

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie



Diplomová práce

**Vliv struktury ceramidu na chování tenkých lipidových filmů
jako modelů kožní bariéry**

The effect of ceramide structure on the behavior of thin films modeling the skin barrier

Terezie Šustrová

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

Hradec Králové, 2024

Prohlášení

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

V Hradci Králové, květen 2024

Terezie Šustrová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále děkuji Mgr. Ivě Hrdinové za pomoc s vyhodnocováním výsledků části této práce a celé skupině Skin Barrier Research Group za vytvoření příjemného prostředí pro práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a blízkým, kteří při mně po celou dobu stáli a podporovali mě.

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Terezie Šustrová**

Studijní program: **Farmacie**

Studijní obor: **Farmacie**

Děkan fakulty Vám podle zákona č. 111/1998 Sb. určuje tuto diplomovou práci:

Název práce: **Vliv struktury ceramidu na chování tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry**

Anglický název práce: **The effect of ceramide structure on the behavior of thin films modeling the skin barrier.**

Zásady pro vypracování:

Literární rešerše na téma: stratum corneum, lipidy lidské kožní bariéry, spontánní uspořádání lipidů, příprava a vlastnosti tenkých filmů.

Experimentální práce:

- příprava směsí syntetizovaných lipidů simulujících složení kožní bariéry,
- příprava pevných podložek na nanesení lipidových vrstev,
- nanesení lipidových vrstev technikou sprejování pomocí přístroje Linomat na připravené podklady,
- hodnocení biofyzikálních vlastností připravených modelů.

Analýza a zpracování dat: v programech Dataviewer, MS Excel, GraphPad, OriginPro.

Sepsání diplomové práce: teoretický úvod, popis experimentálních metod, výsledky, diskuze, použitá literatura.

Seznam odborné literatury:

Dle vyhledávání v databázích Scopus a Web of Science

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

Oponenti:

Konzultanti:

Datum zadání diplomové práce: 11.11.2022

Termín odevzdání diplomové práce: dle harmonogramu příslušného akademického roku

.....
Vedoucí katedry

.....
Děkan

V Hr. Králové 3.5.2024

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Posluchač: Terezie Šustrová

Školitel: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv struktury ceramidu na chování tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry

Kožní bariéra je esenciální pro přežití člověka na souši, je umístěna v nejvrchnější vrstvě kůže, *stratu corneu* (SC). SC se skládá z korneocytů, které jsou obklopené oligolamelární lipidovou matrix. Hlavními složkami lipidů SC jsou ceramidy (Cer), mastné kyseliny (MK) a cholesterol (Chol). Ve SC se nacházejí v poměru 1:1:1. Tento poměr je nezbytný pro homeostázu epidermis. Jakákoliv změna v tomto poměru vede k narušení bariérové funkce, např. k rozvoji atopické dermatitidy nebo psoriázy. Tyto lipidy brání nadměrnému úbytku vody z těla a vniknutí nežádoucích látek z vnějšího prostředí do těla.

Lipidová matrix tvoří v kůži typické lamelární uspořádání. Lipidy tvoří struktury s dlouhou lamelární fází - LPP (z anglického - *long periodicity phase*) ($d \sim 13$ nm), s krátkou lamelární fází - SPP (z anglického - *short periodicity phase*) ($d \sim 6$ nm) a fází separovaného Chol ($d \sim 3,4$ nm). Molekuly jsou navzájem organizovány v laterálním uspořádání, které může být orthorombické, hexagonální nebo kapalné neuspořádané.

Cer patří do skupiny sfingolipidů. Jedná se o velmi heterogenní skupinu lipidů. Do této doby bylo objeveno 15 podtříd Cer. Jsou rozdělovány podle toho, zda obsahují sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS), které jsou typické pro eukaryotické buňky, fytosfingosin (P) nebo 6-dihydrosfingosin (H) specifický pro epidermis.

Cílem této práce bylo připravit modelové membrány obsahující směs Cer (NS, NdS nebo NP), MK a Chol a zjistit, zda má struktura Cer efekt na vlastnosti nanosených

tenkých filmů. Dále byl studován vliv tepelné úpravy (zahřátí vzorků na teplotu tání a následné ochlazení) a přítomnost vody při tepelné úpravě.

Periodická struktura vzorků a konformační a molekulární uspořádání lipidů ve vzorcích bylo následně zkoumáno pomocí rentgenové difraktometrie (XRD - z anglického *X-Ray Diffractometry*), Ramanovy mikrospektrometrie a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR - z anglického *Fourier transformed infrared spectroscopy*).

Součástí standardního protokolu na přípravu modelů je jejich zahřátí nad teplotu hlavního fázového přechodu a následné pomalé ochlazení na laboratorní teplotu (tepelná úprava, z anglického *annealing*). Při experimentu bylo zjištěno, že lipidy tvoří pravidelné struktury již před tepelnou úpravou. Na vznik těchto struktur a jejich periodicitu má vliv struktura přítomného Cer. Tepelná úprava má také vliv na tyto struktury, jejich periodicitu převážně prodlužuje. Bylo zjištěno, že v lipidových směsích se vyskytuje orthorombické uspořádání řetězců, přičemž jsme nepozorovali signifikantní vliv tepelné úpravy nebo způsobu jejího provedení na laterální uspořádání řetězců. Bylo zjištěno, že zahřátí má vliv na mezimolekulární interakce mezi polárními skupinami Cer. Na základě našich výsledků vznikla hypotéza, že před zahřátím převládají v modelech hydrofobní interakce řetězců. Změny ve spektrech po tepelné úpravě připisujeme zapojením se dalších interakcí (vodíkových můstků) mezi polárními hlavami Cer.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Terezie Šustrová

Mentor: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: The effect of ceramide structure on the behavior of thin films modeling the skin barrier

The skin barrier is essential for human survival on dry land, it is located in the uppermost layer of the skin, in the *stratum corneum* (SC). SC consists of corneocytes that are surrounded by an oligolamellar lipid matrix. The main components of the SC lipids are ceramides (Cer), fatty acids (FFA) and cholesterol (Chol). They are found in the SC in a ratio of 1:1:1. This ratio is essential for epidermal homeostasis. Any change in this ratio may lead to disruption of the barrier function, e.g. to the development of atopic dermatitis or psoriasis. These lipids prevent excessive loss of water from the body and the entry of undesired substances from the external environment into the body.

The lipid matrix forms a typical lamellar arrangement in the skin. Lipids form structures with a long periodicity phase - LPP ($d \sim 13$ nm), with a short periodicity phase - SPP ($d \sim 6$ nm) and a separated Chol phase ($d \sim 3,4$ nm). The molecules are organized with each other in a lateral arrangement that can be orthorhombic, hexagonal, or liquid disordered.

Cer belong to the group of sphingolipids. This is a very heterogenous group of lipids. By this time, 15 subclasses of Cer had been discovered. They are divided according to whether they contain sphingosine (S), dihydrosphingosine (dS), which are typical for eukaryotic cells, phytosphingosine (P), or 6-dihydrosphingosine (H) specific to the epidermis.

The aim of this work was to prepare simple model membranes containing

a mixture of Cer (NS, NdS or NP-type), FFA and Chol and to find out whether Cer structure has an effect on the properties of the deposited thin films. The effect of annealing (heating the samples over the melting temperature and subsequent cooling down) and the presence of water during annealing were also studied.

Periodical structure of samples, the conformational order, and the molecular arrangement of the lipids in the samples were investigated using X-ray diffractometry (XRD), Raman microspectrometry and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR).

During the experiment, it was found that lipids form regular structures even before annealing. The formation of these structures and their periodicity was influenced by the structure of the Cer present in the model. Annealing in the presence of water effected these structures, usually prolonging their periodicity. The orthorhombic arrangement of chains was detected in the lipid mixtures. The significant effect of annealing and the presence of water on the lateral arrangement was not observed. Temperature was found to affect the interactions of the chains predominate in the molecular ordering before heating. The intermolecular interactions between the polar heads of Cer (hydrogen bonds) seem to be more involved in the lipid ordering after annealing.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	17
2	TEORETICKÁ ČÁST	18
2.1	KŮŽE.....	18
2.1.1	Funkce kůže.....	18
2.1.2	Stavba kůže	18
2.2	STRATUM CORNEUM	20
2.2.1	Struktura SC	20
2.2.2	Korneocytární lipidová obálka	21
2.2.3	Lipidy SC	21
2.2.4	Ceramidy	22
2.2.4.1	Biosyntéza Cer.....	23
2.2.5	Uspořádání lipidů SC	24
2.2.5.1	Lamelární uspořádání	24
2.2.5.2	Laterální uspořádání	25
2.3	MODELY KOŽNÍ BARIÉRY	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	27
3.2	PŘÍPRAVA LIPIDOVÝCH SMĚSÍ	27
3.3	NANÁŠENÍ MODELOVÝCH LIPIDOVÝCH MEMBRÁN	28
3.3.1	Modely lipidových membrán s Cer NS.....	29
3.3.2	Modely lipidových membrán s Cer NdS.....	29
3.3.3	Modely lipidových membrán s Cer NP	30
3.3.4	Tepelná úprava modelových membrán	31
3.4	METODY POUŽITÉ K ZÍSKÁNÍ DAT Z MODELOVÝCH MEMBRÁN. 31	
3.4.1	Měření vzorků pomocí rentgenové difraktometrie (XRD)	32

3.4.2	Měření vzorků pomocí Ramanova mikrospektrometru	32
3.4.3	Měření vzorků pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).....	32
4	VÝSLEDKY	33
4.1	ROZVRŽENÍ EXPERIMENTŮ	33
4.2	RENTGENOVÁ DIFRAKTOMETRIE	33
4.2.1	XRD modelových membrán s obsahem Cer NS před zahřátím.....	34
4.2.2	XRD modelových membrán s obsahem Cer NS po zahřátí.....	36
4.2.3	XRD modelových membrán s obsahem Cer NdS před zahřátím.....	38
4.2.4	XRD modelových membrán s obsahem Cer NdS po zahřátí.....	40
4.2.5	XRD modelových membrán s obsahem Cer NP před zahřátím.....	42
4.2.6	XRD modelových membrán s obsahem Cer NP po zahřátí.....	45
4.3	RAMANOVA MIKROSPEKTROMETRIE.....	47
4.3.1	Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NS... 48	
4.3.2	Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NdS. 53	
4.3.3	Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NP... 57	
4.4	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	61
4.4.1	FTIR modelových membrán s obsahem Cer NS po zahřátí.....	62
4.4.2	FTIR modelových membrán s obsahem Cer NdS po zahřátí.....	64
4.4.3	FTIR modelových membrán s obsahem Cer NP po zahřátí.....	66
4.5	VLIV TEORETICKÉHO POČTU VYTVOŘENÝCH VRSTEV NA ROZLOŽENÍ LIPIDŮ V MODELOVÝCH MEMBRÁNÁCH	67
5	DISKUSE.....	68
6	ZÁVĚR	71
7	LITERATURA.....	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE - korneocytární obálka (z angl. *corneocyte envelope*)

Cer - ceramid/ceramidy

CLE - korneocytární lipidová obálka (z angl. *corneocyte lipid envelope*)

Chol - cholesterol

CholS - cholesterol-sulfát

FFA - *free fatty acids*

FTIR - infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (z angl. *Fourier transformed infrared spectroscopy*)

LPP - dlouhá lamelární fáze (z angl. *long periodicity phase*)

MK - mastná kyselina/mastné kyseliny

SC - *stratum corneum*

SPP - krátká lamelární fáze (z angl. *short periodicity phase*)

XRD - rentgenová difraktometrie (z angl. *X-Ray Diffractometry*)

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Stavba kůže. Lidská kůže se skládá ze tří vrstev - hypodermis, dermis a epidermis. Převzato a upraveno z⁴. 19
- Obrázek 2: Epidermis. Nejsvrchnější vrstva kůže se skládá z pěti podvrstev. Konkrétně se jedná o stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum (nepřítomné v tenké kůži) a SC. Převzato a upraveno z⁴. 20
- Obrázek 3: Struktura a názvosloví Cer. Cer jsou tvořeny sfingoidní bazí a acylovým řetězcem, které jsou spojeny amidovou vazbou. Převzato a upraveno z¹⁰. 23
- Obrázek 4: Obrázek z kryoelektronové mikroskopie ukazující oblast mezi dvěma korneocyty. Z obrázku je zřejmé, že mezi dvěma korneocyty je jen velmi málo lipidových vrstev. Převzato z²². 24
- Obrázek 5: Charakteristická stavba SC. SC je organizované podle modelu "bricks and mortar". Blíže je zobrazena oblast lipidové matrix s charakteristickou lamelární organizací. Lipidy mohou být v orthorombické, hexagonální nebo neuspořádané kapalně laterální organizaci. Převzato a upraveno z¹⁰. 25
- Obrázek 6: XRD difraktogramy vzorků s Cer NS před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,3 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost..... 35
- Obrázek 7: XRD difraktogramy vzorků s Cer NS po zahřívání bez vody (černá) nebo s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,3 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost. 37
- Obrázek 8: XRD difraktogramy vzorků s Cer NdS před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,23 nm (plná čára) a 4,49 nm (přerušovaná čára). Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost..... 39
- Obrázek 9: XRD difraktogramy vzorků s Cer NdS po zahřívání bez vody (černá) a s vodou (modrá). Plné mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,37 nm a přerušované mřížkové čáry 4,65 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé

difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.....	41
Obrázek 10: XRD difraktogram vzorku s Cer NdS po zahřívání bez vody. Bylo aplikováno 0,009 mg lipidů na cm ² . Červené mřížkové čáry odpovídají periodicitě 10,51 nm. Černé plné mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,65 nm a přerušované mřížkové čáry 4,66 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol.	42
Obrázek 11: XRD difraktogramy vzorků s Cer NP před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,35 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.....	44
Obrázek 12: XRD difraktogramy vzorků s Cer NP po zahřívání bez vody (černá) nebo s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 10,52 nm. Hvězdička označuje separovaný Chol. Šipky označují krystalický Cer NP. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.....	46
Obrázek 13: Ramanova spektra vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	50
Obrázek 14: Ramanova spektra zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	51
Obrázek 15: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) a bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu Amide I se slabým zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.....	52
Obrázek 16: Ramanova spektra vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	54
Obrázek 17: Ramanova spektra zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	55

Obrázek 18: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro Amide I se slabým zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	56
Obrázek 19: Ramanova spektra vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	58
Obrázek 20: Ramanova spektra zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické upořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	59
Obrázek 21: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro Amide I se slabším zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	60
Obrázek 22: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NS po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	63
Obrázek 23: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NdS po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	65
Obrázek 24: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NP po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.	66
Obrázek 25: Fotografie z optického mikroskopu zobrazující vzorky s obsahem Cer NS (vlevo před zahřátím a vpravo po zahřátí). Fotografie jsou seřazené sestupně podle klesajícího obsahu lipidů.	67

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Navážky MK pro vytvoření jejich směsi.....	27
Tabulka 2: Navážky jednotlivých složek směsi a přepočty objemů roztoků jednotlivých lipidů pro vytvoření lipidových směsí.	28
Tabulka 3: Příprava roztoků s Cer NS.....	29
Tabulka 4: Příprava roztoků s Cer NdS.....	30
Tabulka 5: Příprava roztoků s Cer NP.....	31
Tabulka 6: Souhrnná tabulka s výsledky měření XRD. Tabulka předkládá přítomnost Chol a mezirovinné vzdálenosti struktur nalezených u jednotlivých typů modelů.	47
Tabulka 7: Hodnoty vlnočtů CH ₂ symetrických valenčních (stretching) vibrací změřené pomocí FTIR.....	62

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Pro přežití člověka na souši je důležitá ochranná funkce kůže. Tuto funkci většinou zabezpečuje nejvrchnější vrstva epidermis - SC. SC chrání organismus před vnějšími vlivy prostředí a nadměrnými ztrátami vody. Pro tuto základní funkci jsou nezbytné lipidy SC. Správné složení a uspořádání těchto lipidů je esenciální pro epidermální homeostázu. Porucha ve složení nebo uspořádání lipidů může vést k rozvoji kožních onemocnění.

SC se skládá ze zploštělých odumřelých buněk - korneocytů, které jsou obklopené oligolamelární lipidovou matrix. Hlavními složkami lipidové matrix jsou Cer, MK a Chol. Tato směs je důležitá pro správnou bariérovou funkci kůže. Cer jsou heterogenní skupinou lipidů, některé například regulují různé buněčné procesy, jako je proliferace, diferenciace a apoptóza. Lipidy se ve SC nacházejí v charakteristickém lamelárním a laterálním uspořádání. Narušení lamelárního a laterálního uspořádání vede k poruše bariérové funkce kůže.

Cílem této práce bylo připravit zjednodušené modely kožní bariéry s obsahem Chol, MK a jednoho typu Cer (NS, NdS, NP) a hodnotit vliv různé struktury těchto Cer na uspořádání tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry. Dalším cílem bylo hodnotit vliv teploty a přítomnosti vody při tepelné úpravě na uspořádání lipidů v membránových modelech. V neposlední řadě byl hodnocen vliv teoreticky vytvořeného počtu vrstev na rozložení těchto lipidů. V rámci této práce jsme také zjišťovali, jaké minimální množství lipidů lze použít k přípravě modelů kožní bariéry tak, abychom je mohli charakterizovat metodami dostupnými na našem pracovišti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Kůže (lat. *cutis*) je životně důležitý orgán lidského těla. Je to anatomicky a fyziologicky specializovaná tkáň tvořící ucelený zevní povrch lidského těla¹. Plocha kůže může u dospělého člověka v průměru dosahovat až 1,6 - 1,8 m² a může vážit 4,5 kg. V závislosti na části těla činí tloušťka kůže 0,5 mm - 4 mm^{2,3}.

2.1.1 Funkce kůže

Kůže zastává několik životně důležitých funkcí. Jednou z nejdůležitějších funkcí je funkce ochranná. Jedná se o ochranu před vnějšími (fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými) vlivy z prostředí a tvoří také obranu proti infekcím. Brání ztrátám vody a elektrolytů do vnějšího prostředí¹⁻³. Kromě ochrany zastává funkci látkové výměny, která je zajištěna dýcháním a exkrečními orgány (potní a mazové žlázy). Další je funkce termoregulační, na které se podílí potní žlázy a cévy. V neposlední řadě se jedná o tvorbu vitamínu D³. V kůži jsou také uloženy smyslové orgány, díky nimž je možné vnímat hned několik vjemů, konkrétně Vater-Paciniho tělíska pro vnímání hmatu, Krauseho tělíska pro vnímání chladu, Ruffiniho tělíska pro vnímání tepla a volná nervová zakončení pro vnímání bolesti².

2.1.2 Stavba kůže

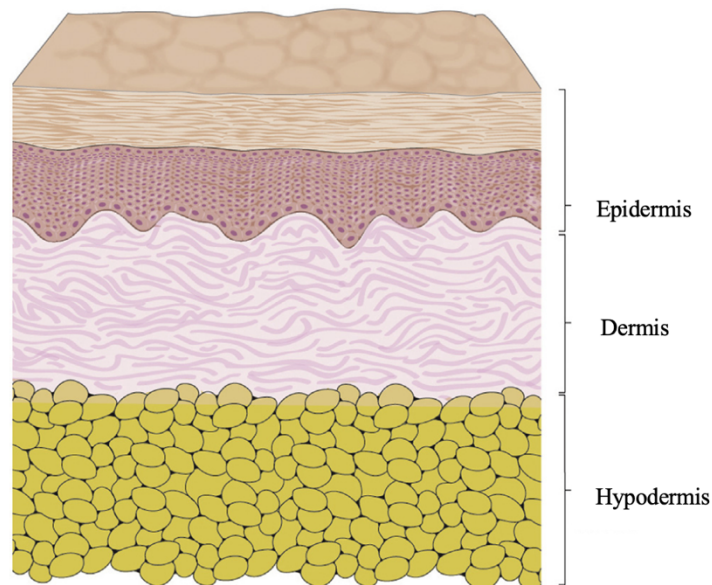
Kůže se skládá z podkožního vaziva (hypodermis), škáry (dermis) a pokožky (epidermis), jak je vidět na obrázku č. 1³.

Hypodermis (označována také jako podkožní tuk nebo *tela subcutanea*) je nejspodnější vrstvou kůže. Je složena převážně z vazivové a tukové tkáně s cévami. Množství tuku se liší dle jedince a místa na těle. Hypodermis hraje roli v termoregulaci, absorpci nárazů a je zdrojem energie⁴.

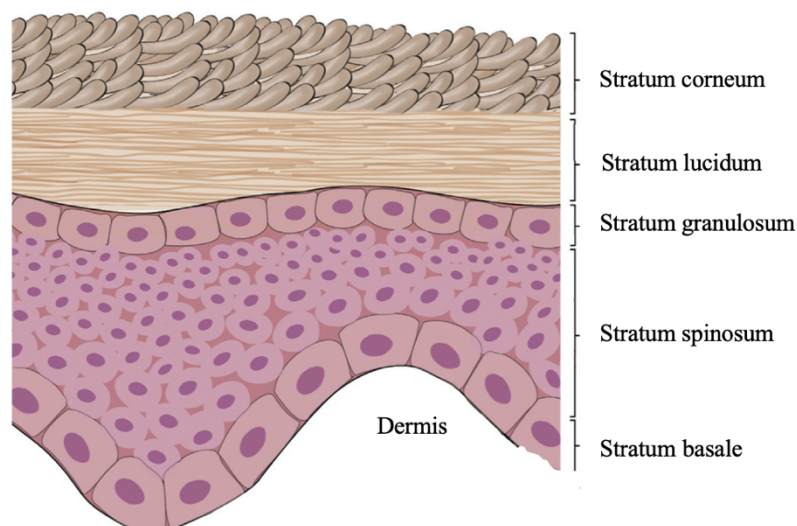
Dermis je různě silná (0,6 - 3 mm) podle toho, na jaké části těla je umístěna. Dermis je tvořena vazivem s elastickými a kolagenními vlákny. Bohatá je také na krevní a lymfatické cévy. I zde se nachází několik dalších druhů buněk. Jedná se například

o monocyty (žírné buňky) nebo lymfocyty (T- a B-). Enzymaticky aktivní formou histiocytů jsou fagocytózy schopné makrofágy. Mastocyty se účastní alergických a zánětlivých reakcí a jsou schopné uvolňovat mediátory, například serotonin, histamin nebo heparin. Střední vrstva kůže je tvořena dvěma vrstvami - papilární vrstvou (lat. *pars papillaris*) na povrchu a hlouběji uloženou retikulární vrstvou (lat. *pars reticularis*). V dermis jsou také uložena veškerá smyslová tělíska zmíněná již výše⁴⁻⁶.

Epidermis tvoří nejsvrchnější část kůže. Hlavními buňkami epidermis jsou keratinocyty. Zbývající část tvoří melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Basální vrstva je tvořena jednou řadou keratinocytů⁵. Ty se dělí a postupně mění na korneocyty tvořící SC. Keratinocyty při migraci z bazální vrstvy k povrchu epidermis procházejí tzv. keratinizací a následně jsou z povrchu odlupovány (tzv. deskvamovány). Epidermis se skládá z pěti vrstev. Odspodu jsou to *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* (nepřítomné v tenké kůži) a svrchní SC⁴. Vrstvy epidermis jsou blíže vidět na obrázku č. 2.



Obrázek 1: Stavba kůže. Lidská kůže se skládá ze tří vrstev - hypodermis, dermis a epidermis. Převzato a upraveno z⁴.



Obrázek 2: Epidermis. Nejsvrchnější vrstva kůže se skládá z pěti podvrstev. Konkrétně se jedná o stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum (nepřítomné v tenké kůži) a SC. Převzato a upraveno z⁴.

2.2 Stratum corneum

SC jako nejsvrchnější vrstva epidermis chrání tělo před ztrátami vody a před vnikem potenciálně patogenních substancí z vnějšího prostředí do kůže⁷. Jedná se o vrstvu silnou 10-15 μm . Bariérová funkce SC je přímo spojována s lipidy v něm obsaženými⁸.

2.2.1 Struktura SC

Struktura SC je nejčastěji znázorňována pomocí modelu „bricks and mortar“ (česky „cihly a malta“). Cihlami jsou zde míněny zploštělé zrohovatělé korneocyty (diferencované keratinocyty), které jsou zabudovány do lipidové matrix (malta)^{8,9}.

Korneocyty obsahují mikrofibrily keratinu a malé množství vody. Na povrchu mají zrohovatělou vrstvu ze zesílených proteinů, jako je loricrin a involucrin. Na zrohovatělé proteiny, zejména na glutamátové zbytky involucrinu, je pomocí EOS-epoxy-enon skupiny neenzymaticky vázána tzv. korneocytární lipidová obálka (CLE - z anglického *corneocyte lipid envelope*) tvořená monovrstvou nepolárních lipidů (ω -hydroxylované Cer a MK). Navázání Cer s obsahem EOS-epoxy-enon skupiny je

nezbytné pro tvorbu kožní bariéry a hraje velký vliv v patogenezi některých onemocnění^{10,11}.

2.2.2 Korneocytární lipidová obálka

CLE tvoří kovalentně vázané lipidy (Cer a MK) na proteiny korneocytární obálky (CE - z anglického *corneocyte envelope*). Mezi další proteinové prekurzory CE patří involucrin a loricrin. CLE je důležitá pro integritu SC jako kožní bariéry. Poškození této struktury je jedním z hlavních strukturálních defektů, které následně vedou k různým kožním onemocněním s porušenou bariérovou funkcí kůže. Způsob připojení lipidů na tyto proteiny je popsán v předchozí sekci (2.2.1). Předpokládá se, že tato obálka tvoří šablonu pro tvorbu mezibuněčných lipidových vrstev. V lipidové matrix je 10-25 těchto vrstev zarovnaných rovnoběžně s povrchem kůže^{10,11}.

2.2.3 Lipidy SC

Hlavními složkami lipidové matrix jsou Cer, Chol a MK v ekvimolárním poměru přibližně 1:1:1. Tento poměr je vysoce důležitý pro epidermální homeostázu. Jakákoliv změna v tomto poměru se ukazuje být příčinou narušení bariérové funkce kůže a vzniku kožních onemocnění jako je psoriáza nebo atopická dermatitida. Ve SC se nenacházejí žádné fosfolipidy nebo glykolipidy^{7,12}.

MK ve SC jsou převážně satureované a nerozvětvené o délce 14 - 34 uhlíků. Kyselina lignocerová ($C_{24}H_{48}O_2$) a cerotová ($C_{26}H_{52}O_2$) tvoří 50% hmotnosti všech MK ve SC. V menším množství se v něm vyskytují kratší a nenasatureované MK. Zvýšené množství těchto kyselin předznamenává patologický stav⁷.

Hlavním steroidem v lipidové bariéře kůže je Chol, který je esenciální pro její správnou funkci. V minimálním množství se ve SC nachází ještě cholesterol-sulfát (CholS) (ester kyseliny sírové a cholesterolu). Jeho funkce není plně známa, ale má se za to, že přispívá k soudržnosti SC a reguluje deskvamaci na povrchu kůže⁷.

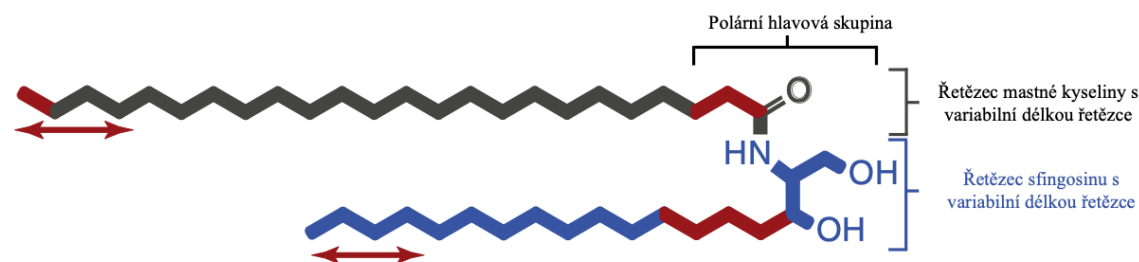
Poslední součástí hydrofobní lipidové matrix jsou Cer, o kterých bude blíže pojednáno v následující kapitole (2.2.4).

2.2.4 Ceramidy

Cer patří do skupiny sfingolipidů. V buňkách se účastní regulace buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace a apoptóza. Jsou součástí oligolamelární lipidové membrány, která se nachází mezi korneocyty ve SC. Ve SC tvoří přibližně 1/3 všech molekul, což je asi 50% hmotnosti všech lipidů⁷.

Cer mají relativně malou polární hlavu a dva hydrofobní řetězce - řetězec sfingoidní baze a N-acylový řetězec (řetězec MK). Cer tvoří heterogenní skupinu. Do této doby bylo popsáno 15 podtříd Cer. Všechny Cer jsou založené na sfingoidní bazi, což je obvykle 18 uhlíků dlouhý aminoalkohol. Sfingoidní baze může být tvořena sfingosinem (S), dihydrosfingosinem (dS), typickým pro eukaryotické buňky, fytosfingosinem (P) nebo 6-hydroxysfingosinem (H), které jsou specifické pro epidermis. Primární aminoskupina Cer je acylována nejčastěji nasycenou a nerozvětvenou MK o 24 uhlících nebo v případech ultradlouhých Cer kyselinou o 30-32 uhlících. Tato MK může být nesubstituovaná (N), α -hydroxylovaná (A), ω -hydroxylovaná (O) nebo je hydroxyl v poloze ω esterifikován dalším acylovým řetězcem, převážně linolové kyseliny (EO)^{7,13}. Struktura Cer je blíže zobrazena na obrázku č. 3.

Cer jsou zkráceně pojmenovávány nomenklaturou dle Motty. Struktura Cer je definována výše zmíněnými písmeny kombinující sfingoidní část a substituci MK^{7,13}.



	Nehydroxylovaná MK, [N]	α -hydroxylovaná MK, [A]	Esterifikovaná ω -hydroxylovaná MK, [EO]
Dihydrosfingosin, [dS]	[NdS]	[AdS]	[EOdS]
Sfingosin, [S]	[NS]	[AS]	[EOS]
Fytosfingosin, [P]	[NP]	[AP]	[EOP]
6-hydroxysfingosin, [H]	[NH]	[AH]	[EOH]

Obrázek 3: Struktura a názvosloví Cer. Cer jsou tvořeny sfingoidní bází a acylovým řetězcem, které jsou spojeny amidovou vazbou. Převzato a upraveno z¹⁰.

2.2.4.1 Biosyntéza Cer

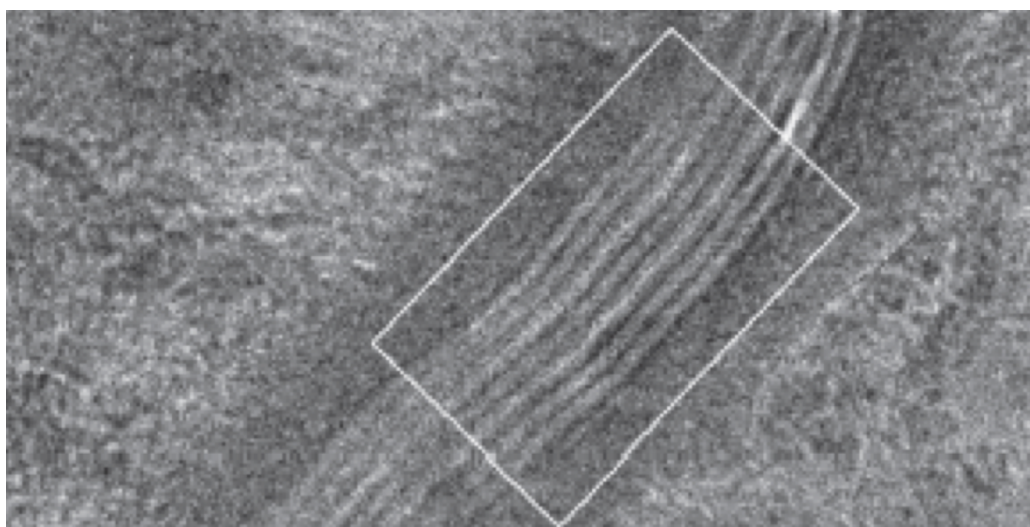
Biosyntéza začíná kondenzací L-serinu a palmitoyl-koenzymu-A v endoplazmatickém retikulu keratinocytů. Tato kondenzace je katalyzována serinpalmitoyl-koenzym-A-transferázou a výsledkem je 3-ketodihydrosfingosin, který je redukován pomocí ketosfinganin-reduktázy na dihydrosfingosin. Tato reakce je následována acylací katalyzovanou Cer-synthasou 1-6 s cílem získat dihydroCer. Tyto molekuly jsou následně desaturovány na N-acylsfingosiny (dle Motty - Cer NS). Hydroxylované Cer, jako jsou fytoCer vycházející ze 4-hydroxysfingosinu, jsou tvořeny z dihydroCer. Původ 6-hydroxyCer (např. Cer NH) je stále nejasný. Cer jsou následně převedeny do formy polárních sfingolipidů (glukosylCer, sfingomyelin). Ve formě lamelárních tělísek jsou transportovány do mezibuněčného prostoru, kde jsou posléze enzymaticky štěpeny zpět na Cer¹⁴.

2.2.5 Uspořádání lipidů SC

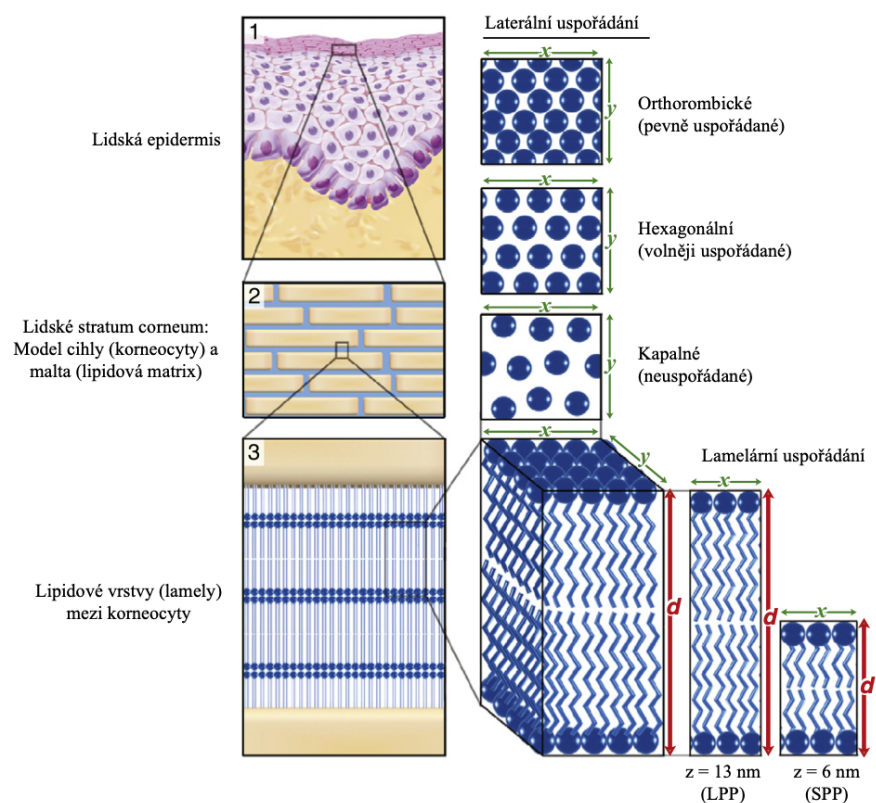
Lipidy mezibuněčné matrix se organizují do typického uspořádání, které můžeme dle struktury rozdělit na lamelární a laterální. Charakteristická struktura SC je blíže vyobrazena na obrázku č. 5. Způsob uspořádání je obvykle studován pomocí několika metod, jako je například Ramanova mikrospektrometrie, XRD nebo FTIR.

2.2.5.1 Lamelární uspořádání

Jak bylo zmíněno již výše, lamely mezibuněčné matrix jsou orientovány paralelně s povrchem korneocytů¹⁰. Mezi dvěma korneocyty se nachází jen několik málo lamel, jak je blíže zobrazeno na obrázku č. 4. Takový tenký systém se obvykle chová jinak než několik stovek vrstev lipidů pohromadě. Ve SC bylo nalezeno lamelární uspořádání s dlouhou lamelární fází (LPP) o délce $d \sim 13$ nm, krátkou lamelární fází (SPP) o délce $d \sim 6$ nm a fází separovaného Chol o délce $d \sim 3,4$ nm¹². Ukazuje se, že přítomnost LPP je unikátní a hraje důležitou roli ve funkci kožní bariéry¹⁰.



Obrázek 4: Obrázek z kryoelektronové mikroskopie ukazující oblast mezi dvěma korneocyty. Z obrázku je zřejmé, že mezi dvěma korneocyty je jen velmi málo lipidových vrstev. Převzato z²².



Obrázek 5: Charakteristická stavba SC. SC je organizované podle modelu "bricks and mortar". Blíže je zobrazena oblast lipidové matrix s charakteristickou lamelární organizací. Lipidy mohou být v orthorombické, hexagonální nebo neuspořádané kapalně laterální organizaci. Převzato a upraveno z¹⁰.

2.2.5.2 Laterální uspořádání

Laterální uspořádání označuje organizaci lipidů v lamelách mezibuněčné matrix. Ve zdravém lidském SC jsou lipidy hlavně v rigidním, orthorombickém, uspořádání bez schopnosti rotace. Pokud jsou lipidy uspořádány volněji, s určitou schopností rotace, jedná se o hexagonální uspořádání. Mohou být ve SC dokonce i v kapalně, neuspořádané, fázi. Toto uspořádání je zobrazeno na obrázku č. 5^{10,15}.

2.3 Modely kožní bariéry

Modely kožní bariéry byly připravovány již v několika desítkách předchozích pracích^{12,16}. Nebylo však dosaženo jednotného modelu uspořádání modelů kožní bariéry. Hlavně díky tomu, že byl experiment pokaždé navržen jinak, a byly použity různé metody přípravy těchto modelů.

Tyto modely vždy jeví určitý stupeň zjednodušení, ale porozumění jednodušším systémům je nezbytné pro porozumění komplexnímu systému SC. V této práci budou porovnány modely kožní bariéry s obsahem vždy jednoho vybraného Cer. Poměr lipidů mezibuněčné matrix zůstane zachován tak, aby se zastoupení jednotlivých lipidů co nejvíce přibližovalo skutečnému poměru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité materiály a chemikálie

K experimentu byly použity *N*-lignoceroyl-*D*-erythro-sfingosin (Cer NS) a *N*-lignoceroyl-*D*-erythro-dihydrosfingosin (Cer NdS) zakoupené od firmy Avanti Polar Lipids, Inc. a *N*-lignoceroyl-fytosfingosin (Cer NP) syntetizovaný na Katedře organické a bioorganické chemie. Chol byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich. Část MK (palmitová, stearová a behenová) byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich, kyselina arachidová od firmy BioChemika a kyselina lignocerová od firmy Tokyo Chemical Industry Co., Inc. Všechna rozpouštědla byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich a byla v HPLC kvalitě.

3.2 Příprava lipidových směsí

K provedení experimentu bylo nutné připravit nejprve směsi lipidů, které byly následně použity k vytvoření modelů kožní bariéry. Připravila se směs složená z kyseliny palmitové ($C_{16}H_{32}O_2$), stearové ($C_{18}H_{36}O_2$), arachidové ($C_{20}H_{40}O_2$), behenové ($C_{22}H_{48}O_2$) a lignocerové ($C_{24}H_{48}O_2$). Kyseliny navážené na analytických vahách se kvantitativně rozpustily ve 100 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Navážky jednotlivých kyselin jsou uvedeny v tabulce č. 1. Pro usnadnění rozpouštění byla použita ultrazvuková lázeň. Následně bylo veškeré rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce a výsledná směs byla dosušena v exsikátoru.

Tabulka 1: Navážky MK pro vytvoření jejich směsi.

hmotnost směsi = 1000 mg			
směs MK	M[g/mol]	molární procenta	hmotnost složky [mg]
Palmitová	256,42	1,8	13,3564
Stearová	284,42	4	32,9218
Arachidová	312,53	7,6	68,7336
Behenová	340,58	47,8	471,0973
Lignocerová	368,63	38,8	413,8910
Celkově		100	1000

Cer NS, Cer NdS, Cer NP a Chol byly naváženy na analytických vahách a následně rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Pro přípravu vzorků byly použity jejich alikvotní objemy. Navážky jednotlivých složek směsí jsou uvedeny v tabulce č. 2. Roztoky ve vialkách se sušily přibližně 30 minut plynným dusíkem za teploty 35 °C, dokud nebylo celé rozpouštědlo vypařené.

Jako poslední proběhlo dosušení jednotlivých složek v exsikátoru nad oxidem fosforečným a tuhým parafínem, aby se vysušily zbytky vlhkosti i organických rozpouštědel. Výsledná směs se tedy skládala z Chol, směsi MK a Cer v poměru 0,45:1:1. Jelikož u Chol často dochází k vytváření jeho krystalů, které později překážejí při vyhodnocování výsledků, postačí, aby se ve směsích nacházel v menším množství¹⁷. Navážky jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Navážky jednotlivých složek směsi a přepočty objemů roztoků jednotlivých lipidů pro vytvoření lipidových směsí.

	Ceramid [mg]	Cholesterol [mg]	MK [mg]	Celkové množství směsi [mg]
TS-NS	5,558	1,488 _{text}	2,954	10
TS-NdS	5,566	1,485	2,949	10
TS-NP	5,625	1,465	2,910	10

3.3 Nanášení modelových lipidových membrán

K přípravě modelů kožní bariéry se lipidové směsi nanášely konstantně v jedné vrstvě na krycí mikroskopická sklíčka o velikosti 22x22 mm pomocí přístroje Linomat V rychlostí 100 µl/10 minut. Výsledný vzorek tvořil na krycím sklíčku čtverec o ploše 1x1 cm. Před nanášením se od každé směsi připravily čtyři roztoky o různých koncentracích, vždy o objemu 10 ml. Jako rozpouštědlo byl použit Hexan:Ethanol 96 % v poměru 2:1. Ke snazšímu rozpouštění se použila ultrazvuková lázeň.

U směsi CerNdS/Chol/MK nedošlo k úplnému rozpuštění pevných látek ani za použití ultrazvukové lázně a zahřívání na teplotu 40°C. Pro rozpuštění bylo nutné k roztoku přidat čisté rozpouštědlo. Vznikl tedy roztok o poloviční koncentraci, než měl

původně být. Vzorky TS-NdS-1A1, TS-NdS-1A2, TS-NdS-1B1 a TS-NdS-1B2 (vzorky s Cer NS v množství 0,45 mg/cm²) se poté nanášely ve dvou vrstvách místo jedné, jako tomu bylo u ostatních vzorků.

3.3.1 Modely lipidových membrán s Cer NS

Od každé vytvořené koncentrace byly nanесeny 4 modelové lipidové membrány. U vzorku TS-NS-1B2 musel být znovu vytvořen roztok s koncentrací 4,5 mg/l. Původní vzorek se z vialky vypařil pravděpodobně v důsledku špatné těsnosti víčka. Znovu se navázila směs s obsahem Cer NS, která byla následně zředěna rozpouštědlem do požadované koncentrace. Navážky a způsob ředění při přípravě roztoků s Cer NS jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Příprava roztoků s Cer NS.

		roztok č. 1	roztok č. 2	roztok č. 3	roztok č. 4
TS-NS	hmotnost lipidů na 1 vzorek [mg]	0,45	0,0675	0,009	0,001
	počet nanášených sklíček	4	4	4	4
	koncentrace nastříkovaného roztoku [mg/ml]	4,5	0,675	0,09	0,01
	množství použitého čistého ceramidu [mg]	3,45			
		1,16			
	objem roztoku č. 1 [μl]		150	20	
	objem roztoku č. 3 [μl]				110
	objem čistého rozpouštědla [μl]	770	850	980	890
260					

3.3.2 Modely lipidových membrán s Cer NdS

Jak je již zmíněno výše, u roztoku s nejvyšší koncentrací došlo k jeho naředění na poloviční koncentraci. Vzorky TS-NdS-1A1, TS-NdS-1A2, TS-NdS-1B1 a TS-NdS-1B2 (vzorky s obsahem Cer NdS v množství 0,45 mg/cm²) byly nanесeny vždy ve dvou vrstvách, bez otočení sklíček.

U vzorků TS-NdS-1A1 a TS-NdS-1A2 byly pozorovány shluky lipidů. Shluky se nacházely a následně byly očištěny i z nanášecí jehly stříkačky v Linomatu V pomocí páry s roztokem chloroformu s methanolem v poměru 2:1. K tomuto čištění došlo před nástřikem první vrstvy u vzorku TS-NdS-1B1 a prvních dvou vrstev vzorku TS-NdS-1B2. Před nanесením posledních dvou modelů musel být nanášený roztok znovu rozpuštěn v ultrazvukové lázni.

Na sklíčkách TS-NdS-2A1, TS-NdS-2A2 a TS-NdS-2B2 (vzorky s obsahem Cer NdS v množství 0,0675 mg/cm²) byly patrné jen malé shluky lipidů. Oproti vzorkům s vyšší koncentrací lipidů nebyly tyto shluky tak velké a časté. U modelů TS-NdS-3A2 a TS-NdS-3B2 (vzorky s obsahem Cer NdS v množství 0,009 mg/cm²) došlo k nanesení lipidové vrstvy v pruzích tak, že plocha na sklíčku nebyla kontinuální. Všechny lipidy během nastříkávání zasychaly. Většina zaschla již před dokončením nástřiku v souvislé vrstvě nebo nesouvisle. Shluky lipidů byly následně pozorovány na sklíčkách některých vzorků, jak je zmíněno výše. K této nehomogenitě mohlo docházet díky tomu, že síly mezi podložkou a nanášenou látkou nebyly dostatečně přitažlivé. Navážky a způsob ředění při přípravě roztoků s Cer NdS jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Příprava roztoků s Cer NdS.

		roztok č. 1	roztok č. 2	roztok č. 3	roztok č. 4
TS-NdS	hmotnost lipidů na 1 vzorek [mg]	0,45	0,0675	0,009	0,001
	počet nanášených sklíček	4	4	4	4
	koncentrace nastříkovaného roztoku [mg/ml]	2,25	0,675	0,09	0,01
	množství použitého čistého ceramidu [mg]	4,13			
	objem roztoku č. 1 [μl]		150	20	
	objem roztoku č. 3 [μl]				110
	objem čistého rozpouštědla [μl]	920 + 920	850	980	890

3.3.3 Modely lipidových membrán s Cer NP

Stejně jako u vzorků s obsahem Cer NdS došlo i zde během zasychání ke shlukování lipidů, a to při nanášení roztoku s nejvyšší koncentrací. Samotný roztok byl čirý a lipidy v něm nebyly vysráženy. Takto tomu bylo u všech sklíček, tedy TS-NP-1A1, TS-NP-1A2, TS-NP-1B1, TS-NP-1B2 (všechny vzorky s obsahem Cer NP v množství 0,45 mg/cm²). Lipidy se shlukovaly i na samotné nanášecí jehle. Jehla byla vyčištěna gázou s roztokem chloroformu s methanolem v poměru 2:1.

Po nanesení těchto vzorků byla nanášecí jehla Linomatu V posunuta o kousek níž, aby nedocházelo k takovému rozptylu nastříkovaného roztoku. I na sklíčkách TS-NP-2A2, TS-NP-2B1 a TS-NP-2B2 (vzorky s obsahem Cer NP v množství 0,0675 mg/cm²) byly pozorovány shluky lipidů, ale v mnohem menším množství a shluky byly menší než u předchozích sklíček. Navážky a způsob ředění při přípravě roztoků s Cer

NP jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Příprava roztoků s Cer NP.

	roztok č. 1	roztok č. 2	roztok č. 3	roztok č. 4
TS-NP	0,45	0,0675	0,009	0,001
hmotnost lipidů na 1 vzorek [mg]	4	4	4	4
počet nanášených sklíček	4,5	0,675	0,09	0,01
koncentrace nastříkovaného roztoku [mg/ml]	4,13			
množství použitého čistého ceramidu [mg]		150	20	
objem roztoku č. 1 [μl]				110
objem roztoku č. 3 [μl]	920	850	980	890
objem čistého rozpouštědla [μl]				

3.3.4 Tepelná úprava modelových membrán

Po nanesení lipidových směsí na krycí mikroskopická sklíčka, byla sklíčka uložena na několik hodin do exsikátoru a vysušena.

Dalším krokem v přípravě modelových lipidových membrán bylo jejich zahřátí na teplotu 70 °C, tedy nad obvyklou teplotu fázového přechodu lipidů. Nanesená sklíčka položená na teflonových podložkách se naskládala do kelímků, ve kterých byla následně zahřívána. Polovina vzorků, označená písmenem B, měla navíc do kelímku přidáno 7,5 ml demineralizované vody, a byla tedy zahřívána v prostředí bohatém na vodní páru. Tato voda nebyla v kontaktu se vzorky. Modelové membrány se zahřívaly po dobu 30 minut a následně po dobu 4 hodin chladly.

3.4 Metody použité k získání dat z modelových membrán

Všechny modelové membrány, které byly vytvořeny nanášením na krycí sklíčka, byly proměřeny několika metodami, abychom získali data potřebná k vyhodnocení cílů této práce. Před tepelnou úpravou byly modelové membrány proměřeny pomocí XRD a Ramanovy mikrospektrometrie. Po tepelné úpravě byly membrány navíc ještě proměřeny pomocí FTIR. Tato metoda byla použita jen po tepelné úpravě vzorků z důvodu jejího destruktivního charakteru.

3.4.1 Měření vzorků pomocí rentgenové difraktometrie (XRD)

Vzorky byly odeslány na pracoviště Vysoké školy chemické a technologické v Praze, kde byly proměřeny. Zde se pracovalo pomocí práškového difraktometru X'Pert PRO θ - θ (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko) s $\text{CoK}\alpha$ zářením ($\lambda = 1,7903 \text{ \AA}$, $U = 35 \text{ kV}$, $I = 40 \text{ mA}$) v upravených držácích vzorků v uhlovém rozsahu $0,6$ – 30° (2θ). Takto byly vzorky proměřeny dvakrát, nejprve před jejich zahřátím a následně po něm. Získaná data byla vyhodnocována pomocí programu DataViewer (PANalytical B. V., Almelo, Nizozemsko).

3.4.2 Měření vzorků pomocí Ramanova mikrospektrometru

Další fází bylo proměření nanosených vzorků pomocí konfokálního Ramanova mikrospektrometru WITec Alpha 300R (WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Ulm, Germany), s vlnovou délkou excitačního záření diodového laseru 633 nm . Ke sběru spekter se využívá spektrograf UHTS 300 vybavený termoelektricky chlazeným CCD detektorem, objektivy EC “Epiplan” DIC se zvětšením $10\times$ a EX “Epiplan - Neofluar” DIC se zvětšením $100\times$ a difrakční mřížka s dělením 600 linek/mm . Získaná data byla vyhodnocována pomocí software WITec Project FIVE+. Stejně jako u předchozí metody byly vzorky proměřeny nejprve před jejich zahřátím a následně i po něm.

3.4.3 Měření vzorků pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Měření FTIR bylo poslední metodou, kterou byly vzorky proměřovány. Infračervená spektra lipidových modelů byla získána na spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybaveném MIRacle ZnSe krystalem pro zeslabenou totální reflektanci (*attenuated total reflectance*, ATR) s jedním odrazem (PIKE technologies, Madison, WI, USA). Vzorek byl umístěn na krystal pomocí mechanismu s konstantním tlakem. Spektra byla generována ze 128 skenů změřených s rozlišením 2 cm^{-1} . Jelikož se jedná o destruktivní metodu, nedaly se vzorky po změření dále použít. Spektra byla následně vyhodnocována pomocí programu OriginPro.

4 VÝSLEDKY

4.1 Rozvržení experimentů

V rámci experimentální práce se porovnávaly tři typy membrán o čtyřech různých množstvích lipidů. Všechny zmíněné modelové membrány obsahovaly směs Chol, MK a Cer NS, NdS nebo NP v poměru 0,45:1:1. Chol ve větší koncentraci by měl vyšší tendenci k separaci ze směsi. Tato skutečnost se ukázala již v předchozích experimentech¹³. Všechny vytvořené membrány byly po prvním proměření dvěma metodami (XRD, Ramanova mikrospektrometrie) zahřívány 30 minut na 70°C, což je teplota vyšší než obvyklá teplota fázového přechodu těchto lipidů, a následně pozvolna 4 hodiny chladly. Polovina vzorků, ty s označením A, byla zahřívána bez přítomnosti vody, vzorky s označením B se zahřívaly za přítomnosti vody (voda nebyla v přímém kontaktu s lipidovou membránou). Zahřívání lipidových membrán nad teplotu fázového přechodu vede ke změně konformace hydrofobních řetězců. Změna je charakterizována poklesem tuhosti a těsnosti uspořádání řetězců. Nad teplotou fázového přechodu jsou řetězce v neuspořádaném fluidním stavu¹⁷.

4.2 Rentgenová difraktometrie

XRD je metoda, pomocí níž je možné určovat atomovou a molekulovou strukturu vzorků. Pravidelné strukturní útvary způsobují difrakci rentgenového paprsku. Měřením úhlu a intenzity odraženého paprsku lze určit polohy atomů a chemické vazby, jejich délky a úhly mezi nimi. V našem případě bylo zjišťováno, zda se v modelových membránách nacházejí opakující se struktury a jejich mezirovinné vzdálenosti¹⁸.

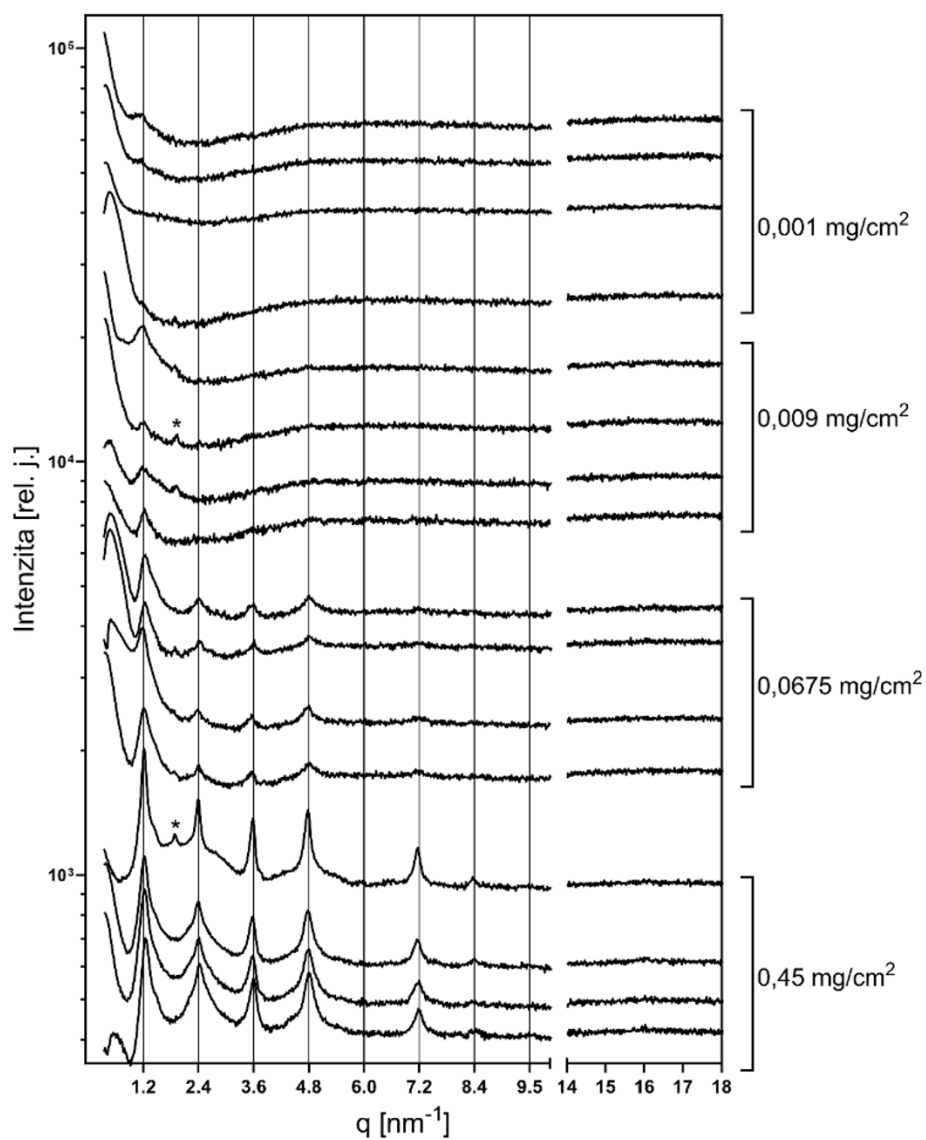
V následujících podkapitolách budou zobrazeny a vyhodnoceny difraktogramy získané měřením jednotlivých typů membrán. Podkapitoly jsou rozdělené podle toho, jaký Cer daná membrána obsahovala a jakým způsobem byla poté tepelně upravena. Chování lipidů bude hodnoceno z hlediska typu obsaženého Cer, množství lipidů aplikovaných na danou plochu a zda se jedná o strukturu vzniklou před zahříváním, po zahřívání bez přítomnosti vody nebo po zahřívání v přítomnosti vody.

4.2.1 XRD modelových membrán s obsahem Cer NS před zahřátím

Pomocí XRD byly měřeny modely, ve kterých bylo vždy na stejnou plochu podložky aplikováno různé množství lipidů. Na obrázku č. 6 jsou difraktogramy modelů s obsahem Cer NS před zahříváním. Relativní intenzity reflexí jsou zobrazeny v závislosti na velikosti rozptylového vektoru q . Oblast $q \leq 10 \text{ nm}^{-1}$ je oblast označována jako uspořádání na dlouhou vzdálenost (z angl. *long-range arrangement*). Tato oblast odpovídá měření reflexí při malých úhlech a obsahuje informaci o velkých mezirovinných vzdálenostech, zjednodušeně tloušťce pravidelně uspořádaných lipidových vrstev. Oblast $q = 14 - 18 \text{ nm}^{-1}$ je oblast uspořádání na krátkou vzdálenost (z anglického *short-range arrangement*) a obsahuje reflexe měřené při větších úhlech. Píky v této oblasti značí přítomnost malých mezirovinných vzdáleností, které odpovídají pravidelnému uspořádání lipidových řetězců ve dvourozměrných mřížkách, které jsou kolmé na podélné osy těchto řetězců.

Přítomnost píků v difraktogramech značí, že i tepelně neupravené vzorky s obsahem Cer NS tvoří pravidelnou strukturu. Pozorujeme, že s klesajícím množstvím lipidů ve vzorku klesá i relativní intenzita reflexí v difraktogramu a kvalita výstupu XRD, jelikož je možné již jen těžko rozlišovat šum a reflexe daného vzorku. Žádný vzorek neobsahoval reflexe odpovídající pravidelnému uspořádání řetězců ve dvourozměrných mřížkách v oblasti „*short-range arrangement*“.

Jen některé vzorky obsahovaly fázi separovaného Chol s mezirovinnou vzdáleností 3,30 – 3,39 nm a 1,68 – 1,77 nm, které jsou v souladu s již publikovanou literaturou^{14,16}. Kromě fáze separovaného Chol nacházíme ve vzorcích i fázi SPP s mezirovinnou vzdáleností 5,28 – 5,36 nm, která je tvořena převážně řetězci velmi dlouhého Cer, Chol a MK. U modelů s obsahem 0,45 mg lipidů na 1 cm² je SPP identifikována pomocí sedmi až osmi reflexí. U vzorků s obsahem 0,0675 mg lipidů na 1 cm² je SPP identifikována pomocí tří až pěti reflexí. U modelů se dvěma nejnižšími obsahy lipidů (0,009 mg/ cm² a 0,001 mg/ cm²) lze vidět jen minimum reflexí, z nichž se nedá spočítat mezirovinná vzdálenost dané opakující se struktury. Poloha všech píků v difraktogramech nezahřátých modelů dobře odpovídá mřížkovým čarám, které předpovídají jejich polohu pro periodicitu 5,3 nm.



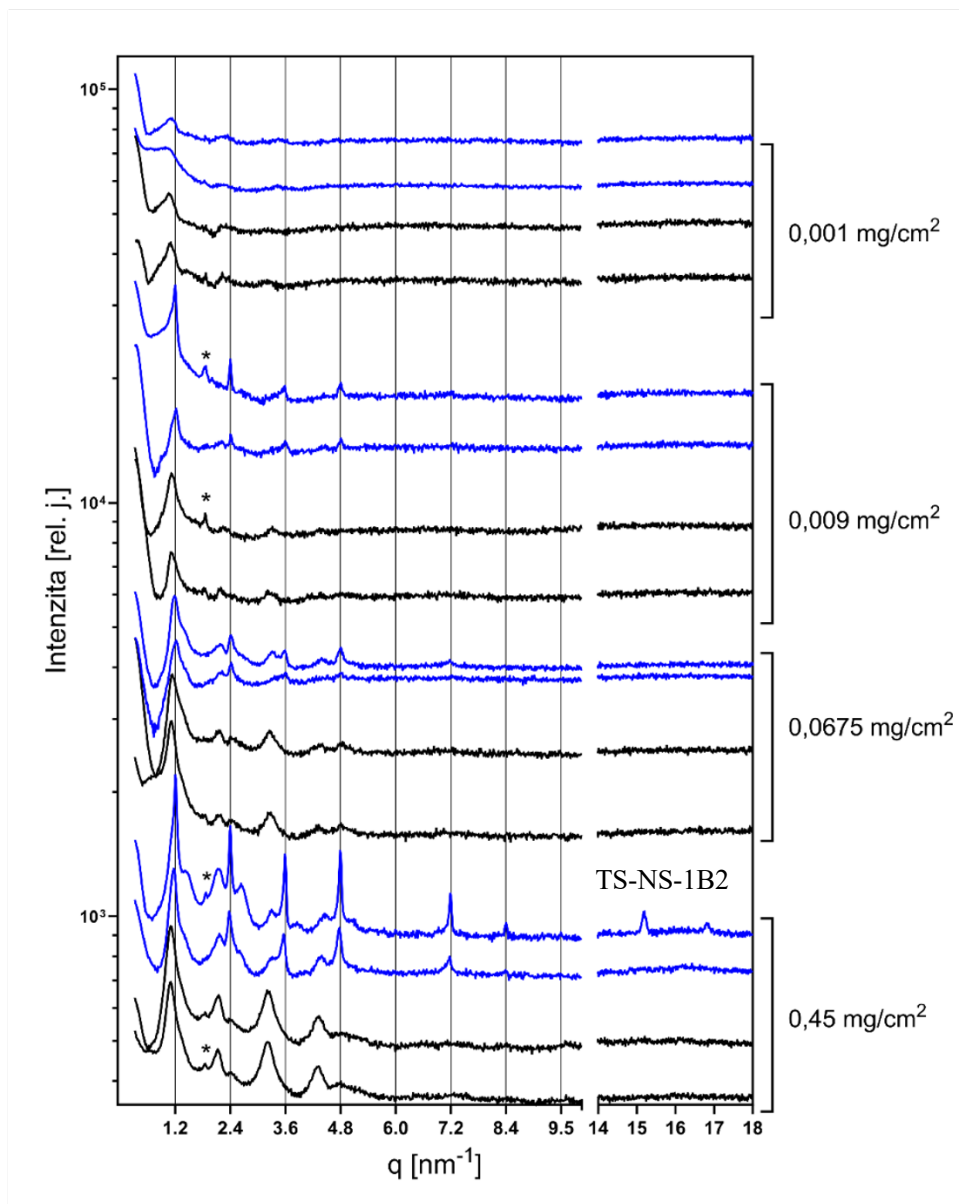
Obrázek 6: XRD difraktogramy vzorků s Cer NS před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,3 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.

4.2.2 XRD modelových membrán s obsahem Cer NS po zahřátí

Vzorky s obsahem Cer NS byly zahřaty na teplotu 70 °C buď bez vody anebo v přítomnosti vody (70 °C/H₂O), která nebyla v přímém kontaktu s lipidem. Stejně jako v difraktogramech membrán z kapitoly 4.2.1 se snižuje relativní intenzita reflexí se snižujícím se množstvím lipidů ve vzorku (obrázek 7). Kromě jednoho vzorku (TS-NS-1B2 na obrázku č. 7) se v těchto difraktogramech nenachází píky v oblasti „*short-range arrangement*“, tudíž se ani zde nedozvídáme nic o molekulárním uspořádání lipidových řetězců v rovině lamely. U vzorku TS-NS-1B2 se objevily reflexe při $q = 15,2$ a $16,8 \text{ nm}^{-1}$ odpovídající dvourozměrné krystalické mřížce lipidových řetězců. Jedná se o těsné orthorombické uspořádání.

Přítomnost reflexí separovaného Chol se jeví jako náhodná a nepozorujeme závislost jejich výskytu na tepelné úpravě vzorku nebo přítomnosti vody. Téměř u všech membrán se v oblasti uspořádání na dlouhou vzdálenost objevují výrazné reflexe, které poskytují mezirovinné vzdálenosti $d = 5,29 - 6,07 \text{ nm}$. Mezirovinná vzdálenost d je v případě vzorků zahříváných bez přítomnosti vody vyšší ($d \sim 6 \text{ nm}$) než u vzorků zahříváných v přítomnosti vody ($d \sim 5,3 \text{ nm}$).

Lze pozorovat posuny reflexí v rámci q , kdy se reflexe vzorků zahříváných bez vody posunuly k mírně nižším hodnotám q , (a tudíž vyšší hodnotě $d \sim 6 \text{ nm}$), zatímco vzorky zahříváné v přítomnosti vody zůstaly u přibližně stejné hodnoty q jako vzorky před zahříváním ($d \sim 5,3 \text{ nm}$). Vzorky zahřáté bez vody tvoří jednodušší strukturu s periodicitou $d \sim 6 \text{ nm}$. Vzorky zahřáté s vodou tvoří složitější strukturu, kde reflexe s vyšší intenzitou poskytují periodicitu $d \sim 5,3 \text{ nm}$. O přítomnosti složitější struktury u vzorků zahříváných s vodou svědčí soubor píků s nižšími intenzitami. Tyto reflexe se vyskytují při $q = 1,46; 2,17; 2,67; 3,32; 3,87; 4,46$ a $5,09 \text{ nm}^{-1}$. Všechny byly popsány již dříve a podle současného stavu výzkumu odpovídají vrstevnatým strukturám s různým pořadím a orientací jednotlivých vrstev. Pro přehlednost se v práci zabýváme především reflexemi s vyšší intenzitou. Difraktogramy vzorků s nejnižším obsahem lipidů ($0,001 \text{ mg/cm}^2$) naznačují, že došlo k posunu periodicity k vyšším hodnotám ve srovnání se vzorky s vyšším obsahem lipidů. Kvůli nízkým intenzitám je efekt málo průkazný.



Obrázek 7: XRD difraktogramy vzorků s Cer NS po zahřívání bez vody (černá) nebo s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,3 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.

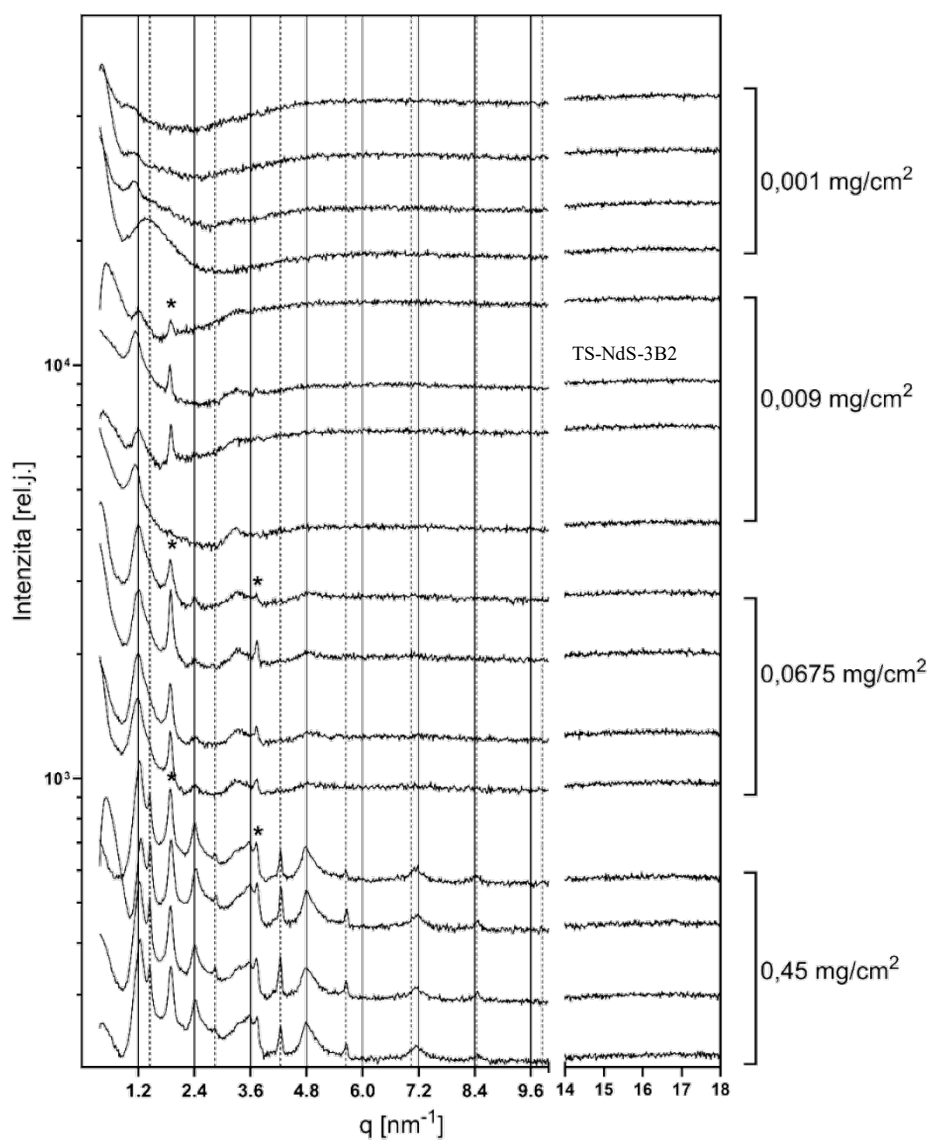
4.2.3 XRD modelových membrán s obsahem Cer NdS před zahřátím

I v případě membrán s Cer NdS je pozorována klesající relativní intenzita reflexí s klesajícím obsahem lipidů ve vzorku (obrázek 8). Ani v tomto případě nebyly v žádném z difraktogramů nalezeny píky odpovídající pravidelnému uspořádání lipidových řetězců v oblasti „*short-range arrangement*“.

V případě modelů membrán s obsahem Cer NdS se v difraktogramech nachází reflexe odpovídající separovanému Chol u vzorků se třemi nejvyššími koncentracemi (0,45 mg/cm², 0,0675 mg/cm² a 0,009 mg/cm²). V tomto případě se píky Chol objevují ve více vzorcích než u modelů s Cer NS a oproti nim je Chol charakterizovaný většinou dvěma reflexemi. Kromě fáze separovaného Chol nacházíme 2 různé fáze s mezirovinnou vzdáleností $d \sim 5,23$ nm a $d \sim 4,49$ nm. Fáze s kratší mezirovinnou vzdáleností byla pozorována u všech modelů s nejvyšším obsahem lipidů (0,45 mg/cm²) a v náznaku u vzorku TS-NdS-3B2 (obrázek č. 8). Hodnoty mezirovinných vzdáleností odpovídají těm, které byly uvedeny již v předchozích experimentálních pracích^{14,16}.

Fáze s $d \sim 5,23$ nm (SPP) poskytuje v případě modelů s nejvyšším obsahem lipidů 7 reflexí, které ve všech případech dobře odpovídají předpovězené periodicitě znázorněné jako plné mřížkové čáry. Se snižujícím se množstvím lipidů se snižuje i počet reflexí, kterým je daná SPP charakterizována. U membrán s nejnižším obsahem lipidů (0,001 mg/cm²) je navíc reflexe posunutá mírně doleva k nižším hodnotám q oproti předpovězené periodicitě, což znamená posun k delší periodicitě.

Oproti modelům s Cer NS (sekce 4.2.1) se u těchto vzorků vyskytují SPP s větším rozptylem mezirovinných vzdáleností. Stejným zůstává trend, při kterém se snižuje počet reflexí úměrně k množství lipidů v membráně. Posuny těchto reflexí v závislosti na q jsou zde však častější.



Obrázek 8: XRD difraktogramy vzorků s Cer NdS před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,23 nm (plná čára) a 4,49 nm (přerušovaná čára). Hvězdička označuje polohu piků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.

4.2.4 XRD modelových membrán s obsahem Cer NdS po zahřátí

Modely byly zahřáté při 70 °C nebo při 70 °C/H₂O stejně jako v předchozích případech. Také zde klesá relativní intenzita píků s množstvím lipidů ve vzorcích. Ani v jednom případě se v difraktogramech nevyskytují reflexe v „*short-range arrangement*“ (obrázek 9).

Reflexe separovaného Chol zde odpovídají pozicím v těchto vzorcích před zahřátím (4.2.3). V některých případech je Chol identifikovaný jednou reflexí navíc a u některých vzorků se píky objevily až po tepelné úpravě. Rozdíly pozorované v pozici reflexí a distribuci intenzity mezi vzorky nelze připsat způsobu tepelné úpravy.

V difraktogramech byly identifikovány reflexe, které odpovídají několika různým fázím, přičemž ne všechny se vyskytují ve všech vzorcích: SPP s mezirovinnou vzdáleností $d = 5,37$ nm, dále fázi s $d = 4,65$ nm, $5,65$ nm a $10,51$ nm.

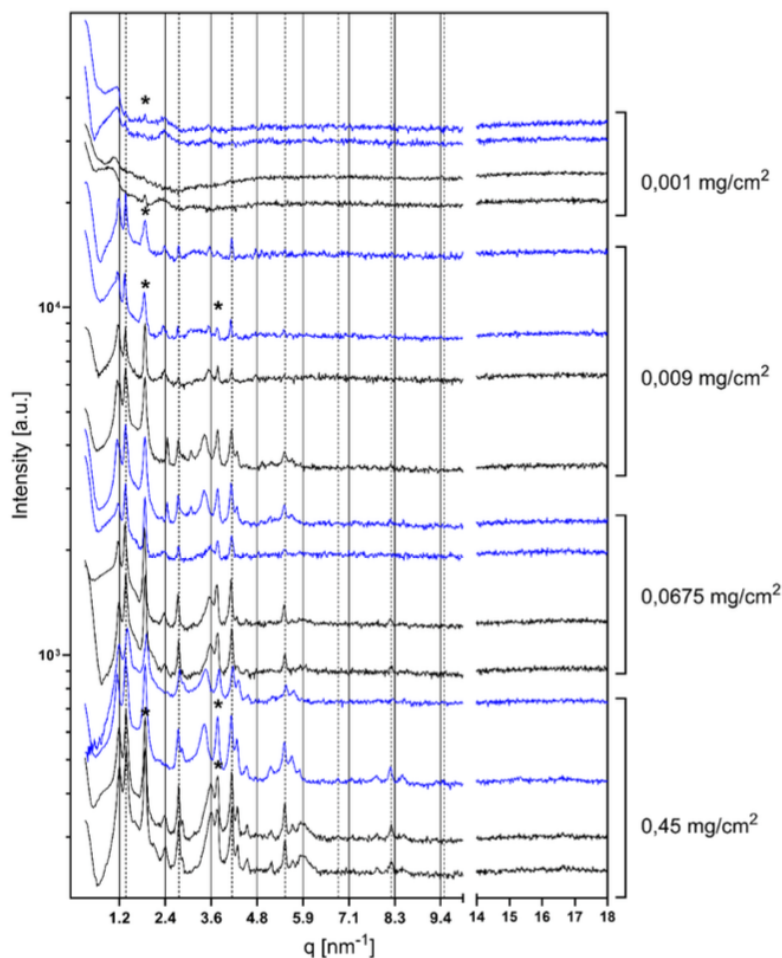
Fáze s periodicitou $5,37$ nm pozorovaná po zahřátí (SPP) je blízko té pozorované ve vzorcích před zahřátím ($d \sim 5,23$ nm), avšak počet reflexí, které identifikují tuto SPP není tak velký jako u nezahřátých vzorků (jedná se o 2-4 reflexe). Celkově došlo ke změně distribuce intenzity, což naznačuje, že došlo i ke změně molekulárního uspořádání této fáze.

Téměř u všech vzorků se vyskytuje kromě SPP ještě jedna fáze s $d = 4,65 - 4,66$ nm. Její periodicitu je blízko té pozorované u nezahřátých vzorků ($d = 4,49$ nm). Tuto fázi určuje většinou 3-5 píků. Obě tyto fáze s d kolem $4,5$ nm odpovídají pravděpodobně čistému vykrystalizovanému Cer. Změna periodicity může odrážet změnu krystalické modifikace Cer NdS, např. mohla nastat změna sklonu řetězců vzhledem k rovině lipidových lamel (v anglojazyčné literatuře *tilt*).

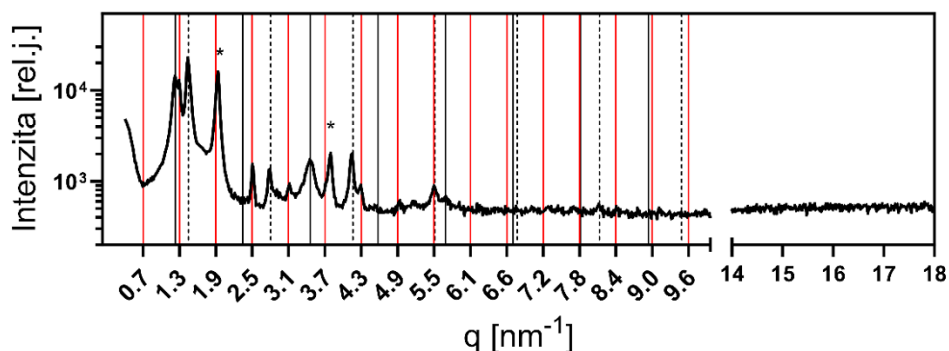
U vzorků s nejvyšším obsahem lipidů ($0,45$ mg/cm²) se vyskytla i třetí fáze s mezirovinnou vzdáleností $4,46 - 4,48$ nm (dobře rozlišené píky při $q = 2,85; 4,26; 5,66$). Jedná se pravděpodobně o pozůstatek krystalické modifikace Cer NdS přítomné ještě před zahřátím vzorků.

U dalších dvou vzorků se objevuje fáze s mezirovinnou vzdáleností $10,51$ nm, což je fáze svým d blízka LPP. Tato fáze je lépe zřetelná na obrázku č. 10, kde se její píky dobře shodují s červenými mřížkovými čarami odpovídajícími periodicitě $10,51$ nm.

Současně došlo k posunu v periodicitě SPP na 5,65 nm. Nelze určit, zda je výskyt této fáze závislý na způsobu zahřátí nebo na množství lipidů ve vzorku, protože se objevila u vzorků o různých množstvích lipidů, u jednoho vzorku zahřátého s vodou a druhého zahřátého bez přítomnosti vody. U vzorků se sníženým obsahem lipidů na jednotku plochy (0,0675 mg/cm² a 0,009 mg/cm²) jsou v některých případech periodicity posunuty k vyšším nebo nižším hodnotám q . Píky u vzorků s nejnižším množstvím lipidů jsou všechny mírně posunuty k nižším hodnotám q . Nelze určit, zda se posuny v rámci q mění v závislosti na tepelné úpravě.



Obrázek 9: XRD difraktogramy vzorků s Cer NdS po zahřívání bez vody (černá) a s vodou (modrá). Plné mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,37 nm a přerušované mřížkové čáry 4,65 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.



Obrázek 10: XRD difraktogram vzorku s Cer NdS po zahřívání bez vody. Bylo aplikováno 0,009 mg lipidů na cm^2 . Červené mřížkové čáry odpovídají periodicitě 10,51 nm. Černé plné mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,65 nm a přerušované mřížkové čáry 4,66 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol.

4.2.5 XRD modelových membrán s obsahem Cer NP před zahřátím

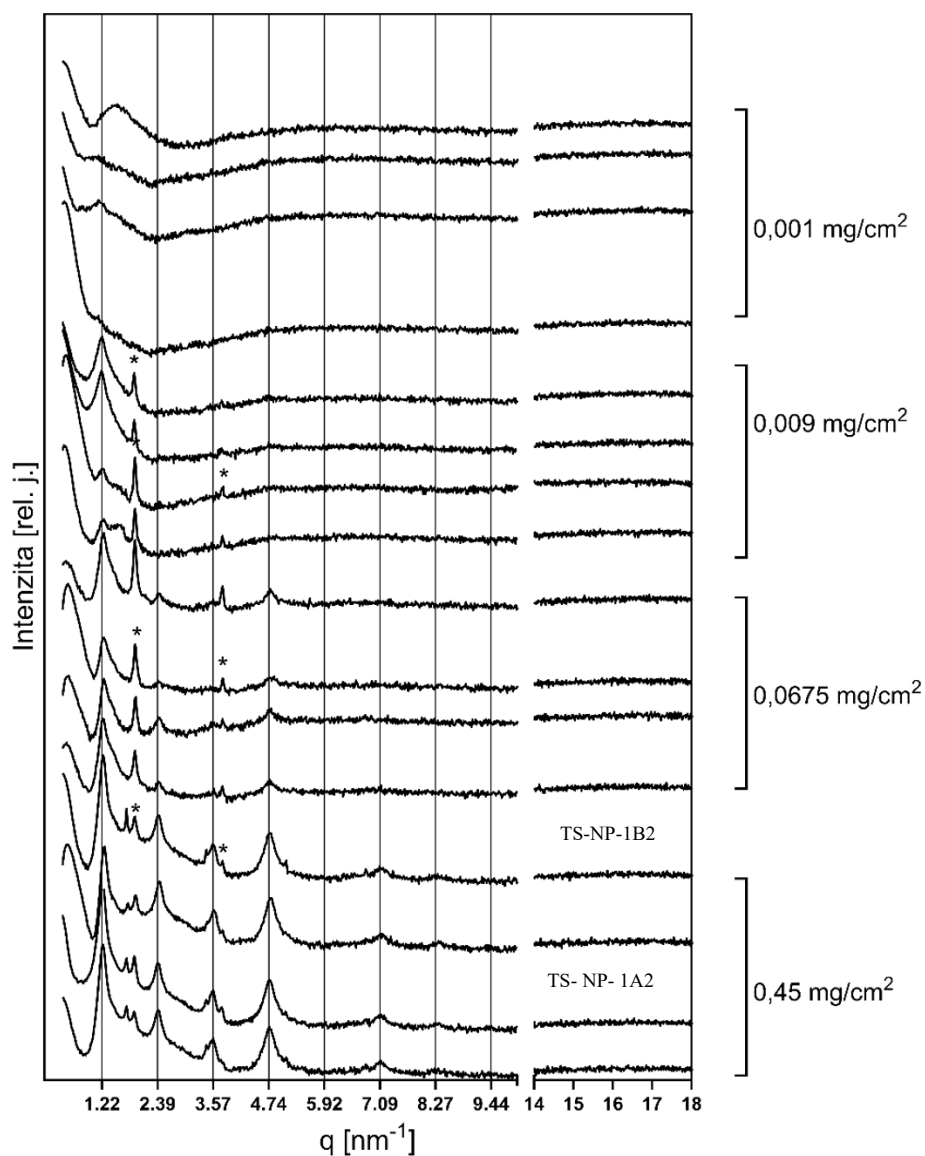
I u vzorků s obsahem Cer NP nacházíme stejný trend jako v předchozích případech. Relativní intenzita reflexí i v tomto případě klesá s klesajícím obsahem lipidů ve vzorcích. Zároveň se ani v jednom ze vzorků neobjevily reflexe v „*short-range arrangement*“ (obrázek 11).

I v modelových membránách s obsahem Cer NP se objevily reflexe odpovídající separovanému Chol. Reflexe odpovídající separovanému Chol nebyly pozorovány u většiny modelů s obsahem 0,001 mg lipidů na 1 cm^2 . V ostatních membránách je Chol identifikován vždy jednou nebo dvěma reflexemi s mezirovinnými vzdálenostmi $d = 3,27 - 3,36 \text{ nm}$ a $d = 1,67 - 1,68 \text{ nm}$. V tomto případě se píky Chol objevují u více vzorků než u předchozích dvou typů membrán. Hodnoty mezirovinných vzdáleností jsou srovnatelné.

Stejně jako u předchozích difraktogramů, tak i v těchto byly nalezeny reflexe odpovídající svou mezirovinnou vzdáleností SPP ($d = 5,24 - 5,37 \text{ nm}$). SPP je identifikována třemi až pěti reflexemi. Pozorována byla mírná variabilita polohy píků SPP vůči předpovězené mřížce, která odpovídá mezirovinné vzdálenosti $d = 5,35 \text{ nm}$. U vzorků TS-NP-1A2 a TS-NP-1B2, které jsou popsány na obrázku č. 11, byla nalezena

další fáze s mezirovinnou vzdáleností $d = 3,73$ nm, která poskytovala tři nebo čtyři reflexe. Tato odpovídá nejspíš některé krystalické modifikaci separovaného Cer NP¹⁹. U vzorků se dvěma nejnižšími obsahy lipidů na cm^2 ($0,009 \text{ mg/cm}^2$ a $0,001 \text{ mg/cm}^2$) byl v difraktogramu nalezen většinou jen jeden pík. Nebylo tedy možné určit mezirovinnou vzdálenost. U většiny vzorků se objevily také píky, které nebyly zařazeny k žádné fázi.

V porovnání s modely s Cer NS jsou hodnoty mezirovinných vzdáleností srovnatelné. U membrán s Cer NP se navíc ve dvou případech objevuje i další fáze, která pravděpodobně odpovídá vykrytalizovanému Cer NP. V porovnání s membránami s Cer NdS je rozptyl hodnot mezirovinných vzdáleností menší. Opakuje se trend snižujícího se počtu píků se snižujícím se množstvím lipidů ve vzorku. Píky v difraktogramech modelů s Cer NP nevykazují výrazné posuny v rámci velikosti rozptylového vektoru q .

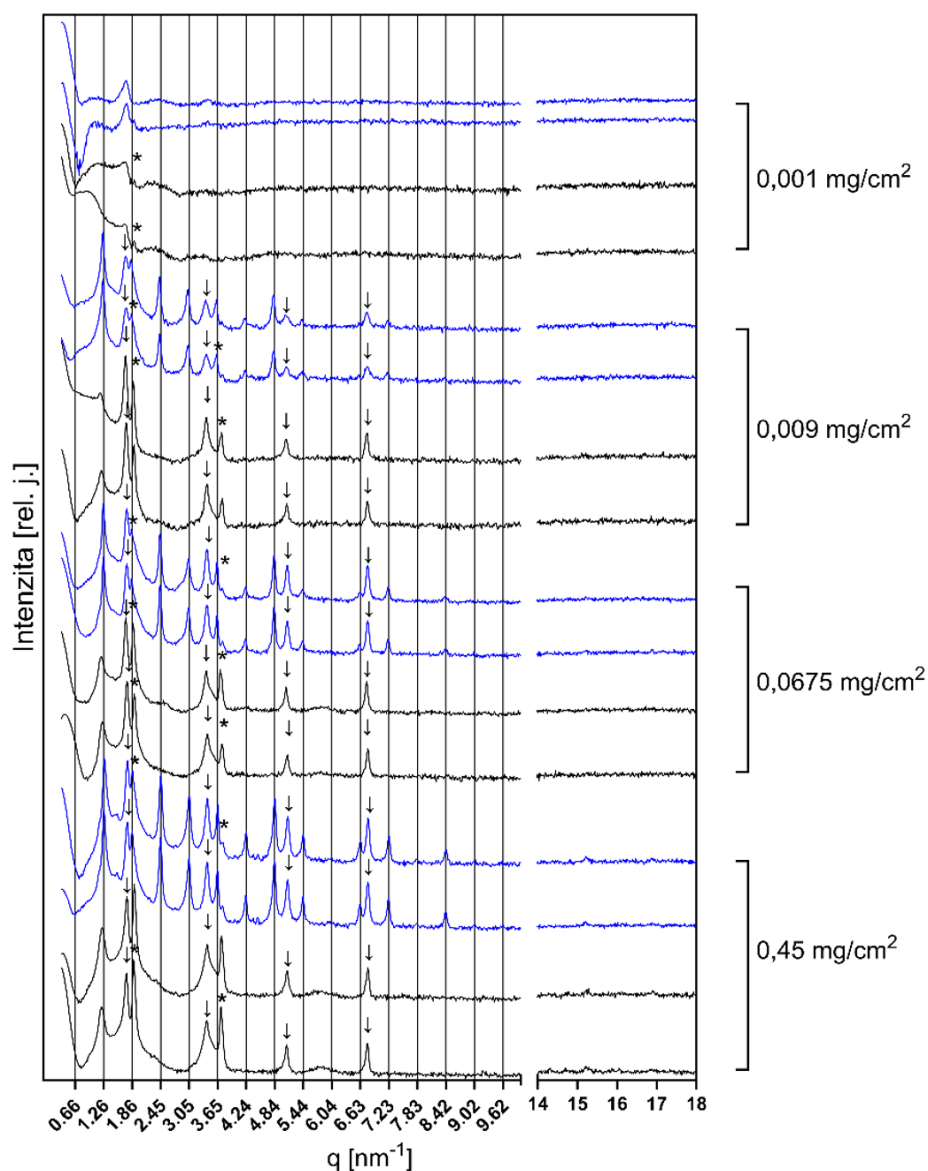


Obrázek 11: XRD difraktogramy vzorků s Cer NP před zahříváním. Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 5,35 nm. Hvězdička označuje polohu píků separovaného Chol. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.

4.2.6 XRD modelových membrán s obsahem Cer NP po zahřátí

I tyto modely byly tepelně zpracovány stejným způsobem jako vzorky v podkapitolách 4.2.2 a 4.2.4 I zde se relativní intenzita reflexí snižuje se snižující se koncentrací lipidů ve vzorku (obrázek 12). V žádném z difraktogramů se nenacházejí reflexe v oblasti „*short-range-arrangement*“, nebo jsou píky jen velmi těžko rozlišitelné.

Přítomnost reflexí separovaného Chol byla pozorována v difraktogramech téměř všech vzorků, kromě těch s nejnižším obsahem lipidů (0,001 mg/cm²). Separovaný Chol se v difraktogramech nachází s mezirovinnou vzdáleností 1,83 – 1,90 nm a 3,71 – 3,75 nm. V této směsi se Chol špatně mísí se zbytkem lipidů. Na tomto difraktogramu jsou vidět velké rozdíly ve vzorcích, které byly zahřáté v přítomnosti vody nebo bez ní. U vzorků zahřátých bez přítomnosti vody (ve spektru na obrázku č. 12 černě) se v oblasti uspořádání na dlouhou vzdálenost objevují reflexe, které shodně poskytují mezirovinnou vzdálenost $d = 3,73$ nm (SPP), která nejspíš odpovídá vykrytalizovanému Cer NP. Kromě této fáze se v difraktogramech nachází ještě SPP s $d = 5,2$ nm. Pro přehlednost se budeme zabývat především reflexemi s vyšší intenzitou. Výrazný rozdíl je u vzorků zahřátých s vodou (ve spektru na obrázku č. 12 modře). V těchto vzorcích se v oblasti uspořádání na dlouhou vzdálenost objevují reflexe, které shodně poskytují mezirovinnou vzdálenost $d = 10,52$ nm (fáze blízká LPP) a fáze s $d = 3,73$ nm odpovídající nejspíš vykrytalizovanému Cer NP¹³. Stejně jako u vzorků zahřátých bez vody se ani v tomto případě nevyskytují intenzivnější reflexe u vzorků s nejnižším množstvím lipidů. V souhrnné tabulce č. 6 jsou uvedeny mezirovinné vzdálenosti struktur, které byly pozorovány pro jednotlivé typy membrán.



Obrázek 12: XRD difraktogramy vzorků s Cer NP po zahřívání bez vody (černá) nebo s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají periodicitě 10,52 nm. Hvězdička označuje separovaný Chol. Šipky označují krystalický Cer NP. Jednotlivé difraktogramy jsou vzájemně posunuty podél osy y pro lepší názornost.

Tabulka 6: Souhrnná tabulka s výsledky měření XRD. Tabulka předkládá přítomnost Chol a meziovinné vzdálenosti struktur nalezených u jednotlivých typů modelů.

	Před zahříváním	Po zahřívání	
		Bez přítomnosti vody	S přítomností vody
Vzorky s ceramidem NS	d ~ 5,3 nm Chol	d ~ 6 nm Chol	d ~ 5,3 nm Složitější struktury Chol
Vzorky s ceramidem NdS	d ~ 5,23 nm d ~ 4,49 nm Chol	d ~ 5,37 nm d ~ 4,65 nm d ~ 10,51 nm Chol	d ~ 5,37 nm d ~ 4,65 nm d ~ 10,51 nm Chol
Vzorky s ceramidem NP	d ~ 5,35 nm Chol	d ~ 5,2 nm d ~ 3,73 nm Chol	d ~ 10,52 nm d ~ 3,73 nm Chol

4.3 Ramanova mikrospektrometrie

Ramanova mikrospektrometrie je metodou vibrační molekulové spektrometrie. Jedná se o metodu, jíž jsme schopni identifikovat složení a strukturu měřeného vzorku. Poskytuje informace o vibračních pohybech molekul. Frekvence vibračních pásů závisí na velikosti atomů a síle vazeb mezi nimi. V našem případě byly zjišťovány informace o účinku architektury polární hlavy na konformační uspořádání a organizační chování Cer⁸.

V následujících podkapitolách budou zobrazena a vyhodnocena zprůměrovaná spektra získaná měřením jednotlivých typů membrán. Naměřeno bylo zpravidla pět Ramanových spekter po zaostření na pět různých pozic na vzorku. V ojedinělých případech, když bylo množství lipidů extrémně malé, se podařilo získat pouze čtyři dostatečně rozlišená spektra. Intenzita spekter nebyla normalizována, v některých případech byla spektra škálována pro lepší zobrazení. Podkapitoly budou rozdělené podle toho, jaký Cer byl v membráně obsažen.

Ze spekter budou vybrány jednotlivé typy vibrací, které budou popsány blíže. V jednotlivých podkapitolách budou popsány vybrané pásy charakteristické pro jednotlivé Cer (Cer NS, NdS a NP). Při hodnotě 700 rel. cm⁻¹ je pozorován jeden z pásů odpovídajících deformacím kruhu Chol. V rozsahu hodnot 1050 – 1140 rel. cm⁻¹

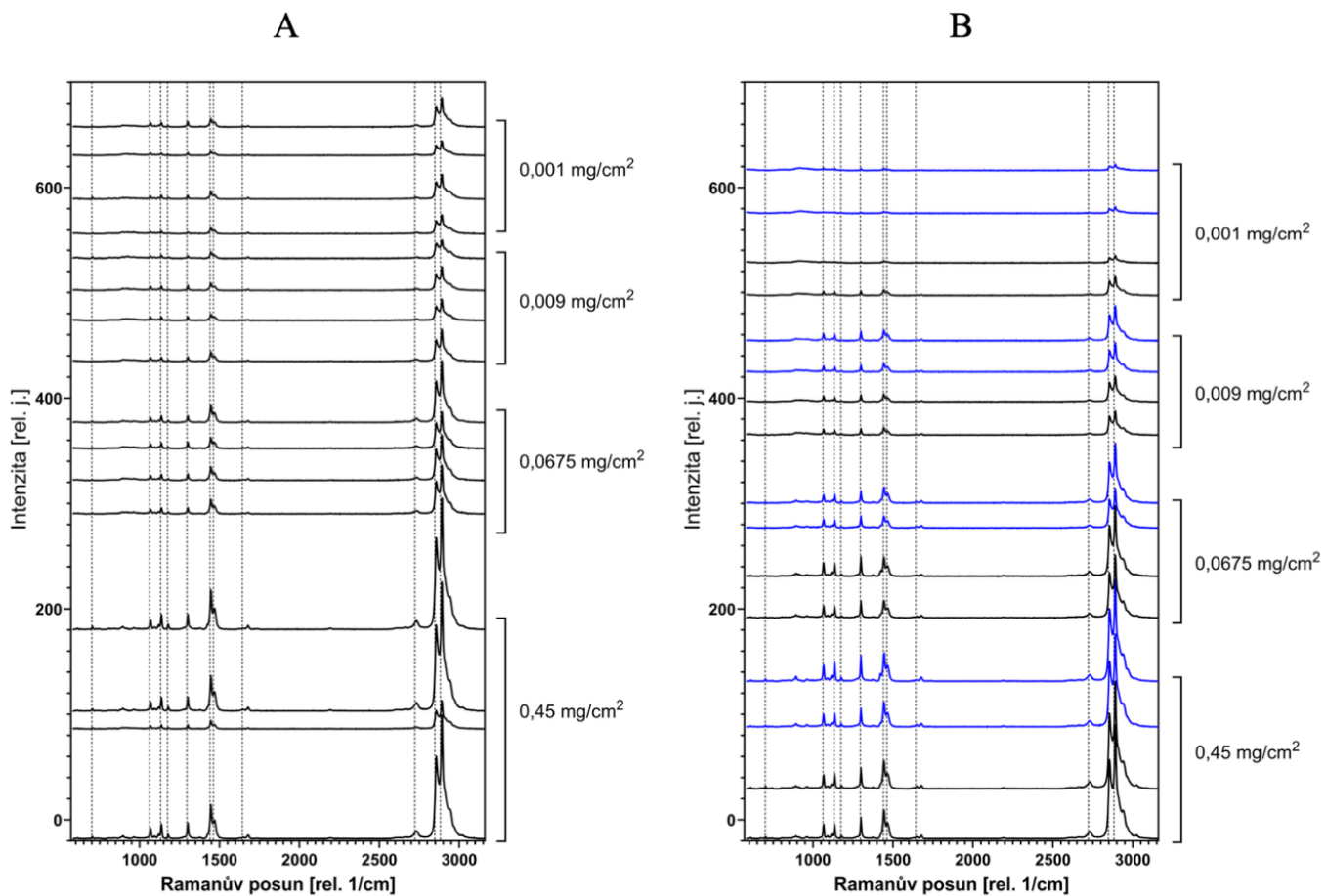
je pozorována oblast odpovídající C-C vazbám v uhlovodíkovém skeletu. Pomocí této oblasti je hodnoceno konformační uspořádání uvnitř řetězce. Tato oblast je spojena buď s *trans* nebo *gauche* uspořádáním v řetězci. Pás v rozsahu hodnot 1296 - 1300 rel. cm^{-1} odpovídá CH_2 kroutivým („*twisting*“) pohybům. Tato oblast je citlivá na poruchy v konformačním uspořádání řetězce. V rozsahu hodnot 1410 – 1480 rel. cm^{-1} jsou pozorovány pásy odpovídající CH_2 nůžkovým („*scissoring*“) vibracím. Tato oblast odráží povahu laterálního uspořádání mezi molekulami Cer. Toto uspořádání může být orthorombické, hexagonální nebo kapalné neuspořádané. Oblast v rozsahu 1600 – 1650 rel. cm^{-1} odráží vibrace karbonylové skupiny v tzv. oblasti Amide I. Jedná se o vibrace v rovině vazby C=O a v rovině ohybu vazby N-H. Díky oblasti Amide I lze hodnotit povahu vodíkových vazeb v hlavových skupinách Cer. Nižší hodnoty jsou spojovány se silnějším zapojením do sítě vodíkových vazeb a vyšší hodnoty naopak se zapojením slabším. Pás při 1675 rel. cm^{-1} odpovídá C=C vazbě v uhlovodíkovém řetězci, která může být různého původu (Cer s dvojnou vazbou, Chol skelet). Soudržnost lipidů SC je částečně odvozena z intermolekulárních vodíkových vazeb mezi oblastmi hlavových skupin. Popisovány jsou také valenční („*stretching*“) vibrace. Konkrétně se jedná o CH_2 valenční symetrické vibrace při 2848 rel. cm^{-1} , CH_2 valenční asymetrické vibrace při 2882 rel. cm^{-1} a CH_3 valenční symetrické vibrace při 2927 rel. cm^{-1} ^{20,21}.

4.3.1 Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NS

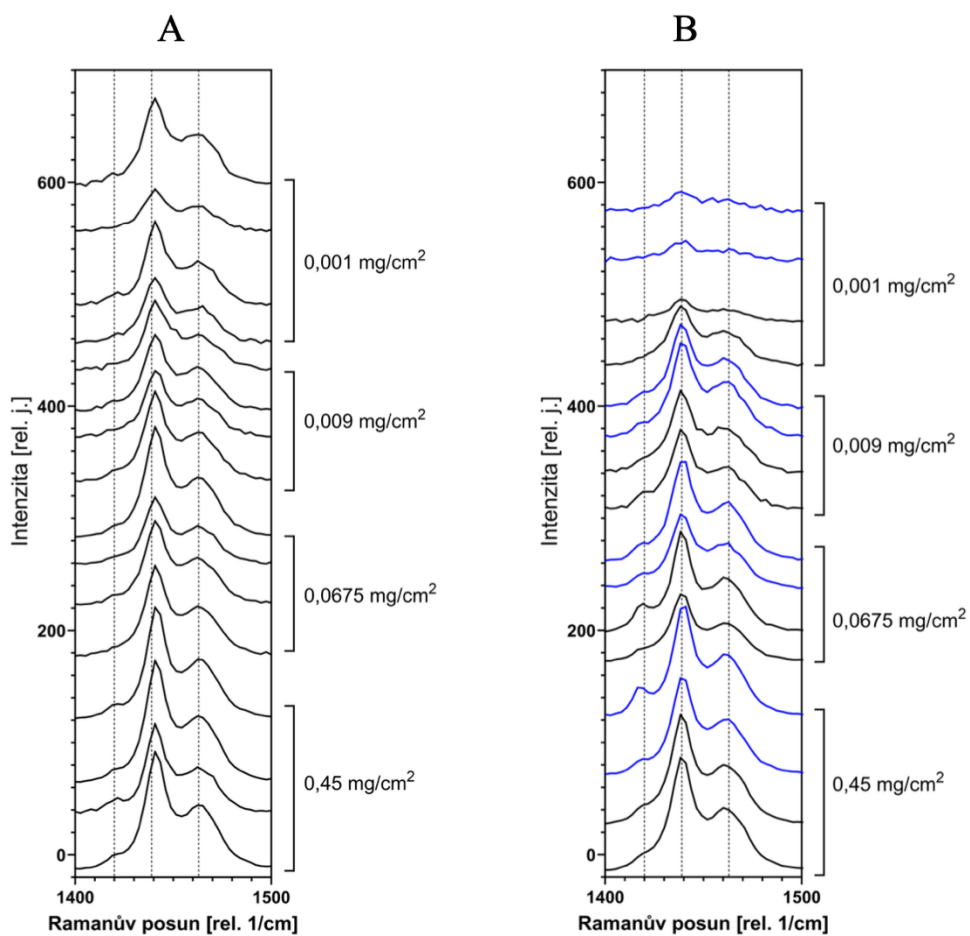
Na obrázku č. 13 jsou zobrazena spektra modelů s obsahem Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B). Přítomnost pásů ve spektrech odpovídá jednotlivým funkčním skupinám v lipidech modelových membrán. Obecně lze říci, že se snižujícím se množstvím lipidů ve vzorku se snižuje i kvalita Ramanových spekter. Oba typy vzorků obsahují ve spektrech pás odpovídající Chol při 700 rel. cm^{-1} . Podle polohy a intenzity pásů v oblasti 1050 – 1140 rel. cm^{-1} usuzujeme, že v obou případech odpovídají přítomné pásy *all-trans* konformaci uhlovodíkových řetězců. Tato konformace je charakteristická přítomností a intenzitou pásů při hodnotách 1060 rel. cm^{-1} , 1100 rel. cm^{-1} a 1130 rel. cm^{-1} . Ostrý pás při 1300 rel. cm^{-1} ve spektrech značí orientované uhlovodíkové řetězce s vysokým obsahem *trans*-konformerů. Pásy mezi 2850 rel. cm^{-1} a 2890 rel. cm^{-1} odpovídají symetrickým a asymetrickým valenčním

vibracím CH₂ vazeb uhlovodíkového řetězce. Stejně jako u nezahřátých vzorků nevykazují pásy výrazné odchylky od těchto hodnot. Je tedy pravděpodobné, že před i po zahřívání se lipidy samovolně organizují do *trans*-konformace.

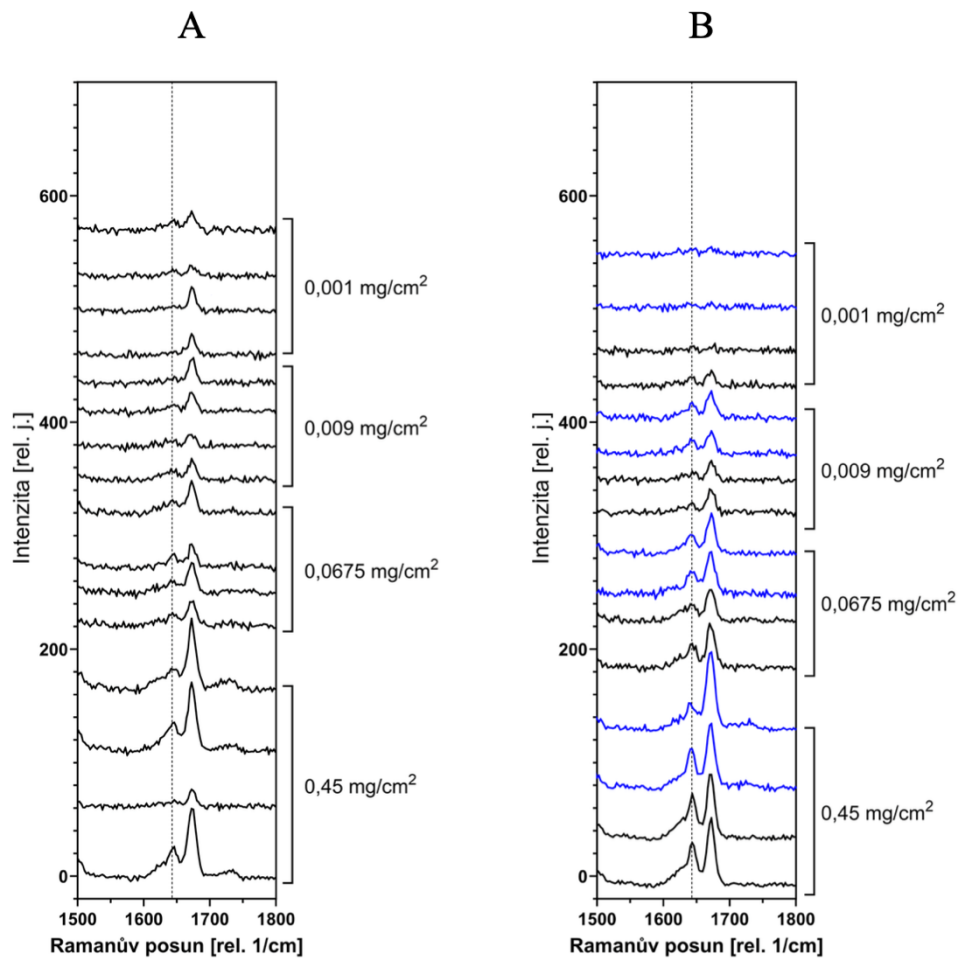
Oblast blíže zobrazená na obrázku č. 14 dává informace o CH₂ nůžkových vibracích ve vzorcích před zahříváním (A) a po zahřívání (B). V daném spektru jsou zobrazeny pásy okolo 1420 rel. cm⁻¹, 1440 rel. cm⁻¹ a 1460 rel. cm⁻¹. Přítomnost pásu v poloze 1420 rel. cm⁻¹ svědčí o přítomnosti orthorombického uspořádání řetězců. Toto pevné uspořádání bylo patrné před zahřátím, ale výraznější bylo po zahřívání s vodou i bez vody. Spektrum na obrázku č. 15 blíže zobrazuje oblast Amide I u vzorků před zahřátím (A) a po zahřátí (B). Pás při 1645 rel. cm⁻¹ poukazuje na zapojení amidové skupiny do slabých vodíkových vazeb. Tento pás se výrazně více vyskytuje ve spektrech vzorků po zahřátí (v přítomnosti vody i bez ní). Pás při 1675 rel. cm⁻¹ odpovídá C=C vazbě v uhlovodíkovém řetězci, která odpovídá 4,5-*trans*-konformaci dvojně vazby ve sfingosinové skupině Cer a/nebo dvojně vazbě Chol skeletu^{20,21}.



Obrázek 13: Ramanova spektra vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.



Obrázek 14: Ramanova spektra zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

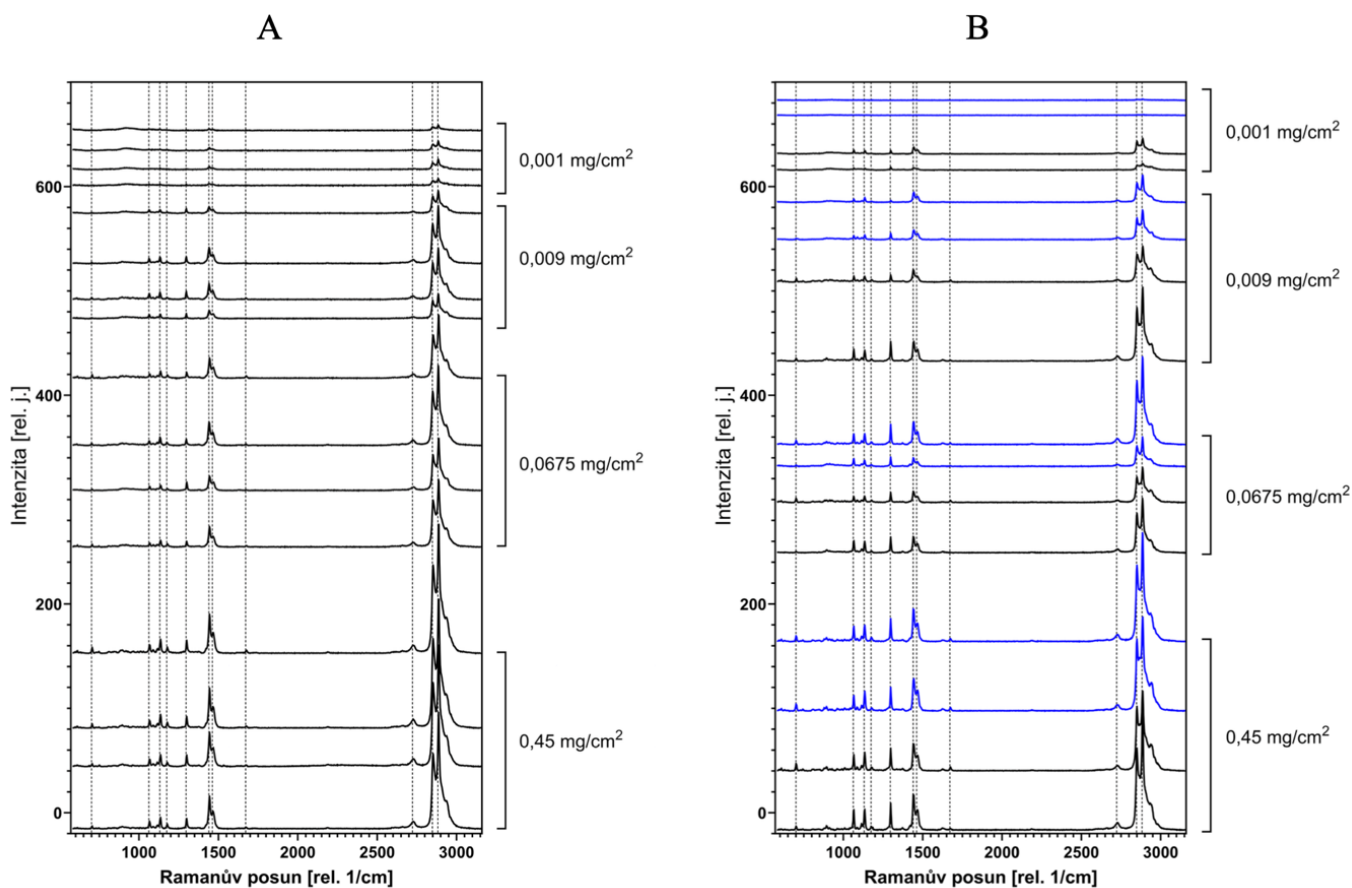


Obrázek 15: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) a bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu Amide I se slabým zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

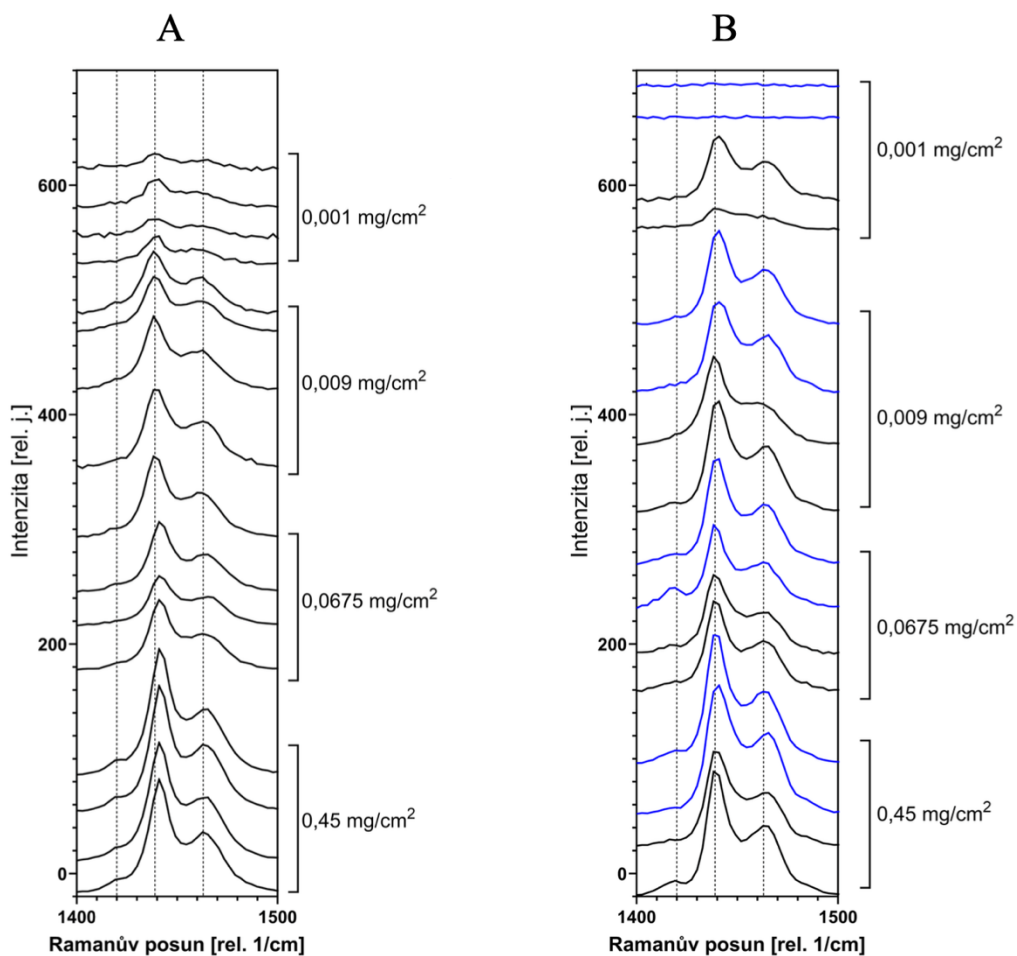
4.3.2 Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NdS

Na obrázku č. 16 jsou zobrazena Ramanova spektra modelů s obsahem Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B). Stejně jako u spekter z podkapitoly 4.3.1 odpovídá přítomnost pásů jednotlivým funkčním skupinám v lipidech modelových membrán. Obecně lze říci, že se snižujícím se množstvím lipidů ve vzorku se snižuje i kvalita Ramanových spekter. Spektra obou typů vzorků obsahují pás odpovídající Chol při 700 rel. cm^{-1} . I v tomto případě značí přítomnost a intenzita tří pásů při 1060 rel. cm^{-1} , 1100 rel. cm^{-1} a 1130 rel. cm^{-1} přítomnost *all-trans* uspořádání uhlovodíkových řetězců. Ostrý pás při 1300 rel. cm^{-1} ve spektrech značí orientované uhlovodíkové řetězce s vysokým obsahem *trans*-konformerů. Obrázek č. 17 blíže zobrazuje oblast nůžkových vibrací před zahřátím (A) a po zahřátí (B). Z Ramanových spekter je zřejmé, že pásy při 1420 rel. cm^{-1} , 1440 rel. cm^{-1} a 1460 rel. cm^{-1} se vyskytují u vzorků před i po jejich tepelné úpravě. Přítomnost tripletu poskytuje informace o orthorombickém uspořádání laterálních řetězců. Pásy mezi 2850 rel. cm^{-1} a 2890 rel. cm^{-1} odpovídají symetrickým a asymetrickým vibracím CH_2 vazeb uhlovodíkového řetězce. Stejně jako u nezahřátých vzorků nevykazují tyto pásy výrazné odchylky od těchto hodnot. I ve vzorcích s obsahem Cer NdS se lipidy organizují do *trans*-konformace. Tato konformace je zřejmá ze spekter vzorků před i po jejich zahřátí.

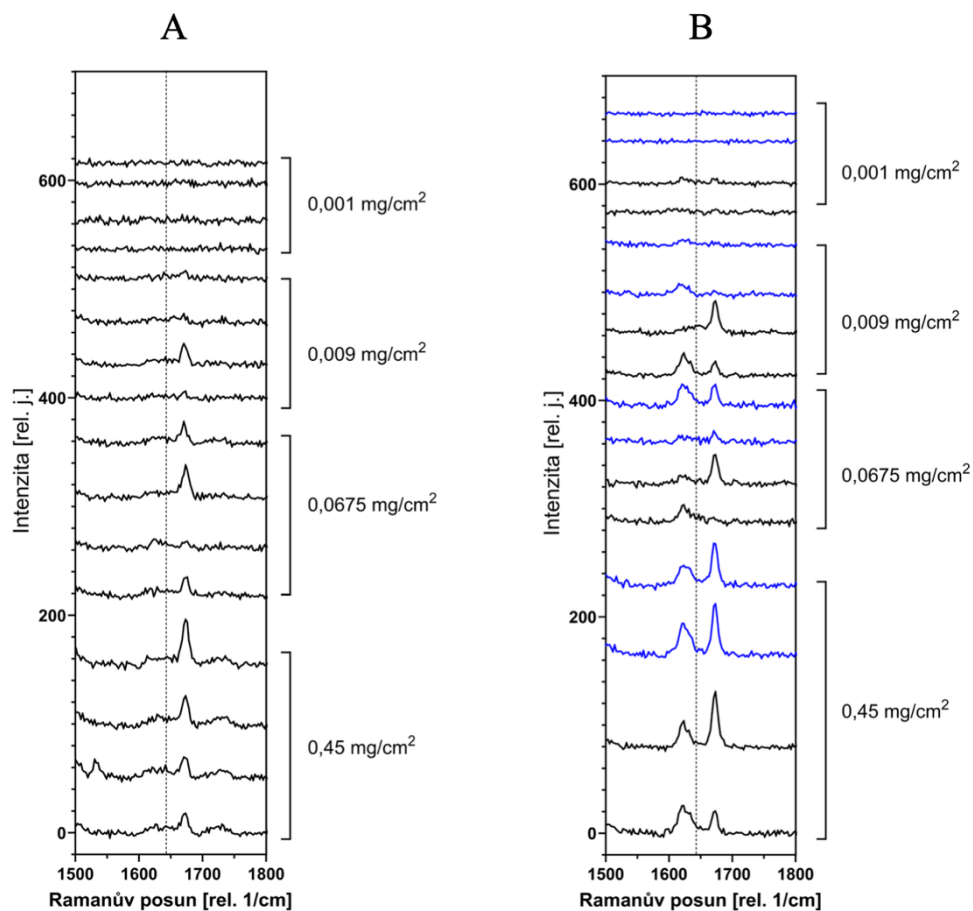
Oblast Amide I, blíže zobrazená na obrázku č. 18, je v tomto případě charakteristická změnami v Ramanových spektrech před zahříváním (A) a po zahřívání (B). Ve spektrech zobrazujících modely před zahříváním je patrný pás při 1675 rel. cm^{-1} odpovídající $\text{C}=\text{C}$ vazbě. Ve spektru B je pozorován navíc i pás při 1625 rel. cm^{-1} . Tato hodnota značí, že je struktura amidu do systému vodíkových vazeb zapojena silněji než v případě vzorků s Cer NS. V tomto případě se pás popisující Amide I zapojený do vodíkových vazeb vyskytuje pouze ve spektrech tepelně upravených vzorků^{20,21}.



Obrázek 16: Ramanova spektra vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.



Obrázek 17: Ramanova spektra zobrazující oblast nížkových vibrací vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

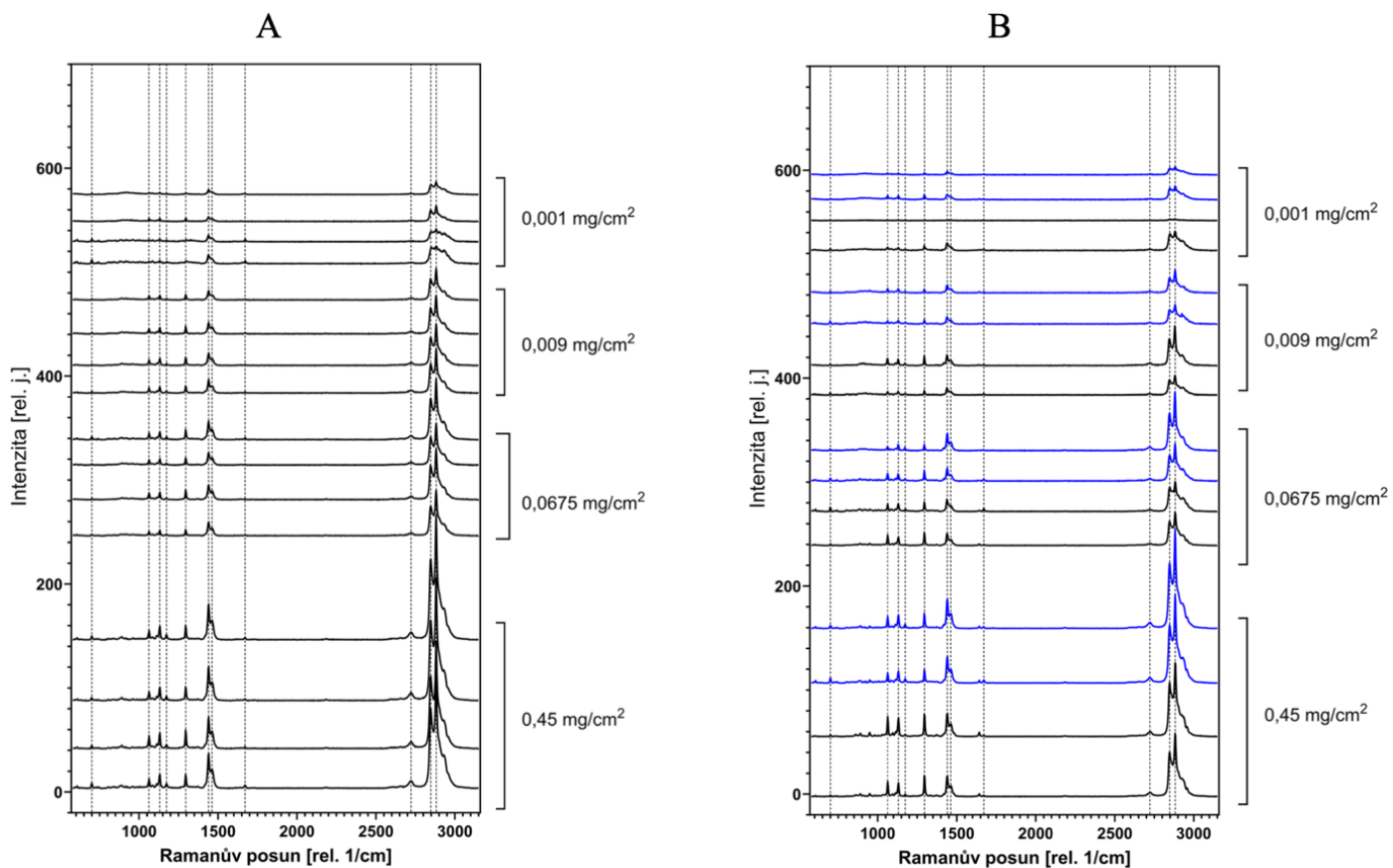


Obrázek 18: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NdS před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro Amide I se slabým zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

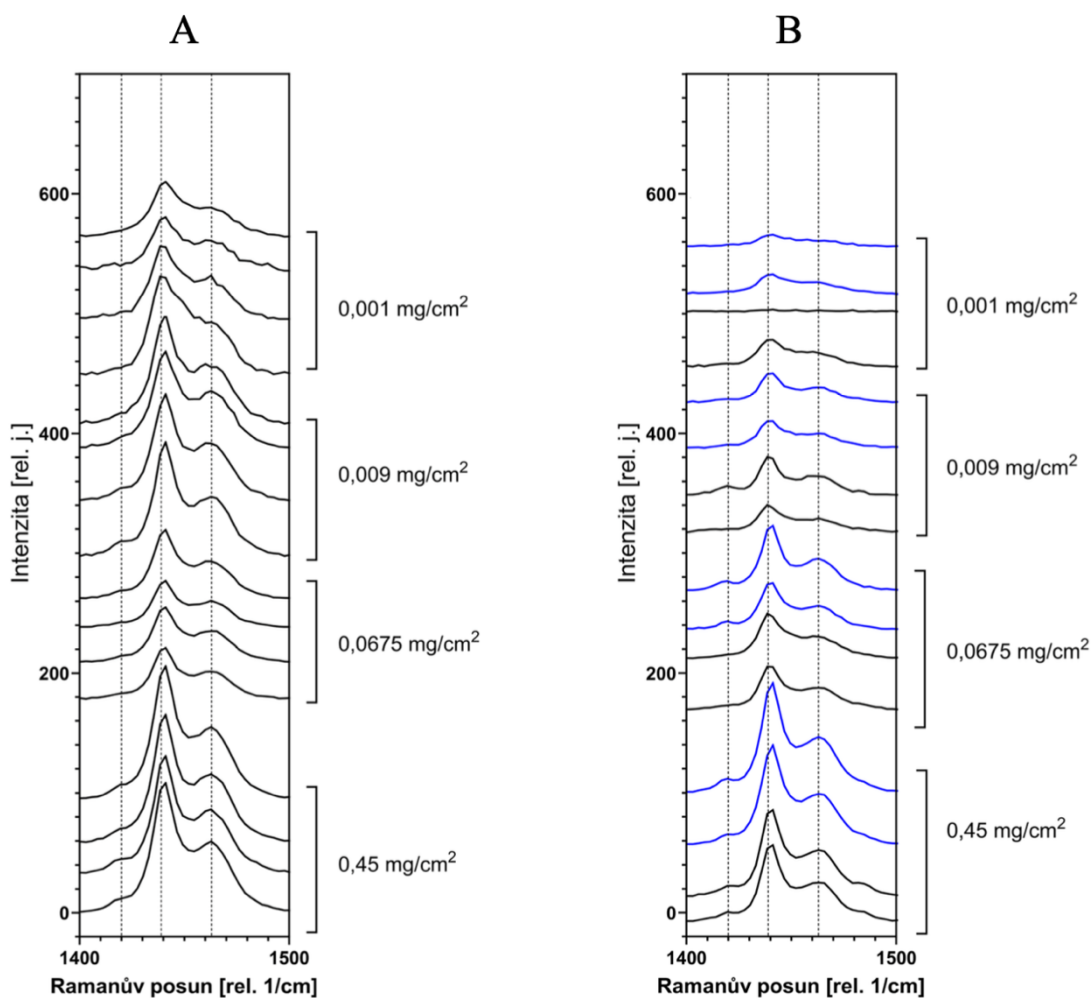
4.3.3 Ramanova mikrospektrometrie modelových membrán s obsahem Cer NP

Na obrázku č. 19 jsou zobrazena Ramanova spektra modelů s obsahem Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B). Stejně jako u spekter z podkapitoly 4.3.1 a 4.3.2 odpovídá přítomnost pásů jednotlivým funkčním skupinám v lipidech modelových membrán. Obecně lze říci, že s klesajícím množstvím lipidů ve vzorku se snižuje i kvalita Ramanových spekter. Spektra obou skupin vzorků obsahují pás odpovídající Chol při 700 rel. cm^{-1} . V oblasti C-C vazeb byly v případě spekter na obrázku č. 19 zobrazeny pásy při 1060 rel. cm^{-1} a 1140 rel. cm^{-1} . Jejich přítomnost poukazuje na přítomnost *all-trans* konformací řetězců. Ostrý pás při 1300 rel. cm^{-1} označuje řetězce s vysokým obsahem *trans*-konformerů. Pásy mezi 2850 rel. cm^{-1} a 2890 rel. cm^{-1} odpovídají symetrickým a asymetrickým vibracím CH_2 vazeb uhlovodíkového řetězce. Stejně jako u nezahřátých vzorků nevykazují tyto pásy výrazné odchylky od těchto hodnot. I ze spekter vzorků s Cer NP je zřejmé, že se lipidy organizují do *trans*-konformace před i po jejich tepelné úpravě.

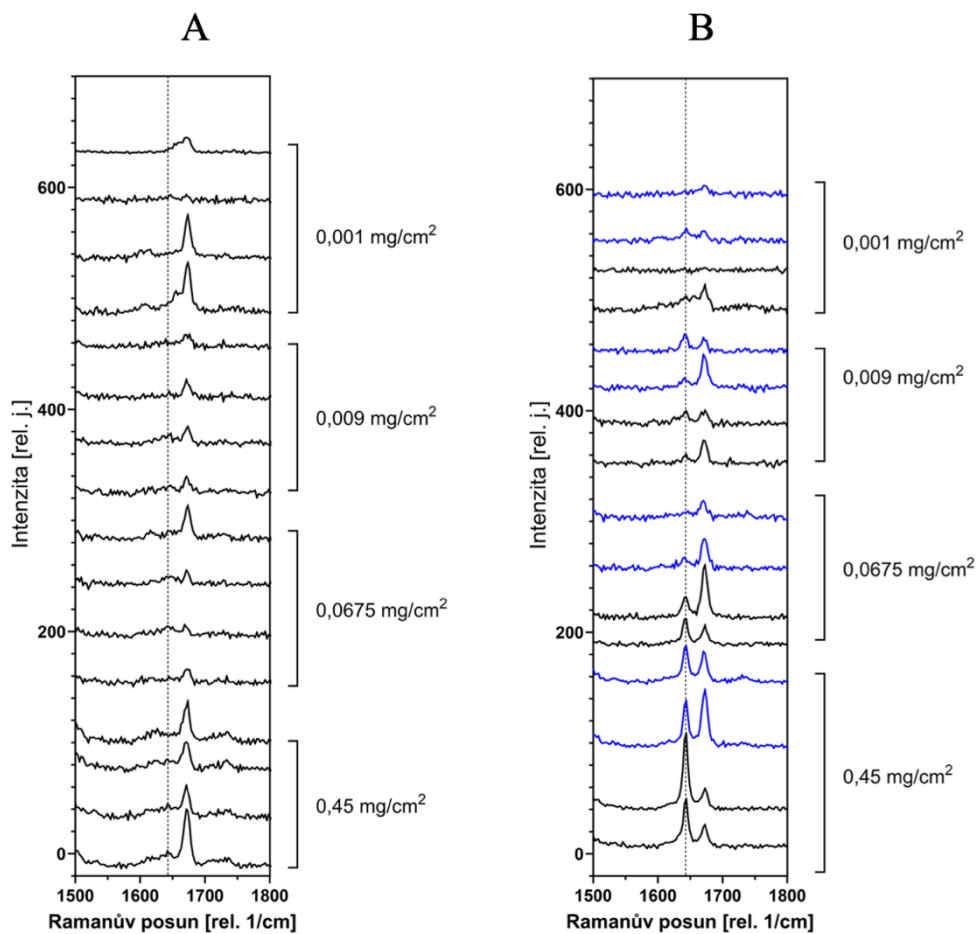
Na obrázku č. 20 je zobrazena oblast nůžkových vibrací modelů s obsahem Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B). I v těchto spektrech značí triplet pásů v rozmezí 1420 – 1460 rel. cm^{-1} přítomnost orthorombického uspořádání. Ramanova spektra na obrázku č. 21 blíže zobrazují oblast Amide I ve vzorcích s Cer NP před zahřátím (A) a po zahřátí (B). Ve spektru A je zobrazen pás při 1675 rel. cm^{-1} . Ve spektru B je navíc i pás při 1645 rel. cm^{-1} , který svědčí o slabém zapojení amidové skupiny do sítě vodíkových vazeb. Ve spektru (A) na obrázku č. 21 není tento pás zřetelný^{20,21}.



Obrázek 19: Ramanova spektra vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají polohám vybraných pásů. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.



Obrázek 20: Ramanova spektra zobrazující oblast nízkových vibrací vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické upořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.



Obrázek 21: Ramanova spektra zobrazující oblast Amide I vzorků s Cer NP před zahříváním (A) a po zahřívání (B) bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro Amide I se slabším zapojením do vodíkových můstků. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

4.4 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

FTIR je metodou vibrační spektroskopie. Jedná se o techniku určenou k identifikaci a charakterizaci organických i anorganických látek. Pomocí této metody je zkoumáno složení a chemické vazby vzorků. Limitací této metody je potřebné množství zkoumaného materiálu. To je v případě našich vzorků velmi malé. Měření v mnoha případech neposkytuje dostatečně kvalitní spektra z důvodu malého množství vzorku. Jelikož vzorek po měření FTIR nelze opětovně použít, byly modely proměřeny jen po jejich tepelné úpravě. V následujících podkapitolách budou vyhodnoceny jednotlivé typy vibrací. Podkapitoly budou rozděleny podle toho, jaký Cer je ve struktuře membrán obsažený.

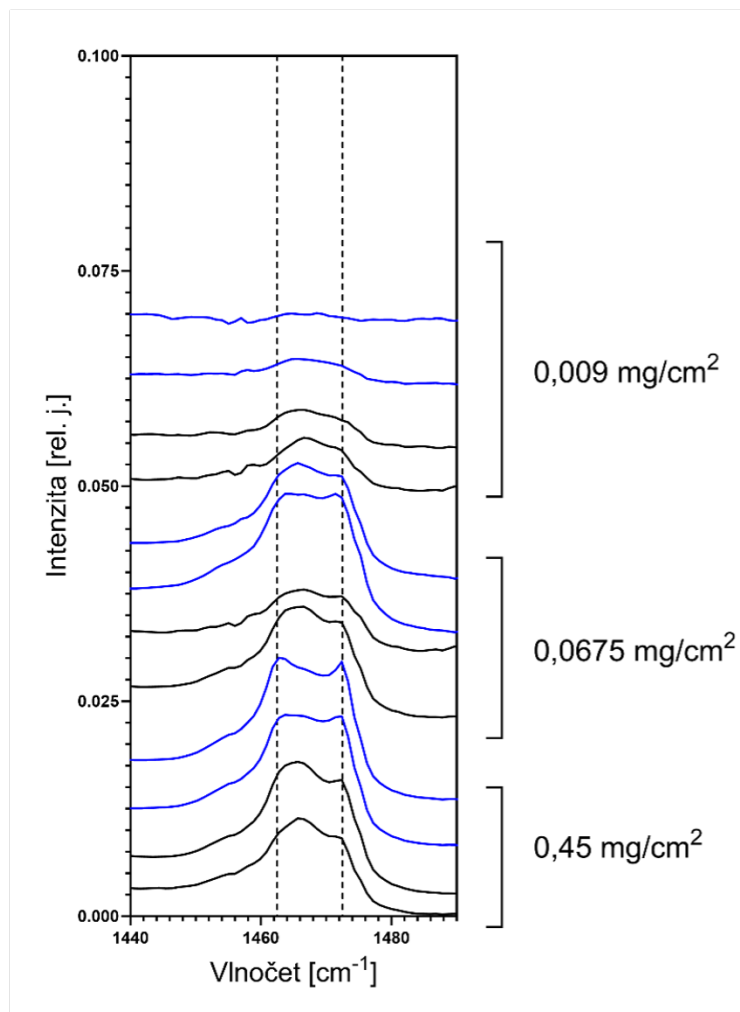
Ve vyhodnocení spekter jsme se zaměřili na tři zásadní oblasti vibrací. Konkrétně se jedná o CH₂ valenční („*stretching*“) vibrace, které kvalitativně monitorují konformační uspořádání a organizaci acylových řetězců. Při hodnotách 2847 – 2866 cm⁻¹ se vyskytují symetrické valenční („*stretching*“) vibrace CH₂ skupiny. Pokud se tyto hodnoty nacházejí pod hranicí 2850 cm⁻¹, jsou řetězce v *trans*-konformaci. Pokud je tato hodnota překročena, nacházejí se řetězce ve větší míře v *gauche* uspořádání. Při hodnotách 2915 – 2924 cm⁻¹ se nacházejí CH₂ asymetrické valenční („*stretching*“) vibrace, které jsou na změny organizace v lipidových strukturách méně citlivé než vibrace symetrické. Dalšími vyhodnocovanými vibracemi jsou CH₂ nůžkové („*scissoring*“) vibrace. Díky nim přímo detekujeme orthorombické fáze a mikroagregaci v upořádaných lipidových fázích. Pokud v této oblasti pozorujeme dublet pásů při hodnotách 1463 a 1473 cm⁻¹, jsou řetězce organizovány do orthorombického uspořádání. Pokud se v této oblasti vyskytuje pouze jeden pás při 1460 cm⁻¹, jedná se o hexagonální uspořádání řetězců. Posledním typem vibrací, který se často ve spektrech popisuje, jsou houpavé („*rocking*“) vibrace. Ve spektrech se nacházejí při 714 – 736 cm⁻¹⁹.

4.4.1 FTIR modelových membrán s obsahem Cer NS po zahřátí

V tabulce č. 7 jsou zaznamenány hodnoty vlnočtů CH_2 symetrických valenčních vibrací. V tabulce jsou průměry naměřených hodnot seřazené podle množství lipidů v daných vzorcích. Žádný z těchto průměrů nepřesahuje hodnotu vlnočtu 2850 cm^{-1} . Jsou tedy důkazem, že se jedná o *trans* uspořádání acylových řetězců. Z tabulky č. 7 se zdá, že s klesajícím množstvím lipidů ve vzorku většinou mírně klesá i rigidita uspořádání řetězců. Výkyvy v linearitě mohou být způsobeny také tím, že FTIR není metodou, která je pro měření takto malých množství vhodná. Čím menší množství lipidů se ve vzorcích nachází, tím obtížnější je takové vzorky pomocí FTIR měřit. Kvalita spekter je tedy díky tomu nižší. Z tohoto důvodu nebylo možné proměřit spektra vzorků s nejnižším obsahem lipidů ($0,001 \text{ mg/cm}^2$). Na obrázku č. 22 je blíže zobrazena oblast nůžkových vibrací. V této oblasti spektra pozorujeme konvoluci dubletu pásů při 1463 cm^{-1} a 1473 cm^{-1} a pásu odpovídajícího hexagonálnímu uspořádání řetězců při $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$. Nejednoznačnost štěpení pásu do dubletu značí, že se jedná o kombinaci hexagonálního a orthorombického uspořádání. Nejsou znatelné rozdíly mezi vzorky zahřátými s vodou a bez vody.

Tabulka 7: Hodnoty vlnočtů CH_2 symetrických valenčních („stretching“) vibrací změřené pomocí FTIR.

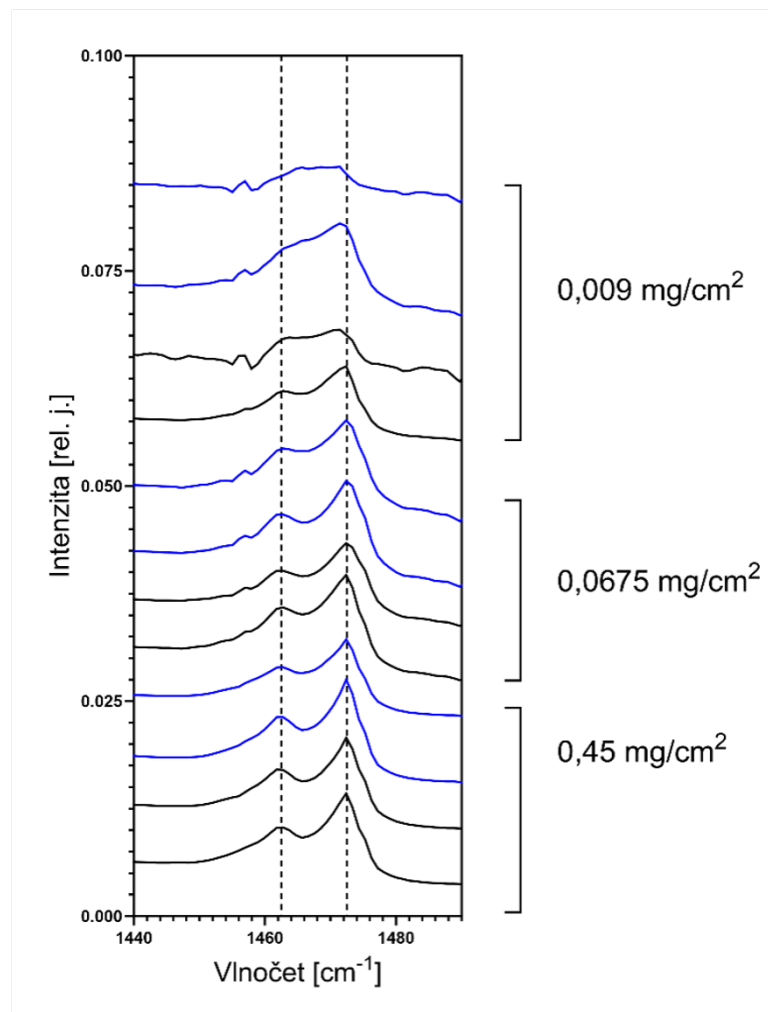
CH ₂ -symmetrical stretching						
Množství lipidů na [mg/cm ²]	Modely zahříváné s vodným prostředím			Modely zahříváné bez vodného prostředí		
	TS-NS-	Změřené hodnoty	Průměr	TS-NS-	Změřené hodnoty	Průměr
0,45	1A1	2848,2	2848,6	1B1	2848,4	2848,4
		2848,9			2848,5	
	1A2	2848,4		1B2	2848,3	
		2848,9			2848,5	
0,0675	2A1	2848,5	2848,8	2B1	2848,5	2848,8
	2A2	2849,1		2B2	2849,0	
0,009	3A1	2848,8	2848,8	3B1	2848,6	2848,1
	3A2	2848,8		3B2	2847,6	
	TS-NdS-			TS-NdS-		
0,45	1A1	2848,7	2848,6	1B1	2848,7	2848,7
	1A2	2848,4		1B2	2848,6	
0,0675	2A1	2848,6	2849,0	2B1	2849,4	2849,3
	2A2	2849,3		2B2	2849,2	
0,009	3A1	2848,1	2848,3	3B1	2848,2	2848,3
	3A2	2848,5		3B2	2848,3	
	TS-NP-			TS-NP-		
0,45	1A1	2848,2	2848,3	1B1	2848,4	2848,3
	1A2	2848,3		1B2	2848,3	
0,0675	2A1	2848,1	2848,2	2B1	2849,0	2849,1
	2A2	2848,4		2B2	2849,2	
0,009	3A1		2848,8	3B1	2850,9	2849,5
	3A2	2848,8		3B2	2848,1	



Obrázek 22: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NS po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

4.4.2 FTIR modelových membrán s obsahem Cer NdS po zahřátí

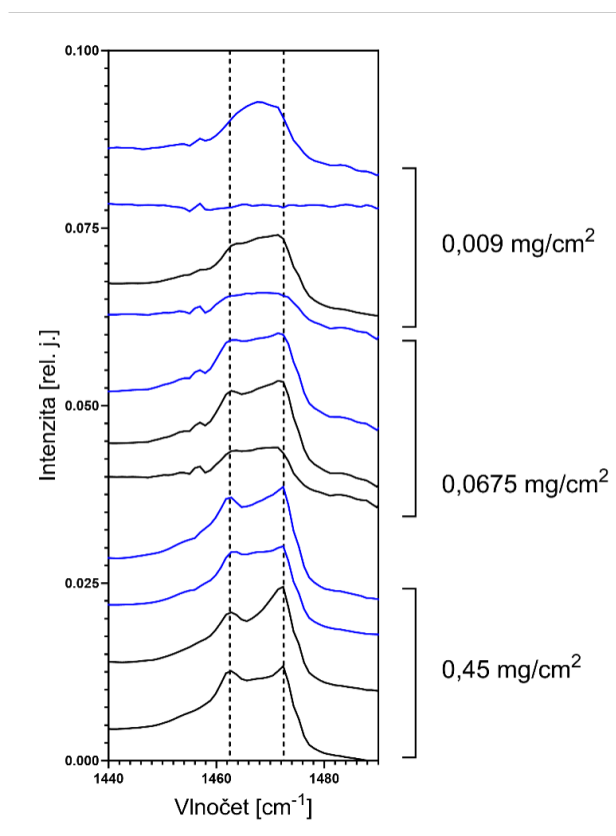
Hodnoty vlnočtů CH_2 symetrických vibrací vzorků s obsahem Cer NdS jsou zaznamenány v tabulce č. 7. Všechny průměry těchto vlnočtů nedosahují hodnot vyšších než 2850 cm^{-1} , což poukazuje na převážně *all-trans* uspořádání acylových řetězců. Hodnoty vlnočtů rostou zároveň s klesajícím obsahem lipidů v měřených vzorcích. Spektrum zobrazené na obrázku č. 23 přibližuje oblast nůžkových vibrací vzorků s obsahem Cer NdS. Podobně jako ve spektru na obrázku č. 22 nelze ani u vzorků s Cer NdS jednoznačně rozeznat štěpení pásu na dublet. Jedná se tedy o situaci, která odpovídá té z předchozí podkapitoly (4.4.1) – o kombinaci hexagonálního a orthorombického uspořádání řetězců. Nelze pozorovat rozdíly mezi vzorky zahřátými za přítomnosti vody nebo bez ní. Ve spektru na obrázku č. 23 lze pozorovat pás při hodnotě kolem 1456 cm^{-1} . Tento pás odpovídá deformačním vibracím asymetrických vazeb CH_3 skupiny a symetrických vazeb CH_2 skupiny ve struktuře lipidů. Přítomnost tohoto pásu nejeví závislost na přítomnosti vody při tepelné úpravě vzorků²².



Obrázek 23: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NdS po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

4.4.3 FTIR modelových membrán s obsahem Cer NP po zahřátí

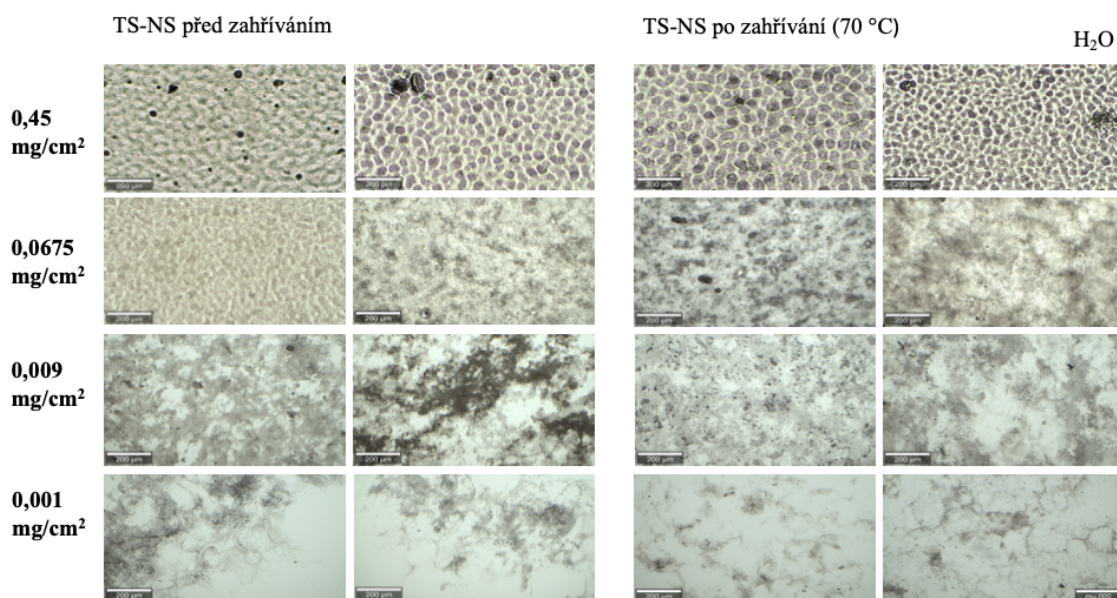
I hodnoty vlnočtů jednotlivých vzorků s obsahem Cer NP jsou uvedeny v tabulce č. 7. Veškeré hodnoty vlnočtů se nacházejí pod hodnotou 2850 cm^{-1} . Tudiž se i v tomto případě jedná převážně o *all-trans* uspořádání řetězců. Z tabulky č. 7 je zřejmé, že s klesajícím množstvím lipidů ve vzorcích klesá i rigidita řetězců. Oblast nůžkových vibrací je blíže zobrazena na obrázku č. 24. Zde pozorujeme konvoluci dubletu pásů při 1463 cm^{-1} a 1473 cm^{-1} a pásu při 1466 cm^{-1} . I v tomto případě se jedná o kombinaci orthorombického a hexagonálního uspořádání. Stejně jako ve spektru na obrázku č. 23, lze i ve spektru na obrázku č. 24 pozorovat pás při hodnotě 1456 cm^{-1} . Pozice tohoto pásu odpovídá přítomnosti deformačním symetrickým vibracím CH_2 skupiny a asymetrickým vibracím CH_3 skupiny ve struktuře vzorků²².



Obrázek 24: FTIR spektrum zobrazující oblast nůžkových vibrací vzorků s Cer NP po zahřátí bez vody (černá) a s vodou (modrá). Mřížkové čáry odpovídají poloze pásu pro orthorombické uspořádání řetězců. Jednotlivá spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y pro lepší názornost.

4.5 Vliv teoretického počtu vytvořených vrstev na rozložení lipidů v modelových membránách

V rámci experimentální práce byly modelové membrány pozorovány optickým mikroskopem. Pomocí výstupů z optického mikroskopu můžeme hodnotit vliv teoretického počtu vrstev, které lipidy mohou vytvořit, na jejich rozložení ve SC. Na reprezentativních fotografiích z optického mikroskopu na obrázku č. 25 lze pozorovat rozložení lipidů na krycím mikroskopickém sklíčku po jejich nanesení a následně i po tepelné úpravě. Lipidy na sklíčku zasychají již během jejich nástřiku. Na fotografiích vzorků s obsahem lipidů $0,45 \text{ mg/cm}^2$ a $0,0675 \text{ mg/cm}^2$ lze pozorovat, že lipidy zasychaly rovnoměrně a vytvořily celistvou plochu. Na fotografiích vzorků s obsahem lipidů $0,009 \text{ mg/cm}^2$ a $0,001 \text{ mg/cm}^2$ lze pozorovat, že lipidy zasychaly ve shlucích. Tuto schopnost shlukovat se si lipidy zachovaly i po tepelné úpravě modelových membrán.



Obrázek 25: Fotografie z optického mikroskopu zobrazující vzorky s obsahem Cer NS (vlevo před zahřátím a vpravo po zahřátí). Fotografie jsou seřazené sestupně podle klesajícího obsahu lipidů.

5 DISKUSE

Pro tuto práci bylo potřeba připravit modely s obsahem vždy jednoho vybraného Cer, směsi MK a Chol v poměru blízkém reálné lipidové matrix ve SC. Tyto modely byly následně zahřáty nad teplotu fázového přechodu lipidů. Struktura tenkých lipidových filmů byla zjišťována pomocí XRD, Ramanovy mikrospektrometrie a FTIR. Cílem práce bylo zjistit vliv struktury Cer, teploty a přítomnosti vody při tepelné úpravě a teoretického počtu vrstev, které lipidy tvoří, na uspořádání tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry. Chtěli jsme také zjistit, jak malá množství lipidů lze k přípravě modelů kožní bariéry použít, aby experiment stále poskytoval relevantní výsledky.

Již v dříve publikovaných článcích bylo popsáno, že lipidy tvoří v modelových membránách struktury s charakteristickými mezirovinnými vzdálenostmi¹⁴. I XRD difraktogramy z našeho experimentu ukazují, že lipidy jsou schopné vytvořit periodické struktury, aniž by tomu musela předcházet tepelná úprava. Ze spekter také vyplývá, že struktura Cer má na rozložení lipidových filmů velký vliv. Tento vliv je vidět na rozdílných mezirovinných vzdálenostech s nimiž se ve vzorcích dané struktury vyskytují. I rozdíly v těchto mezirovinných vzdálenostech jsou potvrzením předchozích publikovaných výsledků^{13,14}. Hodnoty těchto mezirovinných vzdáleností se ve většině případů tepelnou úpravou prodloužily. Tento efekt se objevil u všech měřených typů Cer. Rozdíly jsou znatelné i mezi difraktogramy vzorků zahřátými bez přítomnosti vody a s vodou. Tento vliv je výrazně vidět u modelů s obsahem Cer NS, které vytvořily strukturu s periodicitou $d \sim 6$ nm. Jedná se o periodicitu, která je delší než ta u struktur vzorků zahřátých v přítomnosti vody ($d \sim 5,3$ nm) a u struktur vzorků před jejich zahřátím ($d \sim 5,3$ nm). Tato periodicitu nebyla pro tento Cer dříve publikována. Rozdíl je vidět také u vzorků s obsahem Cer NdS a NP, u kterých byla pozorována fáze s periodicitou $d \sim 10,5$ nm (periodicita blízká LPP). U vzorků s Cer NP je výskyt této fáze, na rozdíl od vzorků s Cer NdS, vázán na zahřívání v přítomnosti vody. Tato delší periodicitu byla dříve pozorována u jiných druhů Cer, například u Cer NH nebo NS^{12,13}. Z našich výsledků vyplývá, že by se mohlo jednat o obecnou vlastnost Cer, které by mohly tuto fázi vytvořit vždy za optimálních podmínek.

I z Ramanových spekter a spekter FTIR vyplývá, že rozložení lipidových filmů je ovlivněno podmínkami během přípravy membrán. Vliv tepelné úpravy je znatelně

viditelný v Ramanových spektrech. V oblasti Amide I je po tepelné úpravě pozorován pás, jehož poloha je ovlivněna mírou zapojení amidové skupiny do systému vodíkových vazeb. Příčina vzniku tohoto pásu může být dána povahou interakcí, které ve vzorku převládají. Po nanesení lipidů na krycí mikroskopické sklíčko pravděpodobně převládají hydrofobní interakce dlouhých lipidových řetězců. Po tepelné úpravě, nezávisle na tom, zda za přítomnosti vody nebo bez ní, se pravděpodobně do formování struktury lipidových lamel více zapojují polární interakce. Jedná se o interakce polárních hlav Cer prostřednictvím vodíkových můstků. Zdá se, že před tepelnou úpravou není hlava Cer ještě kompletně uspořádána. Změna v povaze těchto interakcí se tedy projeví i v Ramanově spektru. Síla zapojení v systému vodíkových vazeb byla hodnocena již v předchozích publikacích²⁰. Rozdíly mezi silou zapojení v hlavových skupinách jednotlivých Cer se shodně ukazují i v našem experimentu. Z Ramanových spekter v oblasti nůžkových vibrací jsme také potvrdili, že část lipidových řetězců má tendenci setrvávat v orthorombickém uspořádání. A to nezávisle na tepelné úpravě nebo přítomnosti vody. I tato myšlenka byla vyslovena již v dřívějších publikacích⁷.

Z experimentu také vyplývá, že nelze zcela průkazně hodnotit vliv teoretického počtu vrstev, které lipidy tvoří, na jejich rozložení ve SC. Z obrázku č. 25 je zřejmé, že se snižujícím se obsahem lipidů ve vzorku klesá i kvalita lipidového filmu na sklíčku. I přes to, že byly lipidové směsi nanášeny kontinuálně, ukazuje se, že nástřikem nelze připravit rovnoměrně tenkou vrstvu. Na vzorcích se dvěma nejvyššími obsahy lipidů (0,45 mg/cm² a 0,0675 mg/cm²) lze vidět, že lipidy tvoří víceméně souvislou strukturu. U vzorků se dvěma nejnižšími obsahy lipidů (0,009 mg/cm² a 0,001 mg/cm²) je pozorováno, že lipidy po nanesení mají tendenci se shlukovat. Mezi shluky jsou poté místa, ve kterých je buď jen velmi tenká vrstva lipidů nebo v nich nejsou lipidy přítomny vůbec. Z obrázku č. 25 je také patrné, že ani po zahřátí nejsou lipidy schopné vytvořit jednolitou vrstvu a zachovávají si tendenci se shlukovat.

Z výsledků námi provedených měření vyplývá, že k přípravě modelů kožní bariéry lze používat množství až 0,009 mg/cm². Ve většině dříve provedených experimentů byla k přípravě modelů kožní bariéry používána několikrát větší množství než v případě naší práce²³. Modely takových membrán obsahují řádově tisíce lipidových lamel. Mnohovrstevné vzorky se označují jako „*bulk sample*“ a vyznačují se hromadným chováním typickým pro velký počet molekul. Takové uspořádání neodpovídá příliš

reálnému uspořádání v SC, jelikož mezi korneocyty ve SC je přítomno jen velmi malé množství lipidových lamel (obrázek č. 4). Naše modely kožní bariéry se tak více přibližují realitě a výsledky z tenkých vrstev mohou lépe modelovat některé aspekty reálného SC.

6 ZÁVĚR

Cíle této práce, definované v úvodní kapitole, byly splněny v plném rozsahu. Bylo zjištěno, že struktura Cer má velký vliv na uspořádání tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry. Mimo to bylo zjištěno, že na toto rozložení má velký vliv i teplota a voda přítomná při tepelné úpravě vzorků. Sledovat vliv vrstev vytvořených lipidy na toto uspořádání se ukázalo jako špatný směr.

Přínosem této práce bylo také zjištění, že lze připravit modely kožní bariéry svým množstvím lipidů blízké reálnému SC. Práce s velmi malými množstvími lipidů je pro tuto přípravu nezbytná. Bylo také objeveno několik strukturních jevů, které dříve pro dané typy lipidů nebyly popsány.

Závěrem bylo zjištěno, že polymorfismy vznikající ve vzorcích lipidů se zdají být obtížně kontrolovatelné. Jejich vznik a chování závisí ve velké míře na vnějších podmínkách.

7 LITERATURA

- (1) Trojan Stanislav. *Lékařská Fyziologie*; Grada Publishing: Praha, 2003.
- (2) Rokyta Richard. *Fyziologie*; Galén: Praha, 2016.
- (3) Čihák Radomír. *Anatomie 3: Třetí, Upravené a Doplněné Vydání*; Grada Publishing, a. s. : Praha, 2016.
- (4) Mohamed, S. A.; Hargest, R. Surgical Anatomy of the Skin. *Surgery (Oxford)* 2022, 40 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2021.11.021>.
- (5) Lai-Cheong, J. E.; McGrath, J. A. Structure and Function of Skin, Hair and Nails. *Medicine* 2009, 37 (5), 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.03.002>.
- (6) Bergerová Yvonne; Brychta Pavel; Stanek Jan; Kolektiv. *Estetická Plastická Chirurgie a Korektivní Dermatologie*; Grada: Praha, 2014.
- (7) Vávrová Kateřina; Kováčik Andrej; Opálka Lukáš. Ceramides in the Skin Barrier. *European Pharmaceutical Journal* 2017, 64 (2), 28–35. <https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0004>.
- (8) Guillard, E.; Tfayli, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Thermal Dependence of Raman Descriptors of Ceramides. Part II: Effect of Chains Lengths and Head Group Structures. *Anal Bioanal Chem* 2011, 399 (3), 1201–1213. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4389-x>.
- (9) Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J. Determination of Molecular Conformation and Permeation in Skin via IR Spectroscopy, Microscopy, and Imaging. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2006, 1758 (7), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.009>.
- (10) van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>.
- (11) Takeichi, T.; Hirabayashi, T.; Miyasaka, Y.; Kawamoto, A.; Okuno, Y.; Taguchi, S.; Tanahashi, K.; Murase, C.; Takama, H.; Tanaka, K.; Boeglin, W. E.; Calcutt, M. W.; Watanabe, D.; Kono, M.; Muro, Y.; Ishikawa, J.; Ohno, T.; Brash, A. R.;

- Akiyama, M. SDR9C7 Catalyzes Critical Dehydrogenation of Acylceramides for Skin Barrier Formation. *Journal of Clinical Investigation* 2020, 130 (2), 890–903. <https://doi.org/10.1172/JCI130675>.
- (12) Pullmannová, P.; Ermakova, E.; Kováčik, A.; Opálka, L.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Kučerka, N.; Vávrová, K. Long and Very Long Lamellar Phases in Model Stratum Corneum Lipid Membranes. *J Lipid Res* 2019, 60 (5), 963–971. <https://doi.org/10.1194/jlr.M090977>.
- (13) Kováčik, A.; Pullmannová, P.; Opálka, L.; Šilarová, M.; Maixner, J.; Vávrová, K. Effects of (R)- and (s)- α -Hydroxylation of Acyl Chains in Sphingosine, Dihydrosphingosine and Phytosphingosine Ceramides on Phase Behavior and Permeability of Skin Lipid Models. *Int J Mol Sci* 2021, 22 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147468>.
- (14) Kováčik, A.; Vogel, A.; Adler, J.; Pullmannová, P.; Vávrová, K.; Huster, D. Probing the Role of Ceramide Hydroxylation in Skin Barrier Lipid Models by 2H Solid-State NMR Spectroscopy and X-Ray Powder Diffraction. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018, 1860 (5), 1162–1170. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.02.003>.
- (15) Boncheva, M. The Physical Chemistry of the Stratum Corneum Lipids. *International Journal of Cosmetic Science*. December 1, 2014, pp 505–515. <https://doi.org/10.1111/ics.12162>.
- (16) Školová, B.; Kováčik, A.; Tesař, O.; Opálka, L.; Vávrová, K. Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017, 1859 (5), 824–834. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.019>.
- (17) Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepíčka, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys Chem* 2017, 224, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.03.004>.
- (18) Atkins Peter William; Jones Loretta. *Chemical Principles: The Quest for Insight*,

fifth edition.; W. H. Freeman, 2010.

- (19) Schroeter, A.; Stahlberg, S.; Školová, B.; Sonnenberger, S.; Eichner, A.; Huster, D.; Vávrová, K.; Hauß, T.; Dobner, B.; Neubert, R. H. H.; Vogel, A. Phase Separation in Ceramide[NP] Containing Lipid Model Membranes: Neutron Diffraction and Solid-State NMR. *Soft Matter* 2017, 13 (10), 2107–2119. <https://doi.org/10.1039/C6SM02356H>.
- (20) Tfayli, A.; Jamal, D.; Vyumvuhore, R.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Hydration Effects on the Barrier Function of Stratum Corneum Lipids: Raman Analysis of Ceramides 2, III and 5. *Analyst* 2013, 138 (21), 6582–6588. <https://doi.org/10.1039/c3an00604b>.
- (21) Tfayli, A.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Thermal Dependence of Raman Descriptors of Ceramides. Part I: Effect of Double Bonds in Hydrocarbon Chains. *Anal Bioanal Chem* 2010, 397 (3), 1281–1296. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3614-y>.
- (22) Dutta, S.; Hartkopf-Fröder, C.; Witte, K.; Brocke, R.; Mann, U. Molecular Characterization of Fossil Palynomorphs by Transmission Micro-FTIR Pectroscopy: Implications for Hydrocarbon Source Evaluation. *Int J Coal Geol* 2013, 115, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2013.04.003>.
- (23) de Jager, M.; Groenink, W.; van der Spek, J.; Janmaat, C.; Gooris, G.; Ponc, M.; Bouwstra, J. Preparation and Characterization of a Stratum Corneum Substitute for in Vitro Percutaneous Penetration Studies. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2006, 1758 (5), 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.001>.