WAXS pro vzorek HSL_ChS_7.4 (obr. 37) má 2 menší píky na širokém píku vytvořeného rozptylem záření na materiálu kapiláry a na přítomných lipidech, které zaujímají méně uspořádané struktury – amorfní uspořádání.⁵⁴ Tyto 2 malé píky značí tvorbu orthorombického uspořádání molekul lipidů v jednotlivých lamelárních rovinách.



Obrázek 37. Difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4, WAXS.

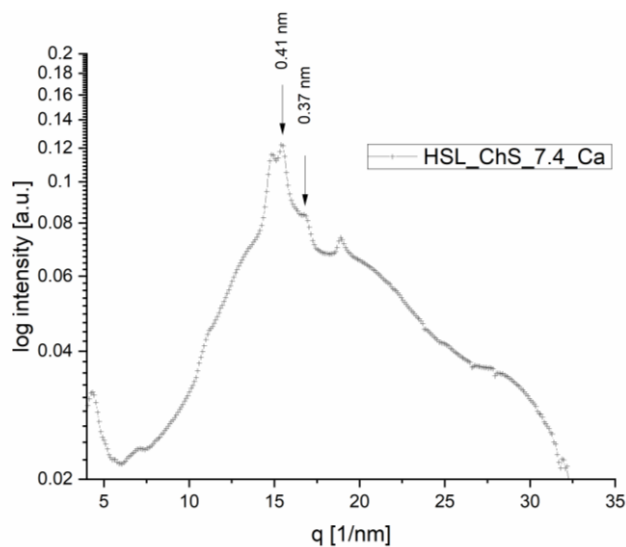
Difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4_Ca z oblasti SAXS (obr. 38) vykazuje přítomnost několika dominantních píků. Píky, kterých poloha odpovídá polohám mřížkových čar, patří pravděpodobně lamelární fázi s dlouhou periodicitou $\sim 13,1$ nm. Opakující se vzdálenost této dlouhé fáze se nepodařila určit tak přesně jako na obr. 32 nebo 36.

Dále na tomto difraktogramu pozorujeme píky, kterých poloha odpovídá mezivinným vzdálenostem $\sim 9,17$ nm a $\sim 5,8$ nm. První z těchto struktur zatím nebyla v literatuře popsána. Podobný pík s hodnotou $d \sim 8,9$ nm se vyskytuje i na obr. 26, kde bylo zvoleno podobné složení vzorku (zásadité prostředí, přídavek ChS a Ca^{2+} kationtů). Druhá zmíněná struktura o $d \sim 5,8$ nm přibližně odpovídá tomu, co bylo publikováno jako SPP^{22,23}. Pík se stejnou hodnotou ($d \sim 5,8$ nm) je k vidění i na obr. 22, kde se vzorek liší kyselým prostředím. Vznik těchto struktur je pravděpodobně podmíněn vlivem přídavku Ca^{2+} kationtů a ChS.



Obrázek 38. Difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4_Ca, SAXS.

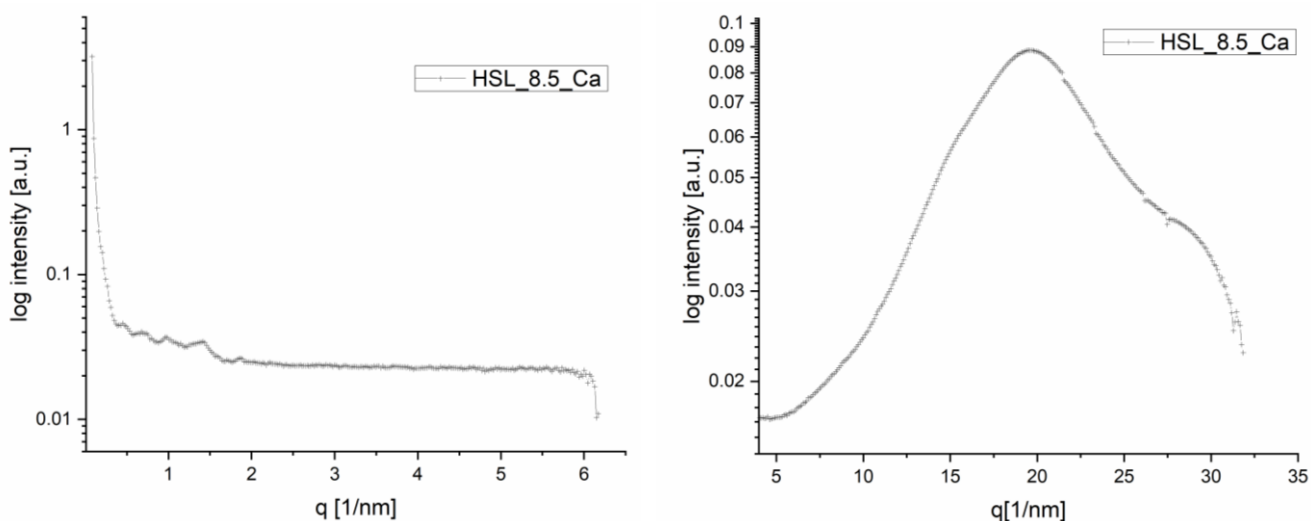
Na obr. 39 se nachází difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4_Ca z oblasti WAXS. Na širokém píku, který se vytváří na základě rozptylu světla na materiále kapiláry a na lipidech tvořící minimálně uspořádané struktury, se objevují píky s hodnotou $d \sim 0,41$ nm a $0,37$ nm. Oba píky značí orthorombické uspořádání lipidů v rovině lamely. V dostupné literatuře se uvádí, že hodnoty $d \sim 0,41$ nm a $0,37$ nm ve WAXS oblasti odpovídají krystalickému orthorombickému uspořádání a že vzdálenost $d \sim 0,41$ nm označuje i hexagonální laterální uspořádání.^{54,55} Dále pozorujeme pík při $q = 14,8 \text{ nm}^{-1}$, který odpovídá $d \sim 0,42$ nm. I tento pík by mohl odpovídat méně těsnému hexagonálnímu uspořádání. Další pík je při $q = 18,9 \text{ nm}^{-1}$, který odpovídá $d \sim 0,33$ nm. Tento pík se nepovedlo přiřadit.



Obrázek 39. Difraktogram vzorku HSL_ChS_7.4_Ca, WAXS.

Alkalická oblast – pH 8,5

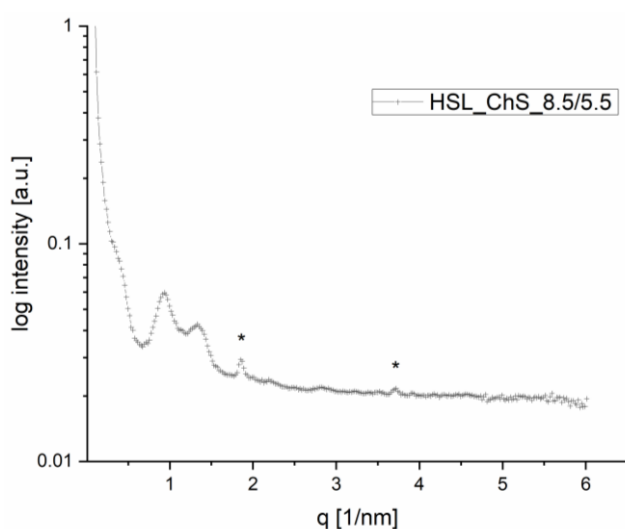
Na následujících difraktogramech z oblasti SAXS a WAXS pro vzorek HSL_8.5_Ca (obr. 40 a 41) nelze určit žádné fáze s opakující se vzdáleností ve vzorku, protože jsou píky příliš malé a špatně rozlišitelné od šumu. Na rozdíl od vzorku na obr. 34 a 35 vykazuje vzorek HSL_8.5_Ca alespoň malé píky v oblasti SAXS. Nelze proto jednoznačně určit, zda došlo k chybě při plnění kapiláry či měření, anebo se jedná o málo uspořádanou strukturu lipidů. Měření bohužel nebylo možné opakovat z hlediska vytížení přístroje a časové náročnosti analýzy.



Obrázek 40 a 41. Difraktogramy vzorku HSL_8.5_Ca, SAXS (vlevo) a WAXS (vpravo).

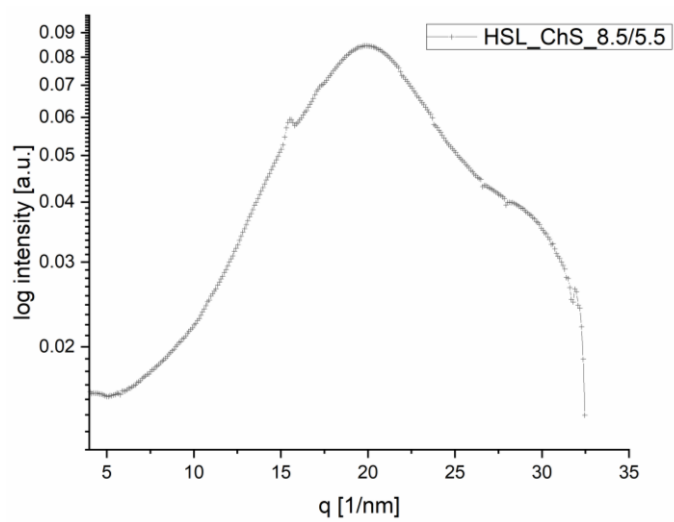
Přechod z alkalické do kyselé oblasti – z pH 8,5 na pH 5,5

Na difraktogramu pro oblast SAXS vzorku HSL_ChS_8.5/5.5 (obr. 42) nebylo možné přesně určit opakující se vzdálenost fáze. Při malých hodnotách q lze pozorovat obtížně viditelný pík poukazující na přítomnost fáze s dlouhou pravidelně se opakující vzdáleností. Píky označené hvězdičkou označují fázi odpovídající separovanému krystalickému Chol s opakující se vzdáleností $\sim 3,4$ nm. Tato vzdálenost byla již dříve publikována v dostupné literatuře.⁵³ U ostatních vzorků z experimentu č. 1 a 2 jsme separovaný Chol nepozorovali nebo nedokázali identifikovat. To by mohlo naznačovat, že při přípravě vzorků okyselením do kyselého pH nastávají procesy, které usnadňují či potencují krystalizaci a separaci Chol.



Obrázek 42. Difraktogram vzorku HSL_ChS_8.5/5.5, SAXS. Hvězdičky značí píky separovaného Chol.

Na obr. 43 je zobrazen difraktogram pro WAXS oblast vzorku HSL_ChS_8.5/5.5. Lze na něm pozorovat široký pík, který je výsledkem rozptylu záření na lipidech a materiálu kapiláry. Na tomto širokém píku je jeden malý ostrý pík a další hůře rozlišený pík, které svědčí o vzniku orthorombického rigidního uspořádání v rovině jednotlivých lamel.



Obrázek 43. Difraktogram vzorku HSL_ChS_8.5/5.5, WAXS.

4.3.3 Shrnutí výsledných uspořádaných struktur ve zvolených podmínkách

V tab. 10 je shrnuto výsledné chování HSL zaměřené na vznik pravidelné struktury s mezirovinnou vzdáleností d (nm) a orthorombického uspořádání v jednotlivých vzorcích.

Tabulka 10. Výsledky vyhodnocování vzorků z pilotního experimentu, experimentu č. 1 a experimentu č. 2 (~ označuje přibližnou hodnotu).

Vzorek	SAXS – lamelární uspořádání	WAXS – laterální uspořádání
HSL_8/5.5	pík při ~ 6,5 nm (d neurčeno) separovaný krystalický Chol	orthorombické
HSL_9/5.5	pík při ~ 6,64 (d neurčeno) separovaný krystalický Chol	bez píků
HSL_ChS_5.5_Ca_1	$d = 13,44$ (odpovídá LPP) pík při ~ 5,8 nm (odpovídá SPP)	orthorombické
HSL_ChS_5.5_Ca_2	$d = 13,75$ (odpovídá LPP)	orthorombické
HSL_ChS_8.5_Ca_1	$d \sim 13,3$ (odpovídá LPP) pík při $d \sim 8,9$ nm (neurčeno)	málo patrné orthorombické
HSL_5.5_Ca	$d = 13,39$ (odpovídá LPP)	orthorombické
HSL_ChS_5.5	bez píků	bez píků
HSL_7.4	$d = 13,33$ (odpovídá LPP)	orthorombické
HSL_7.4_Ca	bez píků	bez píků
HSL_ChS_7.4	$d = 13,31$ (odpovídá LPP)	orthorombické
HSL_ChS_7.4_Ca	$d \sim 13,1$ (odpovídá LPP) píky při ~ 5,8 nm (odpovídá zřejmě SPP) a ~ 9,17 nm (neurčeno)	orthorombické hexagonální
HSL_8.5_Ca	velmi slabé píky	bez píků
HSL_ChS_8.5/5.5	d neučeno, pravidelná struktura blízka LPP separovaný krystalický Chol	orthorombické

V dostupné literatuře převažují názory, že pro dostatečnou organizaci lipidů do uspořádaných struktur je nutné prostředí s kyselým pH 5,5. V tomto pH mají VMK karboxylovou skupinu nedisociovanou. V neutrálním a alkalickém prostředí však dochází k deprotonizaci karboxylové skupiny VMK a pravděpodobně se tím neumožní vznik dostatečně uspořádaných struktur. Dále se předpokládá, že ionizace karboxylové skupiny VMK vede ke snížené tvorbě laterálního orthorombického uspořádání. Oproti vysoce uspořádaným strukturám, které vznikají při fyziologickém kyselém pH, jsou struktury vzniklé v neutrálním pH 7,4 méně odolné vůči ztrátám vody a nemají tak dostatečnou bariérovou funkci. Nižší acidita ve SC je spojena s poruchou kožní bariéry např. u pacientů s atopickou dermatitidou.⁵⁷

Na základě zjištěných výsledků z provedených experimentů lze usoudit, že přidávek Ca^{2+} kationtů a ChS má významný vliv na vznik a udržení vysoce uspořádaných struktur, tedy na lamelární a laterální uspořádání lipidů.

Ve fyziologickém pH 5,5 obecně pozorujeme vznik LPP a orthorombického uspořádání lipidů i při přidavku Ca^{2+} kationtů a ChS. Ve vzorku HSL_ChS_5.5_Ca_1 pozorujeme navíc pík s $d \sim 5,8$ (odpovídající zhruba SPP). U vzorků, ve kterých vznikaly agregáty přechodem z alkalického na kyselé pH okolo 5,5 (HSL_8/5.5, HSL_9/5.5 a HSL_ChS_8.5/5.5) pozorujeme taktéž vznik struktur s určitou pravidelností a dále vznik fáze separovaného krystalického Chol.

Vznik LPP a orthorombického uspořádání je dále patrný v prostředí neutrálním. Při přidavku Ca^{2+} kationtů a ChS v neutrálním prostředí (vzorek HSL_ChS_7.4_Ca) jsme navíc určili SPP s periodicitou $\sim 5,8$ nm a dále fázi s periodicitou $\sim 9,17$ nm, která zatím nebyla v literatuře popsána. Kromě orthorombického uspořádání je ve vzorku patrné i hexagonální. Zajímavé je, že přidávek Ca^{2+} kationtů a ChS pozitivně ovlivnil vznik a udržení LPP s periodicitou $\sim 13,3$ nm i v alkalickém prostředí ve vzorku HSL_ChS_8.5_Ca_1. V tomto vzorku vznikla dále fáze s periodicitou $\sim 8,9$ nm, která dosud nebyla popsána v žádné publikaci.

Předpokládá se, že přítomnost Ca^{2+} kationtů ve směsi lipidů SC s přidavkem ChS podněcuje tvorbu krystalických fází separovaného Chol. Ca^{2+} kationty tvoří v neutrálním a zásaditém pH pravděpodobně komplexy s disociovanými VMK a sulfátovou skupinou ChS,

čímž podporuje udržení hustého uspořádání lipidů v mřížce.⁴⁴ V této práci lze podobně pozorovat vliv Ca^{2+} kationtů na vznik rigidního uspořádání lipidů ve vzorcích HSL_ChS_7.4_Ca a HSL_ChS_8.5_Ca_1.

5. Závěr

Cílem práce bylo sledovat vliv ChS a Ca^{2+} kationtů na chování modelu lidské kožní bariéry. Experiment byl zaměřen na vznik disperze lipidů ve vodném prostředí a optimalizaci podmínek pro spontánní uspořádání lipidů do agregovaných struktur. Vliv Ca^{2+} kationtů na HSL obohacené o ChS byl ale tak velký, že při alkalickém pH nebylo možné připravit disperzi lipidů pro další část experimentu. V práci jsme se dále zaměřili na vliv podmínek (pH, přítomnost Ca^{2+} kationtů, přítomnost ChS) na spontánní uspořádávání lipidů. Ca^{2+} kationty a ChS jsou fyziologicky součástí lidské kožní lipidové bariéry.

Pilotní experiment byl proveden za použití již izolovaných a purifikovaných lipidů SC s cílem získat představu, za jakých podmínek vznikne ve vodném prostředí disperze těchto lipidů. Ověřili jsme, že pro vznik disperze je vhodné zvolit alkalické prostředí o pH $\sim 8,5$. V alkalické oblasti dochází k ionizaci karboxylových skupin VMK a je umožněná hydratace lipidů. Vzniklý záporný náboj VMK navíc disperzi stabilizuje. Přítomnost Ca^{2+} kationtů komplikuje vznik disperze kvůli silným interakcím mezi těmito kationty a anionty VMK vzniklých v alkalickém prostředí. Abychom získali optimální výsledky o strukturách lipidů, připravily se vzorky s různým složením (s přidavkem ChS nebo bez, s přidavkem Ca^{2+} kationtů nebo bez). Pro další experimenty bylo nutné provést novou izolaci a purifikaci lipidů z lidského SC.

Vznik uspořádaných struktur lipidů byl podmíněn změnou teploty (po ochlazení) anebo změnou pH z alkalické do kyselé oblasti. Při přechodu z alkalického do kyselého prostředí docházelo k přeměně disperzního systému na agregovaný (obr. 42 a 43). Nedošlo však k dalšímu shlukování agregátů na kompaktní sraženinu, kterou jsme předpokládali na základě silně hydrofobních interakcí lipidů, ale vznikaly pouze rozptýlené nekompaktní agregáty.

Pomocí měření rozptylu RTG záření jsme zjistili, že při fyziologickém pH 5,5 se tvoří struktura odpovídající dlouhé fázi s periodicitou ~ 13 nm. Přídavek Ca^{2+} kationtů a ChS v kyselém prostředí navíc vedl ke vzniku fáze s periodicitou 5,8 nm. Tato fáze vznikla i v případě použití neutrálního pH s přidavkem Ca^{2+} kationtů a ChS. Kombinace Ca^{2+} kationtů a ChS tedy vede ke vzniku fáze, která se v jejich absenci netvoří.

Neutrální prostředí o pH 7,4 taktéž umožnilo vznik a udržení dlouhé fáze s periodicitou ~ 13 nm. Ve zvoleném alkalickém prostředí o pH 8,5 s přidavkem Ca^{2+} kationtů a ChS byla struktura LPP taktéž zachována. Dále se v tomto prostředí vytvořila struktura s periodicitou $\sim 8,9$ nm, která se nepodařila identifikovat. Přídavek ChS a Ca^{2+} kationtů v alkalickém prostředí umožnil udržení struktury LPP stabilizací lipidů danou silnými interakcemi mezi Ca^{2+} kationty a anionty VMK. Interakce mezi sebou navíc vykazují Ca^{2+} kationty a sulfátová skupina ChS.

Přídavek Ca^{2+} kationtů ve vzorcích pak nejspíše vedl k udržení laterálního orthorombického uspořádání. Přídavek ChS naopak pravděpodobně podpořil tvorbu fluidního uspořádání. Ve vzorcích, kde se vyskytují ChS i Ca^{2+} kationty, se orthorombické uspořádání udrželo.

U některých vzorků došlo pravděpodobně k chybě v měření. Paprsek záření nejspíš mířil na místo, kde se odebraný agregát nenacházel anebo tam nebyl v dostatečném množství. Další možností je, že se nepodařilo najít vhodné místo v kapiláře pro měření.

Pro potvrzení výsledků by bylo potřeba celý experiment zopakovat s větším počtem vzorků a také analytickými metodami verifikovat, že během přípravy vzorků nedochází k významnějším změnám ve složení lipidů, například vlivem degradace některých typů Cer. V takovém případě by bylo nutné provést další optimalizaci metody. V budoucnu by bylo dále vhodné připravit disperzi lipidů s obsahem Ca^{2+} kationtů, která by se dala přenést na delipidizované a saponifikované SC a po okyselení sledovat, jak se budou lipidy chovat za různých podmínek.

6. Seznam zkratek

CE – korneocytární obálka

Cer – ceramidy

CLE – korneocytární lipidová obálka

DLS – dynamický rozptyl světla, z angl. dynamic light scattering

EO Cer – acylceramid

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high-performance liquid chromatography

HPTLC – vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie, z angl. high-performance thin-layer chromatography

HSL – lidské kožní lipidy, z angl. human skin lipids

Chol – cholesterol

ChS – cholesteryl sulfát

LPP – fáze s dlouhou periodicitou, z angl. long periodicity phase

MK – mastné kyseliny

NMF – přirozený zvlhčující faktor, z angl. natural moisturizing factor

PBS – fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline

R_f – retenční faktor

RTG – rentgenové

SAXS – rozptyl rentgenového záření s malým úhlem dopadu, z angl. small angle x-ray scattering

SB – *stratum basale*

SC – *stratum corneum*

SG – *stratum granulosum*

SL – *stratum lucidum*

SPP – fáze s krátkou periodicitou, z angl. short periodicity phase

SS – *stratum spinosum*

TLC – chromatografie na tenké vrstvě, z angl. thin layer chromatography

VMK – volné mastné kyseliny

WAXS – rozptyl rentgenového záření s větším úhlem dopadu, z angl. wide angle x-ray scattering

7. Literatura

- ¹ ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. Ilustroval Ivan HELEKAL. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-140-2.
- ² BERGEROVÁ, Yvonne, BRYCHTA, Pavel a Jan J. STANEK, ed. *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0795-2.
- ³ KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- ⁴ JUNQUEIRA, Luiz C. U., José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- ⁵ ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-371-6.
- ⁶ ARDA, Oktay, Nadir GÖKSÜGÜR a Yalçın TÜZÜN. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*. 2014, **32**(1), 3-13, ISSN 0738081X.
- ⁷ KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
- ⁸ VAN SMEDEN, Jeroen, Michelle JANSSENS, Gert S. GOORIS a Joke A. BOUWSTRA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 295-313, ISSN 13881981.
- ⁹ MATSUI, Takeshi a Masayuki AMAGAI. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International Immunology*. 2015, **27**(6), 269-280, ISSN 09538178.
- ¹⁰ PROKSCH, Ehrhardt, Johanna M. BRANDNER a Jens-Michael JENSEN. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008, **17**(12), 1063-1072, ISSN 09066705.

- ¹¹NEMES, Zoltan a Peter M. STEINERT. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & Molecular Medicine*. 1999, **31**(1), 5-19, ISSN 20926413.
- ¹²JUNGERSTED, Jakob M., Lars I. HELLGREN, Gregor B. E. JEMEC a Tove AGNER. Lipids and skin barrier function – a clinical perspective. *Contact Dermatitis*. 2008, **58**(5), 255-262, ISSN 01051873.
- ¹³VERDIER-SÉVRAIN, Sylvie a Frédéric BONTÉ. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2007, **6**(2), 75-82, ISSN 14732130.
- ¹⁴RINNERTHALER, Mark, Jutta DUSCHL, Peter STEINBACHER, et al. Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Experimental Dermatology*. 2013, **22**(5), 329-335, ISSN 09066705.
- ¹⁵ELIAS, Peter M., Robert GRUBER, Debra CRUMRINE, Gopinathan MENON, Mary L. WILLIAMS, Joan S. WAKEFIELD, Walter M. HOLLERAN a Yoshikazu UCHIDA. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 314-318, ISSN 13881981.
- ¹⁶AKIYAMA, Masashi. Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *Journal of Dermatological Science*. 2017, **88**(1), 3-9, ISSN 09231811.
- ¹⁷ WERTZ, Philip W. Lipid Metabolic Events Underlying the Formation of the Corneocyte Lipid Envelope. *Skin Pharmacology and Physiology*. 1-13, ISSN 16605527.
- ¹⁸ FEINGOLD, Kenneth R. Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of Lipid Research*. 2007, **48**(12), 2531-2546, ISSN 00222275.
- ¹⁹MADISON, Kathi C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003, **121**(2), 231-241, ISSN 0022202X.

²⁰SAHLE, Fitsum F., Tsige GEBRE-MARIAM, Bodo DOBNER, Johannes WOHLRAB a Reinhard H.H. NEUBERT. Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2015, **28**(1), 42-55, ISSN 16605535.

²¹MOORE, David J. a Anthony V. RAWLINGS. The chemistry, function and (patho)physiology of stratum corneum barrier ceramides. *International Journal of Cosmetic Science*. **39**(4), 366-372, ISSN 01425463.

²²GROEN, Daniël, Dana S. POOLE, Gert S. GOORIS a Joke A. BOUWSTRA. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1808**(6), 1529-1537, ISSN 00052736.

²³BOUWSTRA, Joke A., Gert S. GOORIS, Frank E.R. DUBBELAAR a Maria PONEC. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *Journal of Lipid Research*. **42**(11), 1759-1770, ISSN 00222275.

²⁴VÁVROVÁ, Kateřina, Andrej KOVÁČIK a Lukáš OPÁLKA. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. **64**(2), 28-35, ISSN 24536725.

²⁵BONCHEVA, Mila. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *International Journal of Cosmetic Science*. **36**(6), 505-515, ISSN 01425463.

²⁶SOCHOROVÁ, Michaela, Pavla AUDRLICKÁ, Martina ČERVENÁ, Andrej KOVÁČIK, Monika KOPEČNÁ, Lukáš OPÁLKA, Petra PULLMANNOVÁ a Kateřina VÁVROVÁ. Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *Journal of Colloid and Interface Science*. **535**, 227-238, ISSN 00219797.

²⁷BOUWSTRA, Joke A. a Maria PONEC. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1758**(12), 2080-2095, ISSN 00052736.

²⁸MASUKAWA, Yoshinori, Hirofumi NARITA, Eri SHIMIZU, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research*. **49**(7), 1466-1476, ISSN 00222275.

²⁹RABIONET, Mariona, Karin GORGAS a Roger SANDHOFF. Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1841**(3), 422-434, ISSN 13881981.

³⁰TONCIC, Ruzica J., Ivone JAKASA, Suzana L. HADZAVDIC, et al. Altered Levels of Sphingosine, Sphinganine and Their Ceramides in Atopic Dermatitis Are Related to Skin Barrier Function, Disease Severity and Local Cytokine Milieu. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(6), ISSN 14220067.

³¹HOLLERAN, Walter M., Yutaka TAKAGI a Yoshikazu UCHIDA. Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Letters*. **580**(23), 5456-5466, ISSN 00145793.

³²MOTTA, Stefania, Marcello MONTI, Silvia SESANA, Ruggero CAPUTO, Stephana CARELLI a Riccardo GHIDONI. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1182**(2), 147-151, ISSN 09254439.

³³MOJUMDAR, Emanuel H., Gert S. GOORIS a Joke A. BOUWSTRA. Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft Matter*. **11**(21), 4326-4336, ISSN 1744683X.

³⁴WERTZ, Philip W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato-Venereologica*. **80**, 7-11, ISSN 00015555.

³⁵KNOX, Sophie a Niamh M. O'BOYLE. Skin lipids in health and disease: A review. *Chemistry and Physics of Lipids*. **236**, ISSN 00093084.

³⁶SJÖVALL, Peter, Lisa SKEDUNG, Sébastien GREGOIRE, Olga BIGANSKA, Franck CLÉMENT a Gustavo S. LUENGO. Imaging the distribution of skin lipids and topically

applied compounds in human skin using mass spectrometry. *Scientific Reports*. **8**(1), ISSN 20452322.

³⁷STROTT, Charles A. a Yuko HIGASHI. Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *Journal of Lipid Research*. **44**(7), 1268-1278, ISSN 00222275.

³⁸SHIMADA, Midori, Toshihiro MATSUDA, Akira SATO, Takanori AKASE, Tsutomu MATSUBARA, Kiyoshi NAGATA a Yasushi YAMAZOE. Expression of a skin cholesterol sulfotransferase, St2b2, is a trigger of epidermal cell differentiation. *Xenobiotica*. **38**(12), 1487-1499, ISSN 00498254.

³⁹HIGASHI, Yuko, Hirotohi FUDA, Hidekatsu YANAI, Young LEE, Tomoko FUKUSHIGE, Tamotsu KANZAKI a Charles A. STROTT. Expression of Cholesterol Sulfotransferase (SULT2B1b) in Human Skin and Primary Cultures of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. **122**(5), 1207-1213, ISSN 0022202X.

⁴⁰KAWABE, Shoko, Togo IKUTA, Motoi OHBA, Kazuhiro CHIDA, Toshio KUROKI, Eichiro UEDA a Kiyofumi YAMANISHI. Cholesterol Sulfate Activates Transcription of Transglutaminase 1 Gene in Normal Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. **111**(6), 1098-1102, ISSN 0022202X.

⁴¹ELIAS, Peter M., Mary L. WILLIAMS, Eung-Ho CHOI a Kenneth R. FEINGOLD. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1841**(3), 353-361, ISSN 13881981.

⁴²ARSENEAULT, Marjolaine a Michel LAFLEUR. Cholesterol Sulfate and Ca²⁺ Modulate the Mixing Properties of Lipids in Stratum Corneum Model Mixtures. *Biophysical Journal*. **92**(1), 99-114, ISSN 00063495.

⁴³BOUWSTRA, Joke A., Frank E. R. DUBBELAAR, Gert S. GOORIS a Maria PONEC. The Lipid Organisation in the Skin Barrier. *Acta Dermato-Venereologica*. **80**, 23-30, ISSN 00015555.

- ⁴⁴BOUWSTRA, Joke A., Gert S. GOORIS, Frank E. R. DUBBELAAR a Maria PONEC. Cholesterol sulfate and calcium affect stratum corneum lipid organization over a wide temperature range. *Journal of Lipid Research*. **40**(12), 2303-2312, ISSN 00222275.
- ⁴⁵DINNEBIER, Robert E. a Simon J. L. BILLINGE, ed. *Powder Diffraction*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-231-9.
- ⁴⁶ČAPKOVÁ, Pavla. *RTG difrakce v materiálovém výzkumu* [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity J.E.Purkyně v Ústí nad Labem. [cit. 2022-01-15]. Dostupné z: http://www.kmt.tul.cz/edu/podklady_kmt_magistri/MSS/Vyukove_texty_XRD.pdf
- ⁴⁷ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ, Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014, 479-482.
- ⁴⁸BREIDEN, Bernadette a Konrad SANDHOFF. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, **1841**(3), 441-452, ISSN 13881981.
- ⁴⁹GROEN, Daniel, Gert S. GOORIS, David J. BARLOW, Jayne LAWRENCE, Jan B. VAN MECHELEN, Bruno DEMÉ a Joke A. BOUWSTRA. Disposition of Ceramide in Model Lipid Membranes Determined by Neutron Diffraction. *Biophysical Journal*. 2011, **100**(6), 1481-1489, ISSN 00063495.
- ⁵⁰WERTZ, Philip W., William ABRAHAM, Lukas LANDMANN a Donald T. DOWNING. Preparation of Liposomes from Stratum Corneum Lipids. *Journal of Investigative Dermatology*. 1986, **87**(5), 582-584. ISSN 0022202X.
- ⁵¹HATFIELD, Rita M. a Leslie W. FUNG. Molecular properties of a stratum corneum model lipid system: large unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*. 1995, **68**(1), 196-207. ISSN 00063495.
- ⁵² Gaussian LorenCross. *OriginLab.com* [online]. [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <http://www.originlab.com/doc/Origin-Help/Gaussian-LorenCross-PAFunc>

⁵³ PULLMANNOVÁ, Petra, Elena ERMAKOVA, Andrej KOVÁČIK, Lukáš OPÁLKA, Jaroslav MAIXNER, Jarmila ZBYTOVSKÁ, Norbert KUČERKA a Kateřina VÁVROVÁ. Long and very long lamellar phases in model stratum corneum lipid membranes. *Journal of Lipid Research*. 2019, **60**(5), 963-971. ISSN 00222275.

⁵⁴ DOUCET, Jean, Anne POTTER, Carine BALTENNECK a Yegor A. DOMANOV. Micron-scale assessment of molecular lipid organization in human stratum corneum using microprobe X-ray diffraction. *Journal of Lipid Research*. 2014, **55**(11), 2380-2388. ISSN 00222275.

⁵⁵ HATTA, Ichiro, Noboru OHTA, Katsuaki INOUE a Naoto YAGI. Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006, **1758**(11), 1830-1836. ISSN 00052736.

⁵⁶ BRITTON, Hubert T. S. a Robert A. ROBINSON. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society*. 1931, 1456-1462. ISSN 03681769.

⁵⁷ NOVÁČKOVÁ, Anna, Irene SAGRAFENA, Petra PULLMANNOVÁ, et al. Acidic pH Is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021, **141**(8), 1915-1921.e4. ISSN 0022202X.