

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv počtu lipidových vrstev na vlastnosti
tenkých filmů jako modelů kožní bariéry**

**Effect of the number of lipid layers on the
properties of thin films as skin barrier models**

Šárka Bělochová

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

HRADEC KRÁLOVÉ 2024

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, proměření Ramanových spekter a čas věnovaný mně a mé práci. Dále bych ráda poděkovala Ing. Michalu Kurkovi, Ph.D. z Centra materiálů a nanotechnologií při Chemicko-technologické fakultě Univerzity Pardubice za proměření vzorků pomocí AFM. Mé díky patří i výzkumné skupině kožní bariéry za vytvoření přátelského prostředí při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svojí rodině a blízkým za neustálou a nezbytnou podporu.

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

V Hradci Králové 9. května 2024

Šárka Bělochová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Školitel: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Posluchač: Šárka Bělochová

Název diplomové práce: Vliv počtu lipidových vrstev na vlastnosti tenkých filmů jako modelů kožní bariéry

Nejsvrchnější vrstva kůže, *stratum corneum* (SC), plní především bariérovou funkci, která je esenciální pro přežití člověka na souši. SC je tvořena zploštělými odumřelými buňkami, korneocyty, které jsou obklopeny extracelulární lipidovou matrix. Složení i uspořádání lipidů SC úzce souvisí se správnou stavbou a funkcí kůže a jejich narušení může vést k rozvinutí některých kožních onemocnění.

Náplní práce bylo určit vliv počtu vrstev na vlastnosti tenkých filmů jako modelů kožní bariéry. Metodou použitou pro přípravu modelů byla depozice tenkých filmů technikou Langmuir-Blodgett. Byly připraveny jedno-, tří- a pětivrstvé modely. Nanášeným vzorkem byla směs simulující složení kožních lipidů a obsahující ceramid, cholesterol a směs mastných kyselin v molárním poměru 1:0.45:1. Tyto modely byly následně hodnoceny pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM, z angl. *atomic force microscopy*) a Ramanovy mikrospektroskopie. Během experimentů byla pozorována reorganizace lipidů do vyšších struktur, která byla vyhodnocena jako spontánní a vznikala již v krátkém čase od přípravy. K prokázání, že vyšší struktury nejsou nečistotami z prostředí, byla připravena nová lipidová směs obsahující mimo ceramidy a cholesterol i deuterované mastné kyseliny. Po depozici byly modely této směsi opět hodnoceny Ramanovou mikrospektrometrií, která prokázala, že zmíněné vyšší struktury vznikají z nanášené lipidové směsi a nepochází z vnějšího prostředí.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Mentor: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Student: Šárka Bělochová

Title of Thesis: Effect of the number of lipid layers on the properties of thin films as skin barrier models

The uppermost layer of the skin, the *stratum corneum* (SC), primarily serves a barrier function that is essential for human survival on dry land. The SC is composed of flattened dead cells, corneocytes, which are surrounded by an extracellular lipid matrix. The composition and arrangement of SC lipids are closely related to the proper structure and function of the skin, and their disruption can lead to the development of certain skin diseases.

The study aimed to determine the effect of the number of lipid layers on the properties of thin films as skin barrier models. The method used for the preparation of the models was the deposition of thin films by the Langmuir-Blodgett technique. Mono-, tri- and five-layer models were prepared. The deposited sample was a mixture simulating the composition of skin lipids and containing ceramides, cholesterol and a mixture of fatty acids in a molar ratio of 1:0.45:1. These models were then evaluated by atomic force microscopy (AFM) and Raman microspectroscopy. During the experiments, reorganization of the lipids into higher structures was observed and was determined to be spontaneous and may occur shortly after preparation. To demonstrate that the higher structures were not external impurities, a new lipid mixture containing deuterated fatty acids in addition to ceramides and cholesterol was prepared. After deposition, the models of this mixture were again evaluated by Raman spectrometry, which showed that the mentioned higher structures originated from the deposited lipid mixture.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE..... | 9 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 2.1 Kůže..... | 10 |
| 2.1.1 Hypodermis..... | 10 |
| 2.1.2 Dermis..... | 11 |
| 2.1.3 Epidermis | 11 |
| 2.2 Kožní bariéra – Stratum corneum..... | 13 |
| 2.2.1 Volné mastné kyseliny v SC..... | 13 |
| 2.2.2 Cholesterol v SC | 13 |
| 2.2.3 Ceramidy v SC..... | 14 |
| 2.2.4 Korneocytární obálka..... | 15 |
| 2.3 Organizace lipidů v SC | 15 |
| 2.3.1 Lamelární uspořádání SC..... | 16 |
| 2.3.2 Laterální uspořádání SC..... | 17 |
| 2.3.3 Molekulové konformace ceramidů | 18 |
| 2.4 Poznámky k použitým metodám..... | 19 |
| 2.4.1 Langmuir-Blodgettovy (LB) monovrstvy..... | 19 |
| 2.4.1.1 Struktura a vlastnosti plovoucích monovrstev | 19 |
| 2.4.1.2 Depozice LB monovrstev | 20 |
| 2.4.1.3 Langmuirova vanička | 21 |
| 2.4.2 Mikroskopie atomárních sil | 22 |
| 2.4.3 Ramanova spektroskopie | 22 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 24 |
| 3.1 Použité materiály a chemikálie | 24 |
| 3.2 Příprava směsi kožních lipidů..... | 24 |
| 3.3 Příprava acetátového pufru | 25 |
| 3.4 Označování vzorků | 25 |
| 3.5 Langmuir – Blodgettova metoda | 26 |
| 3.5.1 Příprava vzorků..... | 26 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.5.2 | Měření izotermy kyseliny behenové..... | 26 |
| 3.5.3 | Depozice kyseliny behenové na substrát | 27 |
| 3.5.4 | Depozice směsi kožních lipidů | 27 |
| 3.6 | Měření vzorků pomocí AFM | 28 |
| 3.7 | Měření vzorků pomocí Ramanova mikrospektrometru | 28 |
| 3.8 | Výsledky | 29 |
| 3.8.1 | Měření izotermy kyseliny behenové..... | 29 |
| 3.8.2 | Depozice kyseliny behenové na substrát | 29 |
| 3.8.3 | 1.3 Depozice vzorku směsi kožních lipidů na substrát..... | 34 |
| 3.8.4 | Depozice vzorků směsi kožních lipidů s deuterovanými mastnými kyselinami | 45 |
| 4. | DISKUZE | 50 |
| 5. | ZÁVĚR..... | 53 |
| 6. | LITERATURA | 54 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| SC | <i>stratum corneum</i> |
| AFM | mikroskopie atomárních sil (z angl. <i>atomic force microscopy</i>) |
| Cer | ceramid, ceramidy |
| Chol | cholesterol |
| FFA | volná mastná kyselina (z angl. <i>free fatty acid</i>) |
| MK | mastná kyselina |
| CholS | cholesterol-sulfát |
| CE | korneocytární obálka (z angl. <i>corneocyte envelope</i>) |
| LPP | fáze s dlouhou periodicitou (z angl. <i>long periodicity phases</i>) |
| SPP | fáze s krátkou periodicitou (z angl. <i>short periodicity phases</i>) |
| SP | povrchový tlak (z angl. <i>surface pressure</i>) |
| Mma | střední plocha na molekulu (z angl. <i>mean molecular area</i>) |
| TR | transfer ratio |
| PTFE | polytetrafluorethylen |
| IR | infračervená spektrofotometrie (z angl. <i>infrared</i>) |

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Kůže, největší orgán lidského těla, plní mnoho základních vitálních funkcí zahrnující ochranu proti vnějším vlivům, prevenci ztráty vody i termoregulaci. Esenciální komponentou pro plnění ochranné bariérové funkce je její nejsvrchnější vrstva – epidermis, konkrétně *stratum corneum* (SC). SC je tvořena zploštělými odumřelými buňkami, korneocyty, které jsou obklopeny extracelulární lipidovou matrix. Lipidy SC obsahují ceramidy (Cer), cholesterol (Chol) a směs volných mastných kyselin (FFA, z angl. *free fatty acids*) v molárním poměru 1:1:1 a významně se podílejí na funkci *strata cornea*. Složení i uspořádání lipidů SC úzce souvisí se správnou stavbou a funkcí kůže a jejich narušení může vést k rozvinutí některých kožních onemocnění jako atopické dermatitidy nebo psoriázy¹.

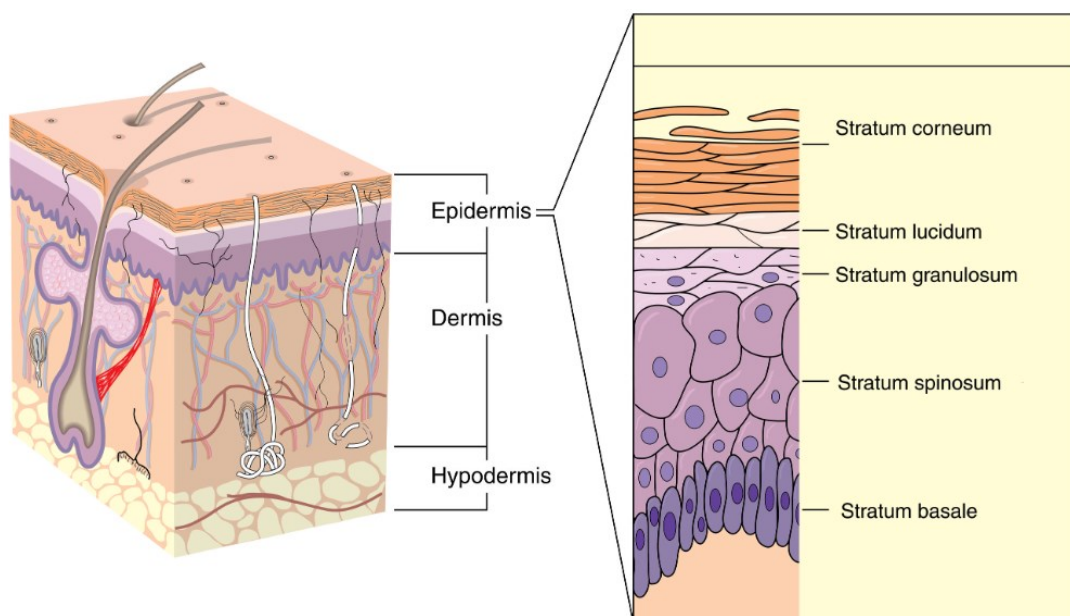
Navzdory důležitému významu přítomnosti lipidové bariéry a její funkce v lidském těle, momentálně neexistuje naprosto uspokojivý model lipidové matrix SC. Cílem této práce bylo pozorovat a určit, jaký je vliv počtu nanášených vrstev na vlastnosti tenkých lipidových filmů jako modelů kožní bariéry. Byla snaha vytvořit tenké několikavrstevné modely, které by se stavbou co nejvíce přiblížily tenkému oligolamelárnímu uspořádání, ve kterém se vyskytují lipidy ve *stratu corneum*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kůže

Kůže je největší orgán lidského těla. Tvoří přibližně 15% celkové tělesné hmotnosti dospělého člověka a plní mnoho základních vitálních funkcí zahrnujících obranu proti vnějším fyzickým, chemickým i biologickým vlivům, prevenci nadměrné ztráty vody povrchem těla a hraje roli i v termoregulaci².

Je tvořena třemi vrstvami, epidermis, dermis a hypodermis, z nichž se každá liší signifikantně svou anatomii i funkcí. Tloušťka jednotlivých vrstev kůže závisí na části těla. Nejtlustější kůže je na dlaních a ploskách nohou, kde epidermis obsahuje ještě navíc vrstvu *stratum lucidum*³.



Obrázek 1: Znárodnění vrstev kůže a vrstev epidermis. Převzato z⁴.

2.1.1 Hypodermis

Hypodermis (označovaná také jako podkožní tuk nebo *tela subcutanea*) je nejhluběji uloženou kožní vrstvou a hlavní strukturální oporou kůže. Je tvořena vazivovou a tukovou tkání a její tloušťka závisí na části těla, pohlaví i stavu nutrice. Tuková tkáň přispívá k tepelné izolaci, odolnosti proti mechanickému stresu a slouží jako zásobárna energie^{5,6}.

2.1.2 Dermis

Dermis je střední vrstvou kůže. Je tvořena především pojivou tkání a obsahuje také řadu krevních a lymfatických cév a nervů. Tloušťka dermis se pohybuje od 0,6 mm až po 5 mm v závislosti na části těla. Nejtenčí je na očních víčkách, naopak nejsilnější je na zádech⁶⁻⁸. Je tvořena dvěma částmi, *pars papillaris* a *pars reticularis*. *Pars papillaris* je svrchnější a podstatně tenčí část dermis vybíhající vůči epidermis v papily. *Pars reticularis* je silnější, hlouběji uložená vrstva skládající se husté sítě kolagenních vláken^{3,6,7}.

2.1.3 Epidermis

Epidermis je nejsvrchnější a nejvíce biologicky aktivní ze všech vrstev, jelikož se neustále obměňuje dělením buněk *stratum basale*⁹. Její tloušťka se pohybuje mezi 0,2 – 1,5 mm v závislosti na lokalitě. Je bezcévná a vůči dermis vybíhá v čepy⁶.

Funguje především jako fyzická a biologická bariéra zabraňující prostupu patogenů a iritantů do těla⁷.

Epidermis je složena hlavně z plátů keratinocytů, ale obsahuje i neepiteliální buňky včetně antigen-prezentujících dendritických Langerhansových buněk, melanocytů a Merkelových buněk¹⁰.

Keratinocyty produkují keratin a jsou zodpovědné za tvorbu epidermální bariéry prostřednictvím produkce a sekrece lipidů. Kromě toho také regulují absorpci vápníku aktivací prekurzorů cholesterolu UV zářením na vitamín D a při poranění se podílejí na tvorbě některých cytokinů^{3,8}. Během svého vývoje procházejí keratinocyty diferenciací, která probíhá za migrace buňky z basální vrstvy až do vrstvy nejsvrchnější. Finálním stádiem je bezjaderná, zploštělá buňka – korneocyt. Tento proces trvá přibližně 30–40 dní⁷.

Podle stupně diferenciaci keratinocytu lze rozdělit epidermis na pět vrstev. Epidermis tenké kůže má čtyři vrstvy, tlusté kůže má vrstev pět. V pořadí od nejspodnější vrstvy je to *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* (nepřítomné v tenké kůži) a *stratum corneum*^{5,10}.

Stratum basale je nejhloběji uloženou vrstvou epidermis. Bývá také označována *stratum germinativum*, protože v ní probíhá dělení keratinocytů, i když ne všechny keratinocyty v této vrstvě mají potenciál se dělit. Většinou je tvořena jednou vrstvou palisádovitě uspořádaných cylindrických keratinocytů s velkými jádry a basofilní cytoplazmou. Keratinocyty jsou navzájem propojeny mezibuněčnými spojeními zprostředkovanými desmozomy. K basální membráně, která odděluje epidermis od dermis, je *stratum basale* připojena pomocí hemidesmosomů. Kromě keratinocytů jsou v této vrstvě obsaženy také melanocyty tvořící 5-10% buněčné populace *stratum basale*. Melanocyty obsahují kožní pigment melanin, který absorbuje škodlivé UV-záření a chrání tak buněčnou DNA. Množství melaninu a jeho distribuce v kůži určují barvu kůže^{3,5-8}.

Stratum spinosum se skládá z několika vrstev polyedrických buněk spojených desmozomy, které se pod mikroskopem jeví jako tzv. „trny“. S postupem k povrchu kůže, keratinocyty ztrácejí vodu, zplošťují se a cytoplazma se stává více acidofilní. Kromě keratinocytů jsou ve vrstvě obsaženy i dendritické Langerhansovy buňky, které se neúčastní procesu keratinizace ani pigmentace, ale váží a prezentují antigeny T-buňkám a jsou významnou složkou buněčné imunity^{3,5,7,8}.

Stratum granulosum je tvořena 1–5 vrstvami postupně se zplošťujících buněk ještě stále s jádry. Keratinocyty obsahují keratohyalinová granula s prekurzory keratinu. V cytoplazmě se také nachází menší lamelární tělíska (*Odland bodies*) syntetizující prekursory lipidů SC. Buňky uvolňují lipidový obsah granul exocytózou do mezibuněčného prostoru, kde jsou lipidy enzymaticky zpracovány za vzniku hydrofobnějších lipidů *stratum corneum*. Tyto tvoří mezibuněčnou lamelární lipidovou matrix a významně se podílejí na bariérové funkci epidermis a vzájemné kohezi buněk *stratum corneum*. Ve velkém množství jsou ve *stratum granulosum* obsaženy lysozomální enzymy, protože zde dochází k rozpadu buněčných organel a finální diferenciaci keratinocytů na korneocyty *stratum corneum*^{2,3,8,11}.

Stratum lucidum není přítomna v tenké epidermis. Je to tenká vrstva tvořena čtyřmi až šesti řadami extrémně plochých buněk většinou již postrádající jádro. Je považována za přechodnou zónu mezi nezrohovatělou a zrohovatělou vrstvou epidermis^{5,6}.

Poslední a nejsvrchnější vrstvou je *stratum corneum* (blíže viz kapitola 2.2).

2.2 Kožní bariéra – *Stratum corneum*

Hlavní funkcí kůže je sloužit jako fyzikální bariéra mezi tělem a okolním prostředím. Kapacita této bariéry je z velké části dána fyzickým stavem a strukturální organizací extracelulární lipidové matrix *strata cornea*¹².

Nejsvrchnější vrstva kůže – *stratum corneum* – chrání tělo před nadměrnou ztrátou vody a zabraňuje vstupu škodlivých látek, alergenů a mikrobů z prostředí. Je tvořena 15–25 vrstvami zploštělých mrtvých buněk, korneocytů a extracelulární lipidovou matrix, která vyplňuje mezibuněčné prostory^{1,13}. K zajištění dostatečné bariérové funkce, jsou lipidy v SC vysoce organizované a specializované. Lipidová matrix je tvořena převážně ceramidy (Cer), volnými mastnými kyselinami (FFA, z angl. *free fatty acids*) a cholesterolem (Chol) v přibližně ekvimolárním poměru 1:1:1 a v menším množství cholesterol-sulfátem (CholS). Zachování ekvimolárního poměru je důležité pro udržení epidermální homeostázy a změny ve složení lipidů jsou spojovány s poškozenou funkcí kožní bariéry^{1,13}.

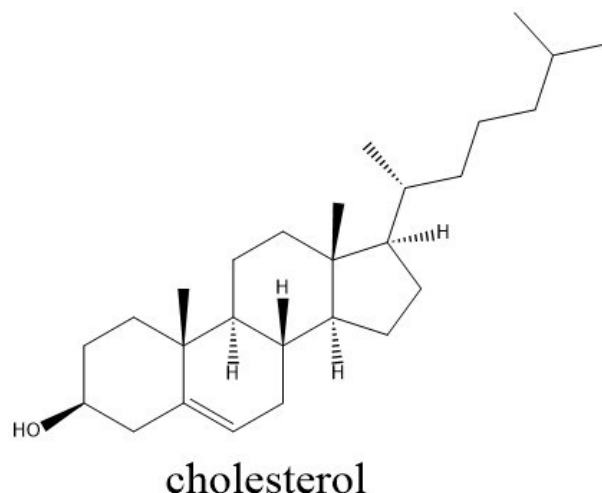
2.2.1 Volné mastné kyseliny v SC

Volné mastné kyseliny v kožní bariéře obsahují 14–34 C dlouhé, většinou nevětvené a nasycené uhlíkaté řetězce. Převažujícími mastnými kyselinami v SC jsou kyselina lignocerová (24 C) a kyselina cerotová (26 C) tvořící až 50% celkové hmotnosti FFA v SC. Obsah nenasycených a kratších mastných kyselin je nízký. Koncentrace těchto FFA se však zvyšuje u patologických stavů jako je atopická dermatitida^{1,14}.

2.2.2 Cholesterol v SC

Cholesterol a jeho deriváty jsou lipofilní steroidy s typickou rigidní strukturou se čtyřmi cykly (ABCD struktura). Cholesterol tvoří přibližně 27 % lipidů SC a přispívá ke správné lamelární a laterální struktuře a fluiditě lipidů v kožní bariéře^{1,14}. Struktura cholesterolu je uvedena na obrázku 2.

Cholesteryl-sulfát je minoritní složka SC, tvořící asi 2-5 % lipidů SC¹⁴.



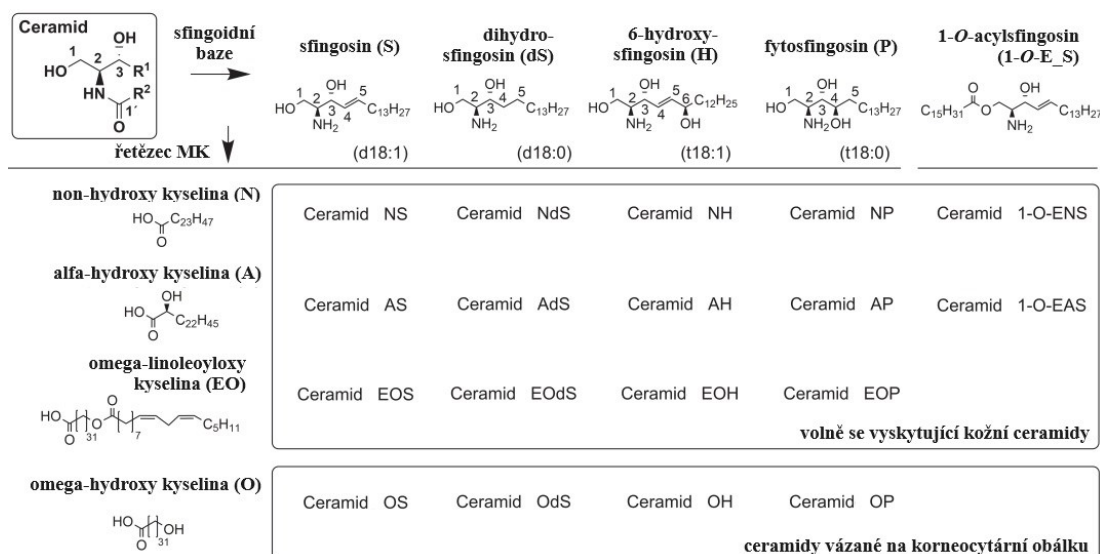
Obrázek 2: Struktura cholesterolu s typickým ABCD uspořádáním cyklů.

2.2.3 Ceramidy v SC

Převažující složkou lipidů SC jsou ceramidy tvořící přibližně 1/3 lipidových molekul ale asi 50% hmotnosti lipidové matrix SC¹⁴. Jejich prekurzory jsou primárně syntetizovány v endoplazmatickém retikulu ve *stratum spinosum*, skladovány následně v lamelárních tělíscích ve *stratum granulosum* a poté, co jsou buňkou vyloučeny, tvoří multilamelární bariéru kolem korneocytů *strata cornea*¹⁵.

Chemicky se jedná o heterogenní třídu sfingolipidů s relativně malou polární hlavičkou a dvěma hydrofobními řetězci – sfingoidní bází a N-acyl řetězcem. Sfingoidní báze (obvykle 18 C dlouhý aminoalkohol) je součástí všech ceramidů. Kožní ceramidy obsahují sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS), fytosfingosin (P) a 6-hydroxysfingosin (H) a nově i dihydroxysfinganin (T) se čtyřmi hydroxyly. Primární aminoskupina sfingoidní báze je acylována mastnou kyselinou, která je obvykle nasycená, nevětvená a dlouhá (24 C) nebo ultra-dlouhá (až 38 C). Řetězec mastné kyseliny může být dále nesubstituovaný (N), α -hydroxylovaný (A) nebo v případě ultra-dlouhých řetězců ω -hydroxylovaný (O). Tento ω -hydroxyl může být dále esterifikován linolovou kyselinou (EO). Existují i ceramidy se třemi hydrofobními řetězci, kdy je esterifikován hydroxyl v poloze 1 sfingoidní báze (1-O-E)^{1,16}.

Strukturální typy ceramidů jsou zobrazeny níže na obrázku 3.



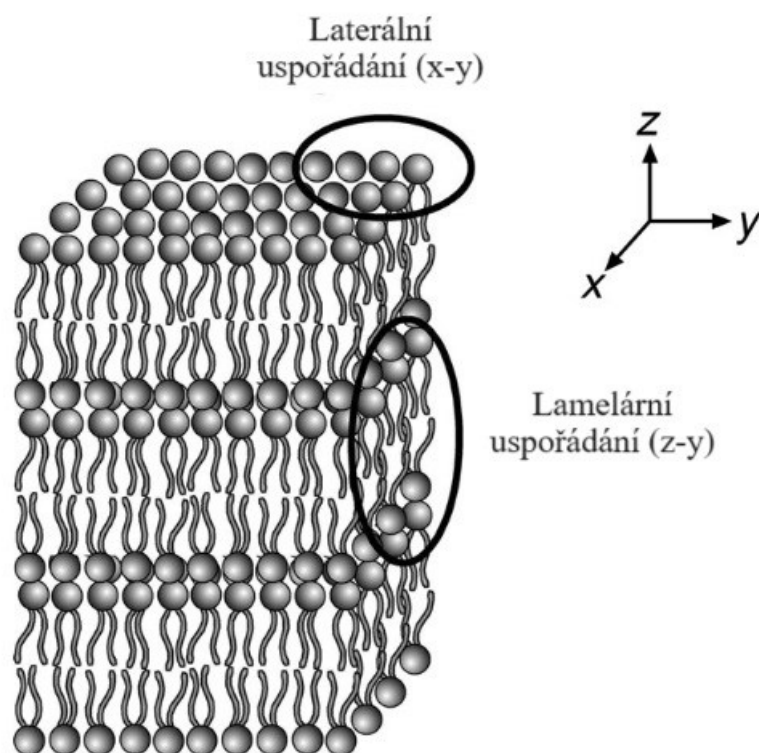
Obrázek 3: Přehled typů ceramidů kožní bariéry, jejich chemického složení a nomenklatury – převzato a upraveno z ¹.

2.2.4 Korneocytární obálka

Korneocyty jsou obklopeny kornifikovanou buněčnou obálkou (CE, z angl. *corneocyte envelope*). CE je tuhá protein/lipidová polymerní struktura nacházející se na povrchu cytoplazmatické membrány, která se skládá ze 2 částí: proteinová a lipidová obálka. Vnitřní částí je proteinová obálka tvořena bílkovinami jako např. involucrin, loricrin, a další¹⁷. Vnější lipidová obálka představuje jednu vrstvu ω -hydroxyceramidů s ultradlouhými řetězci a v malém množství také mastné kyseliny s ultradlouhými řetězci, kde jsou oba komponenty kovalentně navázány na vnější stranu proteinové obálky¹⁸.

2.3 Organizace lipidů v SC

K pozorování uspořádání lipidů v SC se nejčastěji využívají 2 metody – transmisní elektronová mikroskopie a rentgenová difraktometrie (*X-ray*)¹⁹.



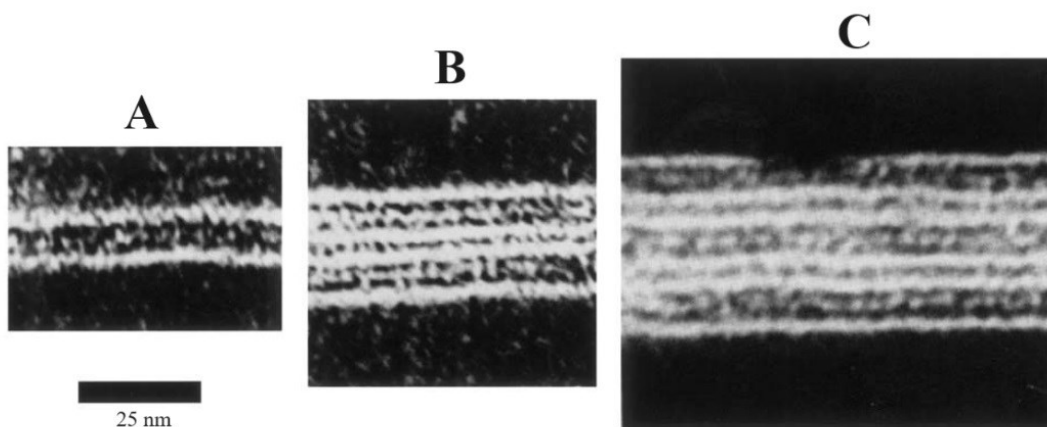
Obrázek 4: Schéma 3D struktury lipidových lamel – převzato a upraveno z²⁰.

2.3.1 Lamelární uspořádání SC

Kožní lipidy nevytváří tradiční dvojvrstvy, ale multilamelární uspořádání, kde je první lipidová vrstva kovalentně navázána na povrch korneocyty¹. Lamely jsou souběžné s povrchy korneocytů. I když řada důkazů poukazuje na existenci pravidelně se opakujících jednotek v lamelách, přesná organizace lipidů v lamele není zcela objasněna.

Několik modelů popisuje lamely jako vrstvy středově souměrných struktur s dlouhou periodicitou a opakující se délkou 11.9-13.1 nm (LPP, z angl. *long periodicity phases*)¹. Některé studie také popisují přítomnost struktur s krátkou periodicitou a opakující se délkou kolem 6 nm (SPP, z angl. *short periodicity phases*) a fázi tvořenou separovaným cholesterolem^{1,20}. Existence a struktura LPP je extrémně citlivá na složení lipidů SC, především obsahu EO ceramidů. Lamely musí obsahovat právě tu správnou frakci EO ceramidů. Pokud je jejich obsah vyšší, tvorba SPP je ztížena, je-li jejich obsah příliš nízký, omezena je tvorba LPP²⁰.

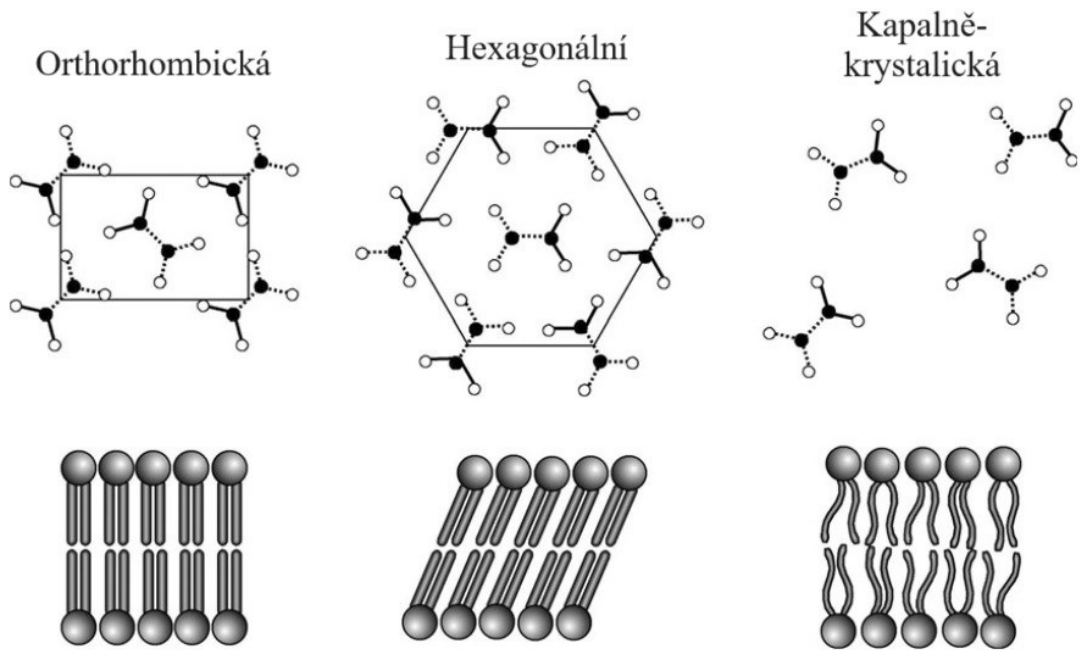
Na elektronovém mikroskopu se jeví organizace lamel do opakujících se trilamelárních jednotek v uspořádání *široký-úzký-široký* elektron-propustný pruh (tzv. *broad-narrow-broad*) s celkovou délkou 13 nm. Nejčastěji pozorované lamelární útvary obsahují 3, 6 a 9 lamel (*obr. 5*). Trilamelární vzor je patrný mezi okraji sousedních korneocytů, zatímco šesti- a devítिलamelární jsou viditelné mezi velkými povrchy sousedních buněk¹⁹.



Obrázek 5: Mezibuněčný prostor SC se zobrazením 3 (A), 6 (B) a 9 lamel metodou transmisní elektronové mikroskopie – převzato a upraveno z¹⁹.

2.3.2 Laterální uspořádání SC

Na rozdíl od fosfolipidů, zejména fosfatidylcholinů, mají ceramidy SC malé polární hlavičky a velmi dlouhé nasycené řetězce v *all-trans* uspořádání. U kožních lipidů byly popsány 3 typy laterálního uspořádání řetězců. Jedním typem je uspořádání do orthorhombické podmřížky (z angl. *sublattice*). Jedná se o těsné uspořádání s limitovaným pohybem lipidů. Dalším typem je hexagonální podmřížka s větší rotační pohyblivostí. Třetím typem uspořádání řetězců je kapalný stav, kde může být do malé míry zachováno směrové a translační uspořádání^{1,19}. Schéma jednotlivých podmřížek je zobrazeno na obrázku 6.

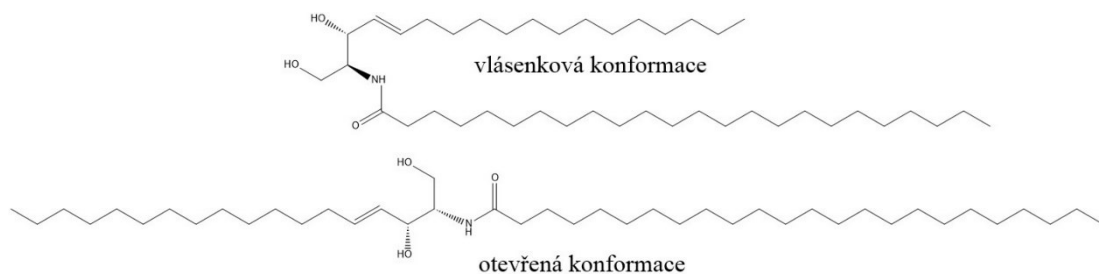


Obrázek 6: Laterální uspořádání SC lipidů – 2D podměřka (horní řada) a konformace řetězců (spodní řada) – orthorhombický, hexagonální a kapalný stav řetězců – převzato a upraveno z²⁰.

2.3.3 Molekulové konformace ceramidů

Díky přítomnosti multilamelárního uspořádání lipidů v SC, ceramidy se teoreticky mohou vyskytovat jak ve vlásečkové konformaci, kdy oba řetězce směřují stejným směrem, tak i v otevřené konformaci s řetězci směřujícími směry opačnými (obr. 7)¹.

Ačkoliv organizace extracelulární lipidové matrix je zásadní pro bariérovou funkci kůže, dosud se nepovedlo navrhnout dostatečně dobrý model SC. To může být způsobeno i rozmanitostí složek SC, které spolu mohou různými způsoby interagovat²⁰.



Obrázek 7: Molekulární konformace ceramidu – vlásečková a otevřená konformace.

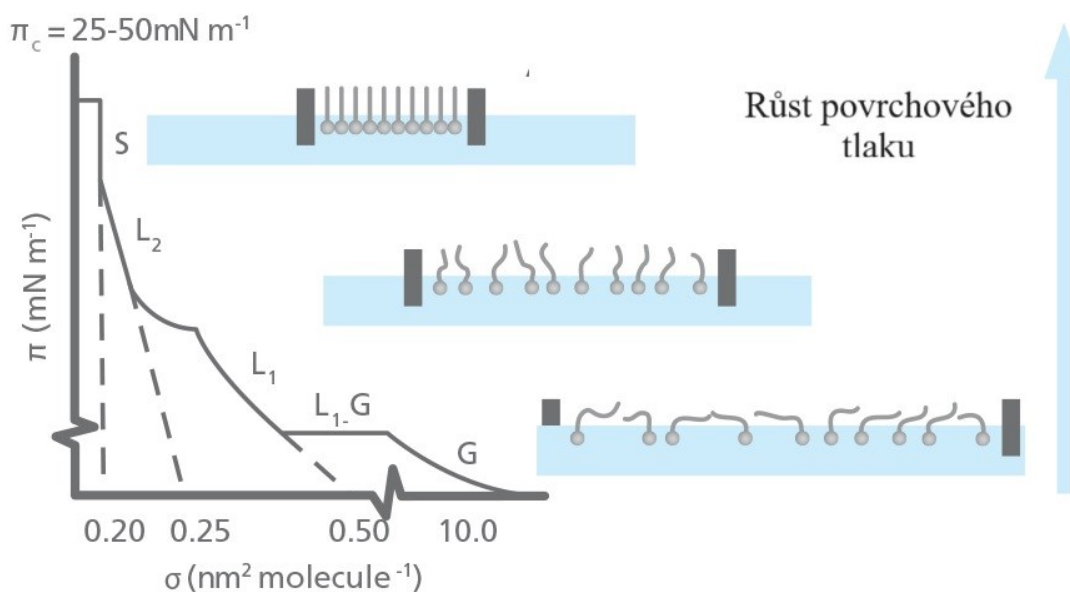
2.4 Poznámky k použitým metodám

2.4.1 Langmuir-Blodgettovy (LB) monovrstvy

2.4.1.1 Struktura a vlastnosti plovoucích monovrstev

Látky schopné vytvářet monovrstvy jsou molekuly amfifilní povahy. Jejich hydrofobní část musí být dostatečně objemná, aby zajistila molekule nerozpustnost ve vodě, zatímco hydrofilní část musí zajistit přichycení molekuly k vodnímu povrchu²¹.

Základním experimentálním výstupem při tvorbě monovrstev je izoterma závislosti povrchového tlaku (SP, z angl. *surface pressure*) na ploše na molekulu (Mma, z angl. *mean molecular area*), tzv. Π -A izoterma. Plocha na molekulu je průměrná plocha, kterou zabírá 1 molekula amfifilu v určitém okamžiku stlačení monovrstvy. Jednotkou je nm^2 nebo \AA^2 (Ångström čtvereční, $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$) na molekulu. Ze tvaru izotermy je možné rozpoznat skupenské fáze monovrstvy – plynnou (G), kapalnou (L) a tzv. pevnou fázi (S). Tyto fáze znázorněné v průběhu izotermy jsou zobrazeny na obrázku 8. Je zřejmé, že čím více jsou si molekuly navzájem blíže, tím vyšší je povrchový tlak. Logicky i kompresibilita monovrstvy klesá od plynné po pevnou fázi²¹.



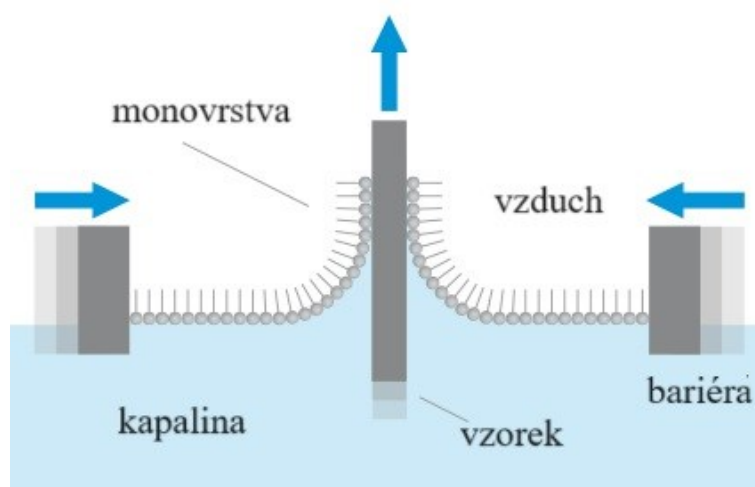
Obrázek 8: Π -A izoterma s vyznačenými fázemi a schéma rozprostření molekul monovrstvy v jednotlivých fázích – převzato a upraveno z ²².

Povrchové napětí vyjadřuje míru kohezivních sil mezi molekulami na fázovém rozhraní²³. Při rozprostření amfifilu na povrch kapaliny dojde k interakci molekul amfifilu s molekulami subfáze a povrchové napětí se sníží. Při stlačování monovrstvy se molekuly dostanou blíže k sobě a převáží odpudivé síly²⁴. Povrchové napětí je měřeno nepřímo pomocí vertikálního tahu na zavěšený Wilhelmyho plátek, který je zčásti vnořený do subfáze²¹.

V praxi se při měření LB vrstev využívá povrchový tlak (SP). Povrchový tlak vyjadřuje rozdíl mezi povrchovým napětím čisté subfáze a povrchovým napětím povrchu s rozprostřeným filmem²¹.

2.4.1.2 Depozice LB monovrstev

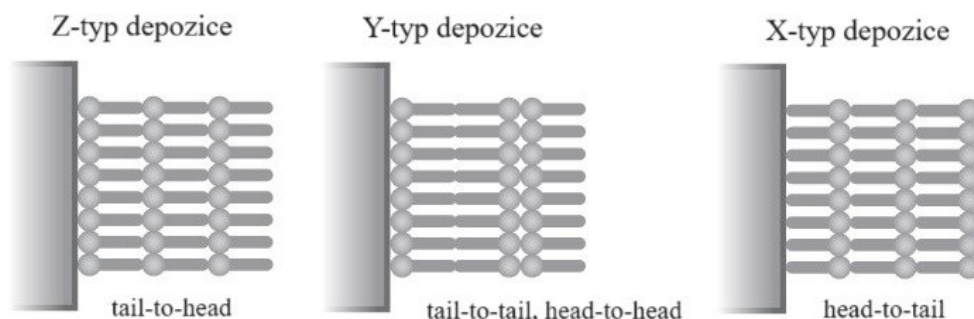
K depozici LB filmů se využívají pevné substráty, které jsou vertikálně taženy skrz rozprostřenou monovrstvu za udržování stálého povrchového tlaku (*obr. 9*). Stálý povrchový tlak zajišťuje udržení filmu v tzv. pevné fázi, při které dochází k depozici. Hodnota povrchového tlaku se většinou volí mezi 20-40 mN/m^{21,23}.



Obrázek 9: Schéma depozice LB filmu na substrát pohybem substrátu nahoru – převzato a upraveno z²².

Ukazatelem kvality přenosu je tzv. transfer ratio (TR). TR určuje poměr mezi poklesem plochy monovrstvy na subfázi během depozičního tahu a plochou substrátu, která byla vytažena ze subfáze. V ideálním případě se rovná 1²³. Pokud by byla hodnota TR blízko nule, lze uvažovat, že se vrstva nenesla, pokud by byla hodnota TR záporná, došlo k odloupení předchozí nanesené vrstvy.

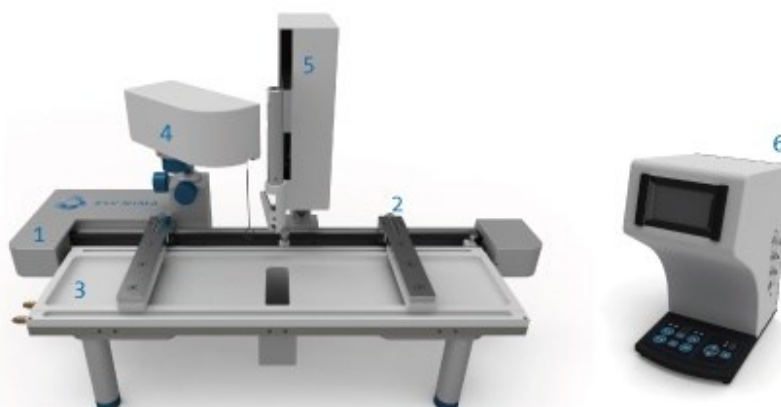
Po depozici první vrstvy, další zanoření/vynoření vede k depozici další vrstvy. Při nanesení více vrstev lze rozlišit 3 typy depozice – X, Y a Z, znázorněné na obrázku 10. Nejčastějším typem je Y-typ depozice (*head-to-head, tail-to-tail*)²¹.



Obrázek 10: Typy depozice LB filmů – převzato a upraveno z²².

2.4.1.3 Langmuirova vanička

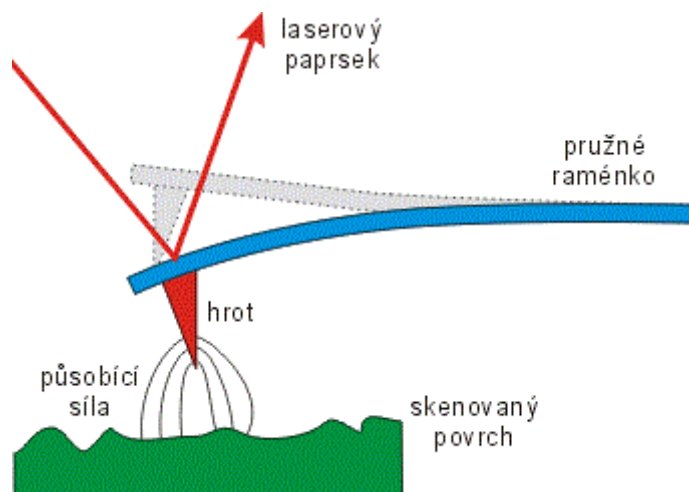
V laboratorních podmínkách je s monovrstvami manipulováno na tzv. Langmuirově vaničce. Skládá se z mělké vaničky z polytetrafluorethylenu (PTFE) s hydrofobními okraji, hydrofilních bariér z Delrinu a z elektronického zařízení měřícího povrchové napětí. Vanička je přeplněna vodou/subfází a bariéry jsou na obou stranách vaničky, kde limitují plochu rozptřeni monovrstvy na hladině subfáze. Monovrstva je rozptřena nanesením určitého objemu roztoku známé koncentrace amfifilu v těkavém rozpouštědle. Po vyprchání rozpouštědla je monovrstva stlačena přiblížením bariér k sobě²¹.



Obrázek 11: Komponenty Langmuirové vaničky – strukturní kostra (1), bariéry (2), vanička (3), detektor povrchového napětí (4), dipper k vynořování/zanořování substrátu (5), mezioperační jednotka (6) – převzato a upraveno z²².

2.4.2 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM, z angl. *atomic force microscopy*) je mikroskopická metoda používána k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Obraz povrchu se sestavuje postupně bod po bodu. Technika je založena na snímání polohy malého hrotu, který vykonává pohyb po povrchu vzorku v rastru, tento pohyb je detekován pomocí laserového paprsku^{25,26}.



Obrázek 12: Zjednodušené schéma principu AFM. Zařízení skenuje povrch pomocí hrotu na pružném raménku. Na hrot působí elektrostatické a van der Waalovy síly povrchu. Výkyvy raménka jsou sledovány laserovým paprskem. Převzato z²⁷.

K měření povrchu se využívají dva základní módy: kontaktní a semikontaktní (tappingový) mód. Během kontaktním módem je výchylka hrotu udržována na konstantní hodnotě a povrch je kopírován pomocí zpětné vazby, nebo vzdálenost od povrchu je konstantní a informace o povrchu jsou získávány přímo ze změny výchylky hrotu. V semikontaktním módem je hrot dostatečně blízko k povrchu vzorku, až v oblasti odpuzivých sil, a osciluje působením harmonické síly^{25,26}.

2.4.3 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je vibrační spektroskopická technika, při níž je vzorek ozařován intenzivním monochromatickým zdrojem světla, obvykle laserem, a detekováno je rozptýlené záření. Většina záření je rozptýlena vzorkem při vlnové délce shodné s dopadajícím světlem – jedná se o elastický rozptyl světla (Rayleighův rozptyl). Malé množství rozptýleného záření má vlnovou délku změněnou ve srovnání

s vlnovou délkou dopadajícího záření – tento posun je znám jako Ramanův rozptyl nebo neelastický rozptyl světla. Rozdíly mezi vlnovými délkami excitačního a rozptýleného záření, Ramanovy posuny, jsou závislé na molekulových vibracích uvnitř vzorku²⁸.

Ramanova spektroskopie je komplementární metodou k infračervené spektroskopii (IR), i když její citlivost je v porovnání s IR nižší. Je vhodná pro sledování nepolárních vazeb a umožňuje pozorovat vibrace i na nižších vlnočtech²⁹.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

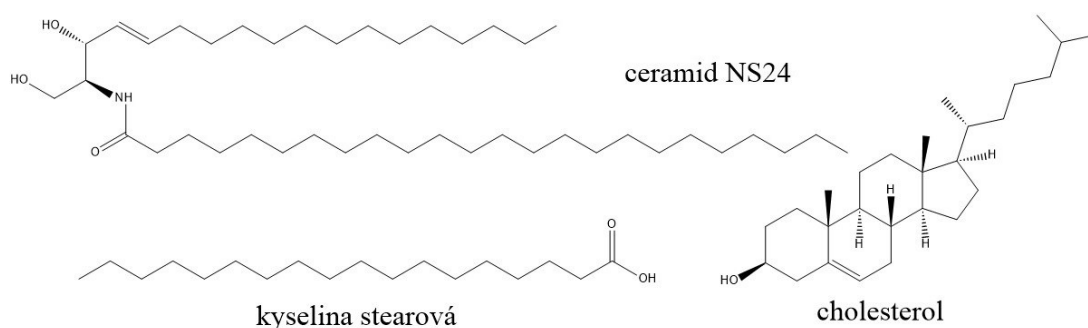
3.1 Použité materiály a chemikálie

Ceramid NS24 byl zakoupený od firmy Avanti Polar Lipids, Inc. Cholesterol, kyselina palmitová, kyselina behenová, kyselina stearová, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a organická rozpouštědla (chloroform, methanol) v HPLC kvalitě od firmy Sigma Aldrich. Kyselina arachidonová byla zakoupena od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. a kyselina lignocerová od firmy Tokyo Chemical Industry Co., Inc.

Pro přípravu acetátového pufru byl použit octan sodný krystalický čistý od firmy LACHEMA o.p. BRNO a kyselina octová 99% p.a. od firmy PENTA chemicals unlimited.

3.2 Příprava směsi kožních lipidů

Směs lipidů, která sloužila jako jednoduchý model lipidů SC, obsahovala ceramid NS24, cholesterol (Chol) a směs mastných kyselin (MK) v molárním poměru 1:0,45:1 (obr. 13).



Obrázek 13: Struktury komponent směsi lipidů – ceramid NS24, cholesterol a zástupce skupiny mastných kyselin – kyselina stearová.

Přesné navážky (tab. 1) byly zvláště použity na přípravu roztoků o objemu 1 ml nebo 2 ml. Rozpouštědlo byla směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Pro přípravu směsi o daném molovém poměru byly použity alikvotní objemy dle tabulky 1. Rozpouštědlo ve vzorku bylo následně odpařeno pod proudem plynného dusíku a vzorek byl dosušen v exsikátoru. Průměrná molární hmotnost směsi byla 477,43 g/mol.

Tabulka 1: Přesné navážky a alikvotní objemy při přípravě směsi kožních lipidů.

| | Molární hmotnost [g/mol] | Vypočtená navážka na 10 mg směsi [mg] | Přesná navážka [mg] | Alikvotní objemy [μl] |
|-------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Ceramid NS | 650,13 | 5,56 | 5,97 | 1863 |
| Cholesterol | 386,65 | 1,49 | 2,49 | 598 |
| Směs MK | 345,57 | 2,95 | 3,53 | 836 |

Příprava směsi kožních lipidů byla v pozdějších experimentech provedena i se směsí deuterovaných mastných kyselin. Postup byl shodný, molární poměr byl opět 1:0,45:1. Vypočtené i přesné navážky a alikvotní objemy jsou uvedené v tabulce 2. Průměrná molární hmotnost směsi byla 495,21 g/mol.

Tabulka 2: Přesné navážky a alikvotní objemy při přípravě směsi kožních lipidů s deuterovanými MK.

| | Molární hmotnost [g/mol] | Vypočtená navážka na 10 mg směsi [mg] | Přesná navážka [mg] | Alikvotní objemy [μl] |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Ceramid NS | 650,13 | 5,36 | 6,56 | 1634 |
| Cholesterol | 386,65 | 1,43 | 2,06 | 694 |
| Směs deuterovaných MK | 389,15 | 3,21 | 3,41 | 941 |

3.3 Příprava acetátového pufru

Byl připraven 10 mM acetátový pufr o pH 5,50. Na přípravu 2l pufru bylo použito 2,286 g octanu sodného ($M = 136,08$ g/mol) a 160 μl kyseliny octové ($M = 60,05$ g/mol). Výsledné pH bylo změřeno pH-metrem. Při některých experimentech bylo k 2l pufru přidáno 0,077 g EDTA za účelem předpokládané zvýšení stability nanášených vrstev.

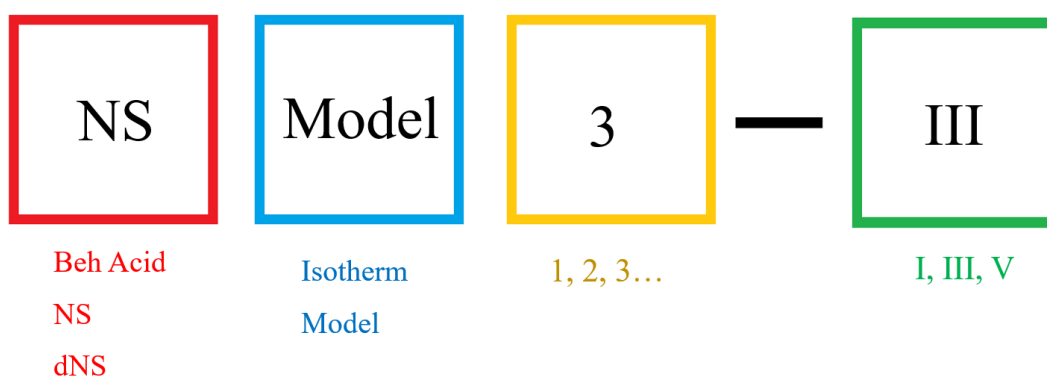
3.4 Označování vzorků

Vzorky byly označovány podle schématu znázorněném na obrázku 14.

První v názvu (červený čtverec) je uvedena nanášená směs, tedy kyselina behenová (Beh Acid), směs kožních lipidů (NS) anebo směs kožních lipidů s deuterovanými MK (dNS). Následuje typ experimentu (modrý čtverec), kde se jednalo buď o měření

izotermu (Isotherm), nebo depozici vzorku na substrát (Model). Číslo před pomlčkou (žlutý čtverec) udává pořadové číslo experimentu, které bylo v průběhu experimentů vzorkům chronologicky přiděleno. Poslední údaj uvedený římskou číslicí (zelený čtverec) udává počet nanášených vrstev při depozici.

Příkladem „NS Model 3-III“ označuje vzorek směsi kožních lipidů, kde došlo k depozici 3 vrstev vzorku na substrát.



Obrázek 14: Schéma tvorby názvů při označování vzorků – uvedena je nanášená směs (červeně), typ experimentu (modře), pořadové číslo experimentu (žlutě) a počet nanášených vrstev (zeleně).

3.5 Langmuir – Blodgettova metoda

3.5.1 Příprava vzorků

Z připravené směsi kožních lipidů bylo na analytických vahách přesně naváženo množství 1 mg a rozpuštěno v 1 ml směsi CHCl_3 :MeOH (2:1). Tento roztok byl uchováván v lednici při 2-8°C.

3.5.2 Měření izotermu kyseliny behenové

Měření sloužilo k seznámení se s metodou a ověření jejího zvládnutí. Byl použit roztok kyseliny behenové v CHCl_3 :MeOH (2:1) o koncentraci 1 mg/ml. Jako subfáze byla použita ultračistá voda Milli-Q, která byla před každým experimentem odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 1 hod.

K měření izotermu byla použita Langmuir-Blodgettova vanička (KSV NIMA KN2002, Biolin Scientific AB, Västra Frölunda, Švédsko) připojena přes kontrolní stanici k počítači se softwarem KSV NIMA. K měření povrchového tlaku byl využit

platinový plíšek (Wilhelmy plate), který byl umístěn v blízkosti dipperu, paralelně s bariérami. Objem subfáze byl 210 ml. Termostat udržoval teplotu na $22 \pm 0,1$ °C. Bariéry byly umístěny tak, aby plocha povrchu byla 23 850 mm².

Hladina subfáze byla před měřením vyčištěna pomocí odsávacího zařízení a ověření čistoty proběhlo co největším přiblížením bariér k sobě a zkontrolováním, zda hodnota povrchového napětí nevzrostla nad 0,09 mN/m. Nanášelo se 40 µl vzorku pomocí mikrostříkačky Hamilton a to rovnoměrně a po kapkách a následně se nechalo rozpouštědlo odpařovat (20 minut). Pomocí programu ISO softwaru KSV NIMA byla změřena izoterma. Měření probíhalo až do dosažení cílové hodnoty povrchového napětí 60 mN/m.

3.5.3 Depozice kyseliny behenové na substrát

Měření sloužilo k seznámení se s metodou a ověření jejího zvládnutí. Byl použit roztok kyseliny behenové v CHCl₃:MeOH (2:1) o koncentraci 1 mg/ml. Jako subfáze byla použita ultračistá voda Milli-Q.

Přístroj byl připraven a roztok lipidu byl rozprostřen na subfázi stejným způsobem jako při měření izotermy. Rozdíl byl v ponoření čerstvě sloupnuté čtvercové vrstvy slídy (MICA) do subfáze do hloubky přibližně 5 mm ještě před procesem nanášení vzorku. Ve zvoleném programu DIP softwaru KSV NIMA byla zvolena cílová hodnota povrchového napětí 30 mN/m. Po kompresi monovrstvy na požadovanou hodnotu povrchového tlaku se vrstva nechala ustálit po dobu 15 minut. Následovala depozice vzorku na substrát MICA za současného přiblížení bariér tak, aby udržovali povrchové napětí na cílové hodnotě. Po vynoření substrátu se nechal vzorek 10 minut oschnout a byl umístěn do čisté vialky pod ochrannou atmosféru plynného dusíku.

Rychlost vynořování substrátu při nanesení první vrstvy byla 0,5 mm/min na substrát. U vícevrstvých depozic byla rychlost depozice následujících vrstev také 0,5 mm/min.

3.5.4 Depozice směsi kožních lipidů

Proces depozice je popsán v kapitole 3.5.3. Byl použit vzorek o koncentraci 1 mg/ml. Jako subfáze byl použit acetátový pufr o pH 5,50. Pufr byl před každým experimentem odplyněn v ultrazvukové lázni.

Byly připraveny jedno-, tří- a pětivrstvé filmy.

Rychlost vyořování substrátu při nanesení první vrstvy byla 0,5 mm/min na substrát. U vícevrstevných depozic byla rychlost depozice následujících vrstev také 0,5 mm/min nebo byla zvýšena na 1,5 mm/min (bude specifikováno u jednotlivých případů v sekci Výsledky).

3.6 Měření vzorků pomocí AFM

Měření AFM probíhalo na Chemicko-technologické fakultě Univerzity Pardubice v Centru materiálů a nanotechnologií. K měření lipidových vrstev byl použit přístroj AFM NTEGRA (NT-MDT) a hrot HA_HR (ScanSens) nebo NSG10 (APPNANO). Topografické skeny a výškové profily byly stanoveny pomocí příslušného softwaru dodaného výrobcem.

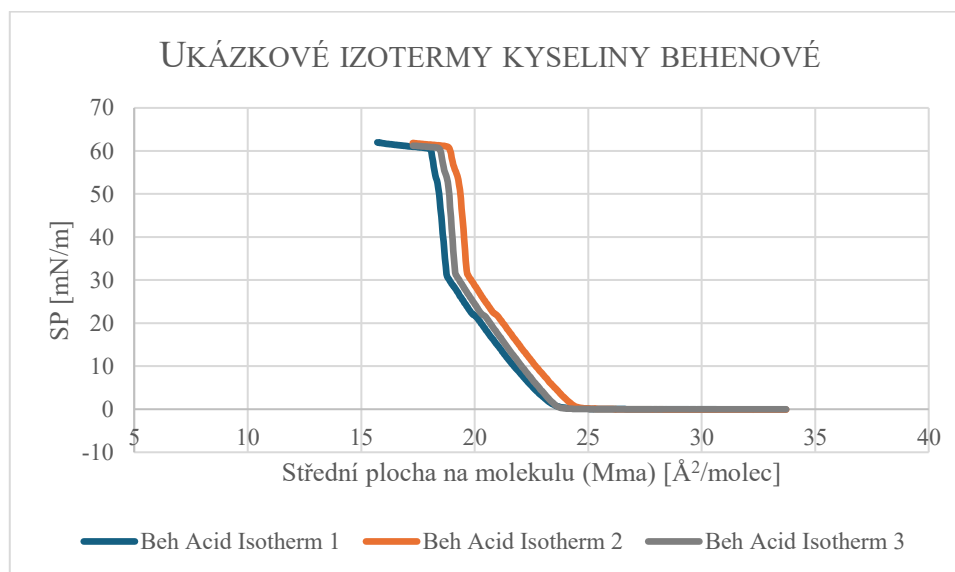
3.7 Měření vzorků pomocí Ramanova mikrospektrometru

Měření probíhalo za využití konfokálního Ramanova mikrospektrometru WITec Alpha 300R (WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Ulm, Germany) s vlnovou délkou excitačního záření diodového laseru 633 nm za pokojové teploty. Ke sběru dat byl použit spektrograf UHTS 300 vybavený termoelektricky chlazeným CCD detektorem s objektivy EC “Epiplan” DIC s 10× zvětšením a EX “Epiplan-Neofluar” DIC se 100× zvětšením a difrakční mřížkou s dělením 600 linek/mm. Data byla vyhodnocena za využití softwaru WITec Project FIVE+.

3.8 Výsledky

3.8.1 Měření izotermy kyseliny behenové

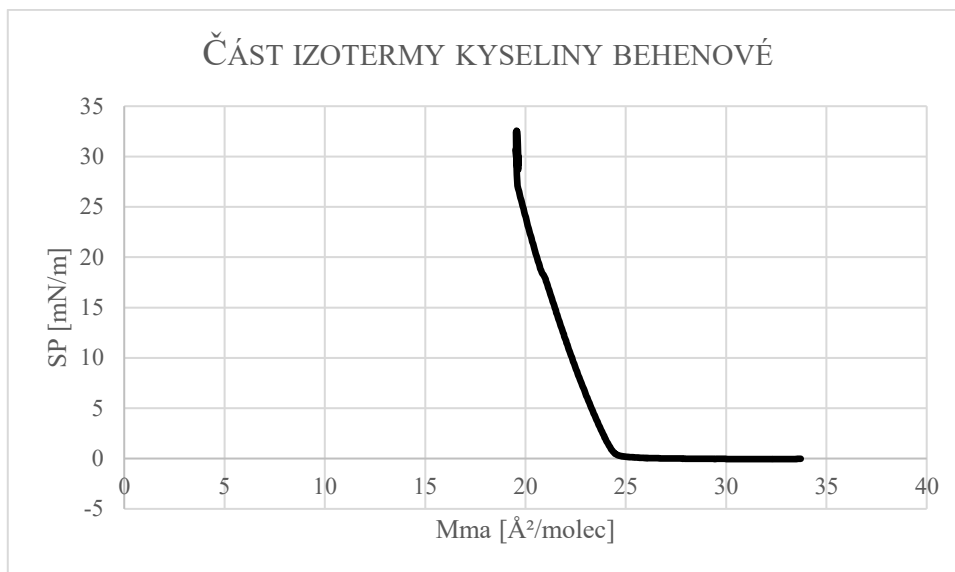
Byly provedeny tři měření, ve kterých všechny naměřené izotermy měly podobný průběh. Průběh izotermy kyseliny behenové je známý a tato měření sloužila k ověření správnosti a reprodukovatelnosti techniky práce s přístrojem.



Graf 1: Izotermy kyseliny behenové – závislost povrchového tlaku (SP) na střední ploše na molekulu (Mma).

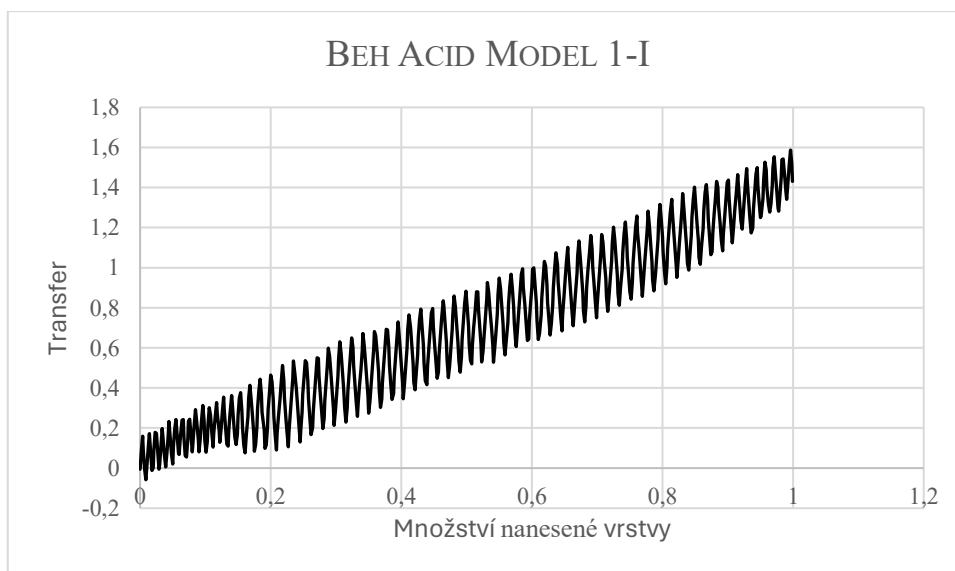
3.8.2 Depozice kyseliny behenové na substrát

Před vlastní depozicí došlo ke kompresi naneseného vzorku až k dosažení hodnoty 30 mN/m a byla změřena část izotermy. Ukázka průběhu izotermy je na grafu 2.



Graf 2: Ukázka izotermy vzorku „Beh Acid Model 2-I“ změřená před depozicí na substrát.

Byly připraveny 2 vzorky s nanesením jedné vrstvy označené „Beh Acid Model 1-I“ a „Beh Acid Model 2-I“. Při nanášení byl udržován povrchový tlak 30 mN/m. Transfer obou vzorků byl úspěšný s výslednými hodnotami TR 1,430 a 1,382 (graf 3).



Graf 3: Závislost transferu na množství nanesené vrstvy vzorku "Beh Acid Model 1-I" ukazující kvalitu přenosu

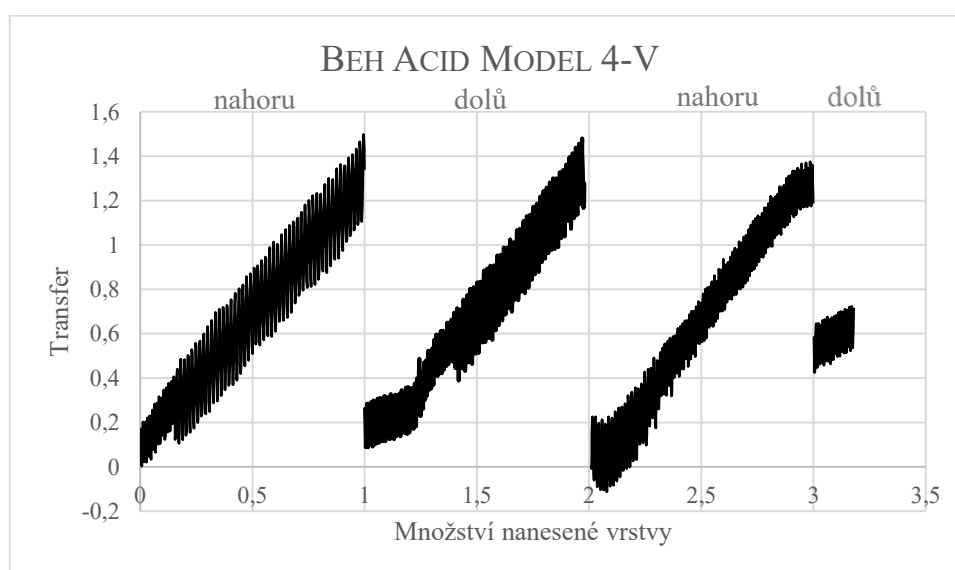
Dále byl připraven vzorek „Beh Acid Model 3-III“. Byly nanесeny 3 vrstvy, substrát byl nejdříve vynořen a po 15 minutách čekání v horní poloze opět zanořen a vynořen. Chybou softwaru nebyla uložena všechna data, ale z tabulky (tab. 3) vyplývá, že

hodnoty jednotlivých TR dosahovaly hodnot přes 1 a transfer lze považovat za úspěšný. Pokud dochází k transferu vrstvy na substrát při pohybu nahoru i dolů, vzniká vícevrstvý film typu Y („*head-to-head, tail-to-tail*“). Tento typ uspořádání připomíná lipidové dvojvrstvy.

Tabulka 3: Záznam transferu vzorku "Beh Acid Model 3-III".

| Vrstva č. | Směr pohybu substrátu | Celková TR přenosu |
|-----------|-----------------------|--------------------|
| 1 | nahoru | 1,274 |
| 2 | dolů | 1,105 |
| 3 | nahoru | 1,239 |

Byla snaha nanést i 5 vrstev kyseliny behenové na substrát, ale, jak je vidět z grafu 4, software spadl ve čtvrté vrstvě, kterou zanechal nedokončenou. Mechanické nanesení zbylých vrstev nebylo možné, protože nebyl po chybě softwaru udržován povrchový tlak na požadované hodnotě 30mN/m. Transfer prvních tří vrstev proběhl však úspěšně.



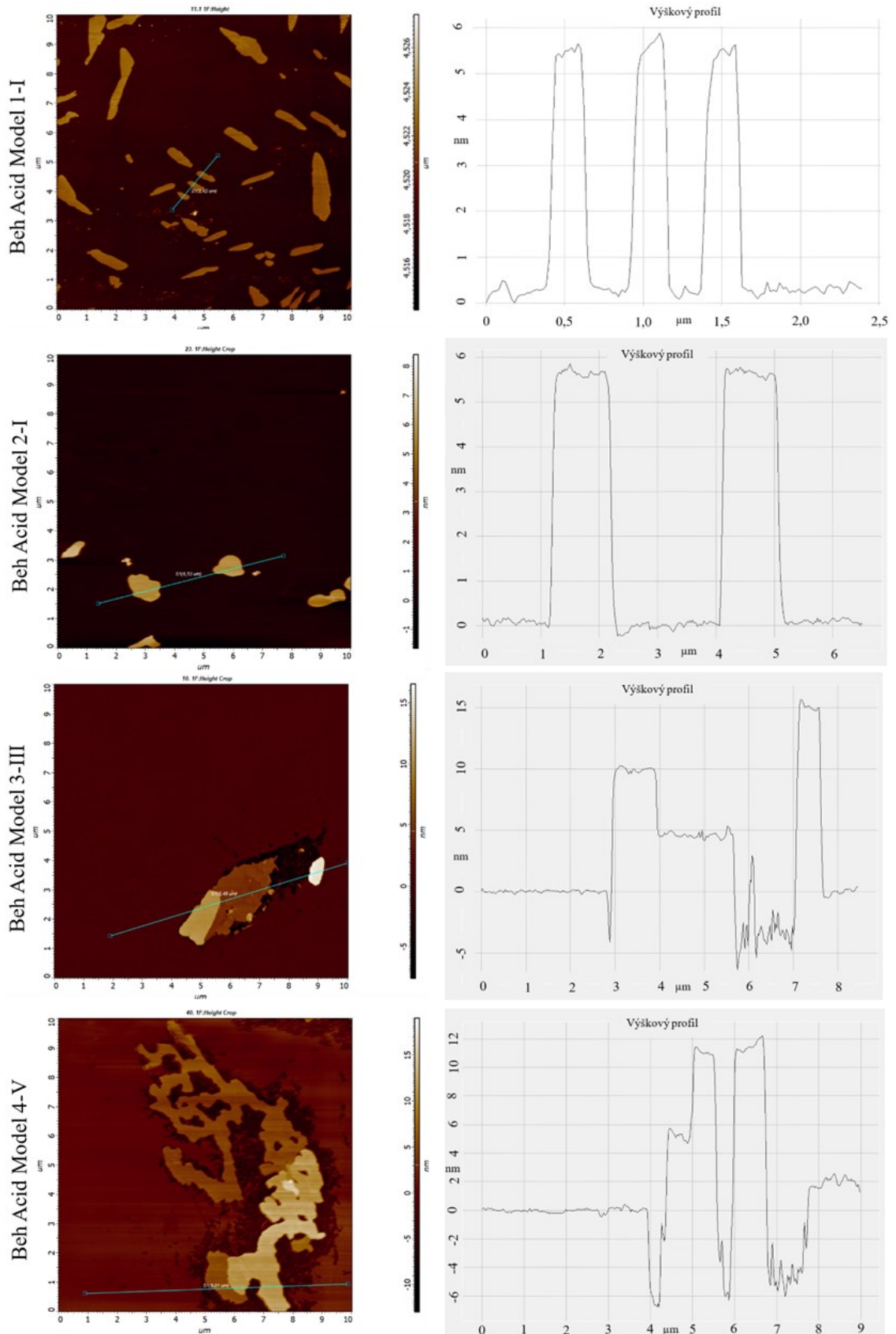
Graf 4: Závislost transferu na množství nanesené vrstvy vzorku "Beh Acid Model 4-V", v horní části je uveden směr pohybu dipperu při nanášení dané vrstvy.

Všechny čtyři vzorky byly měřeny pomocí AFM s časovým odstupem přibližně 1,5 měsíce od depozice.

Na obrázku (obr. 15) jsou vidět AFM snímky nanesených vrstev. Je zřejmé, že lipidy nevytvořily souvislou vrstvu, ale došlo k jejich shlukování. U preparátů s jednou

nanesenou vrstvou je možné vidět 2 úrovně výšky, u vícevrstvých preparátů je těchto úrovní několik. Záznam výškového profilu potvrzuje, že výškové rozdíly vzorku jsou větší než délka plně natažené molekuly kyseliny behenové C22, která je přibližně 2,8 nm³⁰.

Byla stanovena hypotéza, že shlukování je způsobeno stárnutím vzorku v důsledku delší časové prodlevy mezi depozicí a měřením.



Obrázek 15: AFM snímky a výškový profil měřených vzorků kyseliny behenové.

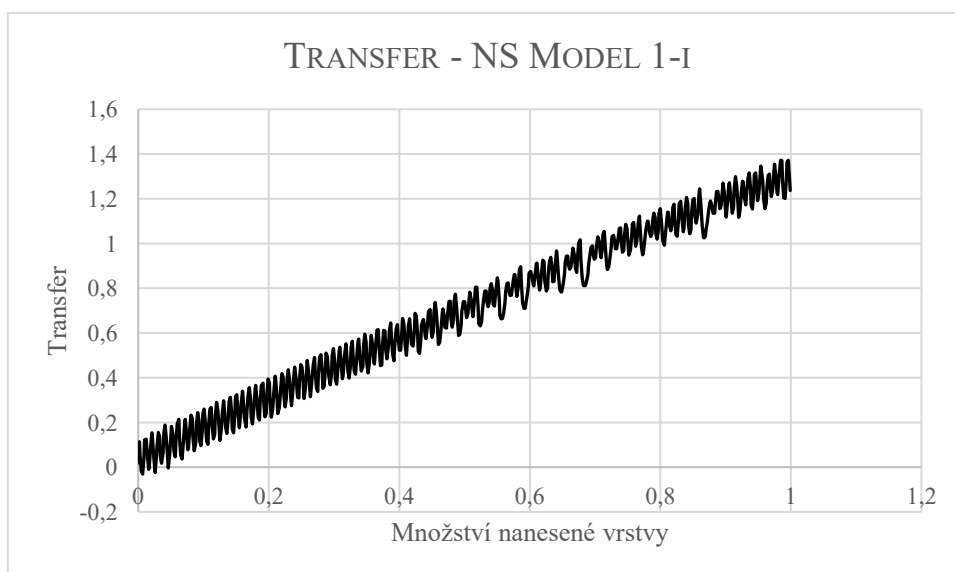
3.8.3 Depozice vzorku směsi kožních lipidů na substrát

Postup depozice probíhal stejně jako u kyseliny behenové. Bylo připraveno celkem 6 vzorků – 2 vzorky s jednou, 2 vzorky se třemi a 2 vzorky s pěti vrstvami. Všechny vzorky byly následně měřeny pomocí AFM v krátkém časovém intervalu 4-7 dní od depozice. Izotermy SP – Mma pro tuto směs byly již v minulosti měřené a publikované^{13,31}. Na grafu 5 je znázorněna izoterma vzorku NS Model 2-I naměřená před transferem na substrát.



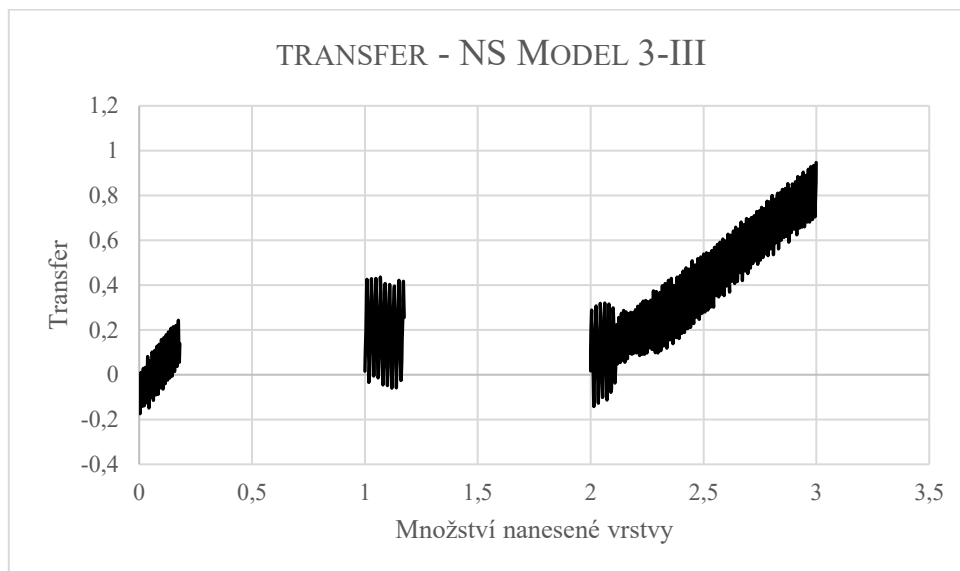
Graf 5: Ukázka izotermy naměřené před depozicí směsi na substrát – NS Model 2-I.

Depozice NS Model 1-I a 2-I proběhla úspěšně s TR 1,238 (1-I) a 1,319 (2-I).



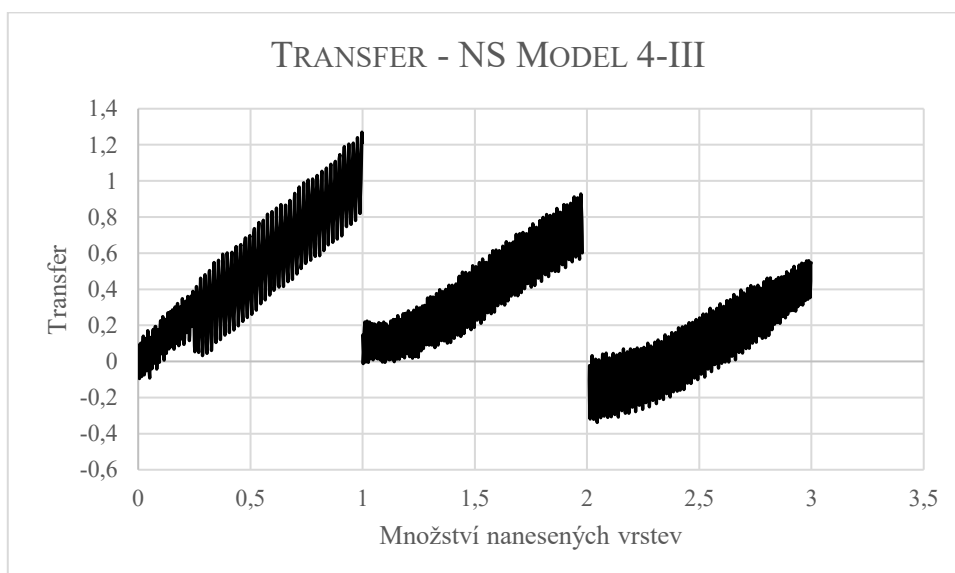
Graf 6: Závislost transferu na množství nanesené vrstvy – NS Model 1-I.

Při nanášení vzorku NS Model 3-III se objevily technické potíže a depozice se zastavila v průběhu nanášení jednotlivých vrstev. Každá vrstva byla tedy nanášena zvlášť a nebyla uložena veškerá data, jak je vidět z grafu 7.



Graf 7: Závislost transferu na množství nanášených vrstev – NS Model 3-III – technické potíže.

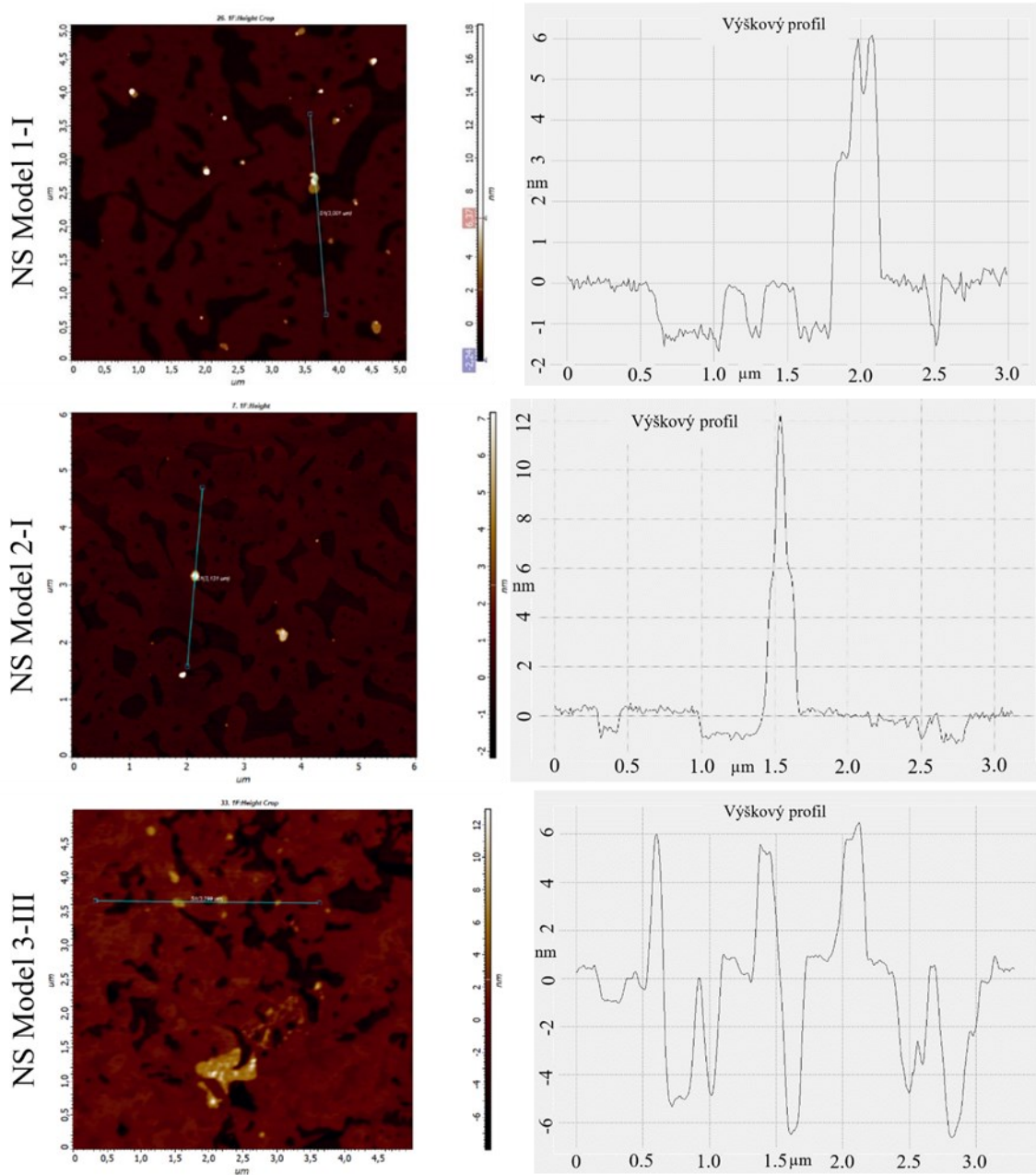
Drobné technické potíže se objevily i při nanášení NS Model 4-III, ale data byla zaznamenána. Z grafu 8 je patrné, že transfery následných vrstev již nebyly tak vysoké jako u předchozích vzorků, ale jejich hodnoty byly stále pozitivní, vyšší než 0,5 a transfer lze považovat za úspěšný.



Graf 8: Závislost transferu na množství nanášených vrstev – NS Model 4-III.

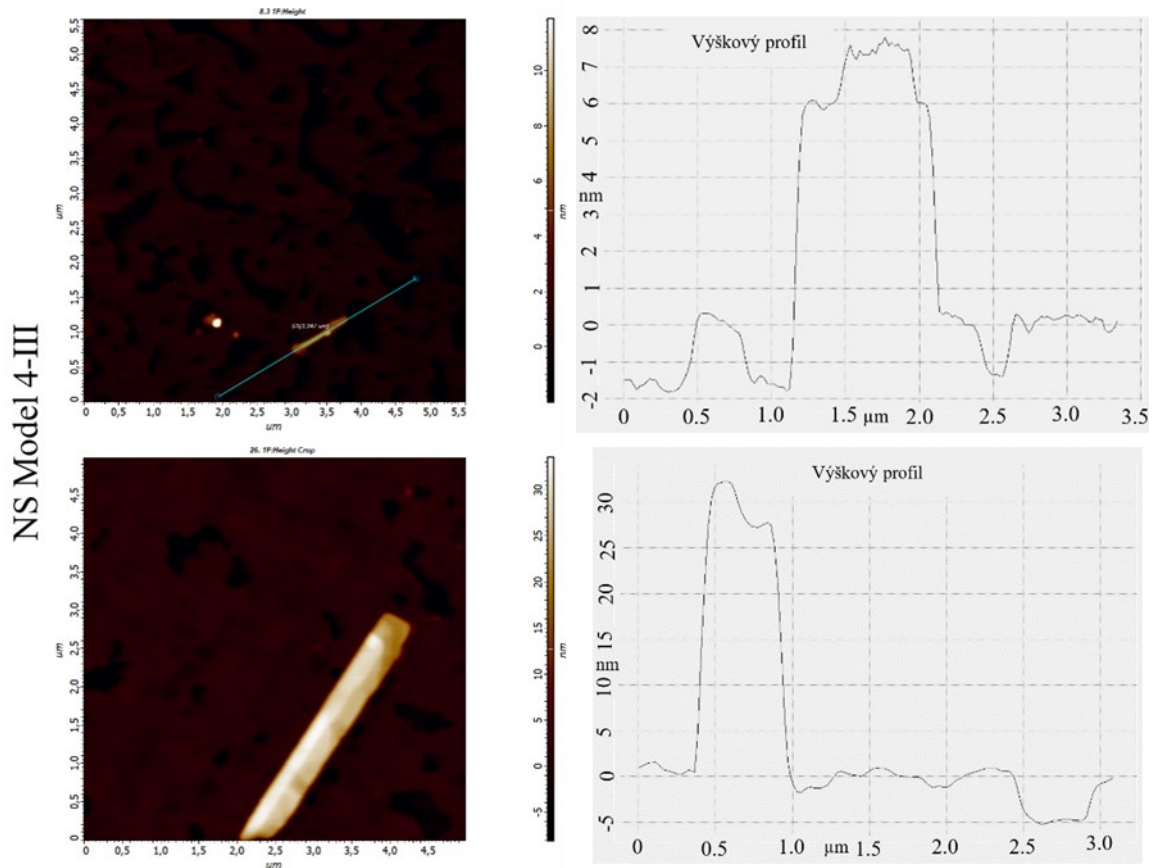
AFM snímky a záznam výškového profilu jsou vidět níže (*obr. 16, 17*). Již u vzorků s jednou vrstvou jsou viditelné vyšší výškové rozdíly dosahující až 12 nm (vzorek 2-I). Nejdelší složkou připravované směsi kožních lipidů byl obsažený ceramid, jehož délka v plně natažené konformaci je odhadována na cca 5 nm, což je přibližný součet délek řetězců 24 C a 18 C (stanoveno po osobní konzultaci s Mgr. Petrou Pullmannovou, Ph.D.). Měřené rozdíly jsou však větší, u některých vzorků je vidět několik úrovní.

Vzorky, kde byly nanášeny tři po sobě následující vrstvy, vykazují ve výškovém profilu také několik úrovní. U vícevrstevných vzorků to lze předpokládat, avšak pokrytí plochy vyššími doménami je nerovnoměrné.



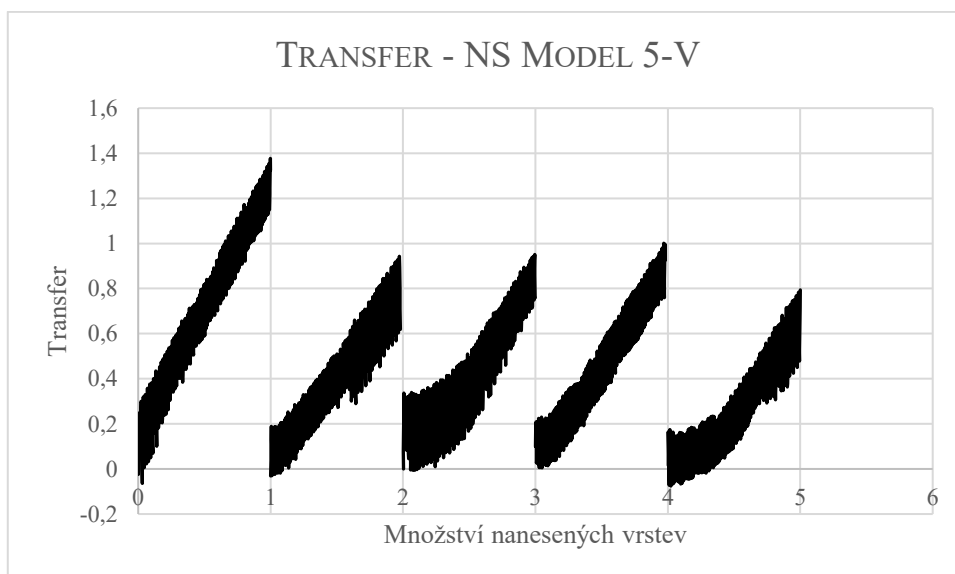
Obrázek 16: AFM snímky vzorků NS Model 1-3.

U vzorku NS Model 4-III jsou na AFM snímku viditelné menší „hromádky“ (z angl. *mounds*), které při měření výškového profilu dosahovaly až 8 nm. Ve vzorku NS Model 4-III byl při měření také vidět hranolovitý krystal s výškou kolem 30 nm.



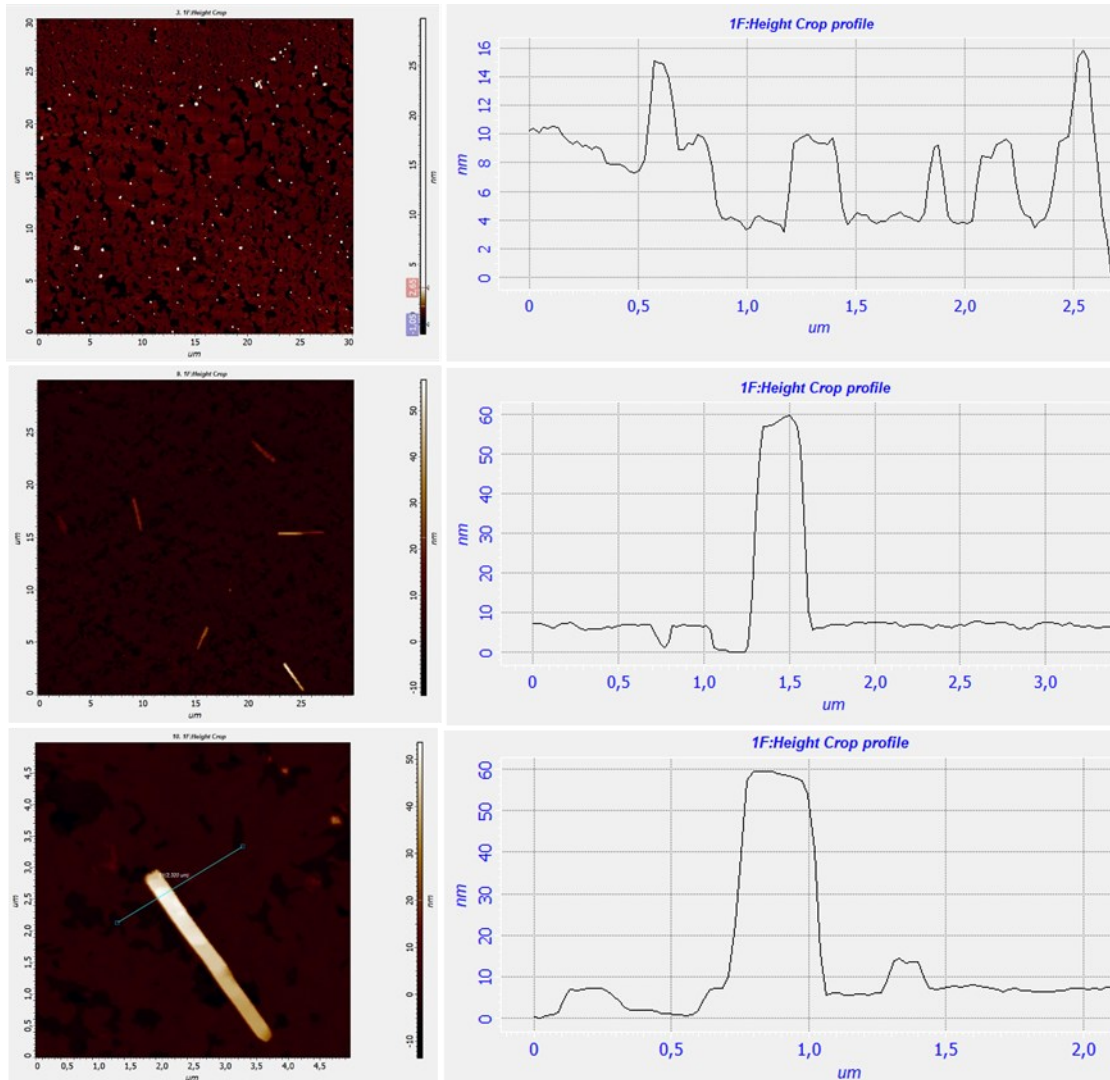
Obrázek 17: AFM snímky – NS Model 4-III.

Na vzorek NS Model 5-V a 6-V bylo nanášeno 5 vrstev. Transfery všech vrstev obou vzorků byly úspěšné, transfery následných vrstev byly stejně jako v případě nanášení tří vrstev nižší než 1, ale vždy v pozitivních hodnotách.



Graf 9: Závislost transferu na množství nanesených vrstev – NS Model 5-V.

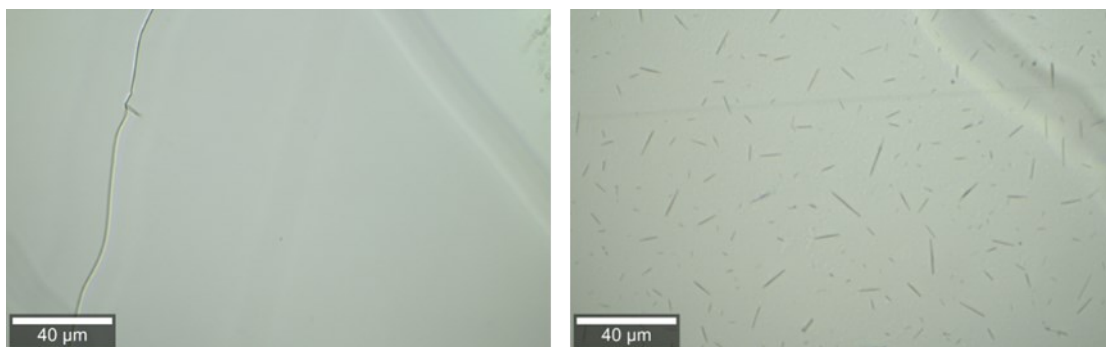
Na AFM snímcích vzorku NS Model 5-V (obr. 18) byly vidět podobné „hromádky“ jako u vzorku 4-III. Také zde byly viditelné podobné hranolovité krystalky s výškou 50-60 nm.



Obrázek 18: AFM snímky a výškové profily vzorku NS Model 5-V.

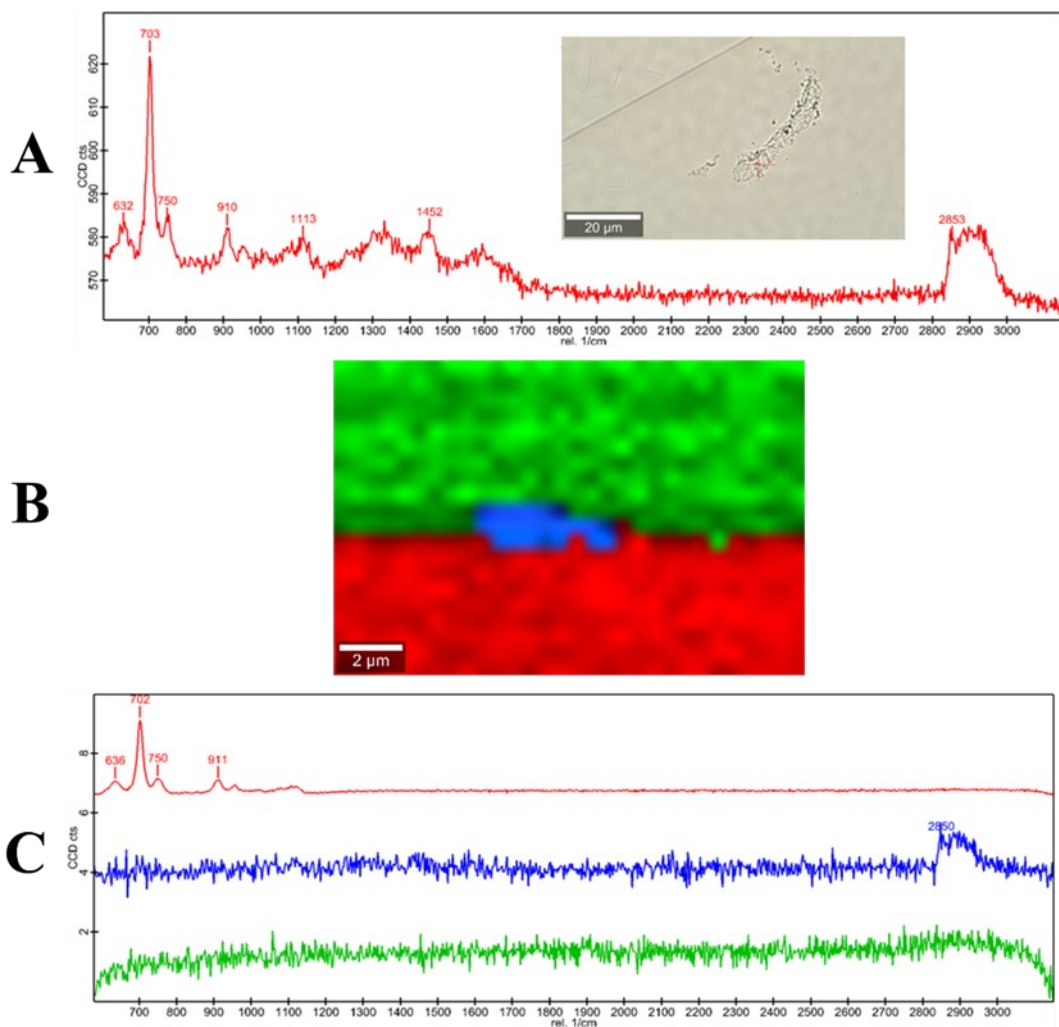
Protože výsledky z AFM obsahovaly poměrně velké struktury, vzorek NS Model 5-V byl následně změřen pomocí Ramanova mikroskopu, který má prostorové rozlišení odpovídající světelnému mikroskopu. Ačkoliv Ramanův mikroskop nedetekuje samotnou monovrstvu, je schopný rozlišit shluky a agregáty ve vzorku. Při měření byly ve vzorku viditelné shluky i hranolovité, resp. jehličkovité krystalky, podobné struktuře naměřené na AFM. Na obrázku 19 je vidět porovnání snímku té části MICA, kde nebyl nanesen vzorek, a následně vzorku 5-V, kde jsou zřetelné jehličkovité

krystalky. Tvar těchto krystalků na snímcích z Ramanova mikroskopu naznačuje, že by se mohlo jednat o krystalky cholesterolu, který takto tvarované krystalky tvoří.



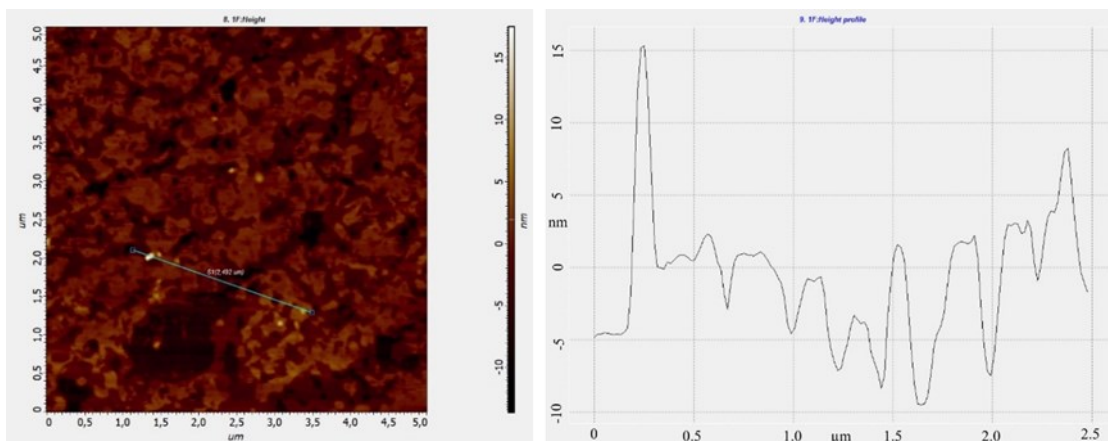
Obrázek 19: Mikroskopický snímek oblasti, kde nebyl nanesen vzorek (vlevo) a oblast nanesení vzorku (vpravo) – NS Model 5-V.

Na obrázku 20 je vidět snímek další struktury nalezené ve vzorku NS Model 5-V a spektrum naměřeno v tomto místě. U tohoto vzorku bylo provedeno i plošné mapování s hloubkovým profilem. Ve spektru jsou viditelné vibrace kolem hodnot $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají valenčním vibracím methylenových skupin, které pravděpodobně pochází z lipidových řetězců. Na mapě Ramanových spekter znázorňuje zelená barva vzduch, červená barva podložku (MICA) a modrá spektrum další komponenty (lipidů). U modrého spektra jsou opět vidět valenční vibrace kolem hodnoty 2850 cm^{-1} methylenových skupin. Snímek hloubkového profilu ukazuje, že se jedná o malý útvar na povrchu slídy (MICA). Skutečná velikost útvaru může být menší než ta vyplývající ze snímku (asi $1\text{ }\mu\text{m}$), což je dáno limitem prostorového rozlišení mikroskopu ve směru z (do hloubky).



Obrázek 20: Vzorek NS Model 5-V – snímek útvaru z Ramanova mikroskopu a spektrum z tohoto místa (panel A), hloubkový profil (panel B), spektra jednotlivých komponentů získané z hloubkového profilu barvami odpovídající plošnému snímku (panel C). Červená – slída (MICA), modrá – nepravidelný útvar, zelená – vzduch.

Útvary na AFM snímcích vzorku NS Model 6-V nebyly tak výrazné jako u vzorku 5-V, přesto i zde se objevovaly výškové rozdíly až 25 nm. Plošný snímek naznačuje, že se v této části opravdu nachází více vrstev na sobě, které zároveň pokrývají většinu plochy na tomto skenu.



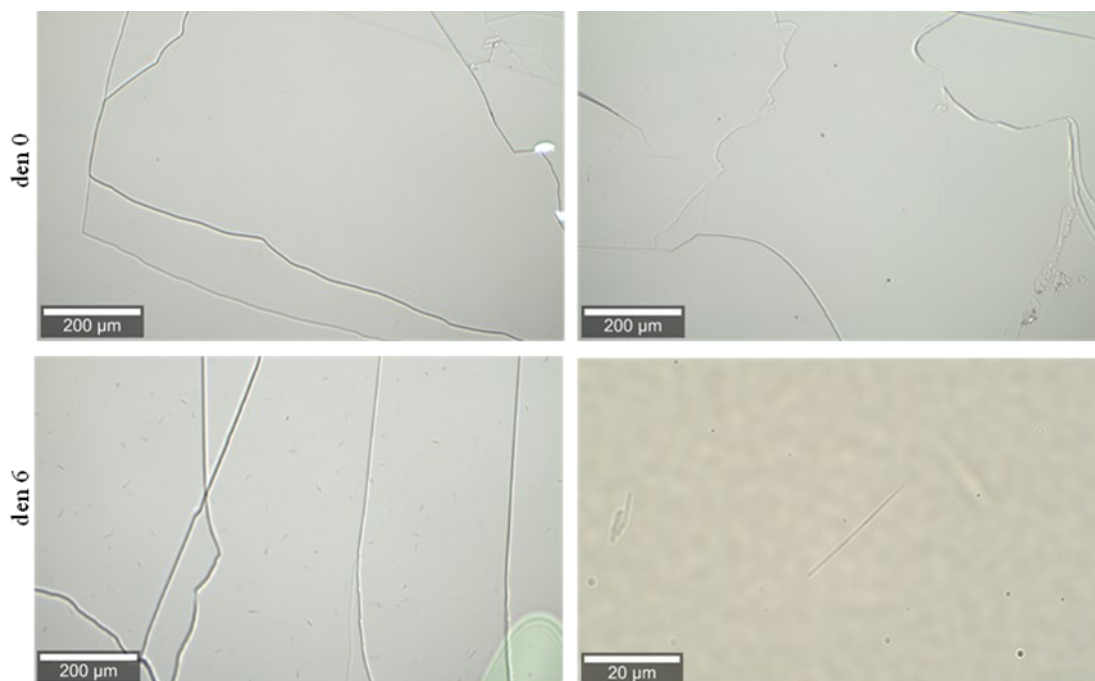
Obrázek 21: AFM snímek a výškový profil vzorku NS Model 6-V.

V další části experimentu bylo připraveno 8 vzorků monovrstev (vzorky 7-14), které byly měřeny Ramanovou mikroskopií v čase neprodleně po přípravě a poté po uplynutí 6 dnů. Cílem této části bylo zjistit, zda vyšší struktury objevující se v předchozích vzorcích na AFM snímcích vznikají ihned nebo se objevují až časem zrání preparátu. U některých vzorků (NS Model 8-I, 10-I) se objevily technické obtíže a nebyl udržován povrchový tlak, proto byly z vyhodnocení vyřazeny. Celková TR vzorků jsou shrnuta v tabulce 4.

Tabulka 4: Celková TR vzorků NS Model 7-I, 9-I, 11-I, 12-I, 13-I, 14-I.

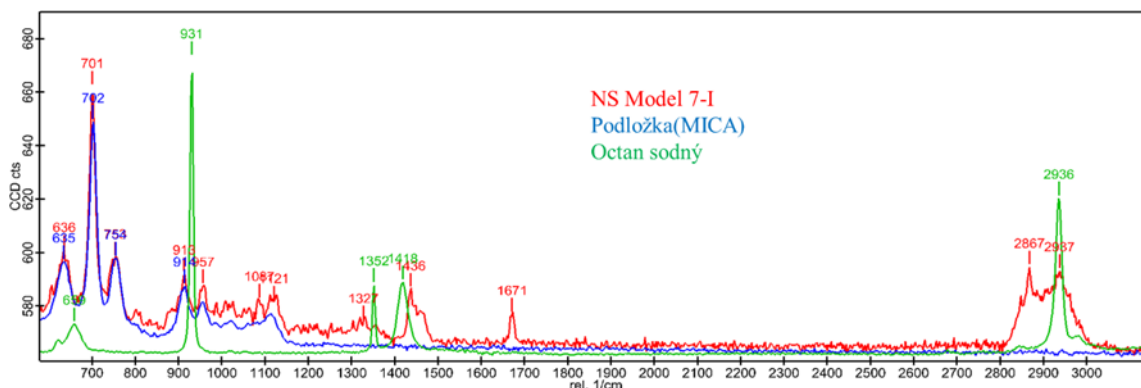
| vzorek | Celková TR |
|---------------|------------|
| NS Model 7-I | 1,041 |
| NS Model 9-I | 0,960 |
| NS Model 11-I | 1,176 |
| NS Model 12-I | 1,258 |
| NS Model 13-I | 1,396 |
| NS Model 14-I | 0,913 |

Na vzorku NS Model 7-I bylo možné pozorovat růst vyšších struktur v čase. V den depozice se je pod mikroskopem detekovat nepovedlo, ale v šestý den již se objevovaly jehličkovité krystaly (obr. 22).



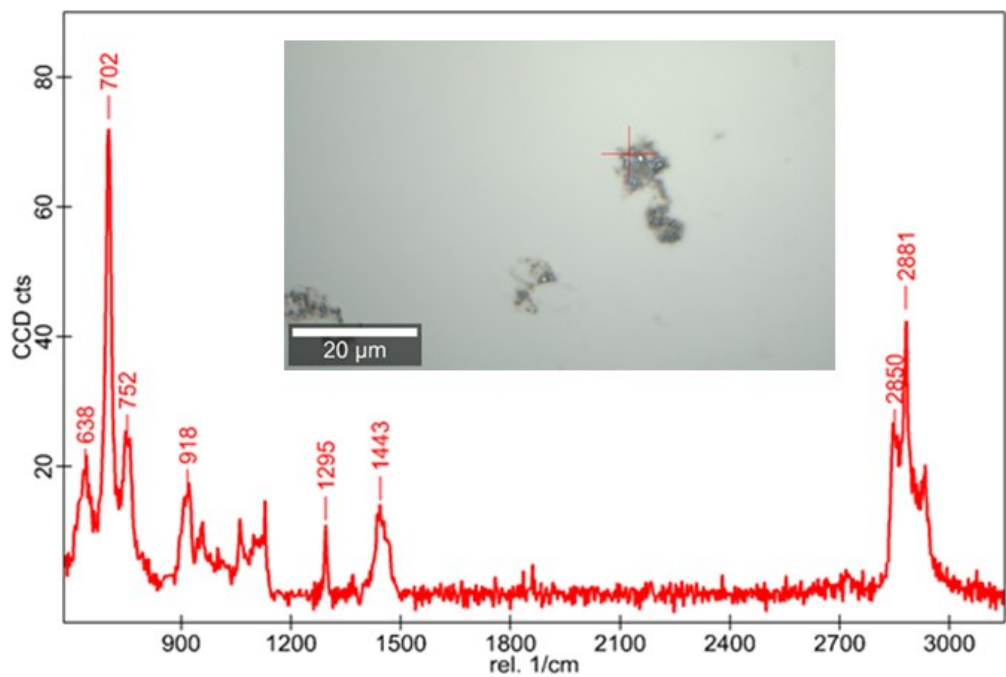
Obrázek 22: Mikroskopické snímky vzorku NS Model 7-I v den depozice (nahore) a v šestý den po depozici (dole).

Bylo proměřeno spektrum krystalku a srovnáno se spektrem čisté slídy (MICA) a spektrem octanu sodného, který byl součástí pufru použitého při depozici (obr. 23). Opět jsou vidět methylenové vibrace kolem $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, které naznačují přítomnost lipidů nebo cholesterolu.

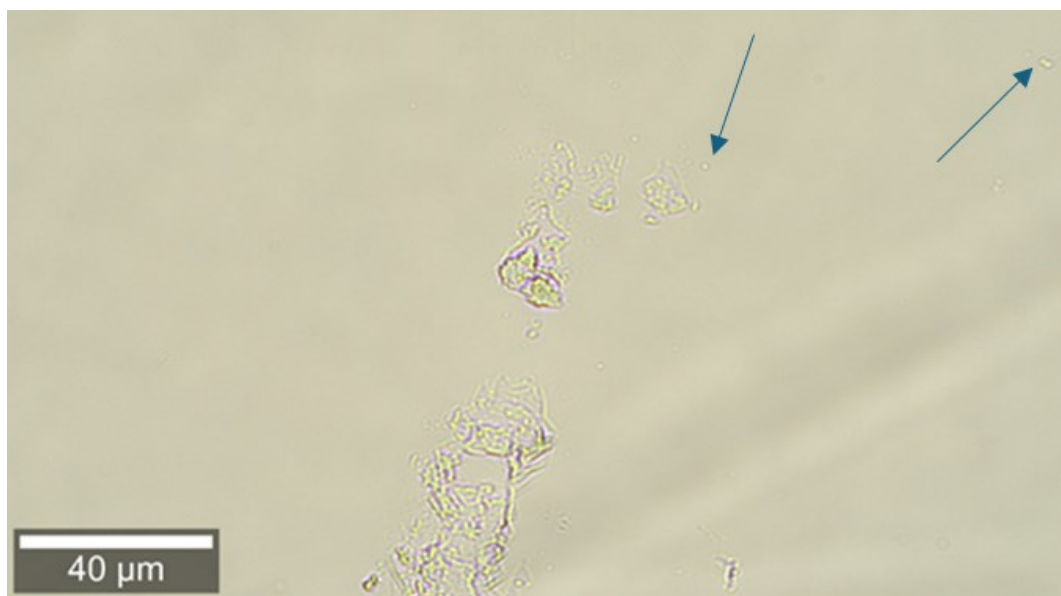


Obrázek 23: Srovnání spekter u vzorku NS Model 7-I.

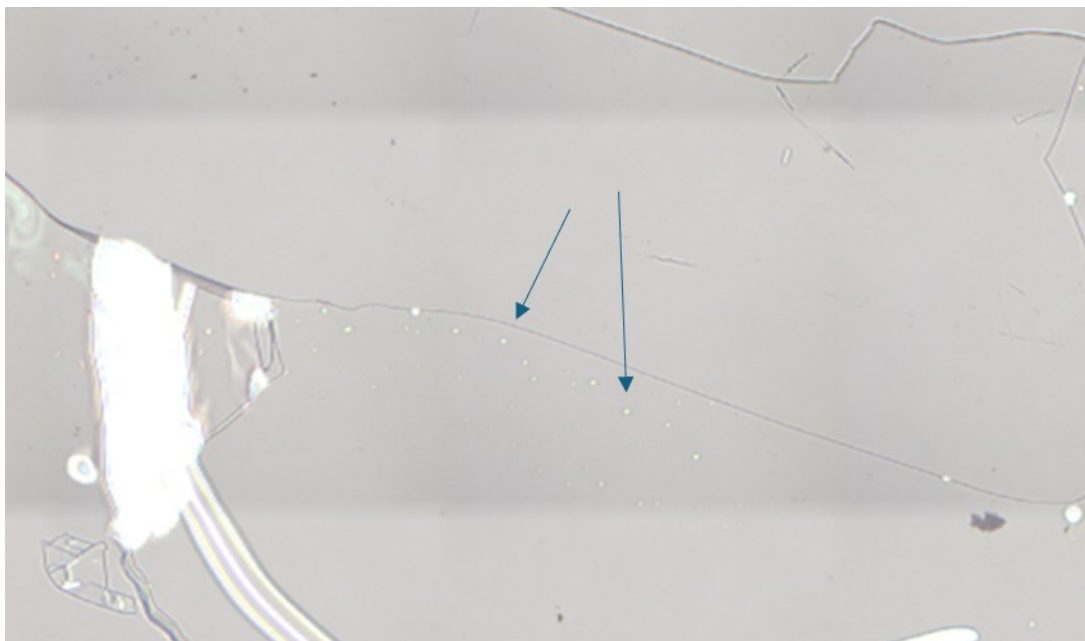
Na většině dalších vzorků byly pozorovány útvary různých velikostí, a to i v den 0, tedy bezprostředně po nanesení (obr. 24,25,26). U některých útvarů se nepodařilo změřit jejich spektrum kvůli malému množství měřitelné látky.



Obrázek 24: Ramanovo spektrum z místa na vzorku NS Modelu 9-I označeného křížkem (vložený panel) v den 0.



Obrázek 25: Mikroskopický obrázek NS Modelu 9-I v den 1.



Obrázek 26: Mikroskopický obrázek z NS Modelu 11-I v den 0.

3.8.4 Depozice vzorků směsi kožních lipidů s deuterovanými mastnými kyselinami

V další části experimentu byla připravena nová směs zjednodušeně modelující složení kožních lipidů, která se od předchozí lišila pouze použitím deuterovaných volných mastných kyseliny. Charakteristické vibrační pásy deuterovaných polymethylenových řetězců jsou posunuty do oblastí nižších vlnočtů:

–CD₂– valenční vibrace: $\approx 2000 - 2200 \text{ rel. cm}^{-1}$

–CD₂– nůžkové vibrace: $\approx 1050 - 1150 \text{ rel. cm}^{-1}$

Za stejných podmínek jako u předchozích vzorků bylo připraveno 6 vzorků dle tabulky 5. Byl použit pufr obsahující EDTA za účelem předpokládané zvýšení stability nanášených vrstev. Cílem bylo odlišit, zda mikroskopicky pozorovatelné „hromádky“ vznikají z nanášené směsi lipidů nebo jsou původem nečistoty z okolí. U nečistot z okolí je výskyt vibračních pasů typických pro –CD₂– velmi nepravděpodobný.

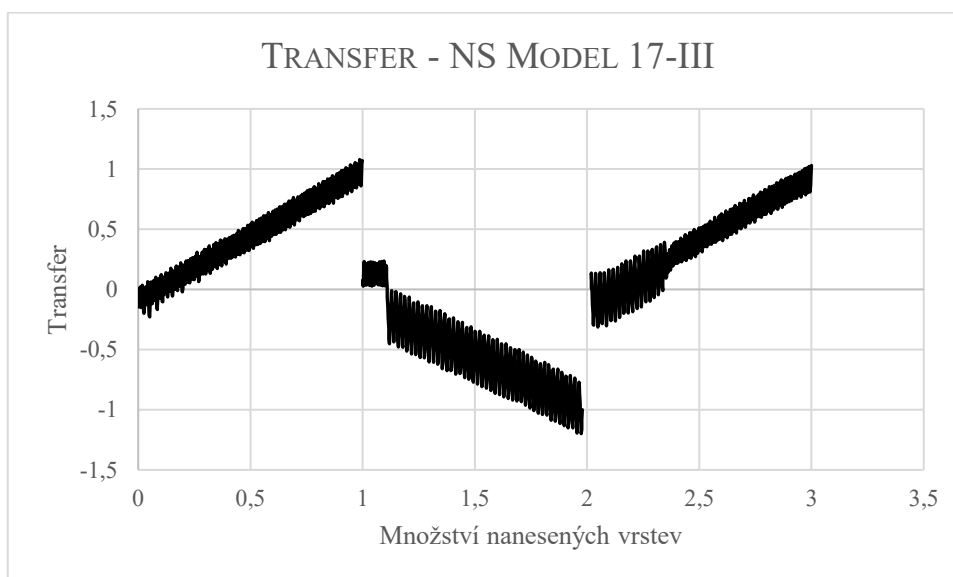
Tabulka 5: Přehled nanášených vrstev ve vzorcích 15-20.

| vzorek č. | množství nanášených vrstev |
|----------------|----------------------------|
| dNS Model 15-I | 1 |
| dNS Model 16-I | 1 |

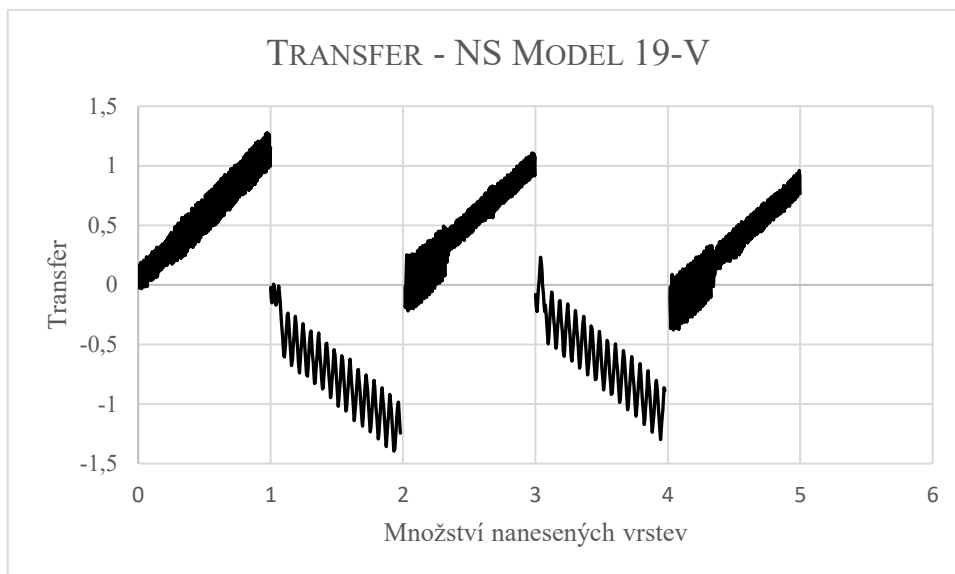
| | |
|------------------|---|
| dNS Model 17-III | 3 |
| dNS Model 18-III | 3 |
| dNS Model 19-V | 5 |
| dNS Model 20-V | 5 |

Transfer monovrstev, vzorků dNS Model 15-I a 16-I proběhl úspěšně s hodnotami celkového transfer ratia 0,967 a 1,007.

U tří- a pětivrstvých preparátů byly hodnoty nanášení sudých vrstev (při zanořování) negativní. Z toho lze vyvodit, že při každém transferu sudé vrstvy došlo k odplavení vrstvy nanesené v předchozím kroku (liché vrstvy). K zabránění odplavování sudých vrstev byla rychlost zanořování zvýšena na 1,5 mm/min. Toto zvýšení nemělo na míru odplavování vliv, TR sudých vrstev zůstalo v negativních hodnotách. Na grafech níže je zobrazen záznam transferu vzorku dNS Model 17-III a dNS Model 19-V.

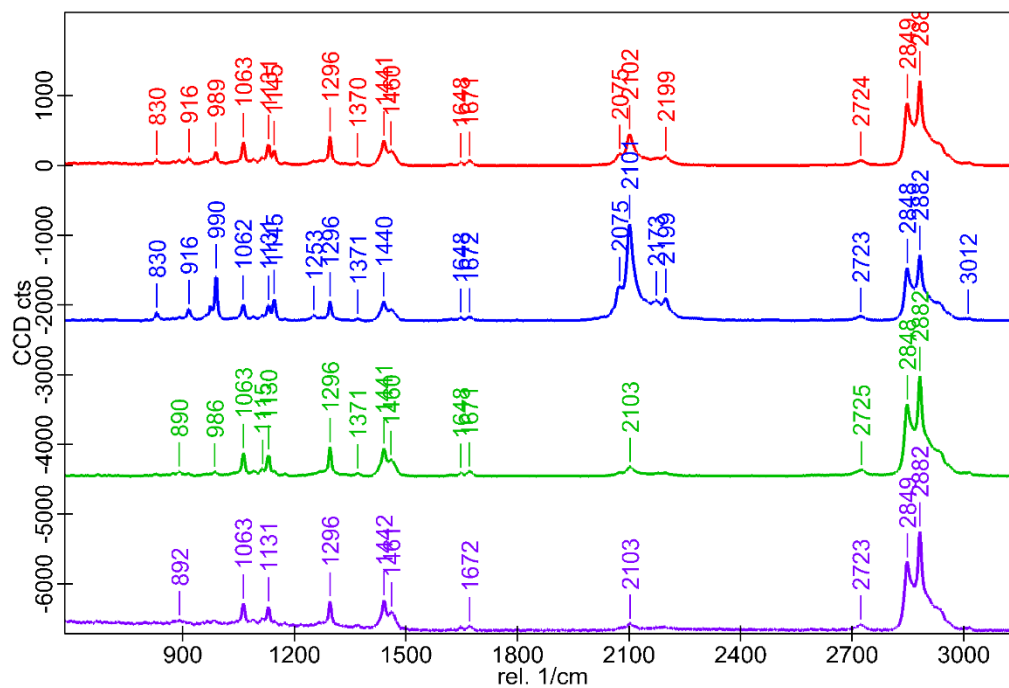


Graf 10: Závislost transferu na množství nanesených vrstev – dNS Model 17-III.



Graf 11: Závislost transferu na množství nanesených vrstev – dNS Model 19-V.

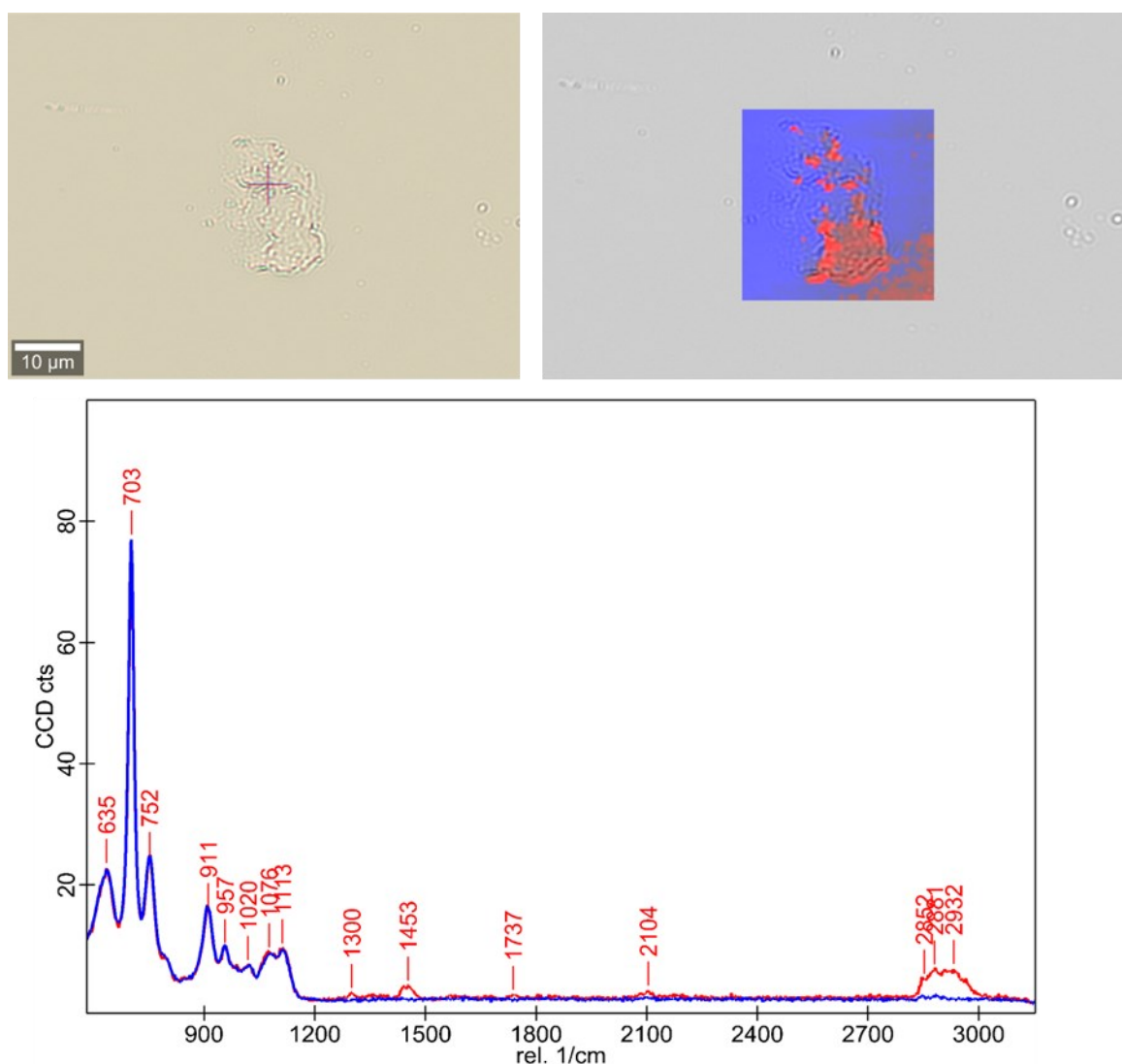
Nanášená směs lipidů byla proměřena nejdříve v suchém stavu na různých místech a bylo získáno několik Ramanových spekter (obr. 27). V těchto spektrech byly detekovány vibrace deuterovaných mastných kyselin, nejvýraznější jsou valenční vibrace $-CD_2-$ skupin v oblasti 2075-2199 $rel. cm^{-1}$. Různorodá distribuce intenzity mezi protonovanou a deuterovanou komponentou v těchto spektrech je pravděpodobně dána tím, že suchá směs lipidů není homogenní.



Obrázek 27: Ramanova spektra změřená na různých místech deuterované směsi v suchém stavu. Spektra jsou vzájemně posunuta podél osy y kvůli přehlednosti.

Nanesené vzorky byly změřeny Ramanovým mikroskopem v den depozice a po 6 dnech od depozice.

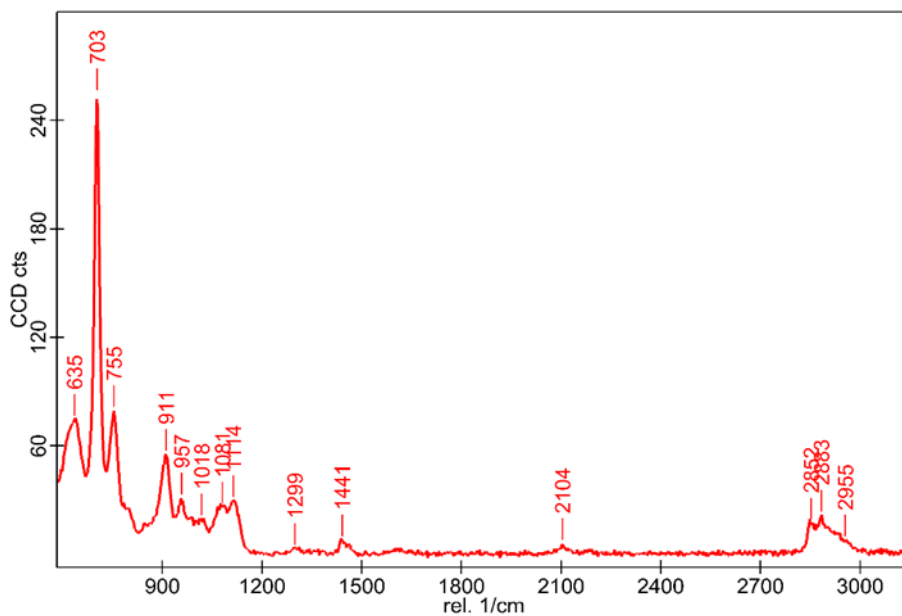
Již v den depozice byly ve vzorcích viditelné „hromádky“ (obr. 28). Při proměření spekter těchto útvarů byly znatelné vibrace nejen v oblasti methylenových skupin (2850-2950 rel. cm^{-1}), ale i slabé vibrace kolem 2100 rel. cm^{-1} poukazující na přítomnost deuterovaných skupin. Jednalo se o vzorek dNS Model 16-I, kde byla nanášena jedna monovrstva s dobrou výslednou hodnotou TR.



Obrázek 28: Mikroskopický snímek a barevná mapa Ramanových spekter ze vzorku dNS Model 16-I (nahore). Zprůměrovaná spektra získaná z Ramanova mapování plochy vyznačené na panelu nahore vpravo. Modré spektrum odpovídá podložce, červené spektrum lipidům nanášeným na vzorku.

Ve většině vzorků byly objeveny útvary, které při proměření spekter měli větší či menší píky kolem oblasti 2100 rel. cm^{-1} . Tyto vibrace byly viditelné jak u vzorků

nanášených jako monovrstvy s úspěšným transferem, tak i u vzorků s více nanášenými vrstvami, přestože u nich ve výsledku byla úspěšně nanesena jenom jedna vrstva (obr. 29).



Obrázek 29: Spektrum – dNS Model 19-V.

Současná přítomnost pásů odpovídajících valenčním vibracím $-\text{CH}_2-$ i $-\text{CD}_2-$ v zobrazených spektrech naznačuje, že pozorované „hromádky“ nejsou tvořeny pouze separovanými deuterovanými mastnými kyselinami, ale vyskytuje se zde alespoň jeden z použitých protonovaných lipidů.

4. DISKUZE

Většina modelů kožní lipidové bariéry používaných napříč různými výzkumnými skupinami obsahuje řádově tisíce opakujících se strukturních jednotek – lipidových lamel. Takový mnohovrstvový vzorek se označuje jako „bulk sample“ a projevuje se v něm hromadné chování souboru velkého počtu molekul. Poměrně zřídka byly v literatuře publikovány výsledky z Langmuirových-Blodgettové monovrstev vytvořených z lipidových modelů kožní bariéry. Mnohovrstvový ani monovrstvový model však příliš neodpovídá situaci v SC *in vivo*. Jak je vidět na obrázku z elektronového mikroskopu (*obr. 5*), lipidové vrstvy uzavřené mezi korneocyty obsahují většinou 3 – 9 lamel (opakujících se jednotek), jedná se tedy o několikavrstvový systém (z angl. *oligolamellar*). Cílem této diplomové práce bylo navázat na některé předchozí diplomové práce a připravit a porovnat monovrstvový a několikavrstvový jednoduchý model kožní lipidové bariéry. Při hodnocení připravených modelů byl s určitou pravidelností pozorován výskyt vyšších struktur – „hromádek“. Výskyt těchto struktur byl pozorován už při monovrstvách. Původní hypotéza, že reorganizace lipidů do vyšších struktur vznikne až po delším čase, se nepotvrdila, neboť „hromádky“ bylo na některých preparátech možné pozorovat již v den 0, tedy ihned po nanesení na substrát. Naše výsledky naznačují, že lipidy jednoduchého modelu se na slídě reorganizují do vyšších struktur spontánně.

Reorganizaci LB monovrstev popisuje Zhavnerko et al., 2002. V této práci byly připraveny monovrstvy kyseliny behenové, včelího vosku a dlouhých amfifilních amidů na grafit nebo slídu (MICA) technikou horizontální depozice. Modely byly následně hodnoceny pomocí AFM. V případě LB filmů s amidy byla pozorována spontánní organizace do superstruktur. V prvotních fázích amidy tvořily mikroskopické třívrstvé krystalky, které se později v časovém horizontu 1-3 měsíce přeskupily do multivrstevných struktur. Souhrnně se ukazuje, že reorganizace amfifilních molekul je vcelku častým fenoménem a jejíž proces může být ovlivněn řadou vnějších a vnitřních faktorů jako například charakterem podložky³².

V článku Girard-Egrot et al., 1993, který se věnuje závislosti kvality LB filmu na integritě monovrstvy mastných kyselin, je popsán růst krystalků v čase. Autoři článku se věnovali vlivu stavu monovrstvy na rozhraní voda-vzduch (před nanesením

na substrát) na konečnou kvalitu a stabilitu LB filmu. Jako klíčové faktory jsou zde zmíněné hodnoty povrchového tlaku a typ komprese, diskutuje se i vliv času mezi nanášením jednotlivých vrstev na tzv. „stárnutí“ monovrstev a ztrátu jejich integrity³³.

Hodnota povrchového tlaku závisí na nanášené monovrstvě a zpravidla se určuje empiricky³³. V případě kožních lipidů se jedná o tlak odpovídající buněčným membránám. Sonia Escribano Serrano během své práce na katedře biofyziky a fyzikální chemie hledala optimální hodnotu povrchového tlaku pro nanášení více vrstev a bylo zjištěno, že optimálním tlakem je 30 mN/m (nepublikované výsledky).

Viswanathan et al., 1994 uvádí situaci, kdy se homogenní LB filmy kadmium-arachidonátu oddělily od podložky v určitých oblastech (pojem „*dewetting*“) a došlo k reorganizaci k vytvoření „schodů a děr“ na povrchu. Později se na preparátech objevovaly krystalky v hexagonálním uspořádání³⁴. Pojem *dewetting* se objevuje i v Bourdieu et al., 1993, který zmiňuje, že defekty vznikají primárně v momentu přenesení monovrstvy ze subfáze na pevný povrch podložky³⁵.

Sah et al., 2020 se věnuje mechanismu kolapsu Langmuirových monovrstev směsi krátkých a dlouhých mastných kyselin v různých poměrech, konkrétně kyseliny behenové a kyseliny stearové. Mimo jiné sleduje i vliv poměru kyselin na způsob a stupeň kolapsu monovrstvy na subfázi při zvýšení povrchového tlaku. Dochází k výsledku, že při kolapsu se na spodní monovrstvu navrství jedna nebo více dvojvrstev způsobem *tail-to-tail*, stupeň kolapsu je tím vyšší, čím větší je poměr kratší kyseliny – kyseliny stearové, kdy dojde ke snížení celkových hydrofobních interakcí mezi uhlovodíkovými řetězci kyselin a snížení stability monovrstvy³⁶.

Porozumět chování kožních lipidů je klíčové pro úspěšnou přípravu modelů kožní bariéry v laboratorních podmínkách. Klíčovým faktorem nejsou jen podmínky přípravy (povrchový tlak, pH subfáze...), ale i složení nanášené směsi, charakter podložky. Z výsledků této práce i výše zmíněných prací je zřejmé, že kolaps monovrstvy i tvorba superstruktur na preparátu po nanášení je častou skutečností, se kterou se při přípravě LB monovrstev lze setkat.

K zamyšlení jsou i hodnoty celkových TR při depozici, které se většinou pohybovaly okolo 1, ale nezřídka byly vyšší než 1 s hodnotami mezi 1,1-1,5. To vede k úvaze, zda z povrchu subfáze nebylo přeneseno více, než odpovídá jedné vrstvě, a to nezapříčinilo

nestabilitu monovrstvy. Na druhou stranu může být hodnota TR ovlivněna i nastavením nulové polohy před začátkem depozice, dále vysunutím slídy a jejím odtržením od povrchu kapaliny (je zde viditelný konvexní meniskus). I tyto faktory mohou hodnotu TR zkreslovat a způsobit její zvýšení.

Zohlednit se musí také fakt, že byla použita směs simulující složení kožní bariéry, ale nekopírující ho přesně. Například kožní lipidy obsahují celou řadu ceramidů, v těchto experimentech byl použit pouze Ceramid NS24, kterého chování je dobře prozkoumané. Význam mohou mít i některé minoritní složky lipidů kožní bariéry jako cholesterol-sulfát apod., které v připravené směsi nebyly vůbec.

V neposlední řadě je nutno zmínit, že v kožní bariéře se lipidy nacházejí v několika tenkých vrstvách mezi korneocyty, tedy mezi jejich protein/lipidovou obálkou. Toto prostředí bude jistě mít také určitý význam na jejich uspořádání a bude se lišit od prostředí slídy (MICA), na které byly kožní lipidy nanášeny v laboratorních podmínkách. Rozdíl je i v způsobu navázání lipidů – na korneocyty je jedna monovrstva vázána pevnou kovalentní vazbou, na slídu pouze pomocí mechanismu adsorpce.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit vliv počtu lipidových vrstev na vlastnosti tenkých filmů jako modelů kožní bariéry. Vytvoření spolehlivého modelu kožní bariéry je esenciální pro pochopení chování lipidů kožní bariéry a nestability připravených filmů brání jejich další aplikaci ve výzkumu terapie některých kožních onemocnění. Za tímto účelem byly připraveny modely s jednou, třemi a pěti vrstvami, které byly následně hodnoceny metodou AFM.

Během hodnocení byla pozorována tvorba shluků lipidů na povrchu preparátu. K vyloučení/potvrzení, že tyto vyšší struktury potřebují dlouhou dobu tzv. „zrání preparátu“ byla připravena řada preparátů s nanosenou monovrstvou, která byla ihned po depozici hodnocena pomocí Ramanovy mikrospektrometrie. Hypotéza byla vyloučena, neboť shluky byly na některých preparátech pozorovány ihned po depozici.

K potvrzení faktu, že se skutečně jedná o shluky nanášených lipidů, nikoliv nečistot z okolního prostředí, byla připravena nová směs kožních lipidů obsahující ceramid, cholesterol a značené deuterované mastné kyseliny. Po depozici nové směsi byly preparáty opět hodnoceny Ramanovou mikrospektrometrií, která potvrdila, že se jedná o shluky lipidů původem z nanášené směsi.

Jak bylo již zmíněno výše, stabilita modelů kožní bariéry je nutným předpokladem pro jejich aplikaci do praxe. Vznik defektů v připravených preparátech není ojedinělý a je z velké části nepředvídatelný, závislý na množství vnějších i vnitřních faktorů. Tyto defekty mohou vycházet již z nestabilit plovoucí monovrstvy, tak z reorganizace na pevném substrátu po depozici. Klíčovým faktorem mohou být povrchový tlak při nanášení, vlastnosti podložky i složení samotné nanášené směsi a molekulární interakce mezi jejími složkami. Vliv zmíněných faktorů na stabilitu modelů kožní bariéry je potřeba pozorovat a určit. Tato problematika je možným směrem budoucích prací na toto téma.

6. LITERATURA

- (1) Vavrova, K.; Kovačik, A.; Opalka, L. Ceramides in the Skin Barrier. *European Pharmaceutical Journal* **2017**, *64* (2). <https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0004>.
- (2) Kolarsick, P. A. J.; Kolarsick, M. A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses Association* **2011**, *3* (4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0B013E3182274A98>.
- (3) Yousef, H.; Alhadjj, M.; Sharma, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls* **2022**.
- (4) *Objectively Assessing the Skin Barrier Function - Ozderm*. <https://ozderm.com.au/objectively-assessing-the-skin-barrier-function/> (accessed 2024-05-08).
- (5) Arda, O.; Göksügür, N.; Tüzün, Y. Basic Histological Structure and Functions of Facial Skin. *Clinics in Dermatology* **2014**, *32* (1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2013.05.021>.
- (6) *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie - Brychta Pavel, Stanek Jan, a kolektiv - Knihy Google*. <https://books.google.cz/books?id=pO9aBAAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> (accessed 2024-03-21).
- (7) 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>.
- (8) Venus, M.; Waterman, J.; McNab, I. Basic Physiology of the Skin. *Surgery (Oxford)* **2010**, *28* (10), 469–472. <https://doi.org/10.1016/J.MPSUR.2010.07.011>.
- (9) Wong, R.; Geyer, S.; Weninger, W.; Guimberteau, J. C.; Wong, J. K. The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin. *Experimental Dermatology* **2016**, *25* (2), 92–98. <https://doi.org/10.1111/EXD.12832>.
- (10) Abdo, J. M.; Sopko, N. A.; Milner, S. M. The Applied Anatomy of Human Skin: A Model for Regeneration. *Wound Medicine* **2020**, *28*, 100179. <https://doi.org/10.1016/J.WNDM.2020.100179>.
- (11) Zámejský, J. Role Ceramidů v Bariérové Funkci Kůže, Jejich Význam ve Vývoji Kožních Onemocnění a Jejich Terapii. *Dermatologie pro praxi* **2013**, *7* (4), 170–174.

- (12) Norlén, L.; Gil, I. P.; Simonsen, A.; Descouts, P. Human Stratum Corneum Lipid Organization as Observed by Atomic Force Microscopy on Langmuir–Blodgett Films. *Journal of Structural Biology* **2007**, *158* (3), 386–400. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2006.12.006>.
- (13) 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. *Biophysical Chemistry* **2017**, *224*. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.03.004>.
- (14) Knox, S.; O’Boyle, N. M. Skin Lipids in Health and Disease: A Review. *Chemistry and Physics of Lipids* **2021**, *236*, 105055. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2021.105055>.
- (15) Cha, H. J.; He, C.; Zhao, H.; Dong, Y.; An, I.-S.; An, S. Intercellular and Intracellular Functions of Ceramides and Their Metabolites in Skin (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. **2016**, *38* (1), 16–22. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2600>.
- (16) Školová, B.; Vávrová, K. Syntéza a Studium Analogů Ceramidů. dissertation, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, **2015**. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/79728> (accessed 2024-03-24).
- (17) Nemes, Z.; Steinert, P. M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Experimental & Molecular Medicine* **1999**, *31* (1), 5–19. <https://doi.org/10.1038/emm.1999.2>.
- (18) Akiyama, M. Corneocyte Lipid Envelope (CLE), the Key Structure for Skin Barrier Function and Ichthyosis Pathogenesis. *Journal of Dermatological Science* **2017**, *88* (1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.002>.
- (19) Hill, J. R.; Wertz, P. W. Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae from Epidermal Stratum Corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2003**, *1616* (2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00238-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00238-4).
- (20) Boncheva, M. The Physical Chemistry of the Stratum Corneum Lipids. *International Journal of Cosmetic Science* **2014**, *36* (6), 505–515. <https://doi.org/10.1111/ICS.12162>.
- (21) Barnes G, I. G. *An Introduction to Interfacial Science*; Oxford University Press, **2005**.

- (22) *Langmuir & Langmuir Blodgett | Measurements.* <https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett> (accessed 2024-05-08).
- (23) KSV NIMA LB Software Manual. Biolin Scientific Oy **2013**. https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf (accessed 2024-05-08).
- (24) Vitásková, A.; Kvítek, L. Langmuirovy Filmy Kyseliny Poly-L-Mléčné – Jejich Nukleace a Růst. *Chemické listy* **2018**, *112* (6), 346–353.
- (25) *AFM Mikroskop.* http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf (accessed 2024-05-08).
- (26) *Mikroskopie atomárních sil (AFM) | Matematicko-fyzikální fakulta.* <https://www.mff.cuni.cz/cs/kfm/experimentalni-vybaveni/mikroskopie-atomarnich-sil-afm> (accessed 2024-04-24).
- (27) Břeň, D.; Kulhánek, P. Pikoškály Aneb Jak Uvidět Atom. *Aldebaran bulletin* **2004**, *2* (27).
- (28) *Český Lékopis 2023; Grada, 2023; Vol. 1.*
- (29) Moravec, Z. *Ramanova Spektroskopie;* **2019**. <https://is.muni.cz/el/sci/podzim2019/C5060/um/MCHV-Moravec-RA.pdf> (accessed 2024-05-08).
- (30) Jiang, X.; Zhang, X.; Dai, S.; Wang, D.; Yuncai, L. I.; Zuliang, D. U. Reorganization of Behenic Acid Monolayer on MICA. *Surface Review and Letters* **2012**, *12* (1), 59–66. <https://doi.org/10.1142/S0218625X05006792>.
- (31) Školová, B.; Janušová, B.; Zbytovská, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepíčka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624–15633. <https://doi.org/10.1021/LA4037474>.
- (32) Zhavnerko, G. K.; Zhavnerko, K. A.; Agabekov, V. E.; Gallyamov, M. O.; Yaminsky, I. V.; Rogach, A. L. Reorganization of Langmuir Monolayers on Solid Surfaces. In *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects;* **2002;** *198–200,* 231–238. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00935-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00935-9).
- (33) Girard-Egrot, A. P.; Morelis, R. M.; Coulet, P. R. Dependence of Langmuir-Blodgett Film Quality on Fatty Acid Monolayer Integrity. 2. Crucial Effect of the Removal Rate of Monolayer during Langmuir-Blodgett Film Deposition. *Langmuir* **1993**, *9* (11), 3101–3106. <https://doi.org/10.1021/la00035a059>.

- (34) Viswanathan, R.; Zasadzinski, J. A.; Schwartz, D. K. Spontaneous Chiral Symmetry Breaking by Achiral Molecules in a Langmuir–Blodgett Film. *Nature* 1994 368:6470 1994, 368 (6470), 440–443. <https://doi.org/10.1038/368440a0>.
- (35) Bourdieu, L.; Ronsin, O.; Chatenay, D. Molecular Positional Order in Langmuir-Blodgett Films by Atomic Force Microscopy. *Science (1979)* 1993, 259 (5096), 798–801. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.259.5096.798>.
- (36) Sah, B. K.; Kundu, S. Collapse of Langmuir Monolayer Formed by the Mixture of Short- and Long-Tailed Fatty Acid Molecules. *Colloid Interface Science Communications* 2020, 36, 100261. <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2020.100261>.