

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



**PERMEABILITA A MIKROSTRUKTURA MODELOVÝCH
LIPIDOVÝCH MEMBRÁN STRATUM CORNEUM; SROVNÁNÍ
NEHYDROXYLOVANÝCH A (R)- A (S)- α -HYDROXYLOVANÝCH
CERAMIDŮ**

Diplomová práce

Michaela Šilarová

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Andrej Kováčik

Hradec Králové 2016

Poděkování

Touto formou bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a pomoc při zpracování této diplomové práce. Za ochotu a navození milé atmosféry dále děkuji Mgr. Andrejovi Kováčikovi a ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie. Práce byla podpořena z projektu GAČR (13-23891S a 16-25687J) a projektů Univerzity Karlovy (GAUK 1868214 a SVV 260291).

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

Michaela Šilarová

V Hradci Králové 2016

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
1. Úvod a cíl práce	8
2. Teoretická část	9
2.1 Stratum corneum.....	9
2.2 Ceramidy.....	10
2.2.1 Ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu	12
2.2.2 Ceramidy s α -hydroxylovanými acyly.....	13
3. Metodická část	14
3.1 Příprava modelových membrán	14
3.2 Studium permeability ve Franzových difúzních celách.....	14
3.3 Ztráta vody přes membránu	14
3.4 Elektrická impedance.....	15
3.5 Infračervená (IR) spektroskopie	15
3.6 Rentgenová prášková difrakce (RPD)	16
4. Experimentální část.....	17
4.1 Použité lipidy a chemikálie.....	17
4.2 Příprava lipidových směsí a modelových lipidových membrán.....	17
4.3 Měření permeačních parametrů	18
4.3.1 Franzovy difúzní cely	18
4.3.2 Měření ztráty vody přes membránu	19
4.3.3 Měření elektrické impedance.....	19
4.3.4 Měření permeability membrán pomocí modelových léčiv	20
4.3.4.1 Příprava vzorků modelových léčiv (TH a IND)	20
4.3.4.2 Permeační pokusy	20
4.3.4.3 Hodnocení kumulativního množství léčiva prošlého přes membránu....	21
4.4 Vyhodnocování dat IR spektroskopie.....	21
4.5 Vyhodnocování dat RPD	21
4.6 Statistická analýza dat.....	22
5. Výsledky	23
5.1 Výsledky permeačních pokusů	23
5.1.1 Výsledky měření ztráty vody	23
5.1.2 Výsledky měření elektrické impedance	24
5.1.3 Výsledky měření permeability membrán pro TH	26
5.1.4 Výsledky měření permeability membrán pro IND	28
5.2 Výsledky IR spektroskopie.....	30

5.2.1 Symetrické valenční vibrace – fázové přechody lipidů v modelových membránách.....	30
5.2.2 Nůžkové vibrace – laterální uspořádání a mísitelnost lipidů v modelových membránách.....	33
5.3 Výsledky RPD	40
6. Diskuze	44
7. Závěr	48
8. Literatura.....	49

Abstrakt

Ceramidy jsou látky ze skupiny sfingolipidů, které jsou nezbytné pro správnou funkci kožní bariéry. Kožní bariéra se nachází v nejsvrchnější vrstvě kůže nazývané *stratum corneum*. Společně s cholesterolem a volnými mastnými kyselinami jsou zde ceramidy zastoupeny v ekvimolárním množství. Kožní ceramidy jsou acylované sfingoidní báze, kterými mohou být buď sfingosin, fytosfingosin, dihydrosfingosin nebo 6-hydroxysfingosin. Sfingoidní báze jsou *N*-acylovány nehydroxylovanou, α -hydroxylovanou nebo ω -hydroxylovanou mastnou kyselinou.

Cílem této práce bylo studium permeability a mikrostruktury modelových membrán obsahující ceramidy s nesubstituovaným (nehydroxylovaným) a α -hydroxylovaným acylem. Dále byl u α -hydroxylovaných ceramidů zkoumán vliv stereochemie hydroxylové skupiny v poloze 2 acylové části. Byly připraveny modelové lipidové membrány obsahující příslušný ceramid, směs mastných kyselin (C_{16-24}), cholesterol a 5% podíl cholesterol-sulfátu. Na takto připravených membránách byly studovány bariérové vlastnosti ceramidů pomocí vybraných permeačních parametrů: relativní ztráta vody přes membránu, elektrická impedance, flux theofylinu a flux indomethacinu. Mikrostruktura a mísitelnost ceramidů s ostatními lipidy byla hodnocena pomocí infračervené spektroskopie a rentgenové práškové difrakce.

Výsledky experimentů na modelových membránách ukázaly některé rozdíly mezi jednotlivými ceramidy. Například vliv struktury sfingoidní báze v molekule ceramidu se významně projevil u relativní ztráty vody, nebo u fluxu indomethacinu. U fluxu theofylinu se zase výrazně projevil vliv α -hydroxylace v acylové části molekuly, kdy téměř všechny α -hydroxylované ceramidy vykazovaly menší propustnost pro dané léčivo v porovnání s nehydroxylovanými ceramidy. U všech strukturních typů ceramidů se u některých permeačních parametrů projevil také vliv stereochemie, jako tomu bylo například u α -hydroxylovaných ceramidů odvozených od sfingoidní báze fytosfingosinu v rámci výsledků elektrické impedance. Signifikantně vyšší (tzn. lepší) hodnoty elektrické impedance byly naměřeny u *S* izomeru. Rozdíly mezi ceramidy se ukázaly i v mikrostruktuře lipidových membrán, kdy nejvýznamnějším poznatkem bylo nalezení dlouhé lamelární fáze v modelových membránách obsahujících ceramid s 6-hydroxysfingosinem jako sfingoidní bázi a s nehydroxylovanou acylovou částí. Můžeme tedy konstatovat, že každý typ ceramidu má jedinečné vlastnosti a každá změna v jejich struktuře vede k rozdílu v bariérové funkci modelových lipidových membrán.

Abstract

Ceramides are lipid components in the uppermost layer of the skin, *stratum corneum* and they are essential for correct function of a skin barrier. In the *stratum corneum*, ceramides with cholesterol and free fatty acids are in equimolar ratio. Ceramides contain sphingoid bases, which are amino alcohols sphingosine, phytosphingosine, dihydrosphingosine or 6-hydroxysphingosine. These sphingoid bases are *N*-acylated by non-hydroxylated, α -hydroxylated or ω -hydroxylated fatty acid, mostly by lignoceric (C24) acid.

The aim of this work was to study the permeability and microstructure of the model membranes containing non-hydroxylated ceramides. Moreover, we aimed to study the effect of additional α -hydroxyl group in ceramides including the effect of stereochemistry in position 2. We prepared model membranes based on Cer, free fatty acids (C₁₆₋₂₄), cholesterol and a small amount of cholesteryl sulfate (5 wt%). We investigated four permeability markers: electrical impedance, water loss through the membrane, flux of theophylline and flux of indomethacin. The microstructure and miscibility of ceramides with other lipids were studied by infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction.

The results from experiments showed some differences between ceramides. For example the effect of the type of sphingoid base is greatly manifested in the water loss through the membrane or in flux of indomethacin. The effect of additional α -hydroxyl group in ceramides was discovered as very important in flux of theophylline. For all structure types of ceramides the effect of stereochemistry in position 2 was observed in some permeability markers. Differences between ceramides was reflected even in the microstructure of lipid model membranes. The most significant finding was discovering of long lamellar phase in membranes with ceramide containing 6-hydroxysphingosine and non-hydroxylated fatty acid. So we can conclude that every type of ceramides has unique properties and every change in their structure (type of sphingoid base, α -hydroxylation and stereochemistry) leads to differences in barrier function of model lipid membranes.

1. Úvod a cíl práce

Jednou ze základních funkcí kůže je spolupodílet se na udržení homeostázy organismu tím, že ho chrání před cizorodými látkami, mechanickými vlivy z okolního prostředí a také, že zabraňuje nadměrné ztrátě vody z těla. Tyto funkce zajišťuje kožní bariéra, která je umístěna v nejsvrchnější vrstvě pokožky, v rohové vrstvě (lat. *stratum corneum*). Je dokázáno, že pro správné bariérové vlastnosti kůže jsou důležité látky ze skupiny sfingolipidů - ceramidy, které představují jednu ze složek intercelulárního prostoru obklopujícího kožní buňky (korneocyty).

Molekula ceramidu se skládá ze dvou částí. První částí je sfingoidní báze; pro savčí kůži jsou typické čtyři typy aminoalkoholů, a to sfingosin, dihydrosfingosin, fytosfingosin a 6-hydroxysfingosin. Acyl mastné kyseliny navázaný na primární aminoskupinu bazického alkoholu, jež představuje druhou část struktury, může být nehydroxylovaný nebo hydroxylovaný buď v poloze α - nebo ω -. Kombinací jednoho ze čtyř aminoalkoholů a tří druhů acylů mastných kyselin vzniká dvanáct strukturně odlišných typů ceramidů.

Cílem této práce bylo připravit modelové lipidové membrány s nehydroxylovanými nebo α -hydroxylovanými ceramidy, které byly následně hodnoceny permeačními pokusy. Dílčím cílem této práce bylo objasnit význam ceramidu odvozeného od 6-hydroxysfingosinu a také ozřejmit vliv stereochemie α -hydroxyly v acylu molekul ceramidů. Kromě permeability modelových lipidových membrán byla hodnocena i jejich mikrostruktura za pomoci infračervené spektroskopie a rentgenové práškové difrakce. Tyto výsledky by nám měly objasnit základní otázku, *proč je v kožní bariéře zapotřebí tolik strukturně různých typů ceramidů*, tj. jaký vliv na správnou funkci epidermis má struktura sfingoidní báze nebo přítomnost α -hydroxyly v acylové části molekuly ceramidu.

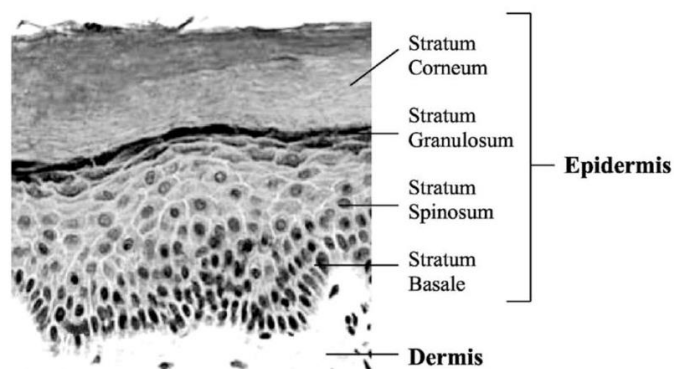
2. Teoretická část

2.1 Stratum corneum

Kůže (lat. *cutis*, řec. *derma*) je největším orgánem lidského těla, který zároveň tvoří jeho zevní povrch. Přirozenou a nejdůležitější funkcí kůže je ochrana organismu před nežádoucími vnějšími vlivy životního prostředí.[1, 2] Kůže se skládá ze dvou základních částí, a to škály (dermis) a pokožky (epidermis).[1] Právě v epidermis, přesněji ve vrstvě nazývané *stratum corneum* (SC), se nacházejí ceramidy (Cer), které jsou zodpovědné za bariérovou funkci kůže (obrázek 1).[3]

SC je nejsvrchnější vrstva kůže; je tvořena korneocyty, odumřelými kožními buňkami vyplněnými z velké části keratinem, a intercelulární hmotou, která obsahuje specifické lipidy. Na rozdíl od jiných membránových struktur, kde jsou základní lipidovou složkou fosfolipidy, v lamelárních strukturách SC tomu tak není. Místo fosfolipidů jsou zde v největší míře zastoupeny Cer (50 hmotnostních %), cholesterol (25 hmotnostních %; Chol) a volné mastné kyseliny (10 hmotnostních %; FFA). Vedle těchto tří hlavních složek lipidů zastoupených ve SC (v ekvimolárním množství) je zde také menší podíl esterů Chol, cholesterol sulfátu (CholS) a glukosylceramidů.[4, 5]

Kromě ochrany organismu je funkcí kůže také zamezit nadměrné ztrátě vody z těla. Pro správnou funkci kožní bariéry je důležité lipidové uspořádání ve SC, přičemž hlavní roli v tomto směru hrají Cer.[3] Cer přispívají k tvorbě lamelárních struktur v mezibuněčném prostoru SC, a právě toto uspořádání ve vícevrstevné lamely je pro SC jako bariéru velice významné.[6]

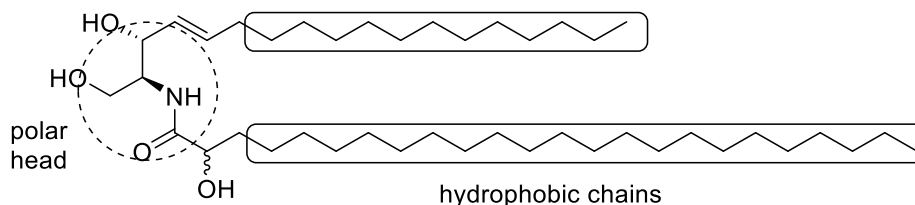


Obrázek 1. Názorné uspořádání jednotlivých vrstev lidské kůže.[7]

2.2 Ceramidy

Molekula Cer je tvořena bazickým aminoalkoholem, kterým může být nejčastěji sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H) nebo dihydrosfingosin (DS). V těchto čtyř strukturních typech aminoalkoholů je buď přítomna dvojná vazba (v případě S a H) nebo je tato vazba redukováná (v případě P a DS). Molekula H se odlišuje od molekuly S na základě přítomnosti hydroxylu v poloze 6, přičemž P má na rozdíl od DS hydroxylovaný uhlík v poloze 4. Na primární aminoskupinu bazického alkoholu je amidově navázána druhá část molekuly Cer, kterou je acyl mastné kyseliny o 16-34 uhlících. Acyl mastné kyseliny může obsahovat hydroxyl v poloze α - (A) nebo ω - (O), kdy v takto hydroxylovaném řetězci je navíc esterově vázaná kyselina linolová (EO). Kromě toho, acyly mastných kyselin mohou být i nesubstituované (N; Cer typu N nebo N Cer).[3, 6] V dnešní době používaná nomenklatura dle Motty je vytvořena na základě kombinací písmen sloužících k označení typů aminoalkoholů a acylů mastné kyseliny.[8] Například Cer označovaný jako AS je tvořen α -hydroxylovaným acylem a S (obrázek 2).

Cer představují hlavní složku sfingolipidů ve SC. V lidské kůži se vyskytuje velké množství jejich přirozených strukturních typů, které se vzájemně liší stavbou polární hlavy, acylu a také délkou obou hydrofobních řetězců. Tyto sfingolipidy mají amfifilní charakter, tj. malou polární hlavu (na rozdíl od fosfolipidů) a dva dlouhé lipofilní uhlovodíkové řetězce (obrázek 2).

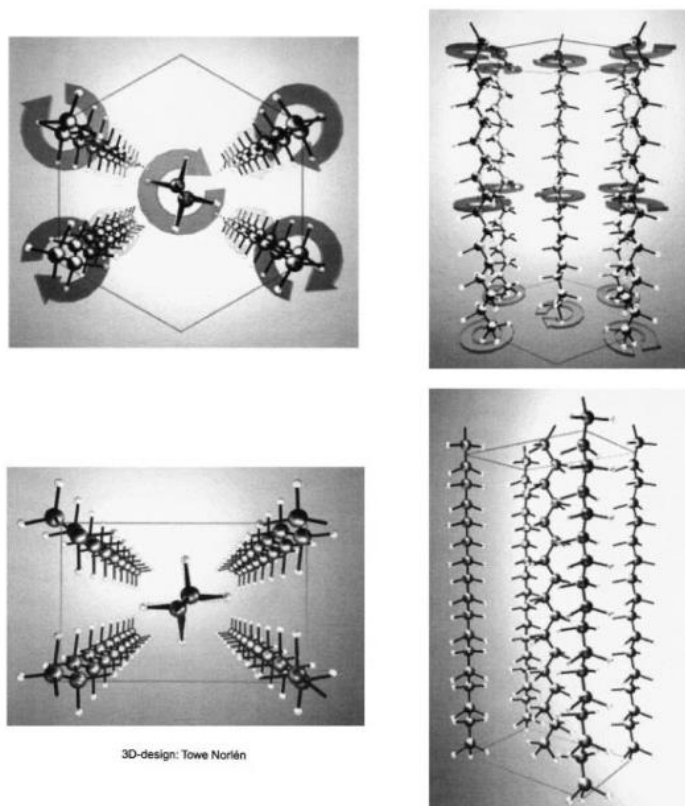


Obrázek 2. Struktura Cer AS ve vlásenkové konformaci, tj. oba řetězce Cer jsou orientovány do jednoho směru. V přerušované kružnici je naznačena polární hlava, v obdélnících jsou zvýrazněny hydrofobní řetězce.

Cer společně s dalšími lipidy (FFA, Chol) jsou ve SC organizovány do lamelárních struktur (lamel) tak, že jejich hydrofobní části (řetězce acylů a sfingoidníchází) směřují dovnitř a hydrofilní části (polární hlavy) vně, do vodního prostředí.[3, 4] Tyto lamely tvoří ve zdravé SC jednak dlouhou lamelární fázi (~12-13 nm), ale také krátkou lamelární fázi (~5-6 nm) a fázi tvořenou separovaným krystalickým Chol (~3,4 nm).[9-11] Cer se od ostatních typů lipidů liší menší polární hlavou a naopak delšími

hydrofobními řetězci, díky čemuž je mezibuněčné lamelární uspořádání ve SC těsnější a jednotlivé lamely jsou více propojené.[3, 4] Ne zcela objasněnou otázkou zůstává, jakým způsobem jsou uspořádány hydrofobní řetězce Cer v lamelách, zda oba řetězce molekuly Cer směřují stejným směrem (tzv. vlásenková konformace; obrázek 2) nebo jsou v tzv. otevřené konformaci, kdy je každý řetězec orientován na opačnou stranu.[12, 13] Je možné, že ve SC se vyskytují obě konformace a každá zde má jinou funkci. Je rovněž popsáno, že na základě rozdílné délky řetězců dochází ke změně vlásenkové konformace Cer v konformaci otevřenou.[14]

Z hlediska laterálního uspořádání lipidů SC, tedy uspořádání řetězců lipidů uvnitř lamely, vyskytují se lipidy buď v orthorhombickém uspořádání do obdélníkové mřížky, které je velmi těsné. Toto uspořádání lipidů brání volné mobilitě řetězců. Lipidy mohou být uspořádány rovněž hexagonálně (šestiúhelníkové uspořádání), kdy je řetězcům umožněno částečně rotovat (obrázek 3). Kromě těchto dvou typů laterálních fází mohou být řetězce v neuspořádané kapalně-krytalické fázi, ve které ztrácí laterální organizaci.[15] V lidském SC se nacházejí všechny tři fáze, přičemž nejvíc zastoupenou fází je fáze orthorhombická.[16, 17]



Obrázek 3. Orthorhombické (dole) a hexagonální (nahore) uspořádání lipidových řetězců v lamelách SC.[17]

Budoucí využití Cer v dermatologii je hlavně v terapii kožních onemocnění, při kterých kůže v bariérové funkci selhává. U těchto onemocnění, jako je atopická dermatitida nebo lupénka, se často objevují abnormální změny v počtu nebo zastoupení jednotlivých Cer a právě jeden z léčebných přístupů by mohla být jejich suplementace.[18]

2.2.1 Ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu

Jak již z názvu vyplývá, tato kapitola pojednává o sfingoidní bázi H a Cer, které jsou od tohoto aminoalkoholu odvozené. 6-Hydroxyceramidy (6-hydroxyCer) se v lidském SC vyskytují v podobě jak s α -hydroxylovanými (Cer AH), ω -hydroxylovanými (Cer EOH), tak i nehydroxylovanými acyly mastných kyselin (Cer NH). Rodinu 6-hydroxyCer doplňuje i kovalentně vázaný Cer OH.[19]

H na rozdíl od ostatních strukturních sfingoidních bází (např. P nebo DS) nebyl nalezen v žádných jiných tkáních než v kůži. Byl objeven v devadesátých letech minulého století,[20] ale jeho struktura byla zcela objasněna až v roce 2003.[21] Navíc Cer odvozené od H nejsou typické pro všechny savce, nejsou přítomny např. u prasat a u psů se vyskytují jen u některých plemen psů. Také není zcela vyloučeno, že H není přítomen ve velmi malém množství i v jiných oblastech organismu.[19-21]

Rozdíly v přítomnosti Cer odvozených od H byly popsány například u pacientů s atopickou dermatitidou. O významnosti 6-hydroxyCer i samotného H napovídá také jejich velké procentuální zastoupení v kožní bariéře, například Cer AH má 22% podíl v rámci lipidů ve SC a přibližně 15% volných sfingoidních bází v lidské kůži představuje volný H.[19, 22]

Cer NH, Cer s nesubstituovanou mastnou kyselinou v acylové části molekuly, byl objeven až v roce 1999 jako poslední z této skupiny. Jeho existence byla ve SC dlouho přehlížena na základě velmi podobného retenčního faktoru s Cer AS v tenkovrstvé chromatografii. [21, 23]

Kvůli teprve nedávné identifikaci 6-hydroxyCer[24] se doposud neobjasnily některé skutečnosti související s jejich přítomností, funkcí nebo chováním v kožní bariéře. Není znám přesný význam hydroxylace v poloze 6, ani jedinečnost těchto Cer ve SC. Rovněž není znám enzym zodpovědný za biosyntézu 6-hydroxyCer ve SC. Zdá se pravděpodobné, že funkcí 6-hydroxyCer je zajištění správné funkce kožní bariéry, pravděpodobně se nepodílejí na buněčné signalizaci.[19, 25, 26]

Protože H od S obsahuje o jednu hydroxylovou skupinu navíc (v poloze 6), 6-hydroxyCer by pravděpodobně mohly vytvářet silnější vodíkové můstky a tím posilovat soudržnost lamelárních struktur SC. V rámci zmíněné teorie by pak Cer AH, který má navíc hydroxyl v acylu v poloze 2, mohl být v tomto směru ještě účinnější.

2.2.2 Ceramidy s α -hydroxylovanými acyly

Cer tvoří velice heterogenní skupinu látek. Kromě různých variant sfingoidní báze přispívá k jejich různorodosti také hydroxylace amidově navázaných mastných kyselin.[27] Hydroxylová skupina v acylové části molekuly může být přítomna ve dvou polohách, přičemž tato kapitola bude pojednávat o Cer, které ve své struktuře obsahují α -hydroxylované acyly (A) mastných kyselin. Takto hydroxylované Cer (Cer typu A) se hojně nacházejí v mozku a právě také v kůži.[28, 29]

Hydroxylace mastné kyseliny na druhém uhlíku je katalyzována 2-hydroxylázou mastných kyselin, NAD(P)H-dependentním enzymem.[30, 31] První krok syntézy těchto Cer typu A představuje α -hydroxylace příslušné mastné kyseliny. Poté je tato kyselina zavedena pomocí jiného enzymu na sfingoidní bázi za vzniku amidové vazby.[32, 33] Enzym 2- hydroxyláza je kódován genem FA2H a exprese tohoto genu společně s produkcí hydroxylovaných mastných kyselin se zvyšuje na začátku diferenciaci keratinocytů, což svědčí o tom, že syntéza zmíněného typu sfingolipidů by mohla probíhat právě v těchto buňkách.[27, 30] O významnosti FA2H genu svědčí i některé genetické studie u mnoha neurodegenerativních onemocnění, nebo vznikem leukodystrofie či spastické paraplegie spojené s mutací genu FA2H.[34-36]

Cer typu A mají na α -uhlíku další chirální centrum. I přestože bylo potvrzeno, že gen FA2H kóduje 2-hydroxylázu, která je (2'*R*)-stereospecifická, není prokázáno, že jsou ve SC přítomny Cer právě v této konfiguraci.[31] Nicméně domněnka, že v lidském těle jsou přítomny (2'*R*)-diastereoizomery, byla podpořena i výzkumem feromonů obsažených ve chlupcích kraba (rod *Erimacrus isenbecii*). V nich bylo nalezeno několik typů Cer, mezi nimi i Cer typu A. Hydroxylu v poloze 2' byla přiřazena absolutní konfigurace (2'*R*).[37]

3. Metodická část

Hlavním cílem této práce bylo prostudovat bariérové vlastnosti a mikrostrukturu modelových lipidových membrán SC obsahující vybrané strukturní typy Cer. K posouzení permeability nám posloužilo měření elektrické impedance nebo relativní ztráty vody přes membránu, dále byla hodnocena permeabilita pro malé polární nebo větší lipofilní látky (modelová léčiva). K hodnocení mikrostruktury jsme využili infračervenou spektroskopii a rentgenovou práškovou difrakci. V této kapitole jsou popsány zmíněné metody, které byly v hodnocení modelových lipidových membrán použity.

3.1 Příprava modelových membrán

Ke tvorbě modelových lipidových membrán, na kterých jsou prováděny permeační pokusy a studium mikrostruktury, je zapotřebí si nejprve připravit lipidové směsi, které by svým složením měly připomínat přirozené prostředí intercelulárního prostoru ve SC. Po přesném navážení a rozpuštění lipidových směsí se lipidy nanášejí na filtry Nucleopore prostřednictvím přístroje Linomat 5, který je vybaven ramenem pohybujícím se po ose y tak, aby lipidy byly po nich rovnoměrně rozprostřeny.

3.2 Studium permeability ve Franzových difúzních celách

Franzovy difúzní cely slouží k hodnocení bariérových vlastností připravených lipidových membrán. Tyto borosilikátové cely se skládají ze dvou částí. První, vrchní část slouží jako donorová a pomocí této můžeme na zkoušenou membránu například aplikovat roztoky léčiv. Druhá, spodní část je část akceptorová a její součástí je ramínko, které slouží k odběrům vzorků. Nedílnou součástí akceptorové části je i míchadlo, které zaručí homogenizaci přítomného roztoku.

3.3 Ztráta vody přes membránu

Voda za fyziologických podmínek prostupuje z hlubších vrstev skrz lipidové vrstvy SC savčí epidermis na její povrch pomocí pasivní difúze. Dochází tak k epidermální ztrátě vody. Měření tohoto, v dermatologii významného, biofyzikálního jevu je jedna z vhodných metod k posouzení správné funkce kožní bariéry. Poškození kožní bariéry se promítne ve zvýšení epidermální ztráty vody.[38] Prostřednictvím tohoto parametru můžeme hodnotit i modelové membrány.

Principem hodnocení trans-membránové ztráty vody (Tewameter® TM 300) je měření tlakového spádu vodní páry, která je nepřímo snímána dvěma dvojicemi senzorů umístěných ve dvou různých výškách uvnitř hlavy sondy, která je součástí přístroje na měření trans-epidermální ztráty vody. Pomocí senzorů přístroje je zaznamenávána teplota a relativní vlhkost těsně nad membránou. Na displeji přístroje poté můžeme odečítat naměřené hmotnosti vody prošlé skrz membránu, vztaženou na časový interval a plochu, kterou membrána zaujímá [g/h/m^2]. Důležité je, aby velikost hlavy měřící sondy byla co nejmenší kvůli minimalizaci vlivu turbulence vzduchu uvnitř sondy, a aby podmínky prostředí při měření byly konstantní.[38, 39]

3.4 Elektrická impedance

Při měření elektrické impedance se zjišťuje měrný odpor kladený střídavému proudu modelové membrány vztažen na jednotku plochy membrány [$\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$]. Měrný odpor je veličina nepřímo úměrná propustnosti pro ionty. Tímto parametrem můžeme také kontrolovat a hodnotit integritu lidské kůže.[39]

Přístroj k měření elektrické impedance, LCR 4080, užívá kmitočet 120 Hz. Principem této metody je vytvoření paralelního obvodu, kterým prochází střídavý elektrický proud. V našem případě dochází k měření odporu kladeného proti tomuto proudu.[39-41] Samotné měření probíhá na základě přiložení dvou nerezových sond, tak aby se elektrický obvod uzavřel a byla možnost sledovat velikost odporu působícího proti proudu, který je vytvářen tokem iontů a polárních látek.

3.5 Infračervená (IR) spektroskopie

Infračervená (angl. *infrared*; IR) spektroskopie je jednou z metod, která byla použita pro studium mikrostruktury lipidových membrán. Principem IR spektroskopie je absorpce infračerveného záření molekulou, což má za následek změnu v jejích vibracích. Tyto tzv. valenční přechody jsou udávány ve vlnočtech ν [cm^{-1}]. Molekulové vibrace dělíme na valenční, při kterých atomy vibrují ve směru molekulových vazeb, a na vibrace deformační, kdy se mění valenční úhly. Výstupem měření je spektrum, které nejčastěji znázorňuje závislost absorbance na vlnočtu.[42]

Uspořádání lipidů (hlavně Cer a mastných kyselin) v lipidových membránách, tj. konformace uhlovodíkových řetězců a jejich laterální uspořádání je popsáno několika vibracemi. Kromě toho, chování jednotlivých lipidových složek můžeme sledovat

odděleně. Docílí se toho pomocí náhrady protonované (^1H) části uhlovodíkového řetězce lipidu deuterovanou (^2D). Tímto můžeme sledovat vzájemnou mísitelnost lipidů v membráně, a to z důvodu odlišného posunu C-H a C-D vibrací v infračerveném spektru.[43] Mezi nejvýznamnější vibrace, na základě kterých můžeme popsat chování lipidů v modelových membránách, patří symetrická valenční CH_2/CD_2 vibrace a deformační nůžková CH_2/CD_2 vibrace.[44]

3.6 Rentgenová prášková difrakce (RPD)

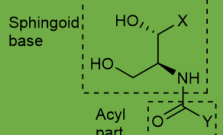
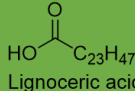
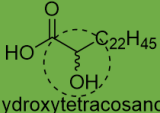
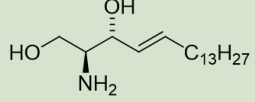
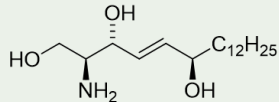
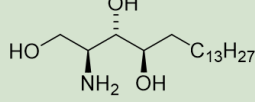
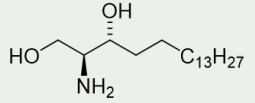
Rentgenová prášková difrakce (RPD) je metoda využívající krátkovlnné elektromagnetické záření. RPD je vhodná ke studiu strukturního uspořádání pevných látek, můžeme s její pomocí zjistit některé informace o mikrostruktuře lipidů nejenom ve SC, ale i v modelových lipidových membránách.[45, 46] Vlnová délka ionizujícího záření odpovídá meziatomovým vzdálenostem ve většině struktur lipidů. Principem této metody je dopad rentgenového (RTG) záření na modelovou membránu pod úhlem Θ , přičemž dochází k tzv. difrakci (ohybu) na elektronech jednotlivých atomů v látce. V případě, že jsou jednotlivé atomy rozmístěny do identických strukturních rovin se stejnou vzdáleností mezi rovinami (v případě modelových membrán mezi jednotlivé lamelární struktury), je dráhový rozdíl rozptýlených paprsků na jednotlivých rovinách roven celočíselnému násobku vlnové délky použitého záření. V takovýchto případech pak dochází ke konstruktivní interferenci; na základě výpočtů lze zjistit počet a délku různých lamelárních fází (identických strukturních rovin) v dané modelové lipidové směsi (membráně), které se periodicky opakují.[45]

Jelikož samotná měření se provádějí práškovými difraktometry, měřené vzorky v polykrystalické formě, by měly mít hladký a rovný povrch. Identifikace jednotlivých fází v nich probíhá na principu „otisku palce“. Základními součástmi přístroje je zdroj RTG záření, monochromátor, který upravuje směr záření tak, aby dopadal na vzorek a detektor. Výsledkem měření je difraktogram, kde na ose x je zaznamenána poloha detektoru ve stupních 2Θ a na ose y je intenzita difraktovaného záření.[45, 47]

4. Experimentální část

4.1 Použité lipidy a chemikálie

N-tetracosanoyl-sfingosin (Cer NS), *N*-tetracosanoyl-fytosfingosin (Cer NP), *N*-tetracosanoyl-dihydrosfingosin (Cer NDS) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). *N*-tetracosanoyl-6-hydroxysfingosin (Cer NH), stejně jako všechny Cer typu A (Cer AS, Cer AP a Cer ADS včetně jejich nefyziologických diastereoizomerů; tabulka 1) byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie v rámci jiného projektu. Ostatní látky (FFA, Chol, CholS) včetně použitých rozpouštědel a další chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) a PENTA (Praha, Česká republika).

	 Lignoceric acid (N)	 2-Hydroxytetracosanoic acid (A)
 Sphingosine (S)	NS	AS (R) / AS (S)
 6-Hydroxysphingosine (H)	NH	-
 Phytosphingosine (P)	NP	AP (R) / AP (S)
 Dihydrosphingosine (dS)	NdS	AdS (R) / AdS (S)

Tabulka 1. Vybrané nesubstituované (nehydroxylované, N) a α -hydroxylované (A) Cer, které byly použity pro přípravu modelových lipidových membrán.

4.2 Příprava lipidových směsí a modelových lipidových membrán

Před samotnými permeačními pokusy bylo potřeba připravit lipidové směsi a následně z nich modelové membrány. Lipidové směsi, resp. modelové membrány obsahovaly ekvimolární množství Chol, FFA (směs mastných kyselin s délkou řetězce o

16, 18, 20, 22 a 24 uhlíků se zastoupením 1,8 %, 4,0 %, 7,6 %, 47,8 % a 38,8 %) a Cer. Z celkové hmotnosti modelové membrány tvořil 5% podíl CholS.

Přesně navážené směsi lipidů byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel hexan/ethanol 96% v poměru 2:1 tak, aby výsledná koncentrace lipidů ve vzniklém roztoku byla 4,5 mg/ml. Následně byly lipidové směsi nanášeny na filtry Nucleopore s průměrem pórů 15 nm. Tyto filtry byly umístěny v kovových držácích s kruhovým otvorem o průměru 1 cm. Lipidové směsi byly na tyto filtry nastříkávány pomocí přístroje Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švýcarsko). V jedné dávce bylo nanášeno 100 μ l lipidové směsi, přičemž na 1 membránu byly aplikovány 3 dávky (to odpovídá 1,35 mg lipidů v jedné membráně). Od každého typu Cer byly připraveny 4 modelové membrány. Pro změření rentgenové práškové difrakce byly jako nosný materiál namísto filtrů použity krycí sklička o rozměrech 22 x 22 mm. Nástřík lipidů byl proveden stejným způsobem jako v případě přípravy modelových membrán pomocí filtrů Nucleopore.

Modelové membrány (nebo sklička) v kovových držácích byly nejdříve vysušeny v exsikátoru, poté byly zahřáty v elektrické peci na 90 °C, tedy na teplotu nad hodnotou teploty fázového přechodu lipidů. Potom byly ponechány velmi pomalu (během 3-4h) vychladnout, čímž došlo k vytvoření lamelární struktury. Poté byly membrány uchovávány 24 h v termostatu při teplotě 32 °C, stejné teplotě, jaká je v kůži.

4.3 Měření permeačních parametrů

Změřením permeačních parametrů, kterými jsou ztráta vody přes membránu, elektrická impedance a kumulativní množství léčiv, si můžeme u jednotlivých Cer udělat představu o tom, jaké má daný Cer bariérové vlastnosti, resp. jak přispívá ke správné bariérové funkci kůže. Pro měření těchto 4 permeačních parametrů jsme připravené modelové membrány umístili do tzv. Franzových difúzních cel.

4.3.1 Franzovy difúzní cely

Modelová membrána se vkládá mezi svrchní a spodní díl Franzovy difúzní cely, která je zde umístěna do teflonových držáků. Franzova cela je následně naplněna definovaným objemem fosfátového pufru o pH 7,4. Kompletně sestavené cely jsou umístěny před permeačními pokusy do magnetické vany, která je naplněna vodou

zahřátou na 32 °C. Jak hodnota pH fosfátového pufru, tak teplota ve vodní lázni mají simulovat fyziologické podmínky, tj. podmínky ve zdravé kůži.

4.3.2 Měření ztráty vody přes membránu

Prvním měřeným permeačním parametrem byla relativní ztráta vody přes membránu, měřená přístrojem Tewameter® TM 300 a sondou a Multi Probe Adapter Cutometer® MPA 580 (CK electronic GmbH, Kolín, Německo). Tato sada je běžně používána pro měření epidermální ztráty vody (angl. *transepidermal water loss*; TEWL). Válcovitá hlava sondy byla horizontálně postupně přikládána k jednotlivým membránám potom, co byly odstraněny donorové Franzových difúzních cel. Bylo potřeba, aby na sondu byl vyvíjen konstantní tlak a proto byla hlava sondy před každým měřením podepřena ve správné výšce tak, aby celý obvod sondy byl umístěn okolo povrchu membrány. Po zahájení měření byl pomocí dvou párů senzorů měřen tlakový gradient vypařované vody. Na displeji Tewametru® bylo možné sledovat hodnoty udávané v jednotkách [g/h/m²] společně s odchylkou vypočítanou na základě jednotlivých změřených hodnot. Po základní době měření (přibližně 100 s) byla zaznamenávána výsledná hodnota, která představovala průměr všech hodnot naměřených v průběhu měření. Pokud byla odchylka vyšší než 0,2, bylo nutné prodloužit dobu měření, aby se zvýšil počet průběžných měření a tím došlo k zmenšení odchylky.

4.3.3 Měření elektrické impedance

Prvním krokem u měření elektrické impedance je nanesení 500 µl fosfátového pufru o pH 7,4 na každou modelovou membránu. Poté bylo přistoupeno k měření pomocí přístroje LCR 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo, měřící rozpětí 20 Ω - 10 MΩ, měřeno v hodnotách kΩ, chyby v hodnotách kΩ < 0,5%), který byl nastaven v paralelním režimu se střídavou frekvencí 120 Hz. Součástí přístroje jsou dvě sondy z nerezové oceli. Měření probíhalo tak, že jsme jednu sondu ponořili do naneseného pufru a druhou sondu za použití raménka do akceptorové části Franzovy difúzní cely. Tím byl uzavřen elektrický obvod a mohlo probíhat samotné měření. Podobně jako u měření relativní ztráty vody bylo možné z displeje LCR přístroje odečítat naměřené hodnoty. Po změření elektrické impedance byl pufru z membrán odstraněn pomocí celulózových přířezů a vatových tyčinek.

4.3.4 Měření permeability membrán pomocí modelových léčiv

Pro zjištění permeability, tedy propustnosti lipidových membrán pro různé látky z vnějšího prostředí, byly použity jako modelová léčiva theofylin (TH; $M_w = 180.164$ g/mol, $\log P \sim 0$), a indometacin (IND; $M_w = 357.787$ g/mol, $\log P \sim 4.3$). Na základě uvedených molekulových hmotností a hodnot $\log P$ je zřejmé, že pomocí TH byla sledována propustnost modelových membrán pro polárnější látky s menší molekulou a naopak IND, který má větší molekulovou hmotnost nám posloužil jako modelové léčivo pro studium permeability lipofilnějších látek.

4.3.4.1 Příprava vzorků modelových léčiv (TH a IND)

Vzorky modelových léčiv byly připraveny jejich navážením a následně naředěním 60% vodným roztokem propylén glykolu tak, aby výsledná koncentrace TH v suspenzi byla 5% (w/v) a koncentrace IND ve vzorku byla 2% (w/v). Takto připravené suspenze byly vloženy do termostatu vytemperovaného na 32 °C. Aby vzorky léčiv před jejich nanesením na lipidové membrány byly co nejvíce homogenní, byly vloženy na 5 minut do automatických třepaček.

4.3.4.2 Permeační pokusy

Abychom mohli sledovat propustnost modelových membrán pro modelová léčiva (TH a IND), byla aplikována do donorové části Franzových difúzních cel 100 μ l suspenze prvního modelového léčiva – TH. Následně byly odebírány po každých 2 hodinách z akceptorové části každé cely vzorky o objemu 300 μ l. Odebraný objem byl znovu navrácen v podobě stejného množství fosfátového pufru. Vzorky byly odebrány po 2, 4, 6, 8 a 10 hodinách. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a následných výpočtech, ve kterých byly zahrnuty i objemy fosfátového pufru z akceptorových částí difúzních cel, bylo zjišťováno kumulativní množství TH, které prošlo skrz membránu. Po provedení celého permeačního pokusu s TH byly nejen očištěny membrány od tohoto léčiva, ale byl vyměněn i celý obsah akceptorové části za čistý fosfátový pufr o specifickém objemu pro každou celu. Na takto ošetřených membránách byl následně proveden tentýž permeační pokus s IND.

4.3.4.3 *Hodnocení kumulativního množství léčiva prošlého přes membránu*

Množství prošlého léčiva bylo v odebraných vzorcích detekováno prostřednictvím HPLC, konkrétně pomocí přístroje Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) skládajícím se z pumpy LC-20AD s odplyňovače DGU-20A3, autodávkače SIL-20A HT, kolony CTO-20AC, detektoru SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20A. Data byla analyzována za použití software LCsolutions 1.22. Separace TH byla dosažena pomocí reverzní fáze na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5 μm , Merck, Darmstadt, Německo), jako mobilní fáze byla použita směs methanol/0,1 M NaH_2PO_4 v poměru 4:6 (v/v) a průtokové rychlosti, která činila 2ml/min. Měření UV absorbance bylo provedeno při vlnové délce 272 nm, přičemž retenční čas TH byl $3,2 \pm 0,1$ min. Vzorky obsahující IND byly analyzovány pomocí kolony LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5 μm , Merck) za použití mobilní fáze acetonitril/voda/kyseliny octová v poměru 90:60:5 (v/v/v) při průtokové rychlosti 2 ml/min. UV absorbance byla měřena při vlnové délce 260 nm a retenční čas IND byl $3,1 \pm 0,1$ min.

Na základě výsledných koncentrací zjištěných pomocí HPLC, které jsme zahrnuli do výpočtu, byla vyhodnocena kumulativní množství a také flux léčiv (permeantů), která prošla přes jednotlivé modelové membrány.

4.4 Vyhodnocování dat IR spektroskopie

Vzorky jednotlivých lipidových směsí byly proměřovány při teplotách od 28 – 100°C přístrojem Nicolet IMPACT 400D FTIR spektrometr (Thermo Scientific, Ontario, Kanada) vybaven MIRacle ATR ZnSe krystalem (PIKE Technologies, Madison, WI). Výsledná IR spektra byla vyhodnocována pomocí softwaru Bruker OPUS.

4.5 Vyhodnocování dat RPD

Samotné měření probíhalo ve spolupráci s pracovištěm na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Vzorky (sklíčka) byly měřeny práškovým difraktometrem X'Pert PRO θ - θ (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko) s $\text{CuK}\alpha$ zářením ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, $U = 40 \text{ kV}$, $I = 30 \text{ mA}$) v upravených držácích na vzorky přes úhlový rozsah 0.6 – 30° (2θ). Součástí přístroje byl i detektor X'Celerator s rozsahem

0.0167° (2θ). Data pak byla hodnocena pomocí softwarového balíčku X'Pert DataViewer (PANalytical B.V., Almelo, Holandsko).[39, 41]

4.6 Statistická analýza dat

Ke statistické analýze dat byla použita analýza rozptylu (ANOVA) s Dunnettovým post-hoc testem.

5. Výsledky

5.1 Výsledky permeačních pokusů

U každého měřeného permeačního parametru jsou výstupem čtyři grafy. V prvním grafu je možné sledovat vliv sfingoidní báze Cer na permeabilitu (Cer typu N). V následných třech dalších grafech jsou prezentovány výsledky Cer odvozených od stejné sfingoidní báze, a to Cer nehydroxylované v acylové části molekuly (N) i α -hydroxylované ((2'R)- a (2'S)-), tudíž je možné sledovat vliv přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 2 na acylu.

5.1.1 Výsledky měření ztráty vody

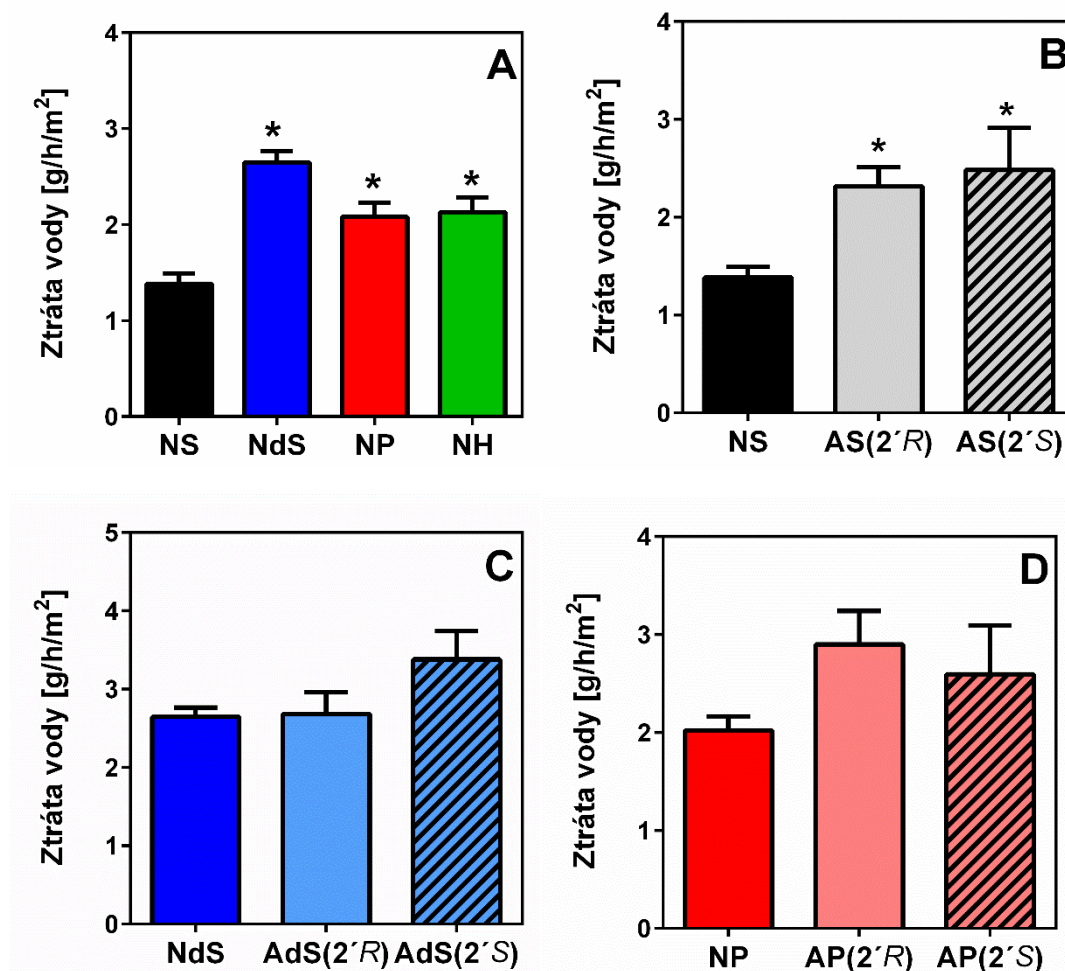
Při měření ztráty vody nebyla sonda TEWL metru přikládána přímo na membránu. Kvůli teflonovému držáku, ve kterém byla lipidová membrána vložena, byla sonda od membrány vzdálena 0,6 cm. Při vyhodnocování výsledků bylo potřeba tuto okolnost zohlednit. Proto každá hodnota odečtená z přístroje byla vynásobena konstantou 1,393. Tato hodnota byla zjištěna kalibrací samotných teflonových držáků. Měření každé membrány proběhlo dvakrát. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v jednotkách [g/m²/h].

V níže uvedeném grafu (Graf 1A) jsou porovnány výsledky měření ztráty vody u N Cer odvozených od všech čtyř sfingoidních bází, to znamená Cer NS, Cer NDS, Cer NP a Cer NH. U modelové membrány obsahující Cer NS byly naměřeny a následně vypočteny hodnoty 1,38±0,11 g/m²/h, u Cer NDS 2,65±0,12 g/m²/h, u Cer NP byly zjištěny hodnoty 2,08±0,15 g/m²/h a u Cer NH 2,13±0,15 g/m²/h. V porovnání s Cer NS se všechny ostatní Cer svými výslednými hodnotami statisticky významně odlišují (p < 0,05).

V dalším grafu (Graf 1B) jsou znázorněny výsledky měření ztráty vody u Cer odvozených od S, konkrétně Cer NS, Cer AS(2'R) a Cer AS(2'S). Průměrná hodnota Cer AS(2'R) je 2,32±0,20 g/m²/h a u Cer AS(2'S) 2,48±0,43 g/m²/h. Oba α -hydroxylované Cer jsou svými hodnotami statisticky významně odlišné od Cer NS (p < 0,05).

Porovnání výsledných hodnot ztráty vody u Cer odvozených od DS můžeme vidět na dalším grafu (Graf 1C). Sledovanými Cer v tomto grafu jsou Cer NDS, Cer ADS(2'R) a Cer ADS(2'S). Výsledná hodnota ztráty vody pro membránu obsahující Cer ADS(2'R) je 2,68±0,28 g/m²/h a Cer ADS(2'S) 3,38±0,36 g/m²/h.

Poslední graf (Graf 1D) srovnává výsledky měření ztráty vody pro membrány obsahující Cer odvozeny od P. Hodnota ztráty vody pro membránu s Cer AP(2'R) byla $2,90 \pm 0,34 \text{ g/m}^2/\text{h}$ a pro membrány s Cer AP(2'S) byla zjištěna hodnota $2,59 \pm 0,50 \text{ g/m}^2/\text{h}$.



Graf 1A, 1B, 1C, 1D. Výsledky měření ztráty vody membránou. * značí statisticky významné zvýšení ztráty vody ($p < 0,05$). Data jsou vyjádřena jako průměr všech naměřených hodnot (n) \pm standardní chyba průměru (SEM); $n = 8-28$.

5.1.2 Výsledky měření elektrické impedance

Výše popsaným způsobem (kap. 4.3.3) byly postupně naměřeny hodnoty elektrické impedance všech modelových membrán. Hodnoty odečtené z přístroje LCR metr byly nejdříve vynásobeny hodnotou 0,5 a následně zaznamenávány v jednotkách [$\text{k}\Omega \times \text{cm}^2$]. Každá membrána byla proměřena minimálně dvakrát.

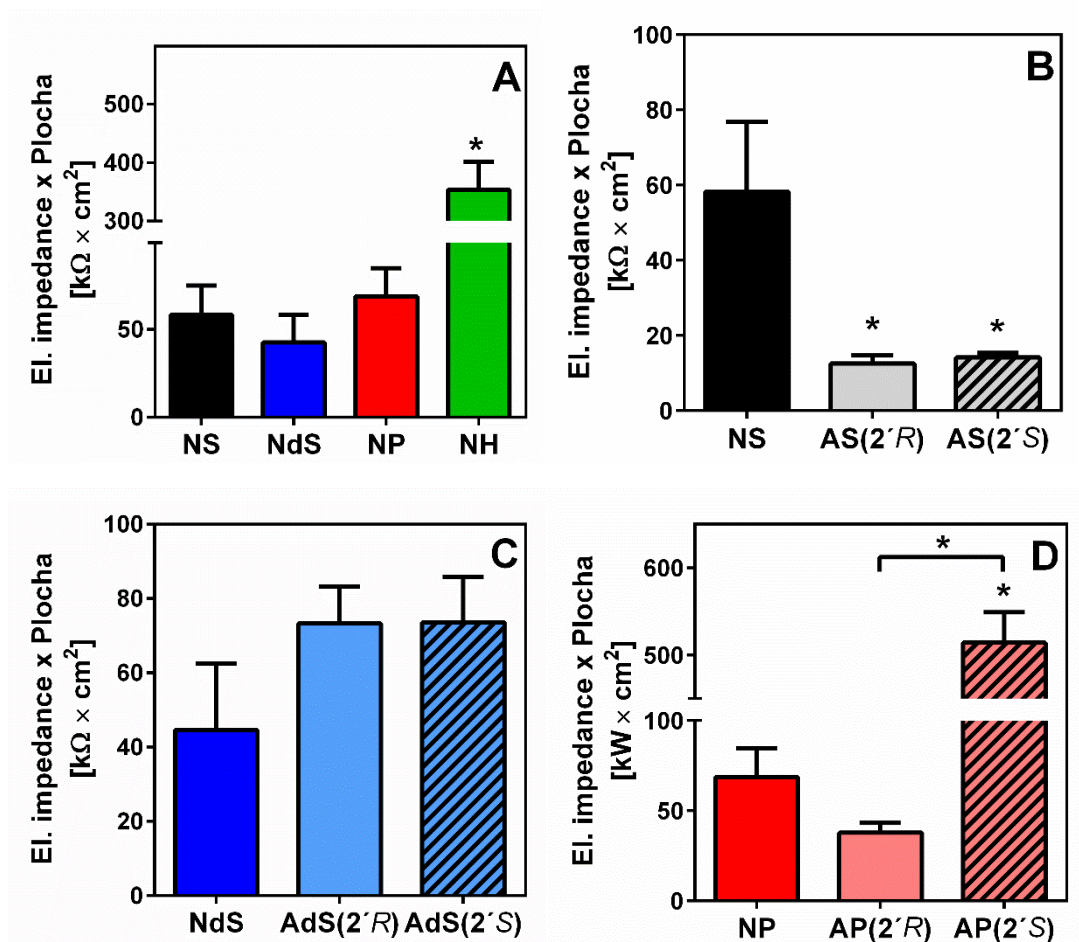
V prvním grafu (Graf 2A) je možné porovnat výsledné hodnoty elektrické impedance u N Cer. Elektrická impedance Cer NS je $58,10 \pm 16,65 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, Cer NDS $42,59 \pm 15,69 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a Cer NP $68,59 \pm 16,03 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Statisticky významně odlišnou

hodnotou ($p < 0,05$) od všech zmíněných hodnot je hodnota elektrické impedance Cer NH, která je několikanásobně vyšší, a která činí $353,40 \pm 47,79 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$.

Výsledné hodnoty elektrické impedance pro membrány obsahující Cer odvozené od S jsou zaznamenány v dalším grafu (Graf 2B). Hodnoty obou α -hydroxylovaných Cer jsou srovnatelné, ale zároveň statisticky významně nižší od Cer NS ($p < 0,05$). Výsledná hodnota Cer AS(2'R) je $12,53 \pm 2,20 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a Cer AS(2'S) je $14,19 \pm 1,13 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$.

Třetí graf (Graf 2C) srovnává výsledky elektrické impedance pro membrány obsahující Cer s DS ve své molekule. Průměrná výsledná hodnota elektrické impedance u Cer ADS(2'R) je $73,31 \pm 9,95 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$ a u jeho S diastereoizomeru (ADS(2'S)) je $73,57 \pm 12,29 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$.

V posledním grafu (Graf 2D) jsou znázorněny výsledky měření elektrické impedance u membrán obsahující Cer odvozených od P. U této skupiny Cer je zaznamenána první statisticky významná odlišná hodnota ($p < 0,05$) mezi diastereoizomery. Na rozdíl od výsledné hodnoty Cer AP(2'R), která činí $37,88 \pm 5,32 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$, je výsledná hodnota jeho S izomeru více než desetinásobně vyšší, konkrétní hodnota průměrné elektrické impedance Cer AP(2'S) je $514,20 \pm 34,91 \text{ k}\Omega \times \text{cm}^2$. Zároveň je tato hodnota staticky významně odlišná ($p < 0,05$) i od výsledné hodnoty Cer NP.



Graf 2A, 2B, 2C, 2D. Výsledky měření elektrické impedance. * značí statisticky významné zvýšení ztráty vody ($p < 0,05$). Data jsou vyjádřena jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 8-37$).

5.1.3 Výsledky měření permeability membrán pro TH

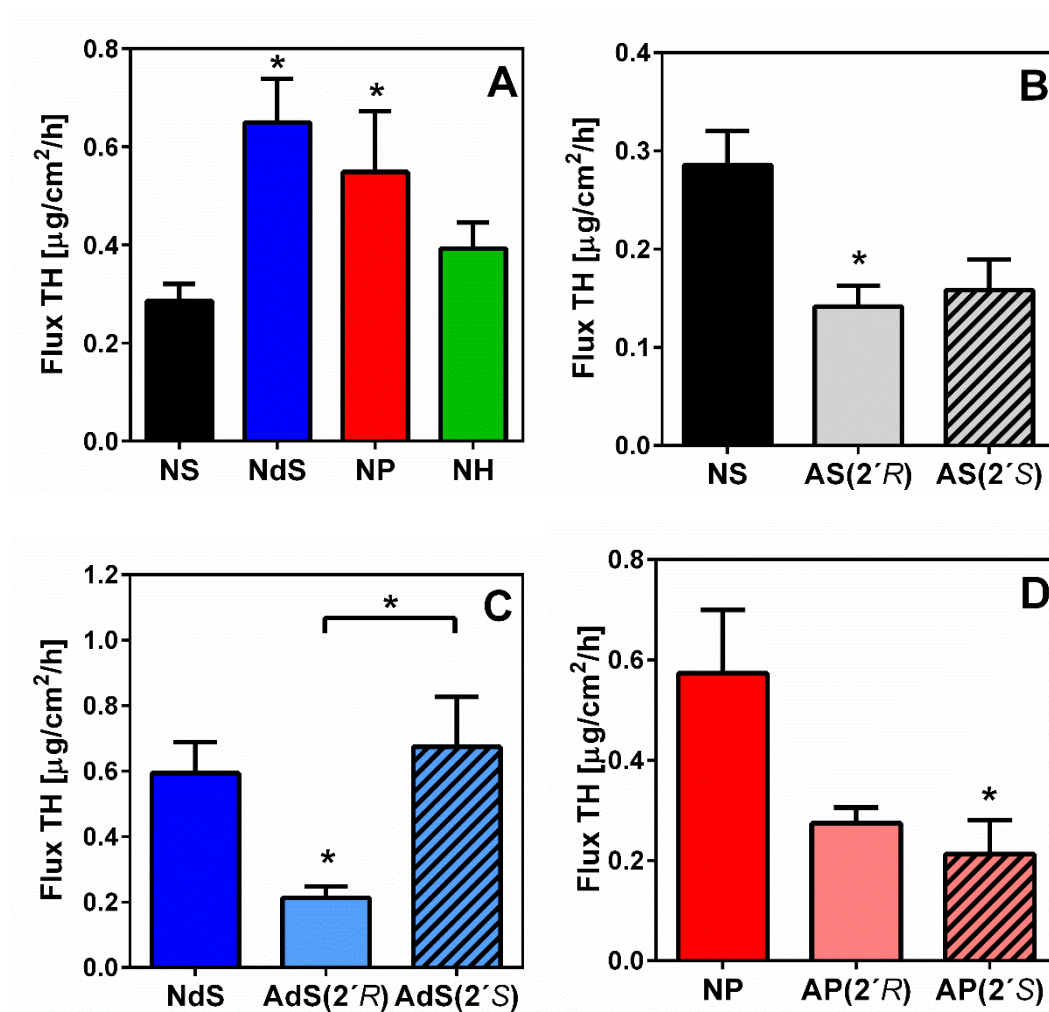
Výsledné hodnoty prostupnosti modelových lipidových membrán pro TH byly stanoveny na základě hodnot koncentrací léčiva prošlého skrze membránu, které byly zjištěny pomocí HPLC v jednotlivých vzorcích. Z hodnot koncentrací léčiva v jednotlivých časových intervalech se vypočítá kumulativní množství léčiva.

Další veličina používaná pro vyjádření propustnosti membrány pro TH je tzv. flux léčiva. Flux léčiva je počítán jako směrnice přímky vzniklé lineární regresi kumulace léčiva v závislosti na čase. Jeho hodnoty pro jednotlivé typy N Cer můžeme sledovat v grafu (Graf 3A). Nejmenší hodnoty byly naměřeny a vypočítány u Cer NS a Cer NH, $0,29 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a $0,39 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Zbylé dva Cer vykazují od těchto Cer nižší a zároveň statisticky významně odlišné výsledné hodnoty ($p < 0,05$). Hodnota fluxu TH Cer NDS je $0,65 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a Cer NP $0,59 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Výsledné fluxy TH pro membrány obsahující Cer se *S* v molekule jsou znázorněny v dalším grafu (Graf 3B). α -Hydroxylované Cer podle těchto výsledků propouštějí méně léčiva oproti N Cer. I přesto, že výsledky obou diastereoizomerů jsou srovnatelné, podle námi nastavené analytické metody je statisticky významně odlišná ($p < 0,05$) pouze výsledná hodnota *R* izomeru, která je $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Hodnota výsledného fluxu TH u *S* diastereoizomeru je $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Nejnižší hodnotu fluxu TH, $0,21 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, mezi Cer odvozenými od DS vykazuje Cer ADS(2'*R*) (Graf 3C). Tato hodnota je statisticky významně odlišná ($p < 0,05$) od výsledné hodnoty Cer NDS i Cer ADS(2'*S*). Naměřená a vypočítaná hodnota fluxu TH u Cer ADS(2'*S*) je $0,67 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Podobná závislost mezi výslednými hodnotami jako byla vypořizována u Cer odvozených od *S*, je možné sledovat i u Cer odvozených od *P*, s tím rozdílem, že statisticky významně odlišná hodnota ($p < 0,05$), $0,21 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, byla zjištěna u *S* diastereoizomeru. Hodnota fluxu TH u Cer AP(2'*R*) je $0,27 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.



Graf 3A, 3B, 3C, 3D. Výsledky měření permeability membrán pro TH. * značí statisticky významné zvýšení ztráty vody ($p < 0,05$). Data jsou vyjádřena jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 6-20$).

5.1.4 Výsledky měření permeability membrán pro IND

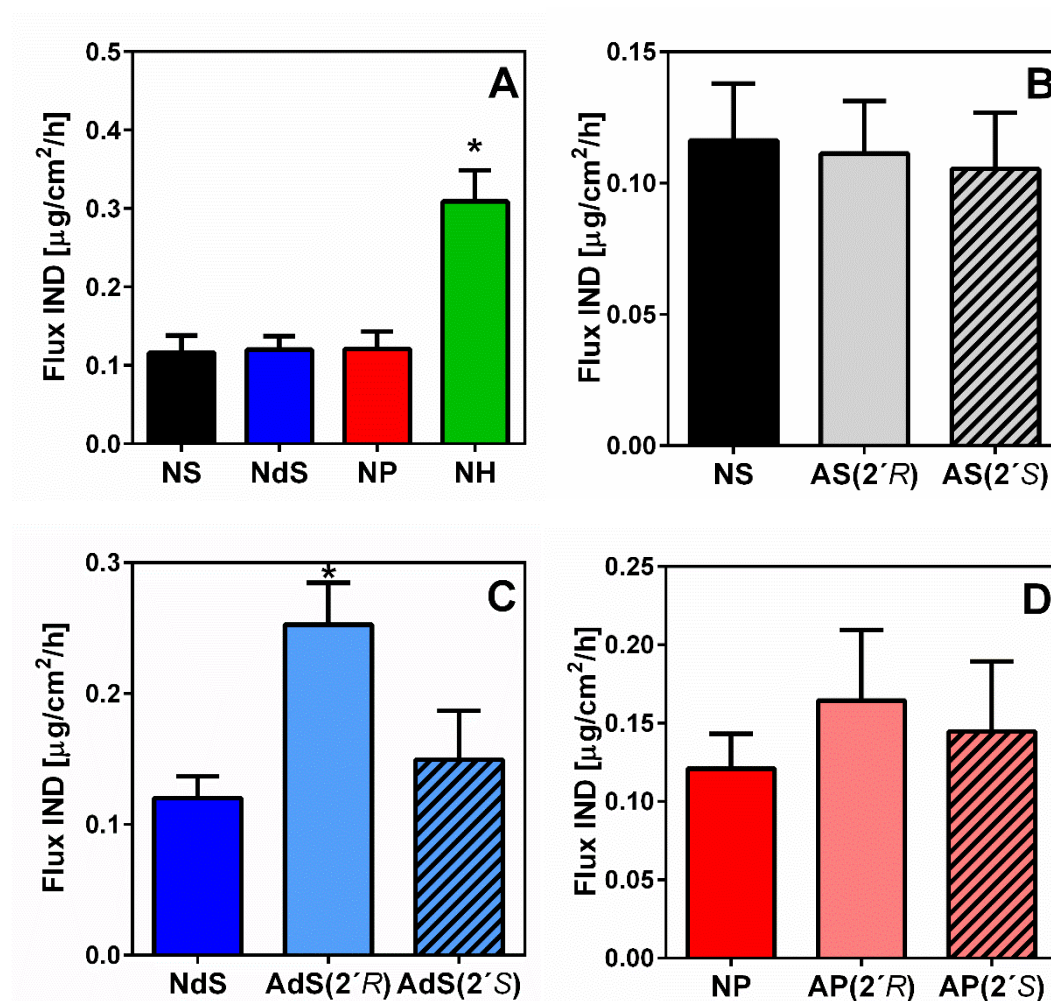
Hodnocení propustnosti modelových membrán pro IND (lipofilnějšího a většího léčiva) probíhalo stejným způsobem jako u TH. Výsledky jsou opět prezentovány pomocí grafů, v nichž je zobrazen flux IND.

Největší propustnost pro IND mezi N Cer (Graf 4A) byl nalezen u Cer NH, jehož flux je $0,31 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Ostatní Cer zahrnutý do toho grafu vykazují velice podobné výsledky. Flux membrány obsahující Cer NS činí $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, Cer NDS $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a Cer NP $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Velice podobné výsledné fluxy IND byly zaznamenány u membrán obsahující Cer odvozené od S (Graf 4B). Hodnota fluxu Cer AS(2'R) je $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a Cer AS(2'S) $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

V dalším grafu (Graf 4C) jsou porovnány hodnoty fluxů IND u Cer odvozených od DS. Můžeme na tomto grafu vidět statisticky významně odlišnou hodnotu ($p < 0,05$), $0,25 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, u Cer ADS(2'R). Cer ADS(2'S) vykazoval výsledný flux $0,15 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

V posledním grafu (Graf 4D) jsou znázorněny výsledné hodnoty fluxu IND u Cer odvozených od P. Výsledná hodnota fluxu IND pro Cer AP(2'R) je $0,16 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a pro Cer AP(2'S) $0,15 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.



Graf 4A, 4B, 4C, 4D. Výsledky měření permeability membrán pro IND. * značí statisticky významné zvýšení ztráty vody ($p < 0,05$). Data jsou vyjádřena jako průměr všech naměřených hodnot ($n \pm \text{SEM}$; $n = 6-19$).

5.2 Výsledky IR spektroskopie

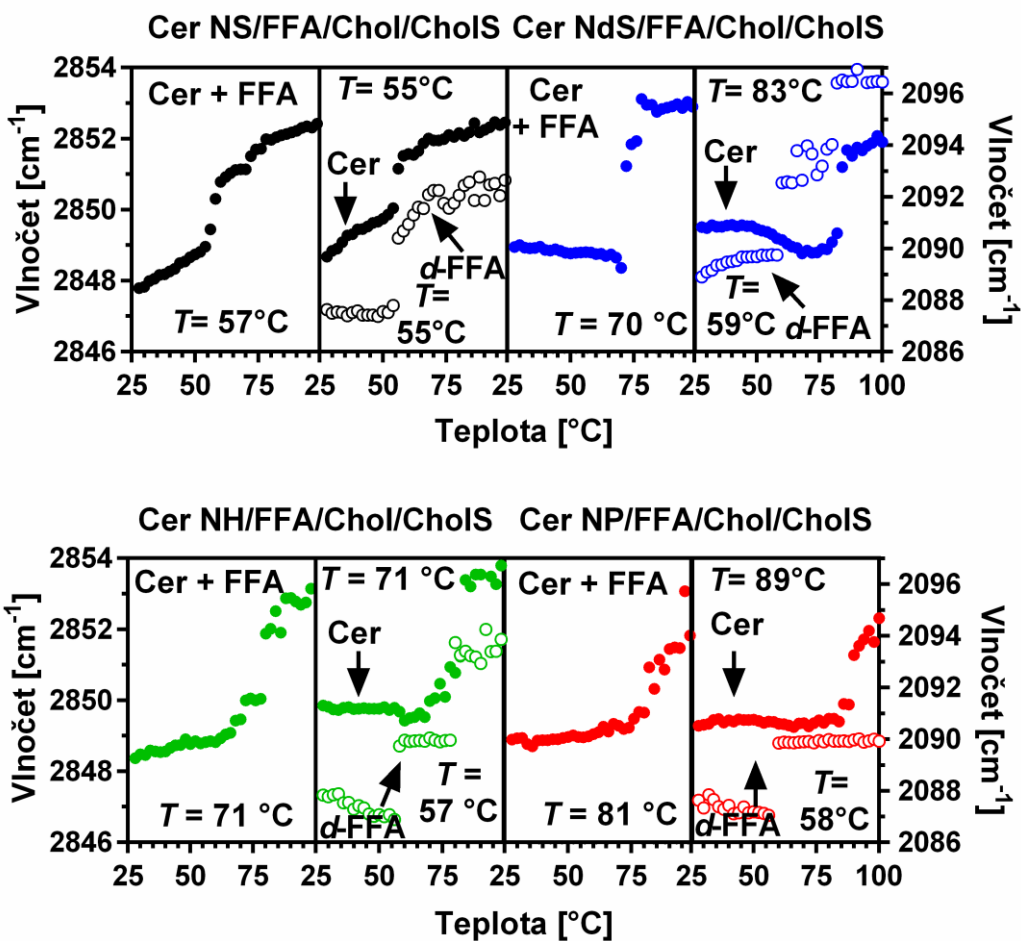
5.2.1 Symetrické valenční vibrace – fázové přechody lipidů v modelových membránách

Pomocí symetrických valenčních methylenových vibrací můžeme sledovat vliv struktury Cer na konformaci lipidových řetězců. Pomocí změny konformace v závislosti na teplotě také určit teplotu fázového přechodu (tj. teplotu, kdy dojde k desorganizaci lipidových řetězců) a tedy i relativní velikost přitažlivých sil v jednotlivých modelových membránách. Co se týče konformací lipidových řetězců při teplotě kožního povrchu, tj. 32 °C, ve všech membránách jsou řetězce dobře uspořádány.

V rámci hodnocení IR spekter byl pro každý Cer vypracován graf, ve kterém je možné sledovat závislost vlnočtu na teplotě. Hodnota výsledného teplotního fázového přechodu je pro zjednodušení námi vyjádřená jako teplota, při níž naměřený vlnčet poprvé přesáhne hodnotu 2850 cm⁻¹ u CH₂ a 2090 cm⁻¹ u CD₂ řetězců. Graf každého Cer je rozdělen na dvě části. V první je znázorněn teplotní fázový přechod pro směs Cer a FFA, a v druhé části je možné sledovat teplotní fázový přechod zvlášť pro Cer a zvlášť pro FFA, čehož bylo dosaženo pomocí proměření membrán, které obsahovaly místo klasické směsi FFA směs deuterovaných FFA (d-FFA).

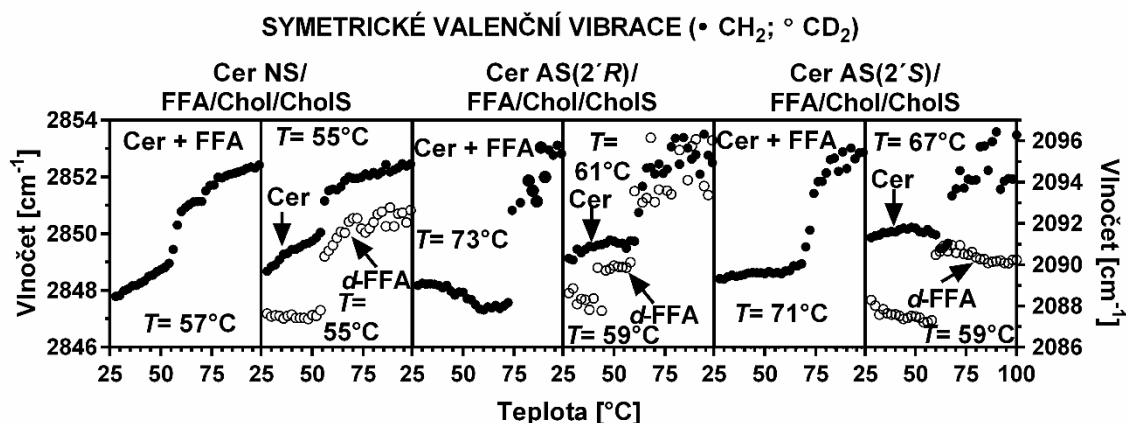
Jednotlivé teplotní fázové přechody membrán s N Cer jsou znázorněny v grafu (Graf 5). K fázovému přechodu ve směsi Cer NS a FFA dochází při 57 °C, u Cer NS stejně jako u samotných d-FFA dochází k fázovému přechodu při 55 °C. Poněkud vyšší hodnoty fázového přechodu je možné sledovat u Cer NDS. Výsledná teplota u směsi Cer NDS a FFA je 70 °C, u Cer NDS 83 °C a u d-FFA 59 °C. U směsi Cer NH a FFA dochází k fázovému přechodu při 71 °C stejně jako u samotného Cer NH, pro d-FFA byla naměřena výsledná hodnota teplotního fázového přechodu 57 °C. Nejsilnější přitažlivé síly byly tímto experimentem zjištěny u modelových membrán obsahující Cer NP. Pro směsi Cer NP a FFA výsledná hodnota fázového přechodu činí 81 °C, pro samotný Cer NP 89 °C a pro d-FFA 58 °C.

SYMETRICKÉ VALENČNÍ VIBRACE (\bullet CH₂; \circ CD₂)



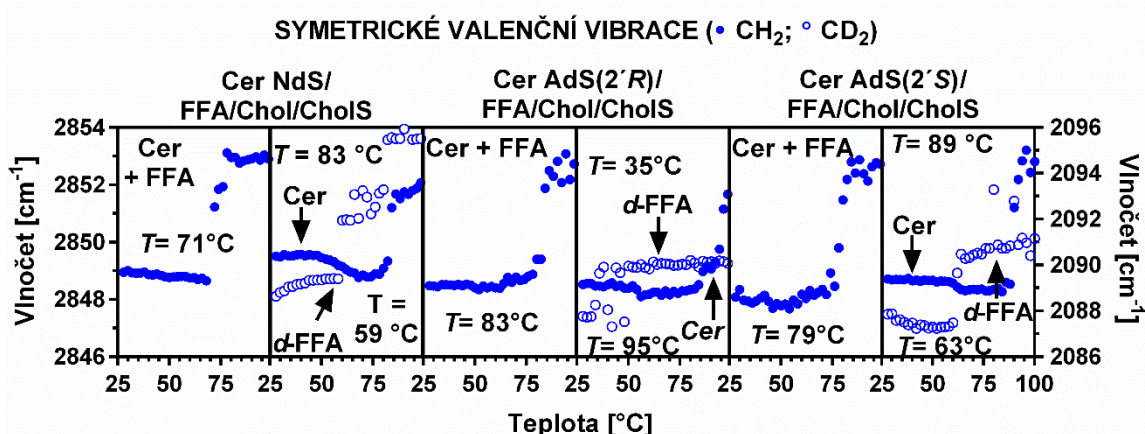
Graf 5. Teplotní fázové přechody modelových membrán obsahujících N Cer. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat teplotní fázový přechod samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu). T značí teplotní fázový přechod.

Teplotní fázové přechody lipidových membrán připravených s Cer odvozenými od S je možné sledovat v grafu (Graf 6). Směs Cer AS(2'R) a FFA vykazuje výslednou hodnotu teplotního fázového přechodu 73 °C, samotný Cer AS(2'R) 61 °C a d-FFA 59 °C. Fázový přechod u směsi Cer AS(2'S) a FFA nastává při 71 °C, u Cer AS(2'S) při 67 °C a u d-FFA při 59 °C.



Graf 7. Teplotní fázové přechody modelových membrán obsahujících A Cer odvozené od S. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat teplotní fázový přechod samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu). T značí teplotní fázový přechod.

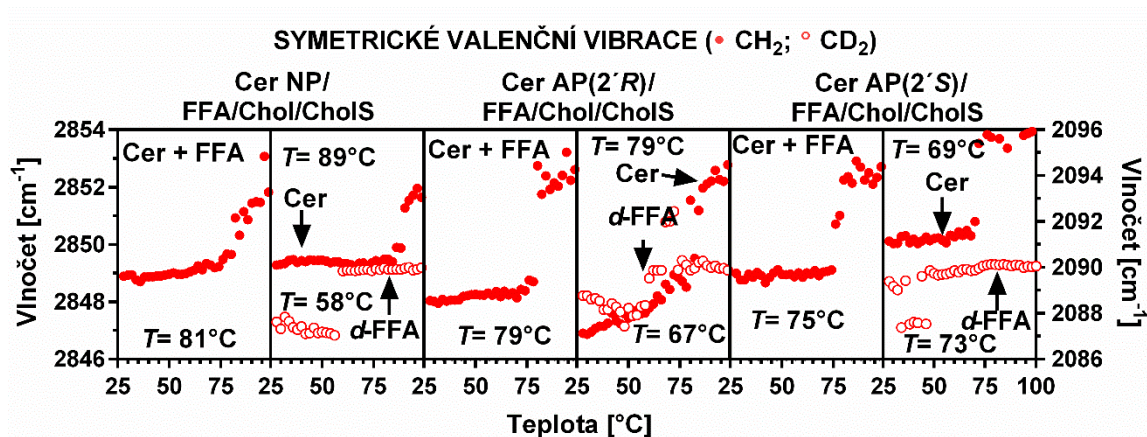
V grafu 7 jsou znázorněny jednotlivé teploty fázových přechodů modelových membrán obsahující Cer odvozené od DS. Uspořádaná struktura směsi Cer ADS(2'R) a FFA se rozpadá při 83 °C; u Cer ADS(2'R) při 95 °C a u samotných d-FFA při 59 °C. Hodnoty fázového přechodu naměřené u membrán, ve kterých byl přítomen S-diastereoizomer Cer ADS jsou 79 °C u směsi Cer a FFA, 89 °C u Cer ADS(2'S) a 63 °C u d-FFA.



Graf 7. Teplotní fázové přechody modelových membrán obsahujících Cer odvozené od DS. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci

FFA, kdy v této části můžeme sledovat teplotní fázový přechod samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu). T značí teplotní fázový přechod.

V posledním grafu v této kapitole (Graf 8) jsou znázorněny teplotní fázové přechody Cer modelových membrán s Cer NP, Cer AP(2'R) a Cer AP(2'S), tedy s Cer odvozených od P. Fázový přechod při 79 °C nastává jak u směsi Cer AP(2'R) a FFA tak i u samotného Cer, u samotných d-FFA fázový přechod nastává při 59 °C. Teplotní fázový přechod pro směs Cer AP(2'S) a FFA je 75 °C, pro samotný Cer AP(2'S) 71 °C a pro samotné d-FFA 72 °C.



Graf 8. Teplotní fázové přechody modelových membrán obsahujících Cer odvozené od P. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat teplotní fázový přechod samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu). T značí teplotní fázový přechod.

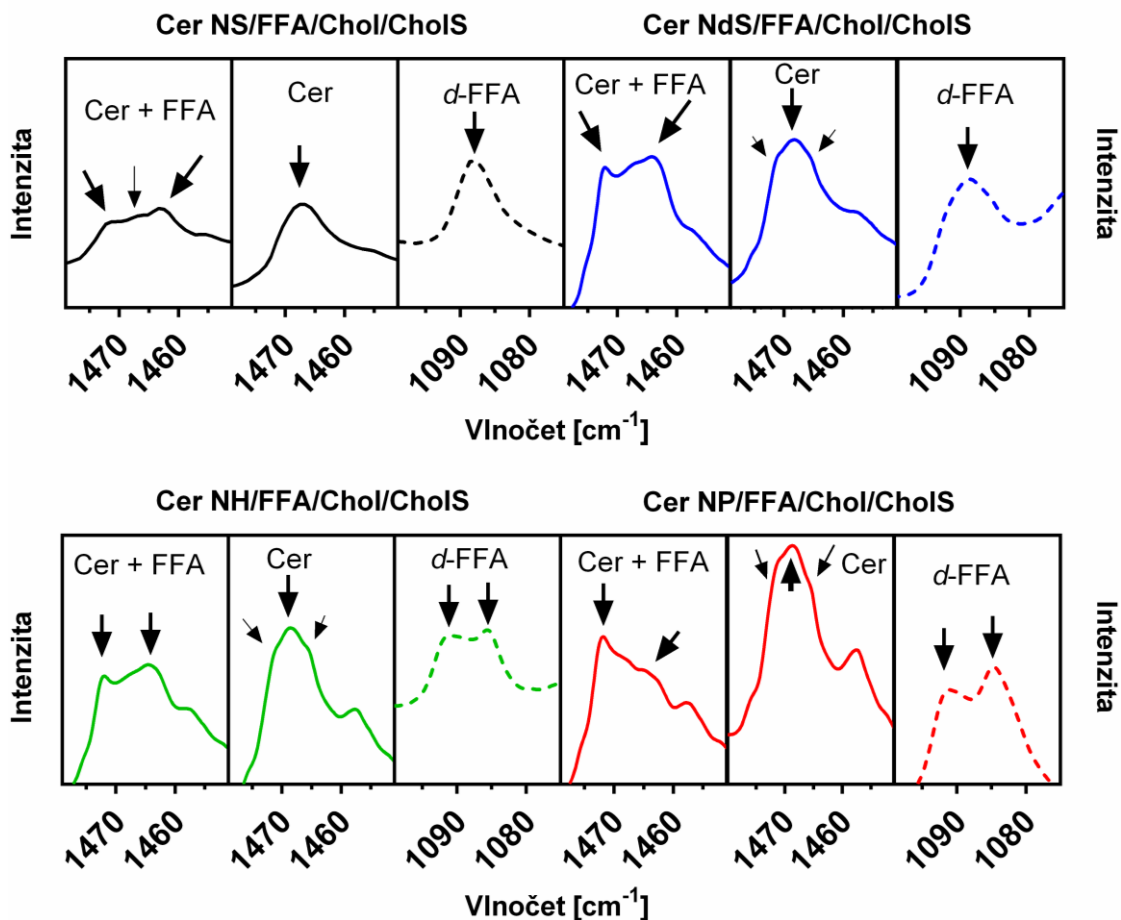
5.2.2 Nůžkové vibrace – laterální uspořádání a mísitelnost lipidů v modelových membránách

Druhým typem vibrací IR spektroskopie, které jsem studovala, jsou nůžkové methylenové vibrace, které nám společně s valenčními vibracemi pomáhají si utvořit představu o mikrostruktuře lipidových membrán. Z nůžkových vibrací lze zjistit laterální uspořádání (orthorhombické či hexagonální) a pomocí selektivní deuterace vzájemnou mísitelnost Cer a FFA.

V rámci hodnocení každého typu modelové membrány v závislosti na typu přítomného Cer jsem připravila dva typy grafů. První graf znázorňuje nůžkové vibrace lipidů v membráně při 32 °C, což je fyziologická teplota kůže. Tento graf je pro každou membránu rozdělen na tři části. První část popisuje membránu s nedeuterovanými lipidy a popisuje laterální uspořádání – pokud je přítomný dublet, jsou lipidové řetězce ve velmi těsném orthorhombickém uspořádání, pokud vidíme pouze singlet, jde o mírně volnější uspořádání hexagonální. Ve většině našich membrán vidíme koexistenci orthorhombického a hexagonálního uspořádání. Druhá a třetí část grafu téže barvy znázorňují membránu, kde byly FFA nahrazeny deuterovanými FFA. Tyto grafy vypovídají o laterálním uspořádání samotných molekul Cer a FFA.

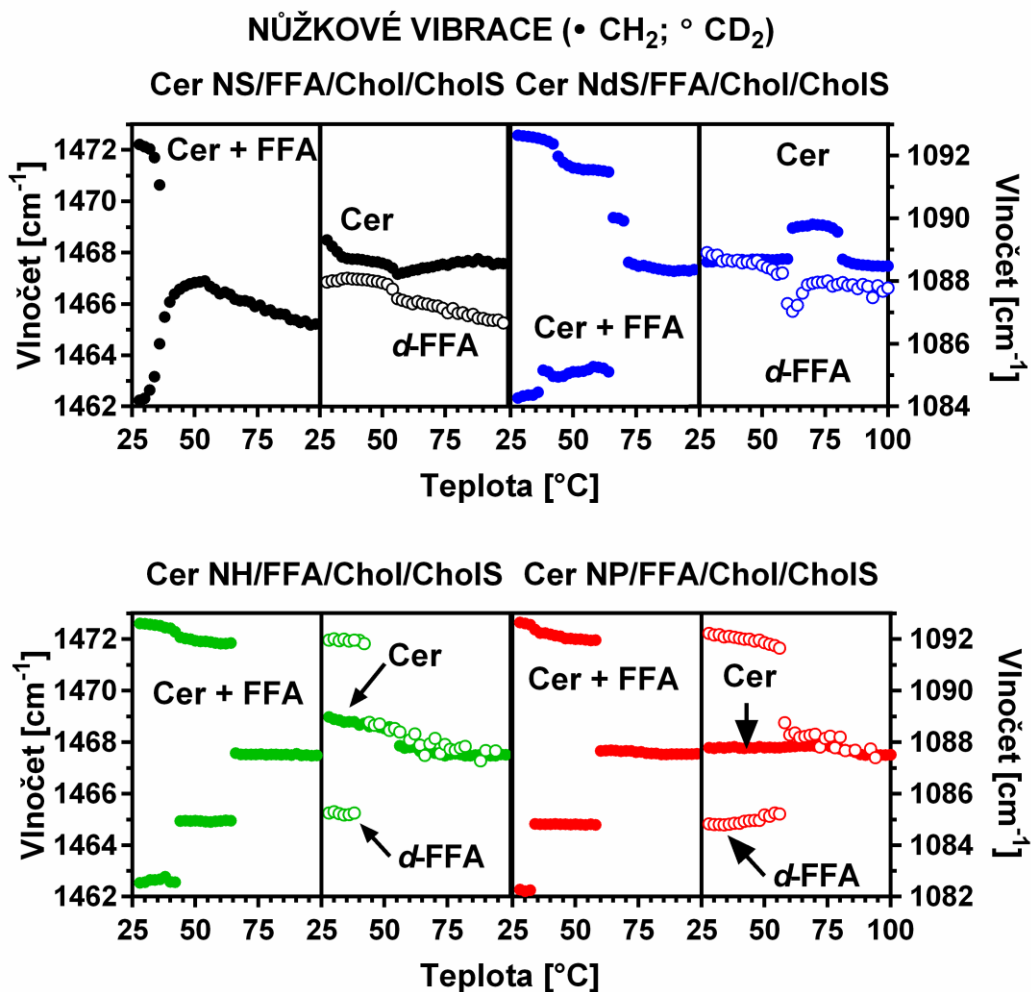
Druhý graf je sestaven jako závislost vlnočtu nůžkových methylenových vibrací na teplotě, která je při měření nastavena v rozmezí 25-100 °C, můžeme tedy na základě tohoto grafu sledovat teplotní průběh laterálního uspořádání v jednotlivých membránách. Tento graf se od prvního typu grafu liší tím, že je rozdělen pouze na dvě části; v první části vidíme neznačenou membránu, tj. uspořádání všech lipidů a v druhé části můžeme sledovat hodnoty nůžkových vibrací samotného Cer a samotných FFA pohromadě. Hodnoty nůžkových vibrací pro CH₂ jsou zaznamenávány v rozmezí 1462-1472 cm⁻¹, hodnoty nůžkových vibrací pro CD₂ jsou pak zaznamenávány v rozmezí 1080-1090 cm⁻¹. Výsledky jsou prezentovány formou komentáře, zda se v jednotlivých částech grafů vyskytuje singlet, kdy je v daném rozmezí rozpoznán pouze jeden zřetelný signál nebo dublet, kdy jsou v daném rozmezí rozpoznány dva zřetelné signály. Na základě přítomnosti singletů a dubletů je možné vyvodit závěry o mísitelnosti jednotlivých Cer s ostatními lipidy.

První série grafů (Obr. 4) znázorňuje nůžkové vibrace při 32 °C v membránách obsahujících N Cer. V případě membrán s Cer NS a Cer NDS je možné vidět dublet ve směsi Cer s FFA, singlety u Cer a samotných *d*-FFA. Směs Cer NH s FFA a samotné *d*-FFA v membránách obsahujících Cer NH vykazují dublety a samotný Cer NH vykazuje singlet s méně výraznými začínajícími dalšími signály. Dublety jsou pozorovány u směsi Cer NP s FFA a samotných *d*-FFA, přičemž u samotného Cer NP je přítomen singlet.



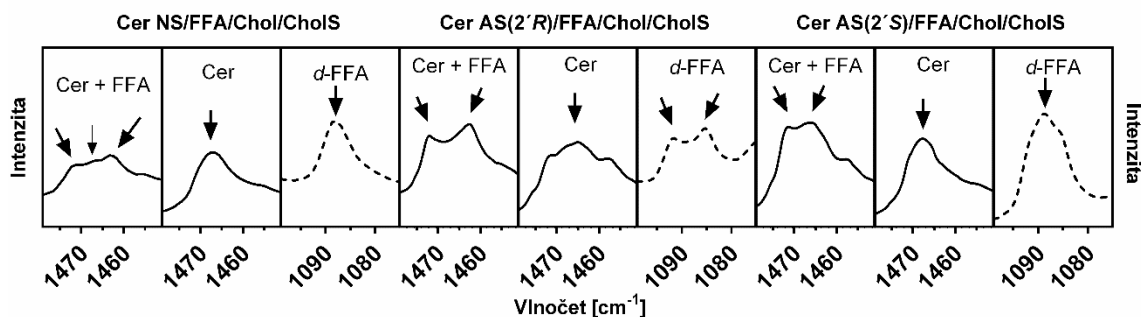
Obrázek 4. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahujících N Cer změřené při 32 °C.

Další série grafů (Obr. 5) opět znázorňuje výsledné nůžkové vibrace u N Cer, ale v tomto případě se jedná o grafy znázorňující jejich celkový vývoj v průběhu konstantního zvyšování teploty. Do 36 °C je u směsi Cer NS s FFA sledován dublet, který se po překročení zmíněné teploty slévá do singletu. Jak samotný Cer NS, tak i samotné d-FFA v rámci celé teplotní škály vykazovaly singlety. Stejně výsledky byly naměřeny i u modelových membrán obsahující Cer NDS, ale ke slítí dubletu do singletu došlo při 66 °C. Cer NH ve směsi s FFA vykazoval dublet do 64 °C, u samotného Cer NH v celém rozmezí teplot byl sledován singlet a d-FFA vykazovaly singlet od 40 °C. U směsi Cer NP s FFA a u samotných d-FFA bylo vypořádováno, že se původně přítomný dublet při určité teplotě slil do singletu. U Cer s FFA k tomu došlo při 60 °C a u samotných d-FFA při 58 °C. U samotného Cer NP



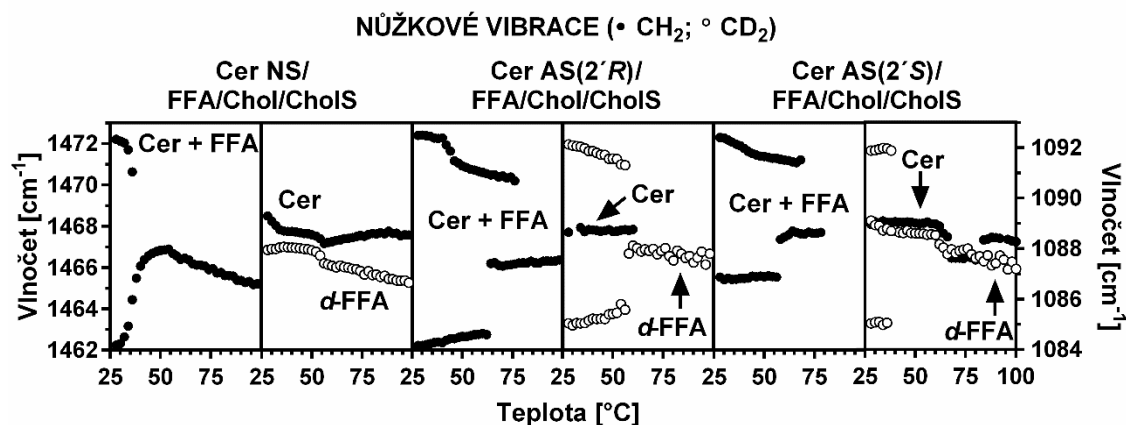
Obr. 5. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující N Cer změřené v rozmezí 25-100°C. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat nůžkové vibrace samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu).

V pořadí třetí série grafů (Obr. 6) jsou znázorněny nůžkové vibrace při 32 °C zaznamenané u membrán obsahující Cer odvozené od S. Cer AS(2'R) a AS(2'S) se od sebe liší pouze v případě třetí části grafu, kde je možné sledovat mísitelnost samotných d-FFA, kdy v případě R-izomeru vidíme dublet a v případě S-izomeru singlet. V první části grafu, který znázorňuje mísitelnost Cer s FFA, u obou izomerů pozorujeme dublety a v částech grafu popisujících mísitelnost Cer jsou přítomny singlety.



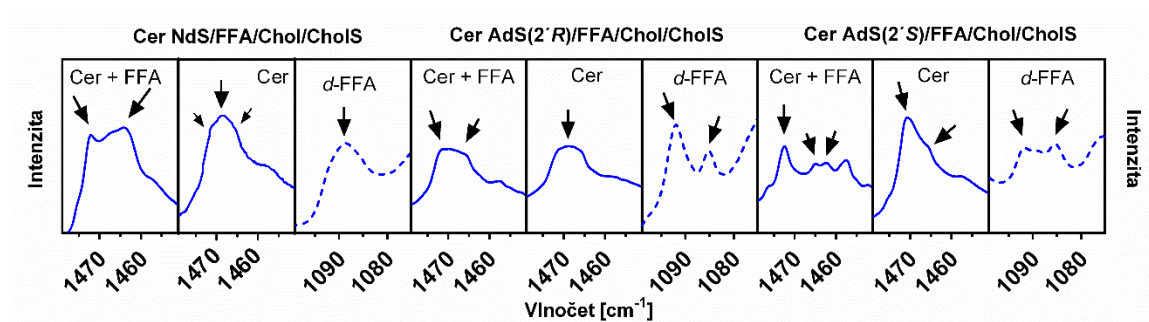
Obr. 6. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od S změřené při 32°C.

V následujících grafech (Obr. 7) jsou opět znázorněny nůžkové vibrace týkající se stejných Cer jako v obrázku předešlém s tím rozdílem, že v nich sledujeme vibrace v teplotním rozmezí 25-100 °C. U směsi Cer AS(2'R) s FFA byl zaznamenán dublet do teploty 78 °C, který následně přešel v singlet, U samotných d-FFA pozorujeme dublet do 58 °C. V případě samotného Cer byl v průběhu celého měření změřen pouze singlet, přičemž tentýž průběh je sledován i u samotného Cer AS(2'S). V první části grafu, u směsi Cer AS(2'S) a FFA přechází dublet v singlet při teplotě 70 °C a u samotných d-FFA při teplotě 40 °C.



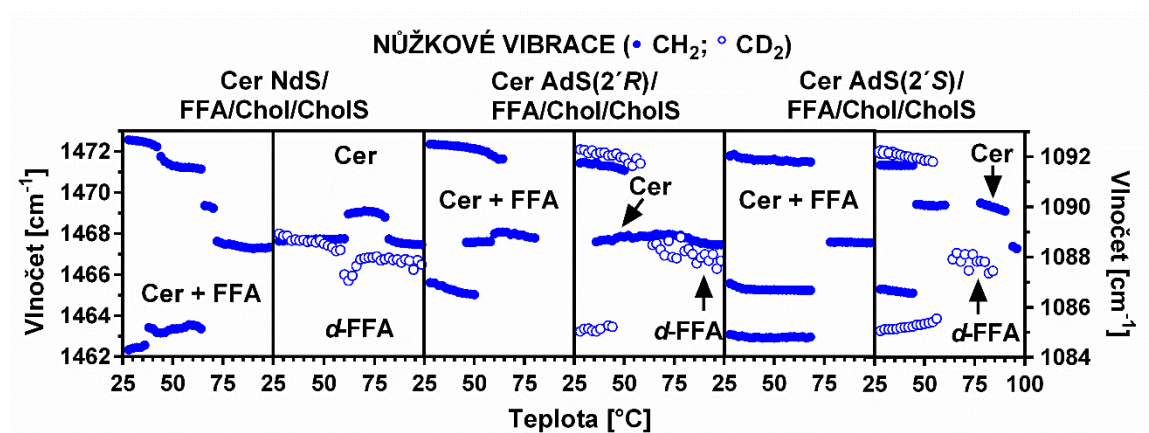
Obr. 7. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od S změřené v rozmezí 25-100 °C. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat nůžkové vibrace samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu).

Nůžkové vibrace zaznamenané při 32 °C u modelových lipidových membrán s Cer odvozenými od DS jsou znázorněny v další sérii grafů (Obr. 8). U obou měřených směsí Cer s FFA byly sledovány dublety, v případě směsi s Cer ADS(2'S) se dokonce jedná o začínající triplet. U obou měření d-FFA byl pozorován dublet. V případě samotného Cer ADS(2'R) byl při 32 °C naměřen singlet, kdežto u Cer ADS(2'S) dublet.



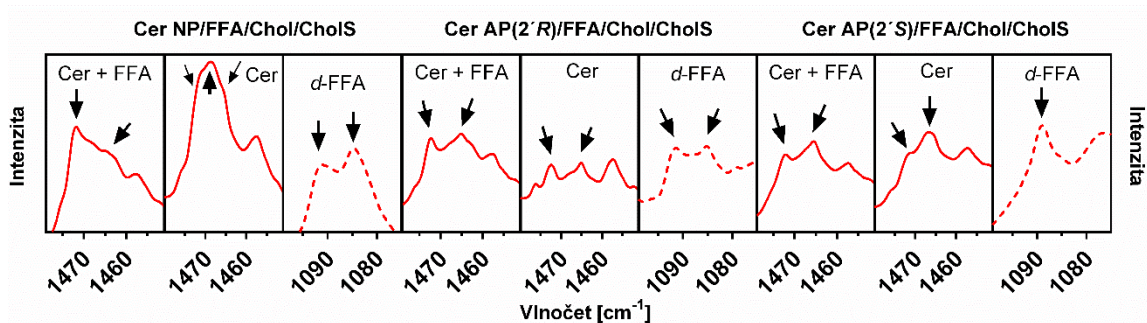
Obr. 8. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od DS změřené při 32°C.

Teplotní vývoj nůžkových vibrací u stejných typů lipidových membrán popisují následující grafy (Obr. 9). Cer ADS(2'R) s FFA vykazoval dublet do 66 °C, samotný Cer do 52 °C a d-FFA do 46 °C, a následně se všechny dublety slily do singletu. U Cer ADS(2'S) s FFA došlo ke změně mísitelnosti při 78 °C, u samotného Cer při 46 °C a u d-FFA při 56 °C.



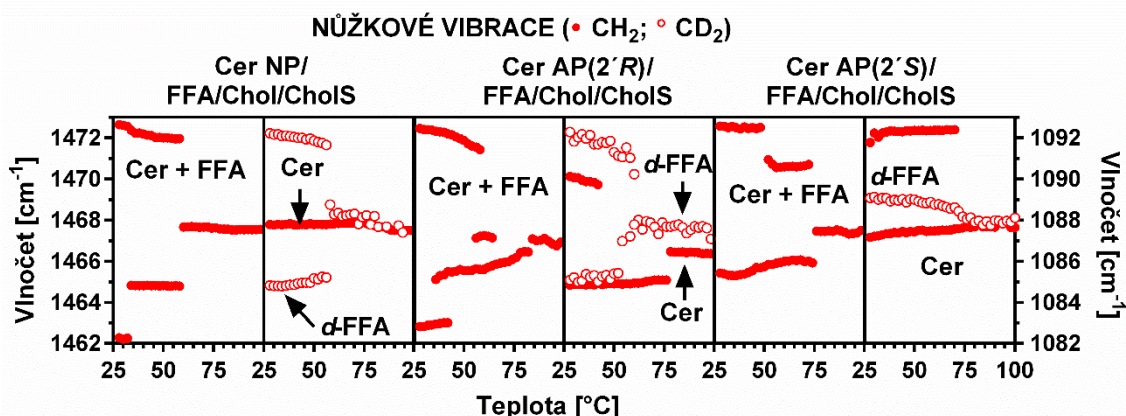
Obr. 9. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od DS změřené v rozmezí 25-100 °C. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězcí popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězcí FFA, kdy v této části můžeme sledovat nůžkové vibrace samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu).

Mísitelnost jednotlivých lipidů při 32 °C byla zkoumána i v membránách obsahujících Cer odvozené od P, výsledky je možné pozorovat v níže uvedených grafech (Obr. 10). Jak u směsi Cer AP(2'R) s FFA a samotného Cer AP(2'R), tak i u směsi Cer AP(2'S) a samotného Cer AP(2'S) byly zaznamenány při 32 °C dublety. Dublet byl pozorován i u samotných d-FFA v membránách s Cer AP(2'R). V poslední části grafu, tedy v části, která znázorňuje mísitelnost samotných d-FFA obsažených v membránách s Cer AP(2'S), byl změřen singlet.



Obr. 10. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od P změřené při 32°C.

V poslední sérii grafů této kapitoly (Obr. 11) je možné sledovat nůžkové vibrace u stejných typů membrán při teplotách 25-100 °C. Ke slítí dubletu v singlet dochází u směsi Cer AP(2'R) s FFA při 66 °C, u samotného Cer při 60 °C a u samotných d-FFA při 62 °C. Dublet ve směsi Cer s FFA byl pozorován do 74 °C, u samotného Cer do 72 °C a u samotných d-FFA byl po celou dobu měření sledován singlet.



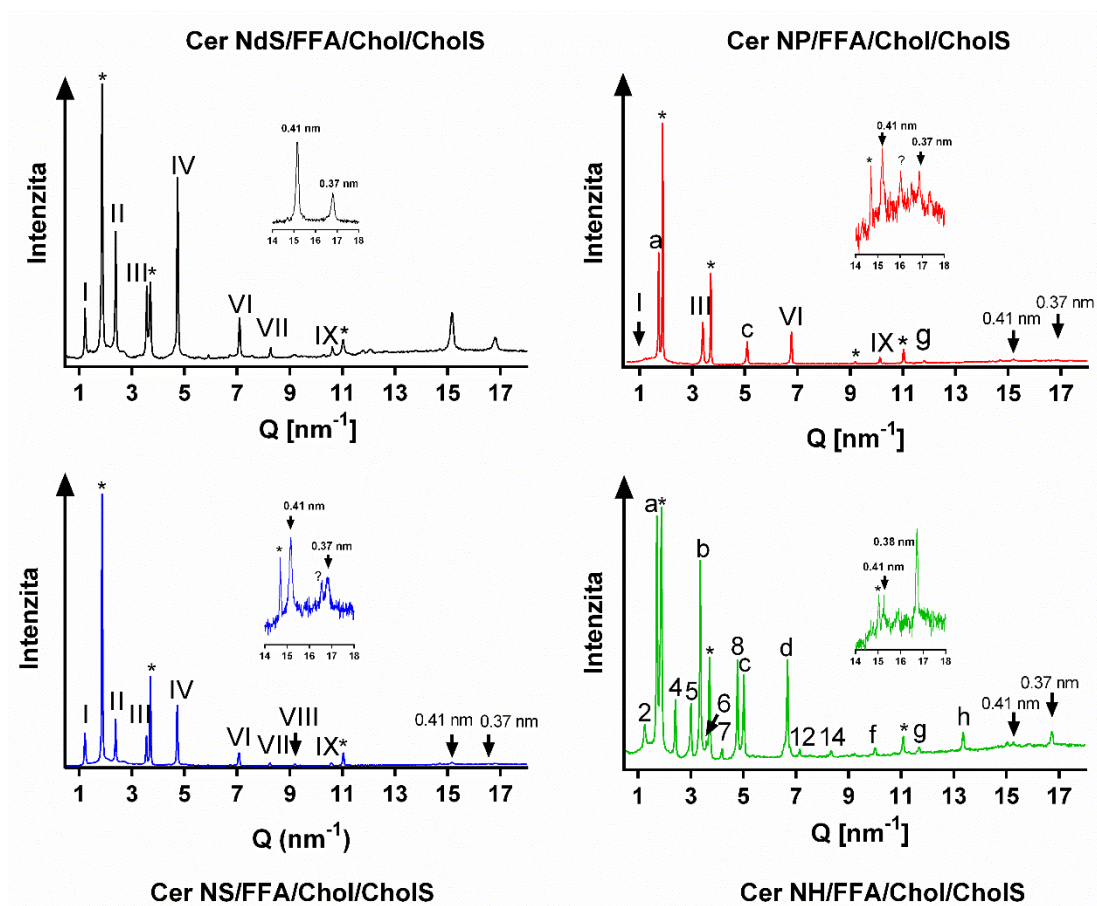
Obr. 11. Nůžkové vibrace modelových membrán obsahující Cer odvozené od P změřené v rozmezí 25-100 °C. První část grafu od každého typu Cer patří membránám s nedeuterovanými řetězci popisující chování Cer i FFA. Druhá část grafu patří membránám s deuterovanými řetězci FFA, kdy v této části můžeme sledovat nůžkové

vibrace samotného Cer (plně vybarvené části grafu) a samotných FFA (nevybarvené části grafu).

5.3 Výsledky RPD

Pomocí RPD je možné zjistit počet lamelárních fází nebo lamelárních struktur, které tvoří lipidy ve SC. Kromě počtu lamelárních fází nám RPD pomáhá určovat jejich délku.

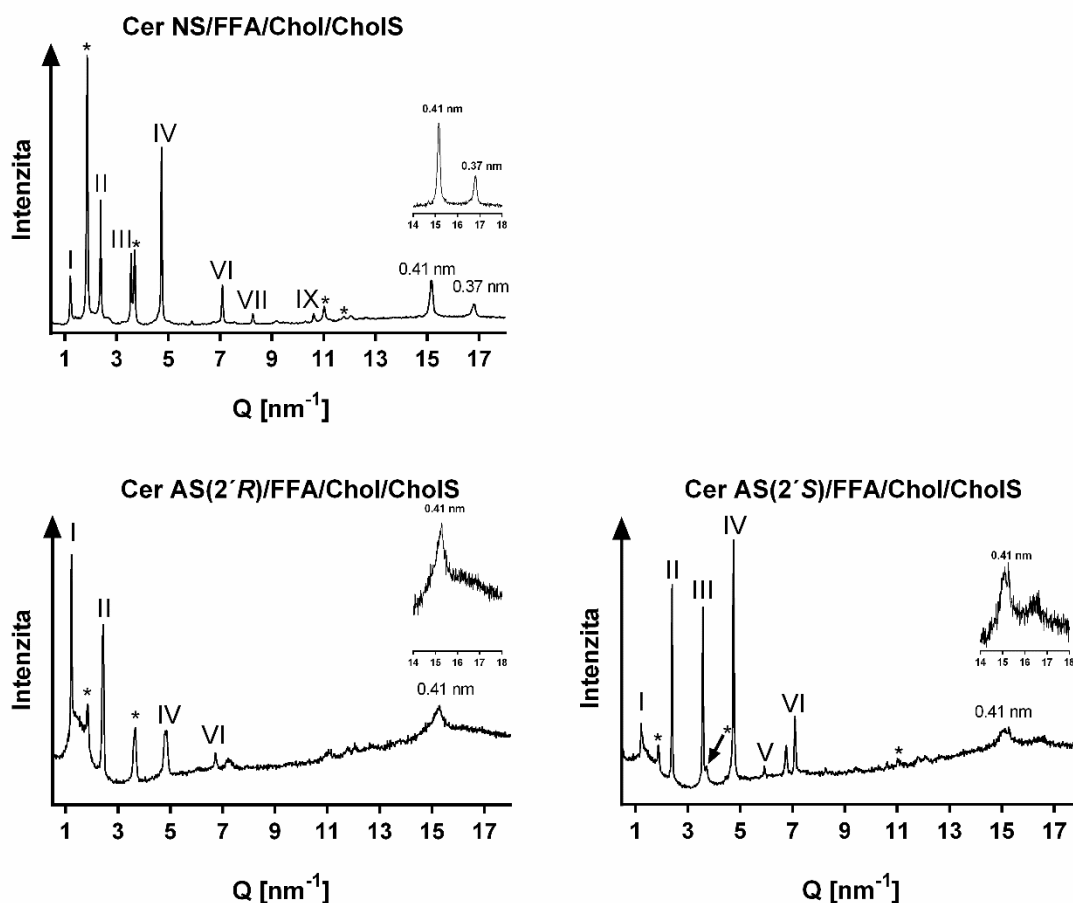
V následujícím grafu (Graf 9) jsou vyhodnoceny modelové membrány (vzorky) obsahující N Cer. Lamelární struktura modelových membrán s Cer NS je tvořena fází krystalického Chol s délkou 3,42 nm a krátkou lamelární fází s délkou 5,33 nm. Stejný počet lamelárních fází byl nalezen i u membrán obsahující Cer NDS, kde fáze Chol měřila opět 3,42 nm a krátká lamelární fáze 5,35 nm. V modelových membránách s Cer NH byla nalezena fáze Chol dlouhá 3,42 nm a kromě krátké lamelární fáze o délce 3,80 nm také fáze dlouhá o délce 10,56 nm. Tři lamelární fáze byly zjištěny i u membrán s Cer NP, a to konkrétně fáze Chol dlouhá 3,42 nm a dvě krátké lamelární fáze s délkami 5,56 nm a 3,73 nm.



Graf 9. Výsledky RPD u membrán obsahující Cer NS nebo Cer NDS nebo Cer NP nebo

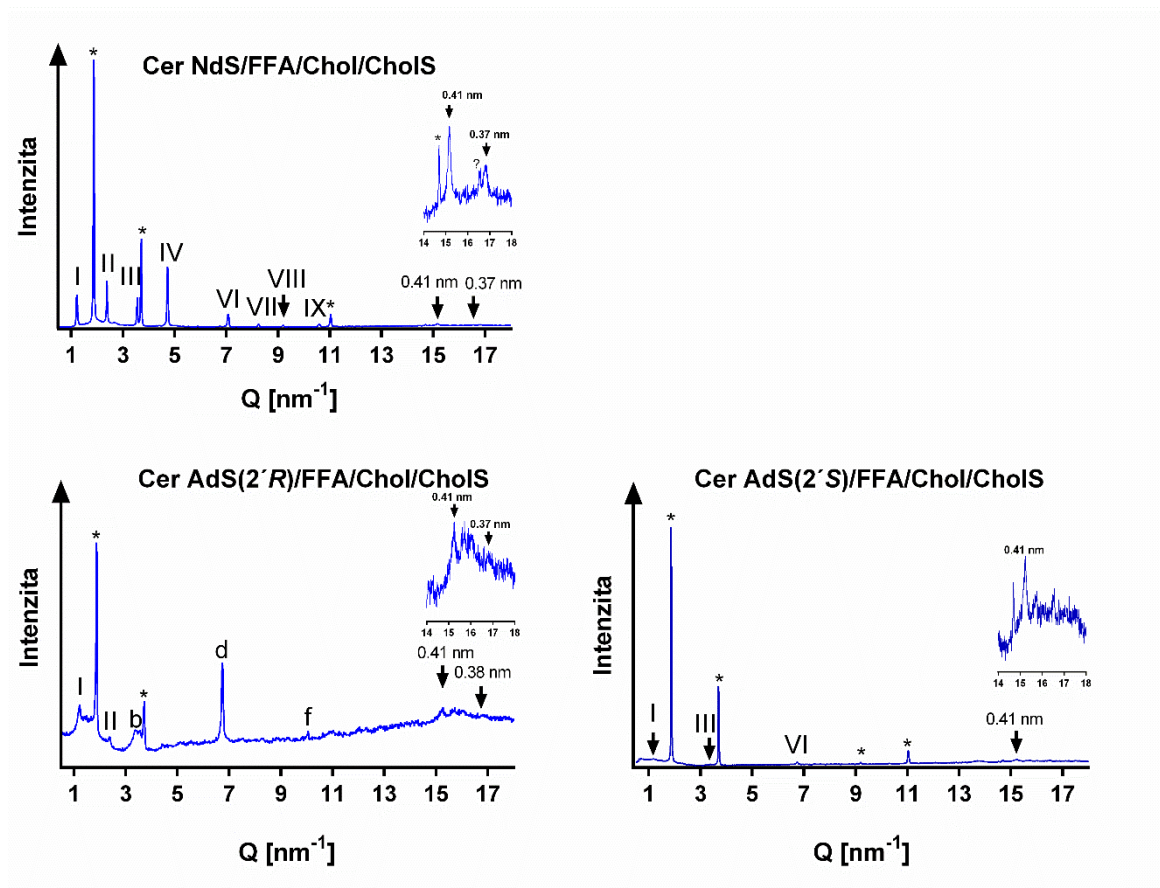
Cer NH/FFA/Chol/CholS. Římské číslice představují reflexe krátké lamelární fáze (~ 5.3-5.6 nm), arabské číslice představují reflexe dlouhé lamelární fáze (~ 10.6 nm), písmena představují reflexe druhé krátké lamelární fáze (~ 3.8 nm) a hvězdička představuje reflexe krystalického Chol.

V dalším grafu (Graf 10) je možné sledovat výsledky z RPD týkající se modelových membrán obsahujících Cer odvozené od S. U obou diastereoizomerů Cer AS byla nalezena fáze separovaného Chol spolu s jednou krátkou lamelární fází. V případě membrán s Cer AS(2'R) měřila fáze Chol 3,44 nm a krátká fáze 5,22 nm, v případě membrán s Cer AS(2'S) měřila fáze Chol 3,43 nm a krátká lamelární fáze 5,32 nm.



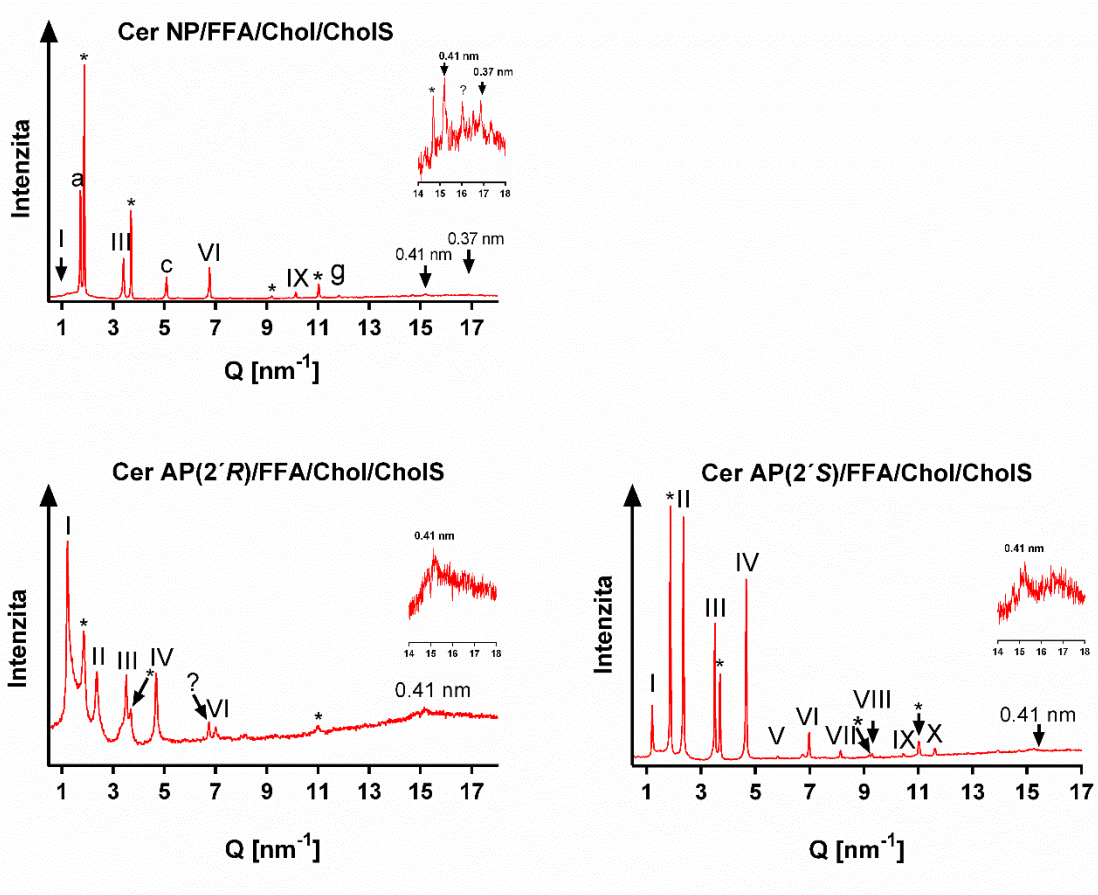
Graf 10. Výsledky RPD modelových membrán (vzorků) obsahující Cer odvozené od S, tj. Cer NS nebo Cer AS(2'R) nebo Cer AS(2'S)/FFA/Chol/CholS. Římské číslice představují reflexe krátké lamelární fáze a hvězdička představuje reflexe krystalického Chol.

Výsledky RDP membrán s Cer obsahující na místě sfingoidní báze DS je možné nalézt v následujícím grafu (Graf 11). Fáze krystalického Chol u membrány s Cer ADS(2'R) měřila 3,39 nm a spolu s ní byly objeveny dvě krátké lamelární fáze, první s délkou 5,27 nm a druhá s délkou 3,75 nm. V membránách s Cer ADS(2'S) bylo nalezeno o jednu krátkou fázi méně. Fáze Chol měřila 3,42 nm a krátká fáze 5,49 nm.



Graf 10. Výsledky RPD modelových membrán obsahující Cer odvozených od DS, tj. Cer NP nebo Cer AP(2'R) nebo Cer AP(2'S)/FFA/Chol/CholS. Římské číslice představují reflexe krátké lamelární fáze, písmena představují reflexe druhé krátké lamelární fáze a hvězdička představuje reflexe krystalického Chol.

V posledním grafu (Graf 11) jsou zaznamenány výsledky RDP membrán obsahující Cer s P ve své molekule. Oba izomery kromě fáze cholesterolu, která v obou případech měřila 3,42 nm, obsahovaly ve své lamelární struktuře další krátkou fázi. Délka této krátké lamelární fáze u Cer AP(2'R) byla 5,40 nm a u Cer AP(2'S) 5,42 nm.



Graf 11. Výsledky RPD modelových membrán obsahující Cer odvozené od P, tj. Cer NP nebo Cer AP(2'R) nebo Cer AP(2'S)/FFA/Chol/CholS. Římské číslice představují reflexe krátké lamelární fáze, písmena představují reflexe druhé krátké lamelární fáze a hvězdička představuje reflexe krystalického Chol.

Součástí každého RPD grafu je vždy i menší graf zobrazující oblast od 14 – 17 Q. Tato oblast umožňuje získat informaci o laterálním uspořádání lipidů v modelových membránách. Pokud jsou v této oblasti přítomné dva píky (~ 0,41 nm a ~0.37-0.38 nm), znamená to, že lipidy jsou ve velmi těsném, tzv. orthorombickém uspořádání, jako je tomu u membrán obsahující Cer NS, NDS, NH, NP a ADS(2'R). Pokud však je zaznamenán pouze jeden pík (0,41 nm), znamená to, že lipidy jsou v lamele uspořádány hexagonálně, jako je tomu u membrán obsahující Cer AS(2'R), AS(2'S), ADS(2'S), AP(2'R) a AP(2'S).

6. Diskuze

Cílem této práce bylo vytvoření modelových lipidových membrán, které svým složením napodobovaly lipidovou směs mezibuněčného prostoru ve SC, a které se navzájem lišily použitým typem Cer. Cer, se kterými jsem pracovala, byly: Cer NS, Cer NDS, Cer NP, Cer NH, Cer AS(2'R), Cer ADS(2'R), Cer AP(2'R), Cer AS(2'S), Cer ADS(2'S) a Cer AP(2'S). Na základě porovnání výsledků z permeačních pokusů, výsledků z IR a RDP u N Cer jsem mohla sledovat vliv struktury sfingoidní báze na funkci kožní bariéry, a podobně jsem sledovala vliv α -hydroxylace, tím že jsem porovnávala výsledky permeačních parametrů a mikrostruktury membrán obsahující Cer typu N a Cer typu A. Dále jsem hodnotila vliv stereochemie u A Cer srovnáním jednotlivých (S)- a (R)-diastereoizomerů. Je také důležité zde uvést, že u všech zkoumaných Cer byla v acylové části přítomna kyselina lignocerová a to buď v nehydroxylované, nebo α -hydroxylované podobě. Kromě odhalení vlivu jednotlivých strukturních změn v molekule Cer nám tento experiment posloužil ke stanovení bariérových vlastností a mikrostruktury u každého typu Cer zvlášť.

V minulosti již byly provedeny podobné experimenty s Cer NS a NDS, které pomohly vysledovat vliv přítomnosti násobné dvojné na uhlíku v poloze 4 na permeabilitu a mikrostrukturu modelových membrán. Mezi výslednými hodnotami permeačních parametrů nebyly objeveny žádné signifikantní rozdíly. Nicméně ze studia mikrostruktury modelových lipidových membrán s těmito Cer vyplývají některé rozdíly mezi Cer NS a NDS. Například bylo zjištěno, že v membránách Cer NDS byly přítomny větší kohezivní síly.[48, 49]

Prvním důležitým krokem k naplnění cílů této práce byla tedy příprava lipidových membrán. Od každého strukturního typu Cer byly připraveny čtyři modelové membrány. Během nástřiku jsme vyzorovali, že se hlavně A Cer odvozené od DS chovají rozdílně od ostatních Cer. Bylo patrné, že lipidy se na tyto modelové membrány nenanášejí rovnoměrně a vznikají na povrchu membrán nehomogenní oblasti. Z těchto důvodů jsme museli mírně upravit koncentraci lipidů v roztoku, který se používal k nástřiku a také podmínky samotného nástřiku. Další kroky spočívající v převážně měření a vyhodnocování jednotlivých permeačních parametrů, IR a RPD probíhaly bez větších problémů.

Ztráta vody skrze membránu byla první měřená veličina v rámci permeačních experimentů. Nejméně propustnou membránou obsahující Cer pro vodu byl Cer NS.

V porovnání s tímto Cer jsou ostatní Cer propustnější. Z toho vyplývá, že strukturní změny v molekule S vedoucí ke vzniku jiných sfingoidních bází, ani α -hydroxylace nezlepšují propustnost membrán pro vodu. Stereochemie tento základní permeační parametr takřka vůbec neovlivňuje, jelikož ani u jedné dvojice stereoizomerů jsem nenalezla signifikantní rozdíl.

Pomocí elektrické impedance se zjišťuje propustnost modelové membrány pro ionty. Nejméně propustnými membránami pro ionty byly membrány obsahující Cer s H jako sfingoidní bází, tedy Cer NH. Hydroxylace v poloze 6 sfingoidní báze má pozitivní vliv na tento permeační parametr. Ostatní N Cer vykazují velice podobné hodnoty elektrické impedance. Vliv α -hydroxylace na elektrickou impedanci se liší v rámci jednotlivých strukturních typů Cer, u Cer odvozených od S α -hydroxylace zvyšuje propustnost pro ionty a polární molekuly, u Cer odvozených od DS nemá α -hydroxylace nijak zvlášť znatelný vliv na elektrickou impedanci, a u Cer odvozených od P má větší vliv na elektrickou impedanci stereochemie než α -hydroxylace. Cer AP(2'S) vykazuje signifikantně menší propustnost oproti zbylým dvěma Cer, tedy Cer AP(2'R) a Cer NP.

Vliv struktury sfingoidní báze na propustnost membrán pro TH byl zaznamenán hlavně u Cer NDS a Cer NP, v jejichž molekulách chybí dvojná vazba. Na rozdíl od Cer, které mají dvojnou vazbu v molekule sfingoidní báze, tedy Cer NS a Cer NH, vykazují zmiňované Cer NDS a Cer NP signifikantně vyšší propustnost pro TH. I vliv α -hydroxylace je u tohoto parametru znatelný. Jak u Cer odvozených od S, tak i u Cer odvozených od P, bylo možné sledovat výrazný pokles propustnosti léčiva u membrán s α -hydroxylovanými Cer. V případě Cer odvozených od DS je rozhodující převážně vliv stereochemie, jelikož membrána obsahující Cer ADS(2'R) propouští zhruba třikrát méně TH v porovnání s Cer NDS a Cer ADS(2'S).

Hydroxylace sfingoidní báze v poloze 6 se ukázala být nevýhodná v případě fluxu pro IND, jelikož membrány s Cer NH propouštěly zhruba třikrát více tohoto léčiva než ostatní N Cer. Ostatní strukturní vlivy, jako α -hydroxylace a stereochemie, se u tohoto permeačního parametru neprojevily jako zásadně rozhodující, až na větší propustnost IND membrán obsahujících Cer ADS(2'R) v porovnání s Cer NDS a Cer ADS(2'S).

Fázové přechody, laterální uspořádání a mísitelnost lipidů v modelových membránách byly hodnoceny pomocí IR spektroskopie. Nejvíce přitažlivých sil v rámci modelových membrán obsahujících N Cer bylo u Cer NP, který vykazoval nejvyšší teplotní fázový přechod. Molekula P má v porovnání s molekulou S redukovanou dvojnou vazbu a zároveň jednu hydroxylovou skupinu navíc. Můžeme se tedy domnívat, že obě tyto

strukturní změny zvyšují teplotní odolnost lipidové směsi. K tomuto tvrzení přispívá i fakt, že u lipidových směsí s Cer NDS a Cer NH, u kterých v molekule sfingoidní báze proběhla jen jedna ze zmiňovaných strukturních změn, byly naměřeny vyšší teplotní fázové přechody než u membrán s Cer NS. Nejen hydroxylace S, ale i α -hydroxylace acylové části Cer přispívá ke zvětšení přitažlivých sil v lipidových směsích. U α -hydroxylovaných Cer odvozených od S a DS, tedy sfingoidních bází obsahující ve své molekule pouze dvě hydroxylové skupiny, byly totiž sledovány vyšší teplotní hodnoty fázového přechodu než u jejich nehydroxylovaných derivátů. Mezi α -hydroxylovaných Cer odvozených od P, který ve své molekule obsahuje tři hydroxylové skupiny, a Cer NP nebyly zaznamenány tak velké rozdíly při měření teplotního fázového přechodu. Z toho vyplývá domněnka, že další hydroxylace v molekule Cer nemá na velikost a množství přitažlivých sil v membráně zásadní vliv. Rozdíly mezi jednotlivými diastereoizomery jsme zaznamenali u Cer ADS, kdy samotné d-FFA v modelových membránách obsahující Cer ADS(2'R) vykazovaly teplotní fázový přechod při zřetelně nižší teplotě, než tomu bylo u d-FFA v membránách s Cer ADS(2'S). Zároveň byly zjištěny rozdíly v teplotních fázových přechodech mezi samotnými Cer AP(2'R) a AP(2'S), kdy u R izomeru byl naměřen fázový přechod při teplotě o 10 °C vyšší než u S izomeru.

Výsledky nůžkových methylenových vibrací nám odhalily i některé rozdíly v mísitelnosti jednotlivých lipidů v rámci modelových membrán v závislosti na strukturním typu obsaženého Cer a také v laterálním uspořádání řetězců Cer a FFA. Poměrně dobře se Cer a FFA vzájemně mísí v membránách s Cer NS a Cer NDS. Cer s hydroxylovanou sfingoidní bází ve své struktuře, to znamená Cer NH a Cer NP, se s FFA mísí méně. Dokonce je z grafů očividné, že FFA vytvářejí v lipidové struktuře vlastní domény. Tato skutečnost by mohla souviset s výsledky relativní ztráty vody přes membránu a fluxu TH, kdy Cer NS, jakožto Cer s nehydroxylovanou sfingoidní bází, vykazoval lepší výsledky než Cer NH a Cer NP. U A Cer odvozených od S i DS byla zjištěna horší mísitelnost mezi Cer a FFA. U Cer AS(2'R) i Cer AS(2'S) si samotné FFA vytváří vlastní domény, což vypovídá o horší schopnosti FFA se mísit s těmito Cer. Také byly u těchto A Cer zaznamenány horší výsledky elektrické impedance a relativní ztráty vody přes membránu v porovnání s Cer NS. V membránách s Cer ADS(2'R) a ADS(2'S) si samostatné domény vedle FFA tvoří i zřejmě molekuly Cer. Špatná mísitelnost Cer a FFA byla zaznamenána i u Cer AP(2'R) i Cer AP(2'S), stejně jako u jejich nehydroxylovaného strukturního derivátu Cer NP. A proto můžeme konstatovat, že α -hydroxylace v acylové části molekuly nepřispívá k lepší mísitelnosti Cer a FFA, ale

naopak ji v modelových membránách zhoršuje. Vliv stereochemie byl v rámci nůžkových vibrací zaznamenán u Cer AS(2'R) a Cer AS(2'S), respektive u d-FFA obsažených v modelových membránách s těmito Cer. V membránách s Cer AS(2'S) se FFA s Cer mísí velmi dobře na rozdíl od membrán s AS(2'R), kde samotné FFA tvoří své vlastní domény. Úplně stejná situace nastala u d-FFA v modelových membrán s Cer AP (2'R) a s Cer AP (2'S). Zmíněné rozdíly v mikrostruktuře těchto izomerů mohou souviset s jejich rozdílnými výsledky fluxu TH a IND.

Posledním hodnoceným parametrem bylo studium mikrostruktury (lamelárního a laterálního uspořádání) pomocí RPD. Touto metodou jsme mohli porovnat jednotlivé Cer podle toho, kolik různých lamelárních fází tvoří s ostatními lipidy v modelových membránách a také v jakém laterálním uspořádání se v těchto lamelách lipidy nacházejí. V acylové části nehydroxylované Cer, které mají v struktuře sfingoidní báze o jeden hydroxyl navíc, což znamená Cer NP a Cer NH, tvoří v lipidových membránách jednu fázi navíc na rozdíl od Cer NS a Cer NDS. Je také důležité zmínit, že jediný Cer NH tvoří s ostatními lipidy dlouhou lamelární fázi, o které se myslelo, že je tvořena pouze Cer s ultra-dlouhými acylovými řetězci.[10, 50-52] Zatímco u Cer odvozených od S jsem nevypozorovala žádný rozdíl v závislosti na α -hydroxylaci nebo stereochemie, u Cer odvozených od DS byl prokázán vliv stereoizomerie na počet lamelárních fází v membránách. Cer ADS(2'R) tvoří o jednu krátkou lamelární fázi více než Cer ADS(2'S), který tvoří stejný počet lamelárních fází jako Cer NDS. Vliv α -hydroxylace pak můžeme sledovat u Cer AP(2'R) a AP(2'S), které v modelových membránách tvoří o jedno krátkou lamelární fázi méně než Cer NP. Hexagonální uspořádání lipidů v lamelách podle výsledků RPD můžeme nalézt v modelových membránách obsahující α -hydroxylované Cer, kromě Cer ADS(2'R), který společně s nehydroxylovanými Cer vykazuje orthorhombické uspořádání lipidů v lamelách.

Dle výše uvedených výsledků lze konstatovat, že jakákoli změna struktury v molekule Cer, ať už se jedná o změnu sfingoidní báze, α -hydroxylaci nebo změnu ve stereochemii na C'2, vede jednak k jeho rozdílným bariérovým vlastnostem ale také k rozdílům v mikrostruktuře modelových membrán.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce byla příprava modelových membrán s deseti různými strukturními typy Cer. Jednotlivé Cer se lišily strukturou sfingoidní báze, α -hydroxylací nebo stereochemií. A proto změřením, vyhodnocením a následným porovnáním permeačních parametrů, IR a RPD jsme měli příležitost zjistit vlivy těchto výše zmíněných strukturních změn v molekule Cer na permeabilitu a mikrostrukturu připravených modelových membrán. Celá práce by nám mohla pomoci nalézt důvody k přítomnosti poměrně velkého počtu Cer ve SC.

Jelikož se mi podařilo připravit modelové membrány deseti typy Cer a následně na nich provést veškeré potřebné experimenty, dovolím si tvrdit, že cíl mé práce byl splněn. Bylo zjištěno, že každý Cer má jedinečné vlastnosti, které různou měrou přispívají k bariérové funkci kožní bariéry. Dalším velkým poznatkem vyplývajícím z této práce bylo nalezení dlouhé lamelární fáze v membránách obsahující Cer NH, tento poznatek se stal součástí již publikované práce.[53]

Do budoucna by bylo zajímavé zkompletovat tyto údaje společně s údaji o permeabilitě a mikrostrukturu Cer AH(R) a Cer AH(S), které ale nejsou komerčně dostupné, proto je nutností nejprve provést jejich syntézu.

8. Literatura

1. Čihák, R., *Anatomie 3*. Grada Publishing, 1997. **672**(1. vydání).
2. Bouwstra, J.A., et al., *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations*. *Prog Lipid Res*, 2003. **42**(1): p. 1-36.
3. Vávrová, K.H., Alexandr, *Role ceramidů v kůži*. *Praktické lékařství*, 2006. **2**: p. 55-58.
4. Hrabálek, A.V., Kateřina, *Lze překonat kožní bariéru?* *Praktické lékařství*, 2005. **1**: p. 8-11.
5. Wartewig, S. and R.H. Neubert, *Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: a review. Part 1: ceramides*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2007. **20**(5): p. 220-9.
6. Masukawa, Y., et al., *Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(7): p. 1466-76.
7. Ermakov, I.V., et al., *Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue*. *J Biomed Opt*, 2005. **10**(6): p. 064028.
8. Motta, S., et al., *Ceramide composition of the psoriatic scale*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1182**(2): p. 147-51.
9. Boncheva, M., *The physical chemistry of the stratum corneum lipids*. *Int J Cosmet Sci*, 2014. **36**(6): p. 505-15.
10. Bouwstra, J.A., et al., *Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering*. *J Invest Dermatol*, 1991. **97**(6): p. 1005-12.
11. Garson, J.C., et al., *Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction*. *J Invest Dermatol*, 1991. **96**(1): p. 43-9.
12. Corkery, R.W., *The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002. **26**(1-2): p. 3-20.
13. Iwai, I., et al., *The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety*. *J Invest Dermatol*, 2012. **132**(9): p. 2215-25.
14. Lopez-Montero, I., et al., *Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(27): p. 25811-9.
15. Bouwstra, J.A., et al., *Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(11): p. 1759-70.
16. Bouwstra, J.A. and M. Ponc, *The skin barrier in healthy and diseased state*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 2080-95.
17. Norlen, L., *Skin barrier structure and function: the single gel phase model*. *J Invest Dermatol*, 2001. **117**(4): p. 830-6.
18. Chamlin, S.L., et al., *Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity*. *J Am Acad Dermatol*, 2002. **47**(2): p. 198-208.
19. Kováčik, A., J. Roh, and K. Vávrová, *The chemistry and biology of 6-hydroxyceramide, the youngest member of the human sphingolipid family*. *ChemBioChem*, 2014. **15**(11): p. 1555-62.
20. Robson, K.J., et al., *6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides*. *J Lipid Res*, 1994. **35**(11): p. 2060-8.

21. Mori, K. and Y. Masuda, *Synthesis and stereochemistry of ceramide B, (2S,3R,4E,6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis*. *Tetrahedron Lett*, 2003. **44**(51): p. 9197-9200.
22. Stewart, M.E. and D.T. Downing, *Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines*. *J Invest Dermatol*, 1995. **105**(4): p. 613-8.
23. Stewart, M.E. and D.T. Downing, *A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(8): p. 1434-9.
24. Masuda, Y. and K. Mori, *Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8*. *Eur J Org Chem*, 2005. **2005**(22): p. 4789-4800.
25. Popa, I., et al., *Analysis of free and protein-bound ceramides by tape stripping of stratum corneum from dogs*. *Arch Dermatol Res*, 2010. **302**(9): p. 639-44.
26. Wertz, P.W. and D.T. Downing, *Ceramides of pig epidermis: structure determination*. *J Lipid Res*, 1983. **24**(6): p. 759-65.
27. Uchida, Y., et al., *Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(18): p. 13211-9.
28. Mizutani, Y., et al., *2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(11): p. 2356-64.
29. Kota, V. and H. Hama, *2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling*. *Adv Biol Regul*, 2014. **54**: p. 223-30.
30. Alderson, N.L., et al., *The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48562-8.
31. Guo, L., et al., *Stereospecificity of fatty acid 2-hydroxylase and differential functions of 2-hydroxy fatty acid enantiomers*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(7): p. 1327-35.
32. Foulon, V., et al., *Breakdown of 2-hydroxylated straight chain fatty acids via peroxisomal 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase: a revised pathway for the alpha-oxidation of straight chain fatty acids*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(11): p. 9802-12.
33. Hama, H., *Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(4): p. 405-14.
34. Zoller, I., et al., *Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration*. *J Neurosci*, 2008. **28**(39): p. 9741-54.
35. Edvardson, S., et al., *Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia*. *Am J Hum Genet*, 2008. **83**(5): p. 643-8.
36. Dick, K.J., et al., *Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35)*. *Hum Mutat*, 2010. **31**(4): p. E1251-60.
37. Asai, N., et al., *Sex Pheromones of the Hair Crab *Erimacrus isenbeckii*. Part 1: Isolation and Structures of Novel Ceramides*. *Tetrahedron*, 2000. **56**(51): p. 9895-9899.
38. De Paepe, K., et al., *Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter*. *Skin Res Technol*, 2005. **11**(1): p. 61-9.
39. Pullmannová, P., et al., *Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(8): p. 2115-26.

40. Fasano, W.J. and P.M. Hinderliter, *The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2004. **18**(5): p. 725-9.
41. Fish, R.M.G.L.A.B., C F, *Medical and Bioengineering Aspects of Electrical Injuries*. Lawyers & Judges Publishing Company, 2003.
42. Waisser, K.P., Milan, *Organická chemie II*. Nakladatelství Karolinum, 2003: p. 29-45.
43. Garidel, P., et al., *The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems*. *Biophys Chem*, 2010. **150**(1-3): p. 144-56.
44. Mendelsohn, R., C.R. Flach, and D.J. Moore, *Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(7): p. 923-33.
45. Valvoda, V.P., M; Lukáč, P, *Základy strukturní analýzy*. Nakladatelství Karolinum, 1992.
46. Groen, D., G.S. Gooris, and J.A. Bouwstra, *New insights into the stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis*. *Biophys J*, 2009. **97**(8): p. 2242-9.
47. Friedel, F., et al., *Material analysis with X-ray microdiffraction*. *Crystal Research and Technology*, 2005. **40**(1-2): p. 182-187.
48. Skolova, B., et al., *Ceramides in the skin lipid membranes: length matters*. *Langmuir*, 2013. **29**(50): p. 15624-33.
49. Skolova, B., et al., *The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes*. *Langmuir*, 2014. **30**(19): p. 5527-35.
50. Mojumdar, E.H., G.S. Gooris, and J.A. Bouwstra, *Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization*. *Soft Matter*, 2015. **11**(21): p. 4326-4336.
51. de Sousa Neto, D., G. Gooris, and J. Bouwstra, *Effect of the omega-acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I)*. *Chem Phys Lipids*, 2011. **164**(3): p. 184-95.
52. Kessner, D., et al., *Impact of the long chain omega-acylceramides on the stratum corneum lipid nanostructure. Part 1: Thermotropic phase behaviour of CER[EOS] and CER[EOP] studied using X-ray powder diffraction and FT-Raman spectroscopy*. *Chem Phys Lipids*, 2010. **163**(1): p. 42-50.
53. Kovacik, A., et al., *Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation-protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes*. *RSC Adv*, 2016. **6**(77): p. 73343-73350.