

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra anorganické a organické chemie

Disertační práce

SYNTÉZA A STUDIUM ANALOGŮ CERAMIDŮ

Barbora Školová

2015

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D.). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Barbora Školová
V Hradci Králové 20. července 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za její odborné vedení a osobní přístup.

Poděkování za spolupráci patří i mým kolegům ze *Skin Barrier Research Group* a Katedry anorganické a organické chemie, na které práce vznikla, a zároveň kolegům z Katedry farmaceutické technologie, jejíž jsem zaměstnancem. Děkuji za spolupráci také kolegům z VŠCHT v Praze a spolupracovníkům ze skupiny prof. Husteru (Universität Leipzig, Německo) a prof. Neuberta (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Německo).

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (GAUK 652412, PRVOUK, SVV 260 183), Grantové agentuře ČR (GAČR 207/11/0365 a 13-23891S) a programu ERASMUS.

Za osobní zázemí a podporu velmi děkuji svým přátelům a rodině.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: **Mgr. Barbora Školová**

Školitel: **doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.**

Název dizertační práce: **Syntéza a studium analogů ceramidů**

Ceramidy spolu s vyššími mastnými kyselinami a cholesterolem tvoří lamely mezibuněčné hmoty nejsvrchnější vrstvy kůže (*stratum corneum*, SC). Tato **lipidová hmota představuje vlastní kožní bariéru** – chrání organismus před vnějším prostředím a zároveň udržuje jeho vnitřní rovnováhu. Složení a uspořádání mezibuněčné hmoty SC jsou pro bariérové vlastnosti kůže zásadní, přesto její **organizace na molekulární úrovni stále není objasněna**. Cílem této práce bylo přispět k detailnějšímu popisu organizace kožní bariéry pomocí studia lipidových modelů SC, především najít **strukturální parametry v molekulách ceramidů**, které se na bariérových vlastnostech lipidové hmoty podílí. Modelové lipidové membrány SC představují užitečný nástroj ve studiu lipidů SC, jejich složení totiž napodobuje (pato)fyziologický stav v kůži. Získané poznatky by mohly být využity v diagnostice a/nebo terapii onemocnění s poškozenou bariérovou funkcí kůže (např. atopická dermatitida nebo psoriáza).

Nejprve jsme se zaměřili na objasnění mechanismu ztráty bariérových vlastností kůže po **zkrácení acylového řetězce v molekule ceramidu**. Studovali jsme permeabilitu (propustnost) multivrstevných lipidových membrán a jejich biofyzikální vlastnosti pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), infračervené (IR) spektroskopie, práškové rentgenové (X-ray) difrakce a hodnotili jsme i lipidové monovrstvy (Langmuirovými izotermami a atomovou silovou mikroskopií). **Řetězce lipidů jsou** při teplotě kožního povrchu (32 °C) **ve všech membránách** (i těch nejpropustnějších – obsahující ceramidy s délkou acylu 4 a 6 uhlíků) **uspořádané** (převážně v *all-trans* konformaci a v těsné orthorhombické mřížce). V membránách obsahující ceramidy s krátkým acylem však dochází k **separaci domén** a vytváření **více lamelárních fází** s krátkou periodicitou, což může být příčinou jejich zvýšené propustnosti. Směs s přirozeným ceramidem (s délkou acylu 24C) se ochotně uspořádává do monovrstev a po přenesení na pevný podklad tvoří souvislé domény, které zaujímají větší plochu.

Podnětem pro studium chování lipidových membrán SC obsahující 16C acyl byly studie poukazující na **zvýšené množství těchto zkrácených ceramidů na úkor přirozených ceramidů (s 24C acylem) v kůži pacientů s atopickou dermatitidou**. Lipidové membrány SC s uvedenými ceramidy jsme studovali pomocí DSC, IR a ²H NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopie v pevné fázi. Jejich přípravě a hodnocení předcházela syntéza ceramidů s deuterovaným acylem – takto značené látky mohou být v membránách pozorovány současně s neznačenými, avšak odděleně díky odlišné poloze absorpčního pásu v IR spektrech. Zjistili jsme, že přirozený ceramid (s 24C acylem) v modelové membráně zaujímá **otevřenou konformaci** s řetězcí orientovanými naproti sobě. Tato konformace je poměrně nezvyklá, avšak může zvyšovat soudružnost lamel, což by mohlo vysvětlit nízkou permeabilitu těchto membrán. Při teplotě kožního povrchu (32 °C) je přirozený ceramid v modelové membráně SC **krystalický**, zatímco ceramid se zkráceným acylem (16C) je přítomen především v propustnější **gelové fázi**.

Dřívější studie ukázaly, že pro zachování bariérových vlastností kůže je důležitý **poměr sfingosinových (sphCer) a dihydrosfingosinových (dihydroCer) ceramidů**. Význam *trans*-dvojně vazby jsme studovali pomocí modelových membrán SC - permeačními pokusy, DSC, IR a ²H NMR spektroskopii a sledovali také vliv zkrácení délky acylového řetězce (na 2, 4, 6 a 8 uhlíků). Permeační pokusy ukázaly, že propustnost dihydroCer membrán obsahující zkrácený acylový řetězec je ve srovnání s membránami s přirozeným dihydroCer (acyl 24C) vyšší, ale bez statistické významnosti. Permeabilita membrán obsahující sphCer se zkráceným acylem je ve srovnání s membránami obsahující dihydroCer vyšší, především u sphCer s délkou acylu 4 a 6C. Avšak membrány obsahující přirozené dihydroCer jsou propustnější než membrány s přirozeným sphCer. Vysvětlením rozdílné permeability membrán může být odlišný **podíl velmi těsného orthorhombického uspořádání lipidů**, které je u sphCer s krátkým acylem nižší než u membrán obsahující dihydroCer analogy. Při teplotě kožního povrchu (32 °C) je v lipidových membránách patný nárůst méně uspořádané **izotropní fáze** na 27 % u přirozeného dihydroCer, u sphCer (acyl 24C) je izotropní fáze zastupena pouze v 1 %.

Délka sfingosinového řetězce má na bariérové vlastnosti kůže také vliv. Ceramidové analogy se zkráceným sfingosinovým (12 a 15C) a acylovým (2, 4 a 6C) řetězcem zvyšují propustnost kůže i modelových lipidových membrán SC. Biofyzikální vlastnosti těchto lipidových membrán hodnocené IR spektroskopii se však významně neliší, např. lipidové řetězce jsou v membránách dobře uspořádané. Rozdíly byly nalezeny v **amidové vibraci** a naznačují odlišné interakce lipidů v oblasti polární hlavy, přestože studované ceramidy se v této části molekuly strukturně neliší. Zároveň bylo zjištěno, že nejpropustnější membrány obsahují **větší počet krátkých lamelárních fází**, které by mohly být příčinou jejich zvýšené permeability.

Výsledky této práce rozšířily poznatky o vlastnostech lipidů SC, které přispěly k lepšímu porozumění bariérové funkce kůže, především byl objasněn vliv některých strukturálních prvků v molekule ceramidů na chování lipidových membrán SC. Tyto skutečnosti mohou být dále využity, např. v návrhu struktur látek obnovujících poškozenou kožní bariéru.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of inorganic and organic chemistry

Candidate: **Mgr. Barbora Školová**

Supervisor: **doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.**

Title of doctoral thesis: **Synthesis and study of ceramide analogues**

Ceramides (Cer) together with free fatty acids and cholesterol form intercellular lamellar space of the uppermost skin layer (*stratum corneum*, SC). **This lipid matrix presents the proper skin barrier** – it protects organism against outer environment and keeps its homeostasis as well. The composition and arrangement of the intercellular lipid matrix is essential for the skin barrier properties. In spite of this fact, **the organization of SC lipids at the molecular level is not fully elucidated**. The aim of this work is to contribute to more detailed insight into organization of skin barrier using SC lipid model membranes, in particular to find **the structural parameters in ceramide molecules**, which play a role in the maintenance of the skin barrier. The SC model membranes present a useful tool to study SC lipids, they mimic physiological or pathological conditions in the skin. The obtained results should be used in diagnosing or therapy of skin diseases characteristic with impaired barrier function, such as atopic dermatitis or psoriasis.

Firstly we focused on explanation of the mechanism of loss of the skin barrier function due to the **shortening of Cer acyl**. We studied permeability of SC lipid membranes and their biophysical properties by differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR) spectroscopy and powder X-ray diffraction and also we evaluated the lipid monolayers (by Langmuir isotherms and atomic force microscopy). At the skin temperature (i.e. 32°C), **in all membranes** (including the most permeable membranes based on Cer with 4 and 6C acyls) **lipid chains are well ordered** (mainly in all-*trans* conformation and in orthorhombic lateral packing). In membranes containing short-acyl Cer the **separation** of lipid domains and the presence of **short-lamellar phases** were observed, which could be reasons of their higher permeability. Monolayers of the mixture containing native Cer (with 24C acyl) are arranged spontaneously and on solid support they form larger continuous domains in larger area.

In skin of atopic dermatitis patients increased levels of long Cer (C16) at the expense of the native Cer with very long acyl (C24) were found. Thus, we decided to study the behavior of SC lipid membranes containing mentioned Cer by DSC, IR and solid-phase ²H NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy. Before the preparation and evaluation of lipid membranes Cer with deuterated acyls were synthesized. Unlabeled and deuterated compounds could be in mixtures studied simultaneously but separately due to different positions of absorption bands in IR spectra. We found that in model SC lipid membranes the native Cer (C24 acyl) adopts the **extended conformation** with chains pointing in the opposite direction. This unusual conformation would increase cohesion of the lipid lamellae and could explain the low permeability of native Cer membranes. At the skin temperature (i.e. 32°C), the very long Cer (C24) is **crystalline** in model membrane but the dominating phase of long Cer (C16) is more permeable **gel state**.

Previous studies suggested that a specific **ratio of dihydrosphingosine Cer (dihydroCer) and sphingosine Cer (sphCer)** is important for the skin barrier properties. We decided to study the importance of *trans*-double bond in SC membranes by permeability experiments, DSC, IR and ²H NMR spectroscopy and we also aimed at studying the effect of acyl chain length (C 2, 4, 6, 8, 24). We found higher (but not significantly) membrane permeability of short-acyl dihydroCer compare to native (24C acyl) dihydroCer. Compared to dihydroCer with shortened acyl chains significantly higher permeabilities were found in the short-acyl sphCer membranes. However, membranes containing native dihydroCer are more permeable than membranes based on native sphCer. It could be explained by **different proportion of very tight orthorhombic lateral packing**, which is lower in sphCer membranes. At the skin temperature (32°C), increased portion of **isotropic phase** of the native dihydroCer (C24 acyl) in lipid membranes was detected (27%) compare to 1% of this phase of sphCer (C24 acyl).

The **length of sphingosine chain** also influences skin barrier properties. Cer analogues with shortened sphingosine (to 12 and 15C) and acyl (to 2, 4 and 6C) chains increase permeability of skin and SC model membranes as well. The biophysical properties of these membranes studied by IR spectroscopy differ slightly, e.g. lipid chains are well ordered. The differences in **amide vibration** indicate different hydrogen-bonding interaction although Cer have the same arrangement in the polar head region. Together with it lots of **short lamellar phases** in the most permeable membranes were identified, which could be reason for their higher permeability.

The obtained results improved our knowledge of SC lipid properties and contributed to better understanding of skin barrier function. The influence of several structural features in Cer molecules on the barrier properties and behavior of SC lipid membranes was elucidated, which could be used e.g. in design of skin barrier repair agents.

Cíle práce

Tato dizertační práce je věnována **ceramidům – vlivem jejich struktury na bariérové vlastnosti kůže**. Cílem práce bylo najít **strukturální prvky v molekulách ceramidů**, které ovlivňují **propustnost (permeabilitu) kůže**, a pomocí biofyzikálních metod popsat **chování lipidů v membránových modelech kožní bariéry**.

Díličními cíli práce byly charakterizace vlastnosti modelových lipidových membrán obsahující **sfiningosinový ceramid s délkou acylu 2, 4, 6, 8, 12, 18:1 a 24 uhlíků** pomocí infračervené spektroskopie, práškové rentgenové difrakce a také studium monovrstevných lipidových modelů včetně zavedení metodiky jejich přípravy. Dále hodnocení vlivu **zkrácení acylového řetězce** (na 2, 4, 6 a 8C) **u dihydro-sfiningosinových ceramidů** v lipidových membránách pomocí infračervené spektroskopie. Jedním z úkolů byla také **syntéza ceramidů s deuterovaným acylem** a hodnocení lipidových směsí obsahující deuterované složky pomocí infračervené spektroskopie. Studován byl význam **trans-dvojných vazby** v molekule ceramidu a uspořádání lipidových směsí obsahující **ceramid se zkráceným acylem (C16)**, jehož zvýšené množství v kůži bylo popsáno u pacientů s atopickou dermatitidou. Úmyslem šestiměsíční zahraniční stáže bylo navázání spolupráce a seznámení se s novými metodami, proto jsou součástí práce také výsledky hodnocení deuterovaných lipidových směsí ^2H NMR spektroskopii v pevné fázi. V neposlední řadě byl studován vliv **zkrácení sfiningosinového** (na 12 a 15C) **a acylového řetězce** (na 2, 4 a 6C) na permeabilitu kožní bariéry pomocí lipidových membrán – permeačními pokusy, infračervenou spektroskopii a rentgenovou difrakcí.

Obsah

Teoretický úvod práce je zaměřen na **vlastnosti kůže** (kapitola 1) a její nejsvrchnější vrstvy - **stratum corneum** (kapitola 2). Mezibuněčná lipidová hmota této vrstvy představuje kožní bariéru, jejíž součástí jsou i **ceramidy**, které jsou přiblíženy v kapitole 2.1. Složení a organizace lipidové matrix SC je pro bariérové vlastnosti kůže zásadní, stále však chybí její podrobný popis na molekulární úrovni. Je však navrženo několik **modelů uspořádání lipidů SC**, které jsou uvedeny v kapitole 3. Kapitola 4 je věnována možnostem a nástrojům **in vitro hodnocení bariérových vlastností kůže**, větší pozornost je namířena na multilamelární lipidové membrány (kapitola 4.3.). V kapitole 5 je stručně přiblíženo **využití infračervené spektroskopie** ve studiu uspořádání lipidů SC - metody, která výsledky této práce propojuje.

Experimentální část je pojata jako **komentář k publikacím** a rozdělena do čtyř podkapitol shrnujících výsledky čtyř přijatých publikací a jednoho rukopisu, který byl v době sepisování této práce v recenzním řízení. Publikace jsou (včetně doplňujících informací) součástí dizertační práce jako přílohy.

Abstrakt	5
Abstract	7
Cíle práce	9
Obsah	10
Seznam zkratk	12
Teoretická část	
1. Kůže	13
1.1. Podkožní vazivo	13
1.2. Dermis	13
1.3. Epidermis	13
2. Stratum corneum	14
2.1. Ceramidy	16
2.1.1. Typy ceramidů v kůži	16
2.1.2. Názvosloví ceramidů	16
2.1.3. Biosyntéza ceramidů	16
2.2. Další složky mezibuněčné hmoty SC	18
2.3. Organizace lipidů SC	18
2.3.1. Lamelární uspořádání SC	19
2.3.2. Laterální uspořádání SC	19
2.3.3. Molekulové konformace ceramidů	20

3.	Modely lamelárního uspořádání lipidů SC.....	21
3.1.	Model podle Swartzendruba.....	21
3.2.	Doménově mozaikový model.....	22
3.3.	Sendvičový model.....	22
3.4.	Model gelové fáze.....	23
3.5.	Rovnoměrný tří jednotkový model lipidové lamely SC.....	23
3.6.	Model asymetrické dvojvrstvy podle McIntoshe.....	24
3.7.	I v přítomnosti ceramidů EO nemusí vznikat dlouhá lamelární fáze (~13 nm).....	24
3.8.	Model lamelárního uspořádání lipidů SC s ceramidy v otevřené konformaci.....	25
3.9.	Podobnost a rozdíly v navržených modelech uspořádání lipidů SC.....	25
4.	<i>In vitro</i> nástroje studia kožní bariéry.....	26
4.1.	Kůže a její části.....	26
4.2.	<i>In vitro</i> tkáňové modely kožní bariéry.....	26
4.3.	Multilamelární membránové modely lipidů SC.....	26
4.3.1.	Složky modelových lipidových membrán SC.....	26
4.3.2.	Biofyzikální metody hodnocení vlastností modelových lipidových membrán SC.....	27
4.3.3.	Příprava modelových multilamelárních lipidových membrán.....	27
4.4.	Monovrstvé modely.....	28
5.	Využití infračervené spektroskopie ve studiu uspořádání lipidů SC.....	29
5.1.	Valenční CH ₂ /CD ₂ vibrace.....	30
5.2.	Deformační CH ₂ /CD ₂ vibrace.....	30
5.3.	Vibrace v polární oblasti.....	30
Experimentální část - komentář k přiloženým publikacím		
	Zkrácení acylového řetězce v molekule ceramidu: ztráta bariérových vlastností kůže.....	32
	Nedostatečné prodloužení acylového řetězce: snížení bariérových vlastností kůže u pacientů s atopickou dermatidou.....	34
	Význam trans-dvojně vazby v molekule ceramidů: dihydroceramidy přispívají k rozmanitosti kožních lipidů.....	37
	Ceramidy s 15C sfingosinem a krátkými acyly mnohonásobně zvyšují permeabilitu kůže i modelových lipidových membrán.....	39
	Závěr.....	42
	Literatura.....	43
	Curriculum vitae.....	54
	Přílohy.....	57

Seznam zkratek

AFM	atomová silová mikroskopie
Cer	ceramid (např. Cer24 označuje přirozený ceramid NS s délkou acylu 24C)
dihydroCer	dihydrosfingosinový ceramid
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
Chol	cholesterol
IF	impact factor
IND	indometacin
IR	infračervená (spektroskopie)
LA	kyselina lignocerová
NMR	nukleární magnetická rezonance
SC	stratum corneum
sphCer	sfingosinový ceramid
TH	theofylin
X-ray	rentgenová (difrakce)

Teoretická část

1. Kůže (lat. *cutis*, řec. *derma*)

Kůže je rozsáhlý orgán pokrývající tělo obratlovců, u člověka dosahuje její plocha 1,6 – 2 m² a hmotnost průměrně 3 kg (s tukovým polštářem až 20 kg). Na očních víčkách je kůže nejtencí (0,5 mm), nejtlustší je na zádech (4 mm).¹⁻²

Kůže chrání organismus před působením vnějšího prostředí (chemické látky, biologická agens, fyzikální faktory) a zachovává jeho vnitřní rovnováhu. Činností cévního řečiště a potních žláz vytváří termoregulační systém, dýcháním a exkrecí potních a mazových žláz se podílí na látkové výměně. Dále se účastní imunitních procesů, produkce vitamínu D a v neposlední řadě je propojena také s psychikou jedince (senzitivní funkce, emoce).²⁻³

Stavba kůže umožňuje její přizpůsobení se pohybu i jiným tvarovým změnám. Rozlišují se dvě hlavní vrstvy kůže – povrchová **epidermis** a hlubší **dermis** a **podkožní vazivo**.¹

1.1. Podkožní vazivo (*tela subcutanea*)

Podkožní vazivo spojuje kůži se svalovou nebo kosterní tkání, je místem ukládání tukového polštáře.

1.2. Dermis (*corium*, škára)

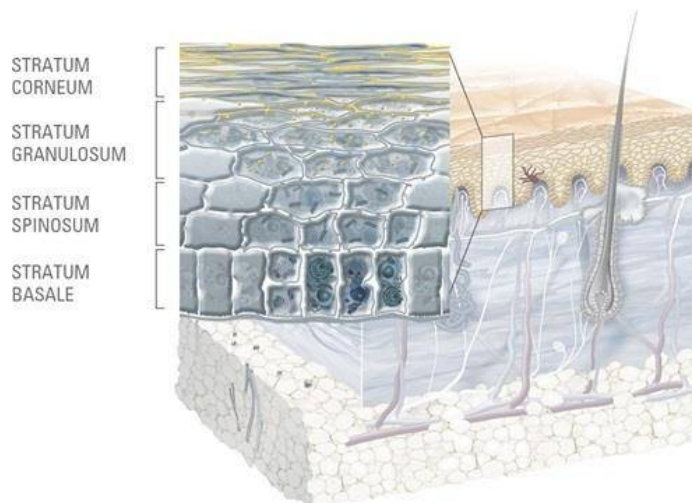
Dermis je 0,5 – 2,5 mm tlustá vazivová vrstva obsahující především kolagenová a elastická vlákna uspořádaná do snopců, plstovitě propletených. Dermis zajišťuje mechanickou pevnost, ohebnost, tažnost a odolnost kůže, zasahuje do ní cévní a nervový systém.

1.3. Epidermis (pokožka)

Epidermis je vnější vrstva kůže, jejíž buňky vytváří směrem k povrchu několik odlišitelných vrstev (obrázek 1, převzato z *Eucerin.cz*⁴) s rostoucím stupněm rohovění (syn. keratinizace = hromadění stavební bílkoviny keratinu⁵), až se nakonec odloučí v podobě šupinek.³ Proces od vzniku buňky po její odloučení trvá 2 – 4 týdny.

- *stratum germinativum* je vrstva zárodečná, zahrnuje dvě dílčí vrstvy:
 - *stratum basale (cylindricum)* – jednobuněčná vrstva při bazální membráně, probíhá v ní buněčné dělení a vznikají nové buňky
 - *stratum spinosum* – nově vzniklé i dělící se buňky charakteristického ostnitého tvaru ve 2 – 5 řadách
- *stratum granulosum* představuje 1 – 3 vrstvy buněk s charakteristickou přítomností prekurzorů keratinu ve formě granul
- *stratum lucidum* - tenká vrstva bezjaderných buněk patrná jen v oblastech s výrazným rohověním; buňky obsahují další prekurzor keratinu obalující cytoskelet
- *stratum corneum* - nejsvrchnější vrstva, která se po částech průběžně odděluje (*stratum disjunctum*)

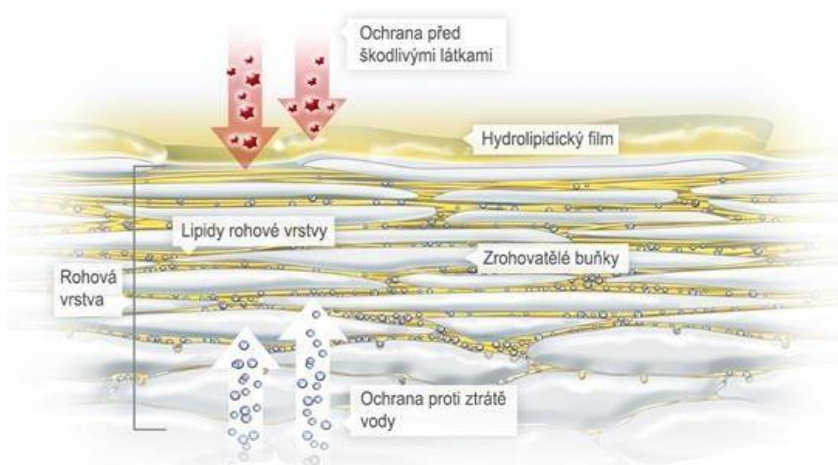
Sousední buňky epidermis jsou pevně spojeny prostřednictvím desmosomů, které průběžně zanikají a znovu se obnovují, aby mohlo docházet k posunu buněk směrem k povrchu.²⁻³ Epidermis není vaskularizovaná a kromě keratinocytů jsou v ní přítomné také pigmentové buňky (melanocyty), imunokompetentní buňky (Langerhansovy buňky) a smyslové buňky (Merkelovy buňky) a její součástí jsou také rohové deriváty (chlupy, nehty, kožní žlázy).¹



Obrázek 1. Schéma stavby kůže s popisem vrstev epidermis ve výřezu.

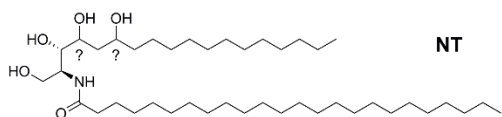
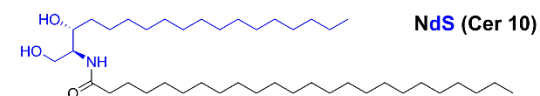
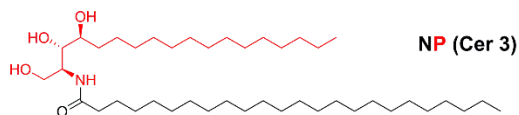
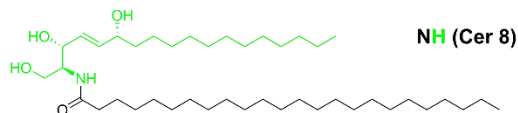
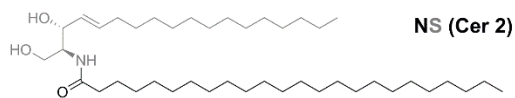
2. Stratum corneum (SC)

Nejsvrchnější vrstvu kůže - *stratum corneum* (syn. rohová vrstva kůže, obrázek 2, převzato z *Eucerin.cz*⁴) tvoří zploštělé, odumřelé **buňky** (korneocyty, syn. rohové buňky) v 10 – 15 vrstvách, které jsou **obklopené lipidovou mezibuněčnou hmotou**. Podíl lipidové hmoty je 6 – 10 % hmotnosti SC,⁶⁻⁷ jejími složkami jsou sfingolipidy, mastné kyseliny, steroly, estery sterolů; fosfolipidy v ní prakticky nejsou zastoupeny.⁸⁻⁹ Základem lipidové matrix je přibližně **ekvivalentní směs ceramidů, volných mastných kyselin a cholesterolu**.¹⁰ Složení a uspořádání mezibuněčné lipidové hmoty je pro bariérovou funkci kůže zásadní,¹¹⁻¹² proto je detailněji přiblíženo v následujícím textu.

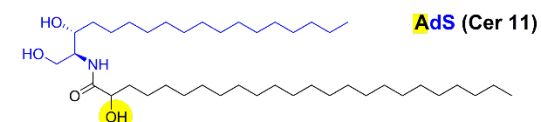
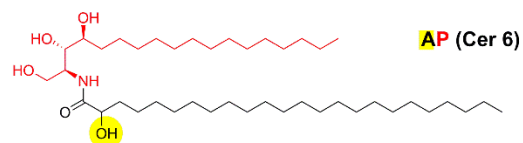
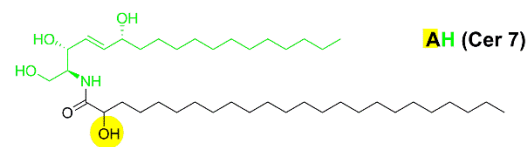
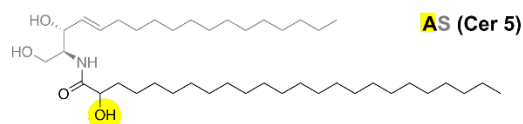


Obrázek 2. Schéma nejsvrchnější vrstvy kůže (*stratum corneum*).

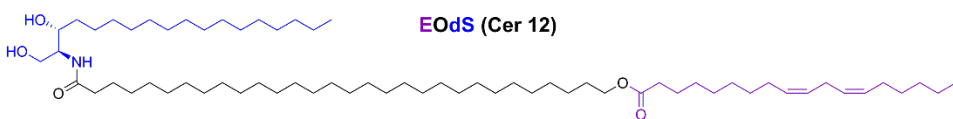
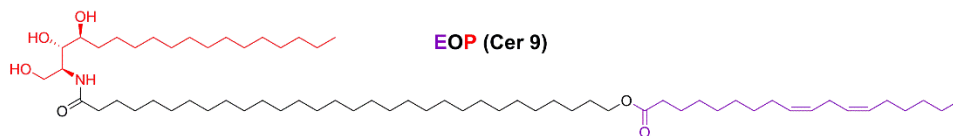
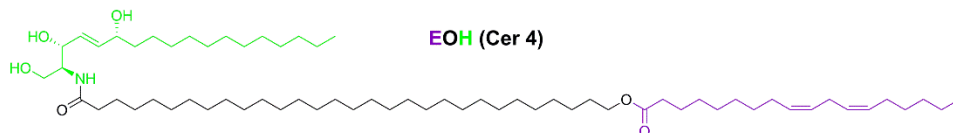
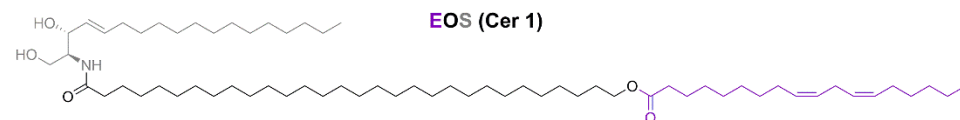
Nehydroxylované ceramidy



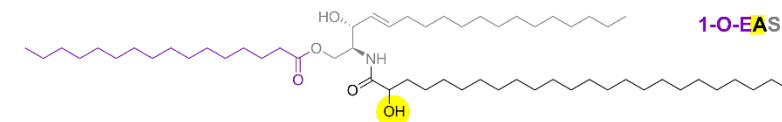
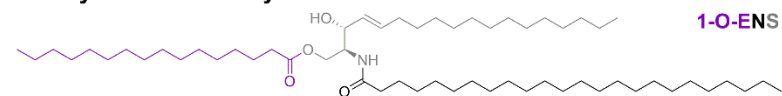
α-hydroxylované ceramidy



ω-esterifikované ceramidy



1-O-acylované ceramidy



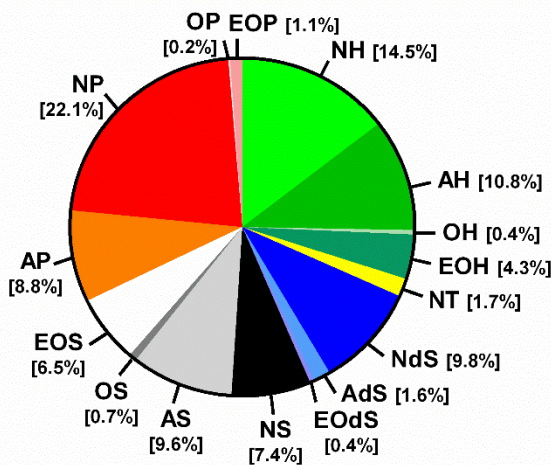
Obrázek 3. Strukturní typy volných kožních ceramidů.

2.1. Ceramidy

Ceramidy patří mezi sfingolipidy.¹³⁻¹⁴ Jako součást plazmatických membrán se účastní buněčné signalizace regulující proliferaci, diferenciaci a smrt buněk.¹⁴⁻¹⁵ Ovlivnění metabolismu ceramidů může být využito v terapii nádorových, kardiovaskulárních a imunitních onemocnění.¹⁵

2.1.1. Typy ceramidů v kůži

Ceramidy jsou nejčastěji odvozeny od bazického aminoalkoholu **sfingosinu** (S), sfinganinu (syn. **dihydrosfingosinu**, dS), **fyto sfingosinu** (P) nebo **6-hydroxysfingosinu** (H). Sfingoidní báze se mezi sebou liší především počtem hydroxylových skupin a přítomností *trans*-dvojnásobné vazby. A např. 6-hydroxysfingosin je přítomný pouze v kožních ceramidech.¹⁶ Primární aminoskupina sfingoidní báze je acylována řetězcem **nasyčené mastné kyseliny** (N, non-hydroxy), **α-hydroxy kyseliny** (A) nebo **ω-hydroxy kyseliny** (O), jejíž koncový hydroxyl může být esterifikován, nejčastěji kyselinou linolovou (EO).¹⁶⁻²¹ Na rozdíl od fosfolipidů mají ceramidy podstatně menší a neionizovanou polární hlavu.²² Sfingoidní báze obsahuje 14 – 28 uhlíků, ceramidový acyl 16 – 36C.²³ Doposud bylo v lidské epidermis popsáno 15 typů volných ceramidů (obrázek 3).¹⁴ V nedávné době byly v kůži detekovány ceramidy NT se čtyřmi hydroxyly v nasyčené sfingoidní bázi (dihydroxysfinganin, T) a dále ceramidy jejichž hydroxyl v poloze 1 je acylován dalším nasyčeným řetězcem (C16, C24, E), tzv. 1-O-acylceramidy (např. 1-O-ENS).^{14, 24} Zastoupení jednotlivých typů ceramidů v nejsvrchnější vrstvě kůže znázorňuje obrázek 4 (převzato z t'Kindt a kol.²⁴).



Obrázek 4. Zastoupení ceramidů v lidském SC.

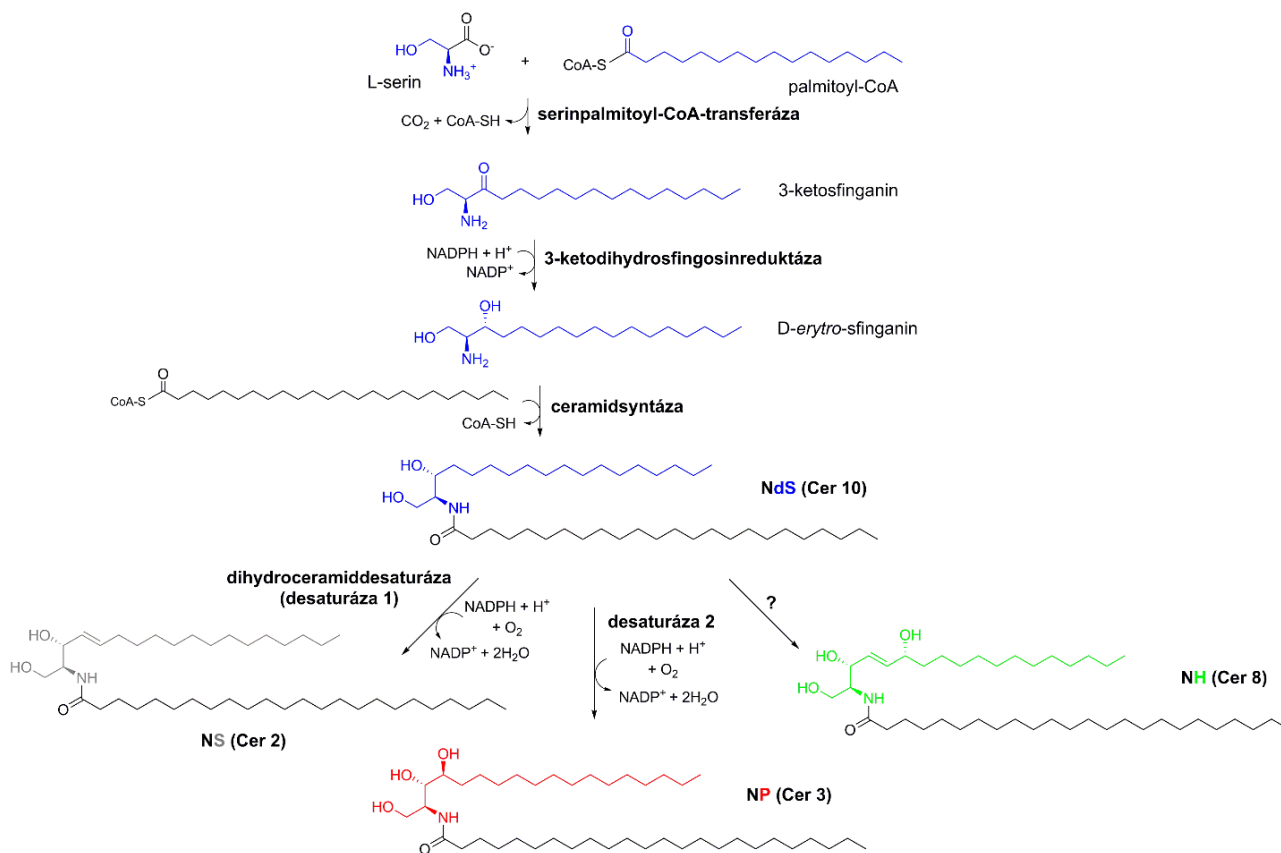
2.1.2. Názvosloví ceramidů

Názvosloví ceramidů podle Motty,²⁵ doplněné Robson a kol.¹⁶ a Rabionet a kol.,¹⁴ vychází z písmenného označení příslušné kyseliny a báze (viz výše) a nahradilo dříve používanou nomenklaturu (Ceramid 1 – 9)²⁶ na základě polarity látek a jejich mobility při tenkovrstvé chromatografii. Např. ceramid složený ze sfingosinové báze a zbytku nasyčené mastné kyseliny bude označen jako NS, fyto sfingosin acylován řetězcem ω-hydroxy kyseliny s linolovým zbytkem jako EOP. Ceramidy typu EO jsou v literatuře označovány také jako acylceramidy.²³

2.1.3. Biosyntéza ceramidů^{14, 23}

Prvním krokem *de novo* syntézy ceramidů je kondenzace palmitoylkoenzymu A (palmitoyl-CoA) a L-serinu probíhající za účasti serinpalmitoyl-CoA-transferázy (klíčového enzymu v regulaci syntézy sfingolipidů) v endoplazmatickém retikulu buňky.²⁷ Vzniklý 3-ketosfinganin (syn. 3-dehydro sfinganin) je následně redukován na D-erythro-sfinganin. K dalším strukturálním změnám sfingoidní báze dochází

až po acylaci její primární aminokupiny (tedy už v molekule ceramidu).²⁸ Dihydroceramiddesaturáza (syn. desaturáza 1) zajišťuje přítomnost 4,5-*trans*-dvojně vazby v řetězci sfingosinu, pomocí desaturázy 2 je do pozice 4 uhlíkatého řetězce zavedena hydroxyskupina v řetězci fytosfingosinu, přeměna báze na 6-hydroxysfingosin zatím není objasněna.^{14, 29-30} Biosyntézu ceramidů zachycuje obrázek 5.



Obrázek 5. Biosyntéza ceramidů.

Acyl mastné kyseliny je ke sfingoidnímu řetězci připojen ze svého koenzymu prostřednictvím jedné z šesti ceramidsyntáz. Ceramidsyntázy jsou charakteristické svojí tkáňově-specifickou distribucí a především preferencí k délce a stupni nasycení acylového řetězce, např. ceramidsyntáza 3 vytváří amidovou vazbu s dlouhým řetězcem ($\geq 26C$) ω -hydroxy kyselin.³¹⁻³² Syntéza ceramidových acylů vychází z mastné kyseliny s 16C řetězcem, který je *de novo* syntetizován a aktivován koenzymem A v cytosolickém proteinovém komplexu.³³ Následné prodloužení řetězce probíhá v endoplazmatickém retikulu; v jednom cyklu je vždy připojen dvouuhlíkatý zbytek pocházející z acetyl-CoA.³⁴ Výchozí reakcí je kondenzace obou složek prostřednictvím 3-ketoacyl-CoA-syntázy, enzymem ze sedmičlenné rodiny označované jako elongázy (resp. enzymy prodlužující velmi dlouhé řetězce mastných kyselin).³⁵⁻³⁶ Číselné označení elongáz souvisí s jejich substrátovou specifitou (délkou řetězce a přítomností nasycených vazeb), v kůži byly identifikovány čtyři elongázy nesoucí označení 1, 3, 4 a 7.^{14, 35} Ketoskupina v poloze 3 je následně redukována na hydroxyskupinu, která je dehydrázou odstraněna za vzniku dvojně vazby, ta je v posledním kroku zredukována na vazbu jednoduchou.

Zavedení hydroxylové skupiny do polohy α a ω acylového řetězce v molekule ceramidu prozatím není zcela objasněno. V případě α -hydroxylace se předpokládá účast více enzymů ze třídy hydroxyláz, ω -hydroxylace je pravděpodobně řízena enzymy z rodiny 4 cytochromu P450.¹⁴ Acyl kyseliny linolové, esterově vázané na ω -hydroxyl ceramidů typu EO, pochází z fosfolipidů a triacylglycerů.³⁷ Podobně jako jiné esenciální mastné kyseliny, kyselina linolová v organismu *de novo* nevzniká, ale je přijímaná stravou.³⁸ Hydroxyl v poloze 1 sfingosinového řetězce je prostřednictvím acyltransferázy esterifikován acyly z diacylglycerolů, na které byly převedeny z fosfolipidů.³⁹⁻⁴⁰

Lipidy jsou v buňce skladovány v **lamelárních tělískách** (syn. Odlandova tělíska)⁴¹, sekrečních buněčných organelách, které obsahují prekurzory ceramidů, fosfolipidy (prekurzory volných mastných kyselin), cholesterol a množství enzymů, které se uplatňují především v metabolických procesech doprovázejících vyplavení jejich obsahu.³ **Prekurzory ceramidů** mají v poloze 1 sfingoidní báze navázanu polární skupinu; převažují glukosylované ceramidy, ceramidy NS a AS se také vyskytují v podobě sfingomyelinu, tzn. s vázaným fosforylcholinem.⁴² Syntéza prekurzorů probíhá v Golgiho aparátu, přenesení glukózy z aktivované formy (uridindifosfátu) zajišťuje glukosyltransferáza, sfingomyelinsyntáza 1 přenáší fosforylovaný zbytek z fosfatidylcholinu.^{13, 43-44} Lamelární tělíska (granula) vznikají z oddělených měchýřků Golgiho aparátu a zanikají splynutím s plazmatickou membránou buňky a vylitím jejich obsahu do mezibuněčného prostoru v oblasti přechodu *strata granulosum* a *corneum*.¹⁴ Odštěpení glukózy z ceramidového prekurzoru zajišťuje β -glukocerebrosidáza, přeměnu sfingomyelinu kyselá sfingomyelináza.⁴⁵⁻⁴⁷

2.2. Další složky mezibuněčné hmoty SC

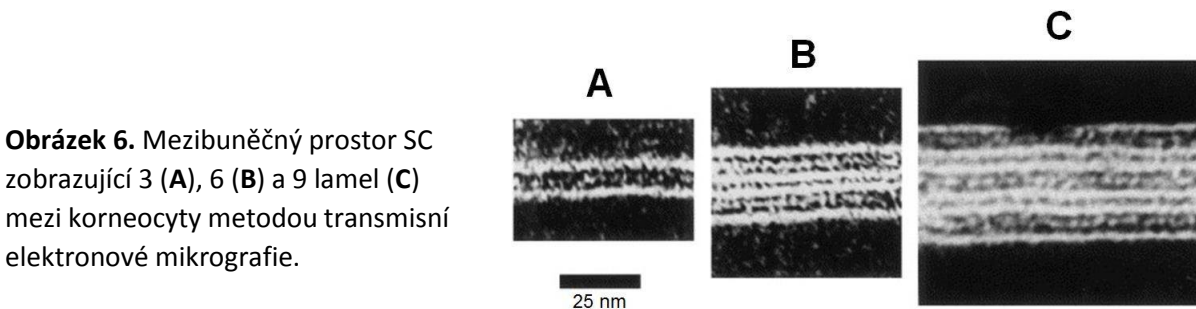
Na základě délky řetězce můžeme volné mastné kyseliny SC rozdělit do tří skupin na i) **kyseliny s dlouhým řetězcem** (C14 – 19), ii) **s velmi dlouhým řetězcem** (C20 – 26) a iii) **s ultra dlouhým řetězcem** (C > 26). Podobně můžeme podle délky acylu klasifikovat ceramidy.¹⁴ Kromě nasycených kyselin, se v lipidové matrix vyskytují také mononenasycené, polynenasycené a hydroxykyseliny.⁴⁸⁻⁴⁹ Nejčastěji jsou pak zastoupeny kyseliny s 24 a 26 uhlíkatým nenasyceným řetězcem.⁵⁰⁻⁵¹ **Cholesterol** (Chol) je hlavním zástupcem sterolů ve SC, dále tato vrstva obsahuje významné množství **cholesterol-sulfátu** (až 6 % z hmotnosti mezibuněčných lipidů), který hraje důležitou roli v soudružnosti a deskvamaci SC a také začlenění cholesterolu do lamelární struktury lipidové matrix.^{7, 10-11, 52}

2.3. Organizace lipidů SC

Mezibuněčná lipidová hmota je s korneocyty propojena prostřednictvím ω -hydroxylovaných ceramidů (OS, OP a OH) nejčastěji s nasyceným 30C acylem, které se kovalentně vážou na bílkoviny (především involukrin) korneocyty přes koncovou OH skupinu.⁵³⁻⁵⁶ Tato **lipidová obálka korneocyty**, jejíž součástí jsou také kovalentně vázané mastné kyseliny, vytváří templát pro uspořádání lipidů SC do lamel.⁵⁷⁻⁵⁸

2.3.1. Lamelární uspořádání SC

Mezibuněčné lipidy jsou uspořádány do lamel souběžných s povrchem korneocytů (obrázek 6, převzato z Hill a kol.⁵⁹), přesná organizace lipidů v lamele však stále není zcela objasněna. Jedním z návrhů uspořádání lamely je středově souměrná **lipidová dvojvrstva o přibližné šířce 13 nm**.^{22, 60-61} Na obrázku 6A je v prostřední části zachycena lamela mezi dvěma korneocyty. Podle modelu Swartzendruber a kol. (1989)⁶² odpovídají vnější světlé (širší) pásy uhlovodíkovým řetězcům směřujícím od buněk ke středu (včetně řetězců kovalentně vázaných ω -hydroxylovaných ceramidů a mastných kyselin), tmavé (užší) pásy zobrazují oblasti s vyšší elektronovou hustotou, tedy polární skupiny. Model předpokládá, že velmi úzký světlý centrální pás obsahuje vzájemně vymezené sfingosinové řetězce kovalentně vázaných ceramidů v otevřené konformaci (viz kapitola 2.3.3.). Kovalentně vázané lipidy pak mají být obklopeny molekulami volných lipidů a cholesterol se má vyskytovat především v okrajových pásech.⁶³ Na obrázku 6B je zachycen mezibuněčný prostor s dvojnásobným počtem lamel (6) v uspořádání široký-úzký-široký-široký-úzký-široký, tedy spárovaná dvojvrstva, která bývá označována jako **Landmannova jednotka**.^{62, 64} Na obrázku 6C jsou patrné dvě Landmannovy jednotky a jim odpovídající tři dvojvrstvy. Mezi spárovanými dvojvrstvami (Landmannovými jednotkami) je patrná úzká elektronově bohatší oblast (tmavý pás), která zřejmě zahrnuje také esterový acyl ceramidů typu EO.⁵⁹



Obrázek 6. Mezibuněčný prostor SC zobrazující 3 (A), 6 (B) a 9 lamel (C) mezi korneocyty metodou transmisní elektronové mikroskopie.

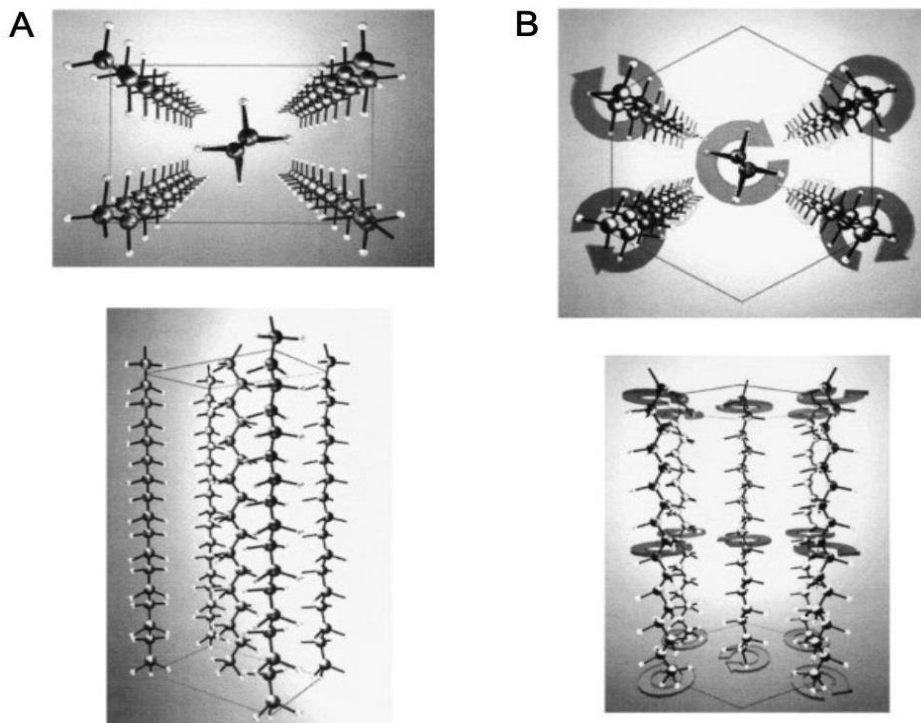
Kromě tzv. **dlouhé lamelární fáze** odpovídající šířce jedné dvojvrstvy (~13 nm), struktura obsahuje tzv. **krátkou lamelární fázi** o délce 6,5 nm.⁶⁵⁻⁶⁸ Předpokládá se, že k vytvoření dlouhé lamelární fáze jsou nepostradatelné ultra dlouhé ceramidy typu EO, neméně důležité je jejich dostatečné množství, rozmanitost v délce řetězců a struktuře polární hlavy.^{22, 69-70} Naopak k vytvoření dlouhé lamelární fáze pravděpodobně nejsou nezbytné mastné kyseliny.⁷¹ Existují však i studie modelových membrán lipidů SC obsahující ceramidy typu EO, v nichž dlouhá lamelární fáze nebyla zachycena a krátká lamelární fáze dosahuje délky 4,2 – 4,8 nm.⁷²⁻⁷³

Ve SC je charakteristicky přítomná další fáze s periodicitou 3,35 nm tvořená separovaným krystalickým cholesterolem.^{67, 74} Předpokládá se také přítomnost 1 – 2 molekul vody na polární hlavu lipidů.^{22, 75}

2.3.2. Laterální uspořádání SC

Laterální uspořádání charakterizuje uspořádání řetězců uvnitř lamely (obrázek 7, převzato z Norlén, L.⁷⁶). Lipidy SC jsou uspořádány buď v **orthorhombické** (obrázek 7A) nebo **hexagonální fázi** (obrázek 7B) nebo jsou neuspořádané v kapalně-krystalické fázi. Orthorhombická fáze představuje

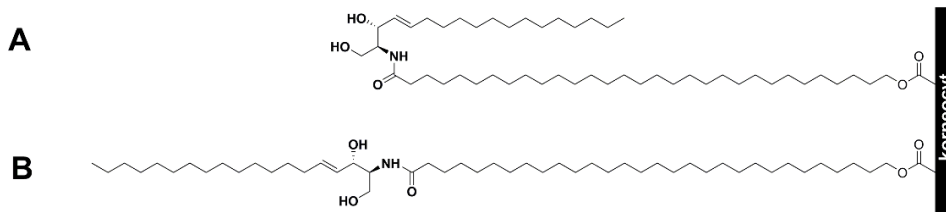
velmi těsné uspořádání řetězců v *all-trans* (syn. *cik-cak*) konformaci do obdélníkové krystalické mřížky, která brání volné rotaci řetězců. Hexagonální (šestiúhelníková) mřížka umožňuje částečnou mobilitu řetězců. V kapalně-krystalické fázi se většina řetězců nachází ve volné *gauche* konformaci a ztrácí laterální organizaci.^{65-66, 77} Ve SC zdravé lidské kůže se vyskytují všechny tři fáze, převažuje však nejtěsnější orthorhombická.^{12, 78-80} Např. v prasečím SC však orthorhombické uspořádání nebylo prokázáno.⁸¹



Obrázek 7. (A) Laterální uspořádání uhlovodíkových řetězců do orthorhombické mřížky (nahore) v *all-trans* konformaci (dole). (B) Laterální uspořádání uhlovodíkových řetězců do hexagonální mřížky (nahore) v *gauche* konformaci (dole).

2.3.3. Molekulové konformace ceramidů

Prostorové uspořádání ceramidových řetězců ve SC vyplývá z amfifilních vlastností jejich molekul. Pokud jsou alkylové řetězce orientovány paralelně vedle sebe, hovoříme o tzv. **vlásenkové (uzavřené)**



Obrázek 8. Kovalentní vazba ω -hydroxylovaných ceramidů na kerneocyty. Na panelu **A** jsou ceramidové řetězce v uzavřené (vlásenkové) konformaci, na panelu **B** v otevřené konformaci.

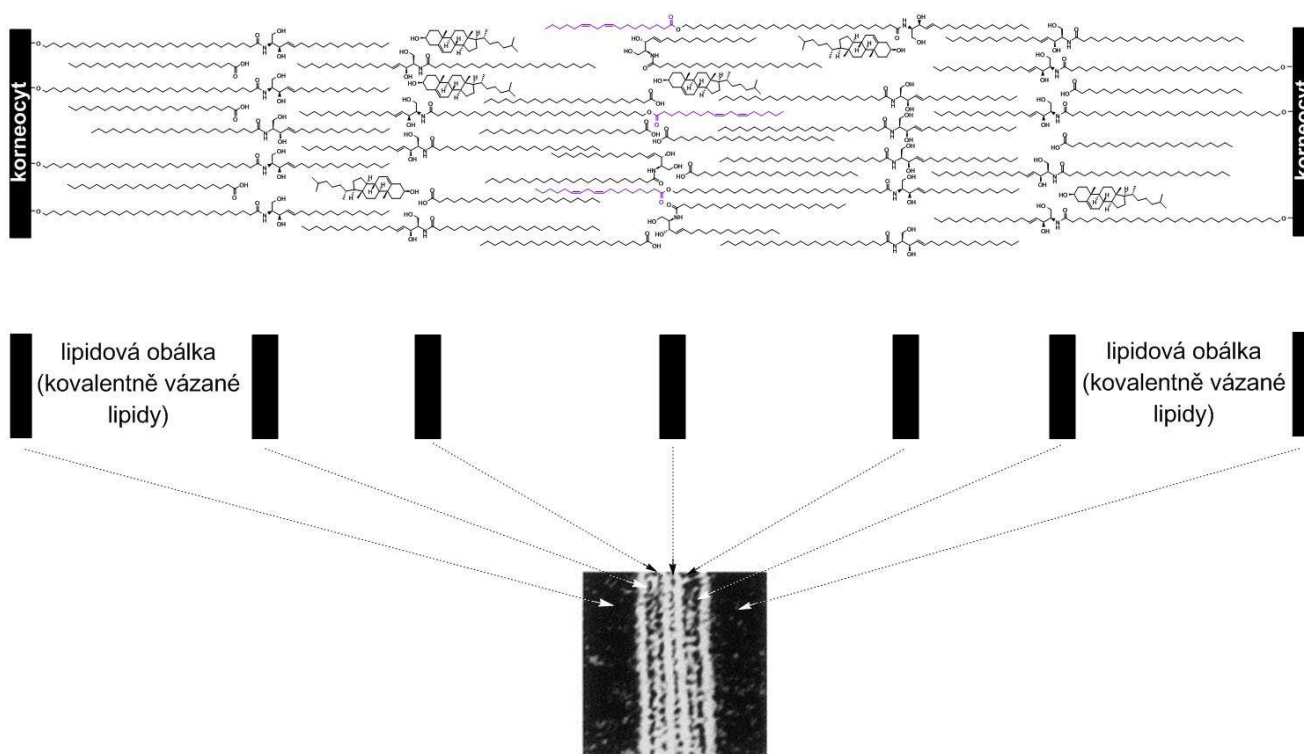
konformaci, obrázek 8A. V případě **otevřené konformace** (obrázek 8B) jsou řetězce postaveny naproti sobě.⁸²

Organizace mezibuněčné hmoty SC je pro bariérové vlastnosti kůže zásadní, stále však chybí podrobný popis lamelární struktury SC a objasněna není ani důležitost laterálního uspořádání.^{12, 78, 83-84} Díky rozmanitosti lipidů SC spolu složky interagují různými způsoby, které také ovlivňují jejich podíl na celkové organizaci mezibuněčné hmoty.²² S využitím různých technik bylo navrženo několik modelů uspořádání lipidů SC, o osmi z nich je pojednáno v následující kapitole.

3. Modely lamelárního uspořádání lipidů SC

3.1. Model podle Swartzendrubera

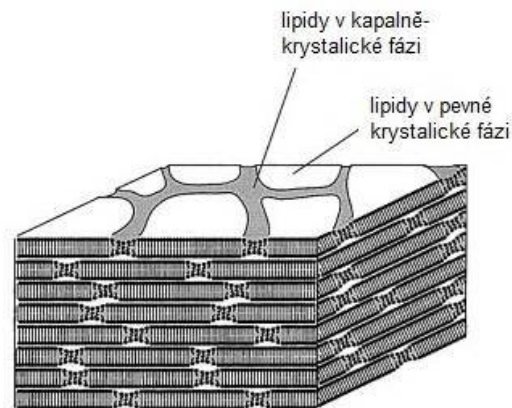
Jeden z prvních modelů navržený Swartzendrubere a kol.⁶² vychází z pozorování mezibuněčného prostoru transmisí elektronovou mikroskopií izolovaného lidského SC a je podrobněji popsán v kapitole 2.3.1. Na obrázku 9 je zachycena Landmannova jednotka mezi dvěma korneocyty, tmavé a světlé pásy odpovídající odlišné elektronové hustotě spárované dvojvrstvy a k nim přiřazeno navržené molekulární uspořádání lipidů.



Obrázek 9. Model lamelárního uspořádání lipidů SC podle Swartzendrubera a kol. (1989).

3.2. Doménově mozaikový model

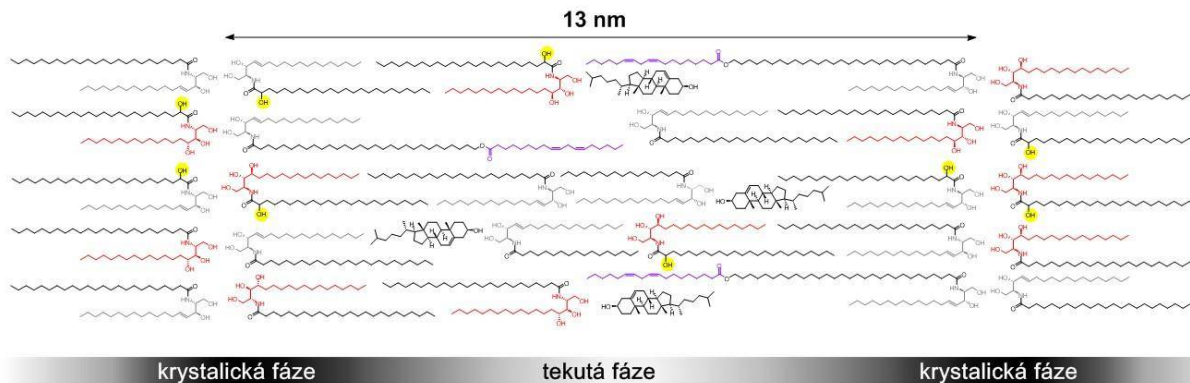
Forslind⁸⁵ (1994) navrhuje dvouvrstvý doménově mozaikový model (v originálním názvu „The Domain Mosaic Model“), v němž se má část lipidů nacházet v **pevné krystalické fázi** a být obklopena oddělenými doménami v **kapalně-krystalické fázi**. Těsnější pevná fáze má být tvořena ceramidy ve vlásenkové konformaci (s řetězci orientovanými vedle sebe) a bránit ztrátám vody z organismu. Permeabilní kapalně-krystalická fáze má obsahovat lipidy s krátkým ($C < 20$) nebo nenasyceným řetězcem, které mají zajišťovat pružnost SC.⁸⁶ Na obrázku 10 (převzato z Norlén, L.⁷⁶) je znázorněno několik lipidových dvojvrstev na sobě, na jejich povrchu je patrné rozlišení fází.



Obrázek 10. Doménově mozaikový model, v němž jsou lipidy uspořádány v oddělených fázích.

3.3. Sendvičový model

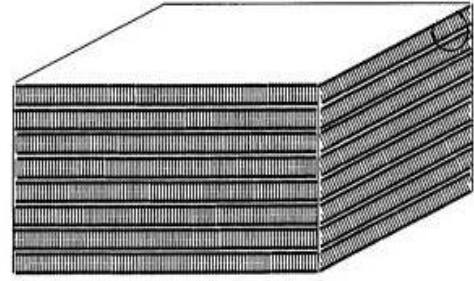
V originále „The Sandwich Model“, popsany Bouwstrou a kol.⁸⁷ (2000) je navržen na základě měření rentgenové difrakce lipidů SC, které spojuje s popisem uspořádání mezibuněčné hmoty zobrazené elektronovou mikroskopií. Vychází mj. z předpokladů, že lipidy SC jsou uspořádány ve dvou lamelárních krystalických fázích s pravidelně se opakující šířkou lamely přibližně 6 a 13 nm a že organizace širší lamelární fáze (12 - 13 nm) je podmíněna přítomností ultra dlouhých ceramidů typu EO.^{66-67, 69, 74} V sendvičovém modelu mají vnější okraje lamely obsahovat těsně přiléhající řetězce ceramidů s nasyceným acylem (převážně s délkou 24 - 26 uhlíků) ve vlásenkové konformaci a cholesterol. Acyl kyseliny linolové s cholesterolem a krátkými ceramidy (převážně s 16C acylem) má vyplňovat střed lamely. Jinými slovy, mezi **dvě vrstvy v krystalickém** uspořádání je vložena **fluidní doména**,⁸⁸ jak je znázorněno na obrázku 11.



Obrázek 11. Sendvičový model podle Bouwstry a kol. – uspořádání dvojvrstvy o délce 13 nm je doplněno o popis fází, ve kterých se lipidy nacházejí.

3.4. Model gelové fáze

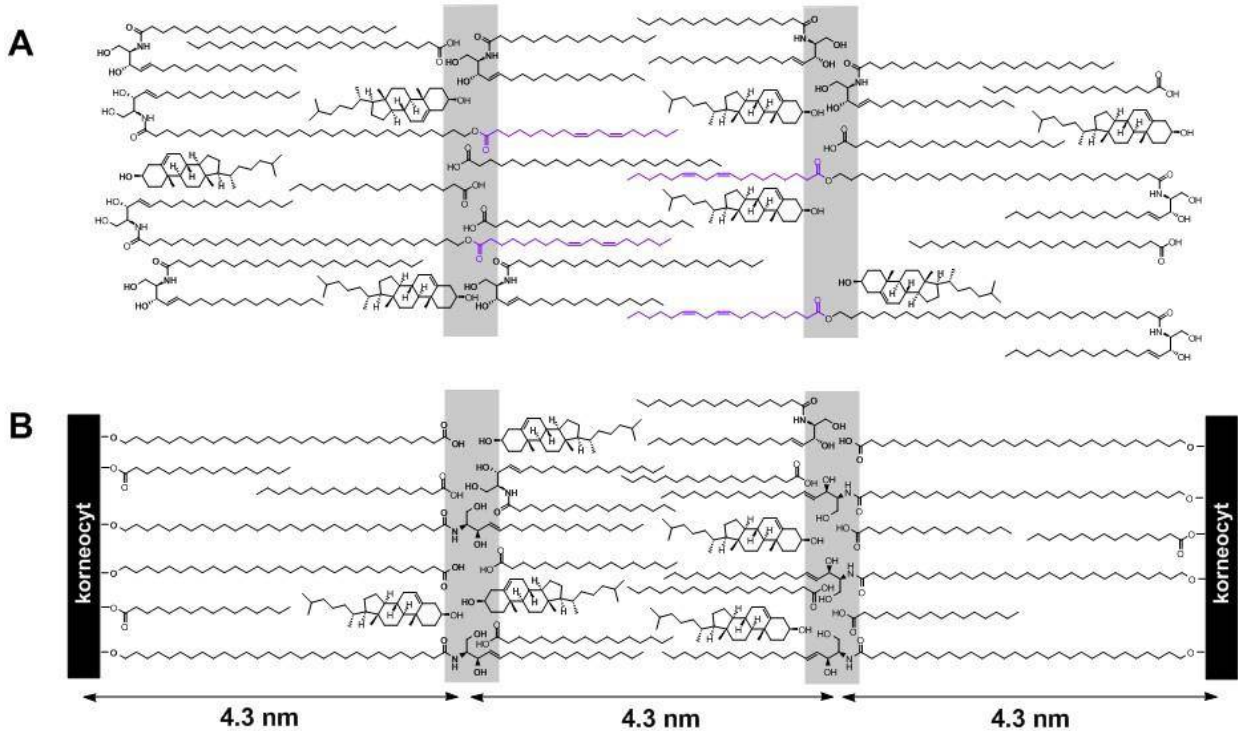
V roce 2001 publikoval Norlén „The Single Gel Phase Model“,⁷⁶ tvořený lipidy SC v souvislé lamelární gelové fázi (obrázek 12). Ta má obsahovat lipidy organizované převážně v **hexagonální mřížce s konformačně neuspořádanými řetězci**. Molekuly mohou být v modelu uspořádány do dvojvrstev a lamela může obsahovat vodu. Na povrchu SC může v důsledku deskvamace a nižšího obsahu vody docházet k fázové separaci lipidů a oddělování krystalické fáze. S touto strukturální změnou mohou ceramidy přecházet z uzavřené (vlásečkové) do otevřené konformace. Kromě koexistence molekulových konformerů ceramidů, mohou být lipidy v modelu zároveň v hexagonálním (řetězce) i v orthorhombickém (oblast polární hlavy) uspořádání. Norlén klade velký důraz na heterogenitu složení mezibuněčné hmoty, která má zajišťovat stabilitu homogenní gelové fáze.



Obrázek 12. Model uspořádání lipidů SC podle Norléna, tvořený souvislou gelovou fází.

3.5. Rovnoměrný tří jednotkový model lipidové lamely SC

Na základě denzitometrického vyhodnocení snímků elektronové mikroskopie přehodnotili Hill s Wertzem⁵⁹ (2003) asymetrické uspořádání lamel, které zřejmě bylo zapříčiněné nerovnoměrností

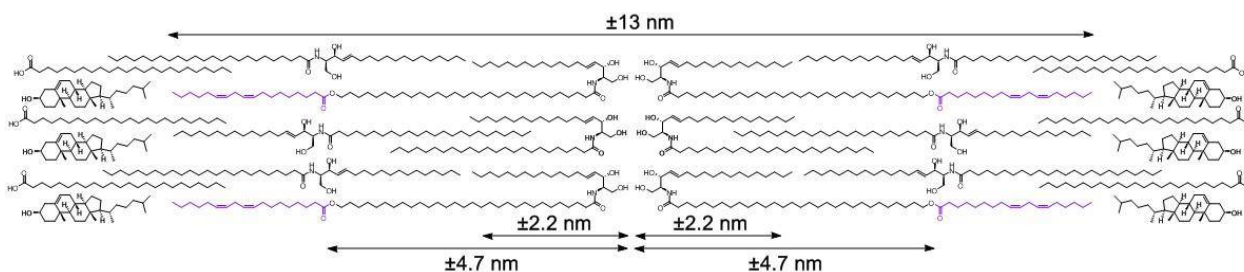


Obrázek 13. (A) Model lamelárního uspořádání lipidů SC podle Hilla a Wertze, (B) uspořádání samostatné lamely mezi korneocyty.

distribucí fixačního činidla. Složení a uspořádání lamely navrhuje v souladu se sendvičovým modelem (kapitola 3.3.) s tím rozdílem, že **lipidy v lamele mají být rozděleny rovnoměrně do tří úseků** o délce 4,3 nm, viz obrázek 13A. Výskyt lipidů v modelu je náhodný s výjimkou acylceramidů, jejichž acyl kyseliny linolové je vždy orientován do prostření části lamely. Samostatná dvojrstva mezi korneocyty (obrázek 13B) obsahuje v centrální části spolu s acyl kyseliny linolové také sfingosinové řetězce kovalentně vázaných ceramidů. Dále se předpokládá, že vnější jednotky lamely budou ve srovnání s jejím středem rigidnější.

3.6. Model asymetrické dvojrstvy podle McIntoshe

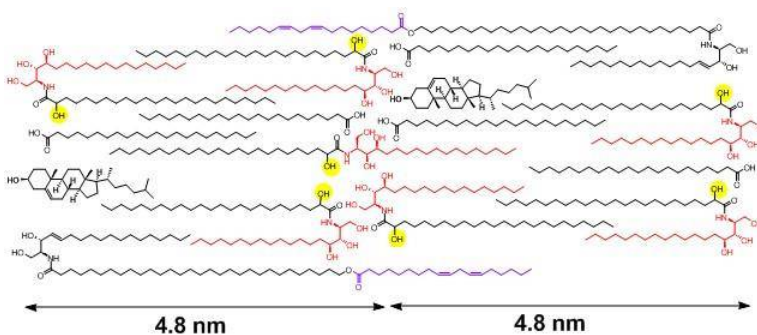
McIntosh navrhl model^{70, 89} (2003, obrázek 14) na základě hodnocení modelových lipidových membrán kožní bariéry rentgenovou difrakcí a výpočtu jejich profilu elektronové hustoty. Oblast s nejnižší elektronovou hustotou ve vzdálenosti $\pm 2,2$ nm od osy dvojrstvy přiřazuje uhlovodíkovým řetězcům. Do středu a na okraje dvojrstvy ($\pm 4,7$ nm od osy dvojrstvy), tedy do míst s největší elektronovou hustotou, umísťuje polární hlavy. **Asymetrické uspořádání dvojrstvy vysvětluje vlastnostmi cholesterolu**, který přednostně interaguje s nasycenými řetězci mastných kyselin a ceramidů a vyhýbá se esterově vázaným nenasyceným acylům dlouhých ceramidů (typu EO), které tímto k nesouměrnosti přispívají. Přiklání se k domněnce, že ultra dlouhé ceramidy jsou pro vytvoření 13 nm strukturální jednotky zásadní a zaujímají vlásenkovou konformaci.⁶⁹⁻⁷⁰ Řetězce ostatních ceramidů mohou být uspořádány ve vlásenkové i otevřené konformaci.



Obrázek 14. Model asymetrického uspořádání dvojrstvy lipidů SC podle McIntoshe.

3.7. I v přítomnosti ceramidů EO nemusí vznikat dlouhá lamelární fáze (~13 nm)

V roce 2009 navrhli Schroeter a kol.⁷³ dvojrstvý lamelární model (obrázek 15), jehož opakující se strukturální jednotky mají stejnou šířku (4,8 nm), přestože studované lipidové modely SC obsahovaly ultra dlouhé ceramidy. V jejich hodnocení metodou neutronového rozptylu použili také deuteriem značené kyseliny, jejichž polární konce, stejně jako polární hlavy ceramidů a esterovou vazbu linolového řetězce, umístili do středu

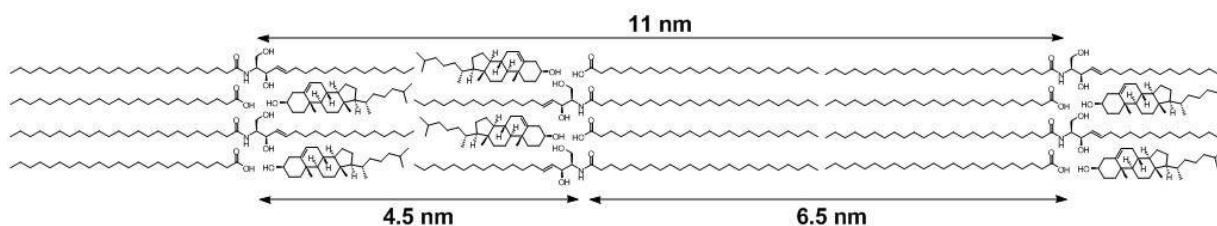


Obrázek 15. Model lamelárního uspořádání lipidů SC podle Schroeter a kol., zahrnující také ultradlouhé ceramidy EO.

a na okraje modelu. Ceramidy mohou v membráně zaujímat vlásenkovou i otevřenou konformaci, cholesterol má být rozložen rovnoměrně.

3.8. Model lamelárního uspořádání lipidů SC s ceramidy v otevřené konformaci

Další Norlénův navržený model⁶³ (2012) je založen na hodnocení kožní bariéry elektronovou mikroskopií v kombinaci se simulací a molekulovým modelováním. V mezibuněčné hmotě SC pozoruje opakující se nesymetrickou lamelární jednotku o délce 11 nm skládající se z úzkého (4,5 nm) a širokého pásu (6,5 nm). Navrhuje **otevřenou konformaci ceramidů**, díky které má být kůže nepropustná pro hydrofilní i lipofilní látky a zároveň odolná proti hydrataci i dehydrataci. Sfingosinový řetězec spolu s cholesterolem má vyplňovat úzkou část a acylový řetězec s volnými mastnými kyselinami širokou část jednotky, jak je znázorněno na obrázku 16.



Obrázek 16. Norlénův model předpokládající otevřenou konformaci ceramidů, asociaci sfingosinových řetězců ceramidů s cholesterolem a acylové části ceramidů s mastnou kyselinou.

3.9. Podobnost a rozdíly v navržených modelech uspořádání lipidů SC

Přestože jeden z prvních modelů (Swartzendruber a kol.⁶²) detailně nepopisuje vzájemné postavení lipidů SC, z návrhu je patrná podobnost s modelem Norléna⁶³ (2012), ačkoli autoři pracují s rozdílnou **šířkou lamely**. Několik modelů vychází z šířky lamely 13 nm (Swartzendruber a kol.,⁶² Bouwstra a kol.,⁸⁷ Hill a Wertz,⁵⁹ McIntosh⁸⁹), zároveň jejich autoři předpokládají, že existence této charakteristické fáze je podmíněna přítomností ceramidů typu EO. Nicméně Schroeter a kol. prokázali, že přestože model obsahuje ceramidy typu EOS, tato lamelární fáze v něm není detekována.⁷³ Doménově mozaikový model (Forslind⁸⁵) a model gelové fáze (Norlén,⁷⁶ 2001) připouští přítomnost dvou fází – Forslind pevnou a kapalně-krytalickou fází a Norlén rozdílné fáze v důsledku odlišného laterálního uspořádání a separace složek. Norlén⁷⁶ (2001) kromě vlásenkové navrhuje otevřenou konformaci ceramidů, která se s výjimkou sendvičového modelu objevuje v ostatních uvedených modelech. Otevřená konformace je pro dvou řetězcové lipidy nezvyklá, ale její přítomnost v lamelě by mohla objasnit její soudružnost.⁶²
⁸² Také v naší práci jsme s použitím deuterovaných lipidů pozorovali přítomnost otevřené konformace v jednoduché lipidové membráně obsahující ceramid NS, lignocerovou kyselinu a cholesterol.⁹⁰ Pokud vezmeme v úvahu přítomnost 1-O-acylceraidů,¹⁴ v jejichž molekule jsou tři řetězce, tato konformace rozhodně nemůže být vyloučena.

4. *In vitro* nástroje studia kožní bariéry

Potřeba *in vitro* modelů kožní bariéry souvisí s etickými problémy pokusů na zvířatech a náročností získat lidskou tkáň. Výběr vhodného modelu je dán předmětem studia, jejich různorodost komplikuje vzájemné porovnání a složitost modelů ztěžuje jejich hodnocení. Každý model zjednodušuje a tím může do jisté míry zkreslovat situaci *in vivo*. Přesto jsou modely užitečným a hojně používaným nástrojem ve výzkumu kožní bariéry.

4.1. Kůže a její části

Průnik látek přes kůži je studován pomocí permeačních pokusů na **kůži**, oddělené **epidermis** nebo **izolovaném SC**. Lidské kůži je nejvíce podobná kůže prasečí, makaka a veverky, používají se i další zvířecí modely - hlodavci (potkan, myš, králík), opice, psi.⁹¹⁻⁹³ Dalšími nástroji ve studiu kůže jsou např. **perfundové orgány** (prasečí uši, kravská vemena).⁹³

4.2. *In vitro* tkáňové modely kožní bariéry

Tkáňové kožní modely jsou zaměřeny především na hodnocení biochemických a imunologických procesů v kůži. Upřednostňovány jsou vícevrstevné buněčné systémy dvojího typu: **i) model epidermis** v podobě keratinocytů pěstovaných na umělých živných půdách nebo **ii) model kůže plné tloušťky** zahrnující kulturu keratinocytů na fibroblastových půdách obsahující kolagen.⁹⁴ Složitější modely mohou obsahovat další typy buněk (např. melanocyty, Langerhansovy buňky) nebo být propojeny do systémů.⁹⁵ Tyto modely jsou díky širokému uplatnění poměrně rozšířené, několik z nich je komerčně dostupných.

4.3. Multilamelární membránové modely lipidů SC

Kožní bariéra je dána vlastnostmi lipidové matrix její nejsvrchnější vrstvy (SC).^{11-12, 23} Lipidové modely SC tyto vlastnosti napodobují a představují tak nástroj ke studiu bariérové funkce kůže.⁹⁶⁻⁹⁷ S využitím biofyzikálních metod lze zkoumat uspořádání lipidů SC za různých podmínek či změnou složení objasnit význam jednotlivých složek. Nejčastěji se jedná o směsi ceramidů, mastných kyselin a cholesterolu.^{70, 77, 98} V dřívějších studiích modely obsahovaly také extrahované korneocyty.⁹⁹⁻¹⁰⁰

4.3.1. Složky modelových lipidových membrán SC

Většina složek SC je komerčně dostupná s výjimkou ceramidů s ultra dlouhým řetězcem nebo ceramidů odvozených od 6-hydroxysfingosinu.¹⁰¹ Používají se ceramidy izolované z kůže (prasečí, myší, lidské), z mozku (hovězího dobytka, prasat) nebo z vajec (především prekurzory ceramidů). Relativně snadné oddělení SC umožňuje izolaci lipidové hmoty a následně separaci jejich jednotlivých složek i v laboratorních podmínkách.¹⁰² Z kvantitativního hlediska tento způsob neposkytuje dostatečné množství látek, proto se ceramidy a jejich analogy připravují synteticky. Mastné kyseliny se používají samostatně nebo jako směsi kyselin s různými délkami uhlovodíkového řetězce. Kromě cholesterolu bývá v modelech v malém množství obsažen také cholesterol-sulfát.^{97, 103-104}

4.3.2. Biofyzikální metody hodnocení vlastností modelových lipidových membrán SC

Biofyzikální charakteristiku lipidových modelů umožňuje **infračervená (IR)** nebo **Ramanova spektroskopie**, které popisují vlastnosti alkylových řetězců (konformace, laterální uspořádání), vodíkové vazby nebo fázové změny.^{79, 105-107} Obě metody jsou relativně levné, nedestruktivní a jejich dalšími výhodami jsou použití malého množství vzorku nebo absence značek a barviv, které by mohly měření ovlivnit.¹⁰⁸ Termotropní chování (fázové přechody a energetické změny) lipidů SC bývá kromě spektroskopických metod hodnoceno **diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC)**.¹⁰⁹⁻¹¹³ Opakující se lamelární struktura v lipidových systémech je popisována pomocí **maloúhlové rentgenové difrakce** a **neutronové difrakce**.^{66-67, 73, 114} V oblasti **širokoúhlé rentgenové difrakce** je možné prokázat přítomnost laterálního orthorhombického uspořádání.^{70, 84, 87, 89} **Spektroskopii nukleární magnetické rezonance** pevného skupenství (solid-state Nuclear Magnetic Resonance, NMR) je dokonce možné rozlišit přítomnost více fází na základě odlišné mobility alkylových řetězců.^{77, 115-120} Vlastnosti lipidů v modelech může být hodnoceno také propustností modelových membrán pomocí **permeačních pokusů**.^{83, 97, 121-123}

4.3.3. Příprava modelových multilamelárních lipidových membrán

Prvním krokem přípravy modelových membrán je **rozpuštění** lipidových složek, nejčastěji v chloroformu, příp. ve směsi chloroformu s methanolem. Používají se i další organická rozpouštědla a jejich směsi, např. benzen.^{77, 109} Po **smísení** lipidových komponent je rozpouštědlo odstraněno proudem inertního plynu (dusíku) a následně je vzorek dosušen v exikátoru. Lipidové směsi se zpravidla rozpouštějí analogicky ve směsi chloroform/methanol, nejčastěji v poměru 2:1 a podle hodnotící metody jsou po odpaření rozpouštědla připraveny k měření. V případech, kdy je směs nanášena na povrch (např. polykarbonátový membránový filtr), který není odolný působení chloroformu, se lipidy rozpouštějí ve směsi hexan/ethanol, hexan/isopropylalkohol, příp. methanol/ethyl-acetát.^{121, 124}

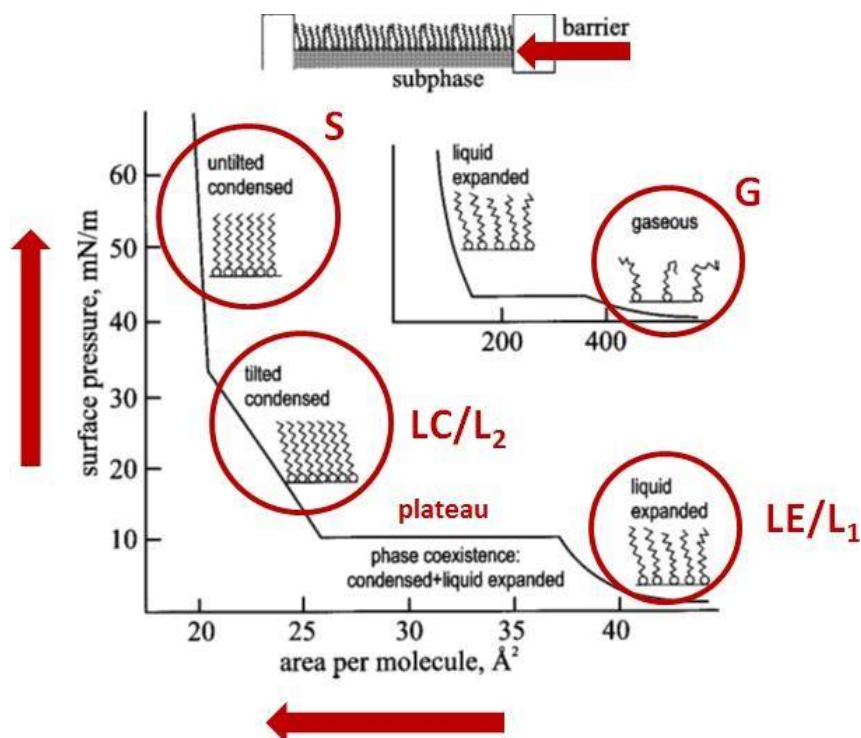
Příprava membrán spočívá v rovnoměrném **nanášení** roztoku lipidů ze stříkačky a současným rozprášením proudem inertního plynu. Nanášecím zařízením může být Linomat (Camag, Muttenz, Švýcarsko) nebo stříkáčká pistole (Airbrush Service Almere, Lelystad, Holandsko). Zbytky rozpouštědel jsou odstraněny inertním plynem nebo vysušením v exikátoru. Následuje zahřátí (na teplotu vyšší než je hlavní fázový přechod lipidové směsi) a pozvolné zchlazení (cca 4 hodiny) membrány, přičemž dochází k vytvoření lamelárního uspořádání.¹²⁵⁻¹²⁶ Po 24 hodinách **ekvilibrace** při 32 °C je membrána zpravidla připravena k hodnocení.

Pro měření **IR spektroskopii** mohou být lipidové směsi nanášeny přímo na měřicí krystal (ATR, AgBr), vzorky měřené **Ramanovou spektroskopii** bývají umístěny do skleněných vzorkovnic, **kalorimetrické měření** probíhá v kovových nádobkách. Měření **neutronové difrakce** lipidových vzorků probíhá na křemíkovém nebo silikonovém substrátu, vzorky hodnocené **rentgenovou (X-ray) difrakci** bývají nanášeny na křemíkové, slídové nebo skleněné nosiče. Pro měření pevných vzorků **NMR spektroskopii** slouží skleněné rourky. Pro studium **permeability** modelových membrán bývá lipidová směs nanášena na filtr (polykarbonátový, celulózový) s definovanou velikostí pórů. Membrány jsou pak umístěny do difúzních cel lipidovou vrstvou směřující k donorové části.

Vliv **hydratace** na uspořádání přirozených lipidů (ceramidů s velmi dlouhými řetězci) v modelových membránách při teplotě kožního povrchu nebyl pozorován, nicméně ovlivněno může být uspořádání lipidů s odlišnou strukturou.^{70, 121, 127} Membrány se hydratují vodou nebo pufrů o různém složení a pH, např. pro hodnocení vlivu iontů na organizaci lipidů v modelových membránách. Následuje-li hydratace krátce po ekvilibraci, voda narušuje celistvost membrány, protože proniká dovnitř a vytváří v ní vlastní separované domény, což není žádoucí především v permeačních studiích.¹²¹

4.4. Monovrstvé modely

Langmuirovy monovrstvy představují zjednodušený model multilamelárního uspořádání lipidů SC.¹²⁸⁻¹²⁹ Molekulový film se utváří **na rozhraní kapalina-vzduch** po opatrném nanesení lipidové směsi na povrch kapaliny (subfáze). Vzorky jsou nanášeny v organickém rozpouštědle a po jeho odpaření se pomocí posuvných bariér zmenšuje plocha subfáze (area per molecule, A [\AA^2]) a tím se zvyšuje povrchové napětí (surface pressure, π [mN/m]). Chování monovrstev za těchto podmínek vyjadřují křivky závislosti změn povrchového napětí na teoretické ploše jedné molekuly (**π -A izotermie**) popisující termodynamické vlastnosti a fázové změny monovrstev (obrázek 17, převzato z *Smos.sogang.ac.kr*¹³⁰). Při kompresi prochází monovrstvy hned několika fázovými změnami v závislosti na teplotě tání látek.¹³¹ Z počáteční koexistence *gas (G)/liquid-expanded (LE* nebo také L_1) fáze přejdou do *liquid-expanded (LE* nebo také L_1) fáze a přes hlavní fázový přechod do uspořádané *liquid-condensed (LC* nebo také L_2) fáze. Dalším stlačováním monovrstvy dochází k vytvoření pevné (solid, **S**) fáze a následně kolapsu monovrstvy.¹³² Derivací izotermie získáme hodnotu **maxima modulu kompresibility** (C_s^{-1}) popisující elastické vlastnosti molekulového filmu. Průběh křivky významně ovlivňuje teplota a složení subfáze, nejčastěji pufru s požadovanými vlastnostmi.



Obrázek 17. Fázové změny monovrstvy popsané na izotermě - křivce závislosti povrchového napětí na zmenšující se teoretické ploše jedné molekuly.

K bližší charakterizaci monomolekulového filmu slouží doplňkové metody popisující monovrstvy *in situ* nebo přenesené na pevný podklad. Zobrazení povrchové struktury monovrstev, především přítomnost separovaných oblastí (domén), umožňuje **Brewsterova úhlová mikroskopie** založená na odrazu polarizovaného světla od molekulového filmu.¹³³ Další metodou vizualizace plochy tvořené monovrstvou je **fluorescenční mikroskopie**, která si žádá použití značených molekul, ty však mohou chování monovrstvy ovlivnit.¹³⁴ Techniky využívající **rentgenové záření** nachází uplatnění v popisu laterálního uspořádání polárních hlav a/i hydrofobních řetězců amfifilních molekul.¹³⁵ Určení konformace molekul, jejich vzájemné uspořádání a interakce umožňuje hodnocení monovrstev **IR spektroskopii**.¹²⁹ Obě tyto techniky mohou být využity ke studiu monovrstev na rozhraní kapalina-vzduch i monovrstev přenesených na pevný podklad.¹³⁶ Velmi používanou metodou trojrozměrného zobrazení povrchu s rozlišením v desetinách nm je **atomová silová mikroskopie**.¹³⁷

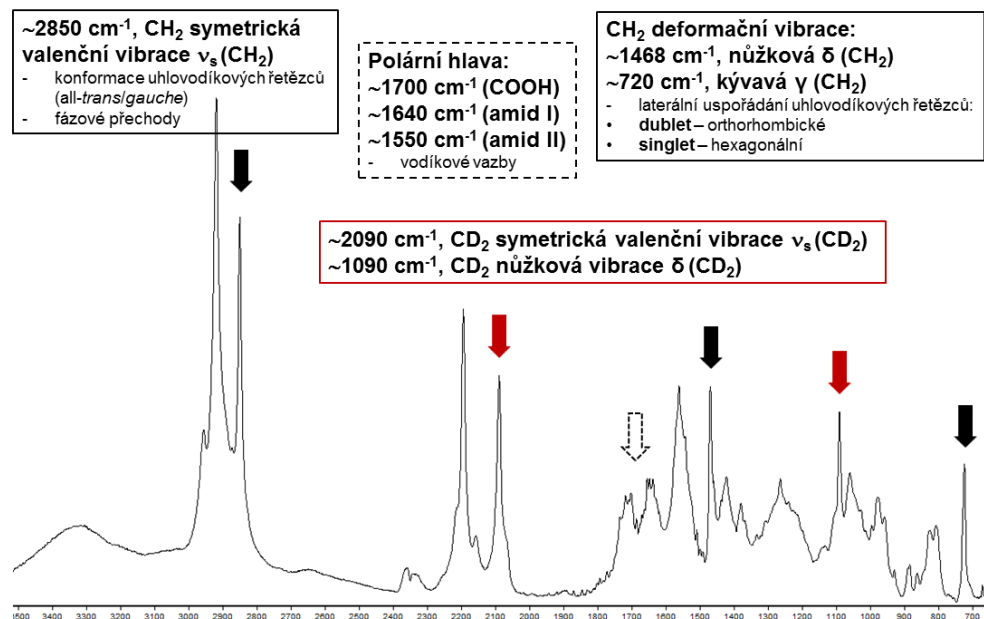
Způsob přenesení molekulového filmu z povrchu kapalně subfáze na pevný nosič je znám jako **technika Langmuir-Blodgettové**.¹³⁸ Pevný podklad je zvolen s ohledem na hydrofilně-lipofilní vlastnosti přenášené vrstvy a techniku jejich dalšího studia, např. za účelem mikroskopického hodnocení bývají monovrstvy přenášeny na sklo, křemen nebo slídová sklíčka.¹³⁹ Při nanášení monovrstvy na hydrofilní substrát předchází ponoření nosiče do subfáze nanesení vzorku na její povrch. Monovrstvy jsou z povrchu subfáze přenášeny při konstantní rychlosti a povrchovém napětí zajišťující rovnoměrné pokrytí pevného podkladu.

5. Využití infračervené spektroskopie ve studiu uspořádání lipidů SC

IR spektroskopie je rychlá, levná, poměrně efektivní a nedestruktivní metoda pro studium uspořádání lipidových modelů SC, ale také izolované vrstvy SC nebo přímo kůže za různých podmínek.^{78, 105, 140} Jejím principem je absorpce infračerveného záření, která má za následek **změny v molekulových vibracích**, resp. přechod molekuly na vyšší energetickou hladinu v závislosti na změnách dipólového momentu. Atomy nebo skupiny atomů mohou v molekulách vibrovat ve směru vazeb – **valenční vibrace**, nebo může docházet ke změnám valenčních úhlů – **deformační vibrace**.¹⁴¹ Vibrační přechody vždy doprovází změny rotačního stavu, které jsou energeticky méně náročné.¹⁴²

Hodnoty vibračních přechodů se v IR spektroskopii udávají ve **vlnočtech** [cm^{-1}], největší význam má oblast 4000 – 200 cm^{-1} . Výstupem je **spektrum** – grafické znázornění závislosti energie vyjádřené jako absorbance (bezrozměrná veličina), příp. v procentech transmitance (propustnosti) či reflektance (odrazu) na vlnové délce. Pro odhad polohy absorpčního pásu platí, že pro energetický přechod u valenčních vibrací je potřeba tím více energie, čím menší je hmotnost vzájemně vázaných atomů a čím větší je silová konstanta vazby (vzrůstá od jednoduché přes dvojnou k trojně vazbě).¹⁴¹ Nejvíce energie (nejvyšší hodnoty vlnočtu) bude potřeba pro valenční vibrační přechod nejlehčího atomu – vodíku. Odhad polohy pásů deformačních vibrací je složitější.

Chování lipidů SC je popisováno několika vibracemi, ty nejdůležitější jsou shrnuty na obrázku 18 a přiblíženy v dalším textu. Nahradíme-li neznačené složky membrán SC deuterovanými lipidy, můžeme jejich chování sledovat zároveň avšak odděleně z důvodu odlišného posunu C-H a C-D vibrací.^{105, 107}



Obrázek 18. Znázornění vybraných vibrací na IR spektru modelové lipidové membrány SC.

5.1. Valenční CH₂/CD₂ vibrace

Rozlišujeme symetrické (v_s) a asymetrické (v_a) valenční vibrace methylenových skupin.¹⁴³ Obě jsou citlivé na změny konformace řetězců (*trans*/*gauche*) a jejich laterálního uspořádání. **Symetrické vibrace** uhlovodíkových řetězců se ve spektru nacházejí v rozmezí 2848 - 2854 cm⁻¹, deuterovaných řetězců okolo 2090 cm⁻¹.^{105, 107} Hodnota vlnočtu **pod 2850 cm⁻¹** naznačuje, že v uhlovodíkových řetězcích převažuje all-*trans* konformace; s rostoucím podílem *gauche* konformerů hodnota vlnočtu stoupá.^{105, 107, 144} Zároveň, prochází-li lipidy SC fázovými změnami (např. se zvyšující se teplotou), dochází ke změnám jejich laterálního uspořádání, což se projeví zvýšením hodnoty vlnočtu CH₂/CD₂ valenční vibrace.^{79, 109, 145}

5.2. Deformační CH₂/CD₂ vibrace

Obě deformační vibrace – **nůžková** (δ) a **kývavá** (γ) – umožňují sledování uspořádání lipidových řetězců do krystalické mřížky a určit přítomnost oddělených fází (domén).^{83, 107} Pás nůžkové vibrace uhlovodíkových řetězců se ve spektru nachází v oblasti 1460 – 1475 cm⁻¹, deuterovaných řetězců v oblasti 1086 – 1094 cm⁻¹.¹⁰⁵ Pro orthorhombickou mřížku je charakteristické **rozštěpení píku** v dublet u obou deformačních vibrací (u kývavé CH₂ s hodnotami vlnočtů okolo 720 a 728 cm⁻¹), zatímco pro hexagonální uspořádání je ve spektru jeden pík.^{83, 105, 107, 146-147} Štěpení píku je způsobeno spřažením vibrací sousedních řetězců stejných izotopů,¹⁰⁵ proto když použijeme lipidové směsi obsahující neznačené a deuterované složky, budeme moci sledovat také mísitelnost lipidů.

5.3. Vibrace v polární oblasti

K objasnění molekulární organizace lipidů SC mohou přispět také interakce v oblasti polární hlavy ceramidů a mastných kyselin. K jejich popisu můžeme použít např. **valenční vibraci karbonylu** –

karboxylové a amidové (amid I a II) skupiny v oblasti 1690 – 1740 cm^{-1} .^{107, 148-149} Nízké hodnoty vlnočtu karboxylu ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) značí zapojení skupiny do vodíkových vazeb, jejich oslabení se projeví zvýšením vlnočtu.^{106, 148-149} **Amidovou vibraci I** (1650 – 1660 cm^{-1}) tvoří především valenční vibrace amidového karbonylu, pokles jejího vlnočtu naznačuje zapojení do vodíkových vazeb. Naopak **amidová vibrace II** (1540 – 1550 cm^{-1}) vychází z deformační N-H a valenční C-N vibrace a pokles jejího vlnočtu naznačuje oslabení vodíkových interakcí.^{107, 144, 150-151}

Experimentální část

Tato dizertační práce je věnována **studiu strukturálních prvků v molekulách ceramidů, které ovlivňují bariérové vlastnosti kůže**. Převážná část výsledků je získána hodnocením modelových lipidových membrán představující zjednodušený model mezibuněčné hmoty SC, která je bariérovou funkcí kůže zásadní. V následujících čtyřech podkapitolách je komentováno celkem pět publikací, jejichž jsem prvním nebo druhým autorem. Komentované publikace jsou na konci podkapitol uvedeny a zároveň jsou přiloženy jako přílohy.

Zkrácení acylového řetězce v molekule ceramidu: ztráta bariérových vlastností kůže

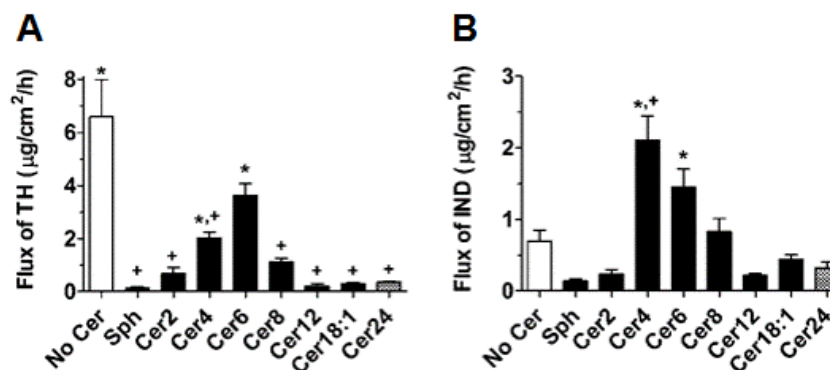
Publikace (příloha 1):

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. [IF 2013: 4,2]

Lokálně podávané ceramidy a jejich analogy zlepšují projevy kožních onemocnění, pro které je typické poškození bariérové funkce kůže (např. atopická dermatitida).¹⁵²⁻¹⁵⁵ Ceramidy se zkráceným acylem se dříve používaly ve studiu biologických vlastností ceramidů pro jejich schopnost začlenit se v buněčných membránách, avšak zjistilo se, že zkrácení acylu v molekule ceramidů vede ke změnám jejich biologické funkce.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Bylo zjištěno, že sfingosinové ceramidy (typu NS) s krátkým acylem zvyšují propustnost kůže, proto jsme se rozhodli studovat molekulární podstatu tohoto děje pomocí lipidových membrán SC.^{103, 158}

V prvním kroku jsme se zaměřili na **permeační charakteristiky** modelových membrán a možnost jejich využití jako objektivního nástroje ke studiu vlastností ceramidů. Byly připraveny lipidové membrány SC obsahující ceramidy s acylem o délce 2, 4, 6, 8, 12, 18:1 a 24 uhlíků (Cer2 – 24). Byly potvrzeny výsledky z permeačních experimentů na kůži - **sfingosinové ceramidy se zkráceným acylovým řetězcem ztrácí bariérové vlastnosti**.

Propustnost membrán je vyjádřena pomocí veličiny flux na obrázku 19. Flux je množství modelové látky (např. léčiva), které projde plochou kůže/membrány za jednotku času. **Membrány obsahující ceramid se 4 a 6C acylem byly až 10x** (pro modelové léčivo theofylin, TH –

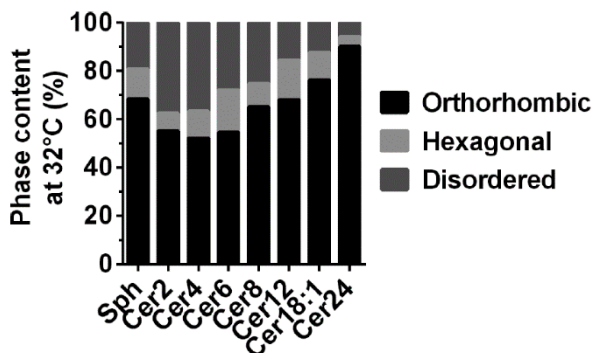


Obrázek 19. Permeabilita modelových membrán SC – flux TH (panel A) a flux IND (panel B).

obrázek 19, panel A), **resp. 6,5x propustnější** (pro modelové léčivo indometacin, IND – obrázek 19, panel B) **než membrány obsahující přirozený ceramid (Cer24)**. Navíc, lipidové membrány obsahující Cer 4, 6 a 8 zvyšují propustnost pro IND ve srovnání s membránou bez ceramidu (obrázek 19, panel B). Naše výsledky tak rozšířily poznatky z jiných studií, které popisují vliv délky acylového řetězce na chování ceramidů v plazmatických membránách.^{156-157, 159-160}

K přiblížení molekulární podstaty zvýšené permeability modelových membrán obsahující ceramidy se zkráceným acylem jsme je dále studovali pomocí biofyzikálních metod – **diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), infračervené (IR) spektroskopie a práškové rentgenové (X-ray) difrakce**. Dále jsme hodnotili lipidové **monovrstvy na rozhraní voda-vzduch** a na pevném podkladu pomocí **atomové silové mikroskopie (AFM)**.

Velmi překvapivé bylo zjištění, že při teplotě povrchu kůže (tj. 32 °C) jsou **lipidové řetězce ve všech modelových membránách SC velmi dobře uspořádané** – ve velmi těsné (orthorhombické) mřížce a zaujímají převážně *all-trans* konformaci. Rozdíl je však v podílu orthorhombické fáze (obrázek 20), který je u propustnějších membrán nižší. Uspořádání řetězců do orthorhombické mřížky je nejspíš dáno přítomností volných mastných kyselin, které se v modelových membránách mohou separovat. Důležitá je však také délka řetězce mastných kyselin. Podíl orthorhombické fáze v modelových membránách obsahujících



Obrázek 20. Podíl orthorhombické, hexagonální a neuspořádané fáze v modelových membránách SC.

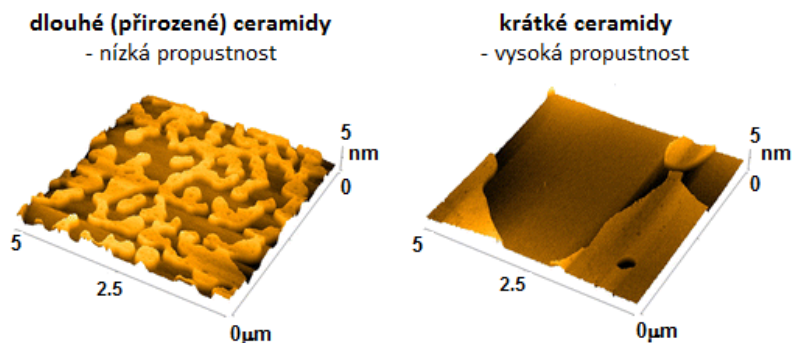
šestnácti uhlíkatou mastnou kyselinu je totiž nižší ve srovnání s modelem obsahující 24C mastnou kyselinu, pravděpodobně z důvodu rozdílné fázové separace.¹⁶¹ Také dvojná vazba v řetězci kyseliny v modelových membránách SC narušuje konformaci řetězců a brání jejich těsnému seskupení do orthorhombické mřížky.¹²² V ekvimolární směsi ceramidů s cholesterolem je přítomnost orthorhombické fáze nezřetelná.¹⁶² **Pouhá přítomnost orthorhombického uspořádání lipidů tak nemůže být považováno za parametr nízké propustnosti modelových lipidových membrán SC.** Z pozdější studie Mojumbara kol.¹⁶³ bylo potvrzeno, že rozdílná délka řetězců ve směsi ceramidů v modelech SC má za následek volnější konformaci a zvýšení podílu hexagonálního uspořádání lipidů.

Mísitelnost a separace lipidových složek může být podstatou rozdílné permeability modelových membrán obsahující ceramidy s různou délkou acylu. Např. mísitelnost ceramidů s mastnými kyselinami je podmíněna délkou řetězců lipidů. Kyselina palmitová (C16) je v ekvimolárním poměru mísitelná s ceramidem NP s délkou acylu 16 i 24 uhlíků, avšak kyselina lignocerová (C24) není zcela mísitelná ani jedním z nich.¹⁶⁴ V ekvimolární směsi ceramidu, kyseliny lignocerové a cholesterolu se však objevují pouze dvě fáze a to v případě ceramidu NP i NS.¹⁶⁴ V našich modelových membránách se **přirozený ceramid (Cer24) s kyselinou lignocerovou mísí velmi dobře, zatímco ceramidy se zkráceným acylem vytváří separované domény**. To je zřejmé z nůžkové vibrace v infračervených spekter neznačených lipidů a směsí s deuterovanou kyselinou. V X-ray difraktogramech pozorujeme pouze dvě lamelární fáze v případě membrány Cer24, **pro propustné membrány obsahující ceramidy se zkrácenými acyly je charakteristická přítomnost více lamelárních fází s krátkou periodicitou.**

V lipidových směsích izolovaných z lidské SC se na soudružnosti ceramidové domény pravděpodobně významně podílí směs volných mastných kyselin.¹³⁷

Monovrstvy lipidových směsí s přirozeným ceramidem (Cer24) se s rostoucím povrchovým napětím na rozhraní voda-vzduch uspořádávají (kondenzují) ochotněji a na pevném podkladu vytváří „vyšší fázi“ - souvislejší domény zaujímající větší plochu (obrázek 21). Za příčinu těsnějšího uspořádání monovrstev ceramidů odvozených od sfingosinu, který obsahuje *trans*-dvojnou vazbu, ve srovnání s ceramid

s nasyceným sfingosinovým řetězcem jsou považovány interakce polární hlavy s vodou.¹⁶⁵ Dvojná vazba se podílí na připojení dvou molekul vody k molekule ceramidu a vzniku komplexu, který další vodíkové můstky s okolím nevytváří, avšak nebrání působení van der Waalových sil mezi uhlovodíkovými řetězci ceramidu.¹⁶⁶ Těsné uspořádání polárních hlav ceramidů vyplývající z jejich hydratace slábne při změně stereochemie ceramidů, polohy dvojných vazby či v přítomnosti jednoduché nebo trojné vazby.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Ceramidy s velmi dlouhým acylem (24C) kondenzují snadněji, zatímco ceramidy s acylem kratším než 14 uhlíků spontánně nekondenzují a molekuly mají spíš rozvolněný (liquid-expanded) charakter.^{164, 167-169} Tyto poznatky se shodují s našimi výsledky. Přítomnost cholesterolu způsobuje v monovrstvách ceramidů rozvolnění řetězců a v závislosti na vzájemném poměru složek, na délce a nasycení acylového řetězce ceramidů může docházet k jejich fázové separaci.^{129, 170-172} U monovrstevného modelu je třeba mít na paměti, že ceramidy v něm mohou zaujímat pouze vlásenkovou konformaci.



Obrázek 21. Zobrazení lipidových monovrstev na pevném podkladu pomocí atomové silové mikroskopie.

Nedostatečné prodloužení acylového řetězce: snížení bariérových vlastností kůže u pacientů s atopickou dermatidou

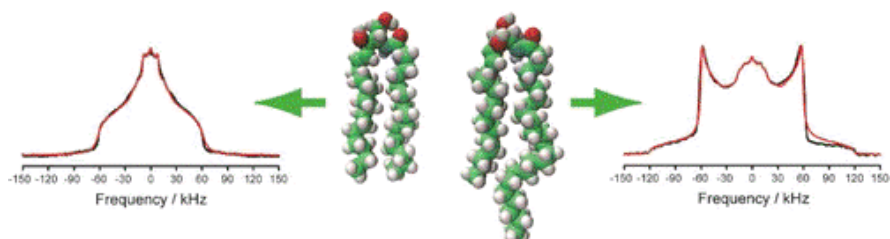
Publikace (přílohy 2 a 3):

Školová, B., Hudská, K., Pullmannová, P., Kováčik, A., Palát, K., Roh, J., Fleddermann, J., Estrela-Lopis, I., Vávrová, K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (35), 10460-10470. [IF 2014: 3,3]

Stahlberg, S., **Školová, B.,** Madhu, P. K., Vogel, A., Vávrová, K., Huster, D. Probing the Role of the Ceramide Acyl Chain Length and Sphingosine Unsaturation in Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ²H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2015**, *31* (17), 4906-4915. [IF 2014: 4,5]

V kůži pacientů s atopickou dermatitidou bylo zjištěno zvýšené množství ceramidů NS s 16 uhlíkatým acylem (CerNS16) na úkor ceramidů s 24 uhlíkatým acylem (CerNS24).¹⁷³⁻¹⁷⁴ Prodlužování acylového řetězce v molekulách ceramidů zajišťují enzymy z rodiny elongáz.¹⁴ Pokles jejich aktivity prokázal zvýšený poměr ceramidů NS s acylem $\leq 22C$ ku ceramidům NS s acylem $\geq 24C$ v myším modelu atopické dermatitidy.¹⁷⁵ Toto snížení aktivity může být způsobeno např. zvýšenou expresí interferonu gamma.¹⁷⁶

Vliv zkrácení ceramidového acylu o 8 uhlíků na vlastnosti modelových membrán SC jsme hodnotili pomocí DSC, IR a 2H NMR spektroskopie na pevné fázi (obrázek 22). Přípravě

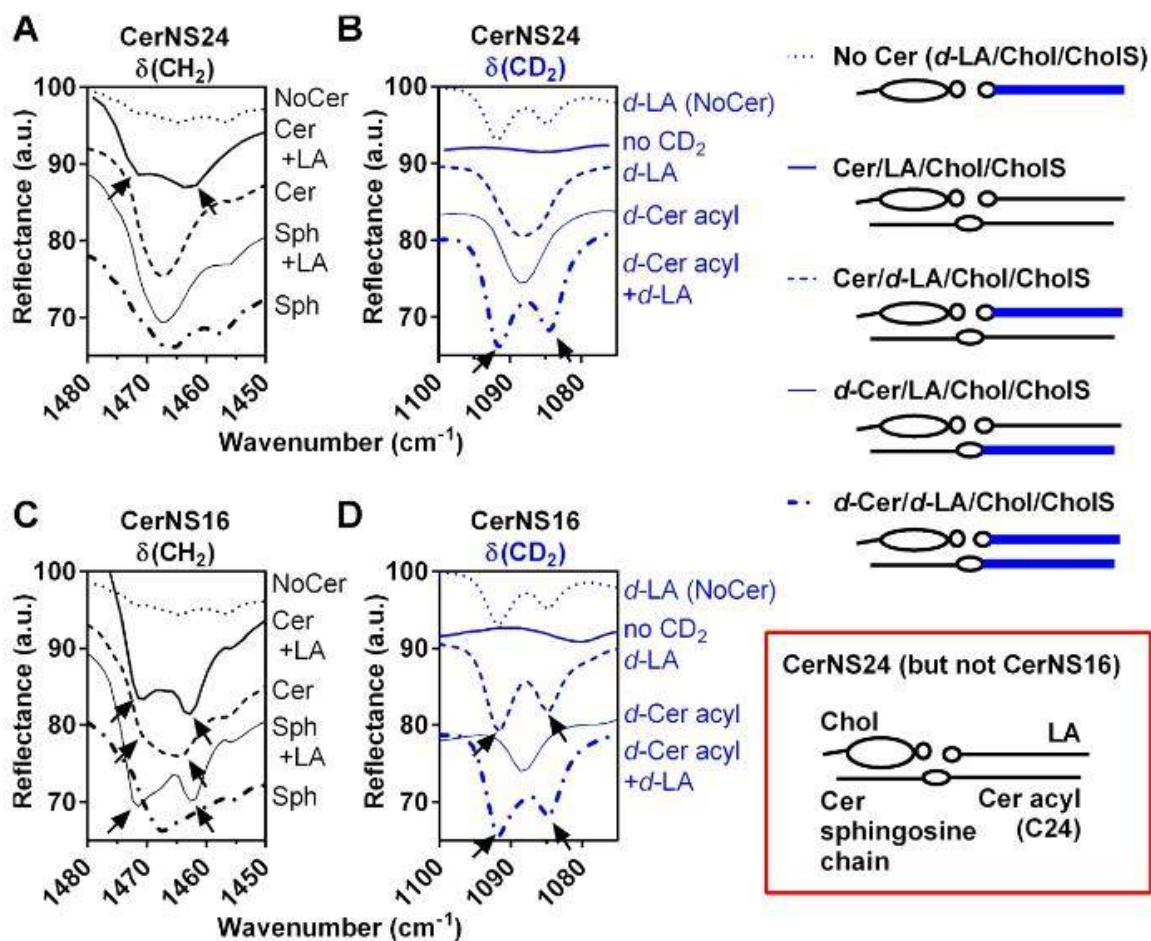


Obrázek 22. 2H NMR spektra lipidových modelů SC obsahující deuterované složky. Vlevo směs CerNS16, vpravo směs s CerNS24.

membrán předcházela **syntéza** ceramidů s deuterovaným acylovým řetězcem a v lipidových směsích byly použity neznačené i deuteriem značené složky.

Zjistili jsme, že **CerNS24 v modelových membránách zaujímá otevřenou konformaci** s řetězcí postavenými naproti sobě. Vysvětlení poskytuje chování nůžkových vibrací v infračervených spektrech lipidových směsí s různou kombinací deuterovaných složek (obrázek 23). Dublet v oblasti vlnočtu okolo 1468 cm^{-1} ve spektrech směsí s neznačenými složkami potvrzuje těsné orthorhombické laterální uspořádání lipidů v membránách obou ceramidů (obrázek 23, panel A a C).^{83, 107} Ve spektru lipidové směsi obsahující deuterovanou kyselinu lignocerovou (d-LA) a CerNS24 je v $\delta(CD_2)$ patrný singlet (obrázek 23, panel B), na rozdíl od dubletu v membráně s CerNS16 (obrázek 23, panel D). Štěpení signálu ve spektru je možné jen mezi stejnými izotopy.¹⁰⁵ Kyselina tak bude v membráně s CerNS16 částečně separovaná, zatímco v membráně s CerNS24 budou deuterované kyselinové řetězce „naředěny“ neznačenými uhlovodíkovými řetězci. V membráně obsahující deuterovanou kyselinu i deuterovaný ceramid (d-Cer) je patrný dublet $\delta(CD_2)$ u obou membrán (obrázek 23, panel B a D). „Ředění“ kyselinových řetězců způsobují deuterované acyly ceramidu a štěpení $\delta(CD_2)$ tak vychází z interakce deuterované kyseliny a deuterovaného acylu, což potvrzuje singlet v $\delta(CD_2)$ směsi deuterovaného CerNS24 a neznačené kyseliny. V případě membrány obsahující CerNS24 to znamená, že deuterované řetězce d-LA a deuterovaného ceramidu nejsou „neředěny“ sfingosinovými řetězci ani cholesterolem a ceramid v membráně pravděpodobně zaujímá otevřenou konformaci (obrázek 23, červený rámeček). V membráně obsahující CerNS16 nelze jednoznačně říct, ve které konformaci se ceramid nachází.

Otevřená molekulová konformace lipidů není obvyklá, avšak může přispívat k lepší soudružnosti lipidových lamel, která by mohla vysvětlit nízkou permeabilitu modelových membrán obsahující CerNS24.^{62, 82, 104} V nedávné době byly popsány třířetězcové ceramidy s acylem na kyslíku v poloze 1 (1-O-acylované ceramidy)¹⁴, které budou s největší pravděpodobností zaujímat otevřenou konformaci. Otevřená konformace ceramidů je navržena ve většině modelů uspořádání SC (kapitola 3).

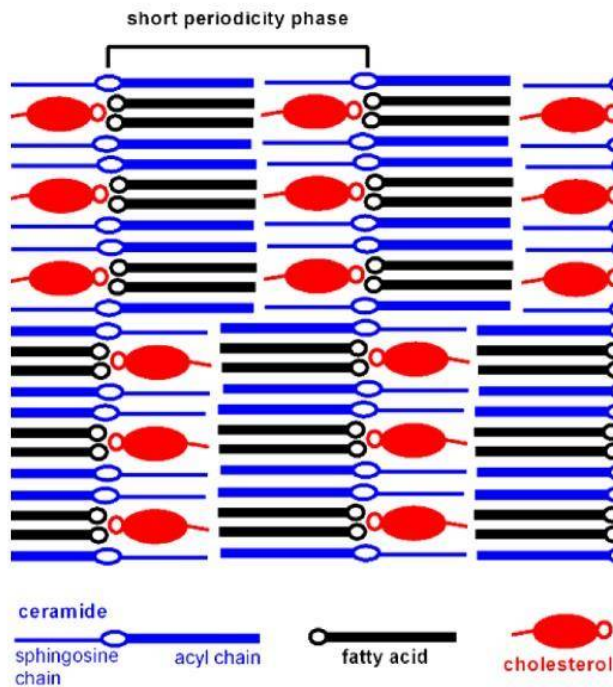


Obrázek 23. Nůžková vibrace (δ) CH_2 řetězců (panel A a C) a CD_2 řetězců (panel B a D) modelových membrán SC s CerNS24 a CerNS16. Vpravo vysvětlivky a dole navržené uspořádání membrány SC obsahující CerNS24.

Další rozdíl mezi lipidovými membránami SC obsahující CerNS24 a CerNS16 je v **mísitelnosti** složek. Kyselina lignocerová a cholesterol se nemísí.¹⁷⁷ CerNS16 se s kyselinou lignocerovou mísí podstatně hůř než CerNS24. Nízká teplota fázového přechodu membrány obsahující CerNS16 (ve srovnání s CerNS24) by tak mohla být vysvětlena mísitelností s cholesterolem. Monovrstva složená z CerNS16 a cholesterolu v poměru 1:1.5 vytváří homogenní fázi.¹⁷² Ve stejném poměru vytváří směs jednu lamelární fázi s periodicitou 3,50 nm.¹⁷⁸ Mísitelnost CerNS16 a cholesterolu by mohla podpořit také vlásenková konformace CerNS16, plochy příčného průřezu ceramidu a cholesterolu jsou totiž podobné.

V lipidové membráně obsahující CerNS24 byla pomocí X-ray difrakce identifikována **krátká lamelární fáze s periodicitou 5,2 – 5,4 nm** a další lamelární fáze (3,4 nm) náležející krystalickému cholesterolu.¹⁰⁴ Separovaný cholesterol byl popsán ve SC i jiných modelových membránách SC^{70, 96, 179} a pro úplné začlenění cholesterolu do lamely modelové membrány SC byl navržen molární poměr směsi ceramidů,

cholesterolu a mastných kyselin 1:0.5:1.¹⁸⁰ Přestože jsme si vědomi, že naše modelové membrány jsou značně zjednodušeným nástrojem ke studiu molekulární organizace lipidů SC, především protože neobsahují ultradlouhé acylceramidy, navrhujeme uspořádání, které je v souladu s modelem Norléna⁶³ (2012). Délka **krátké lamelární fáze** (short periodicity phase) je v našem modelu přiřazena **otevřené konformaci ceramidu**, k jehož sfingosinovému řetězci je přidružen cholesterol a k acylové části řetězec mastné kyseliny (obrázek 24).



Obrázek 24. Model uspořádání lipidové membrány SC.

Modelové membrány obsahující CerNS16 jsou až dvakrát propustnější ve srovnání s membránami s CerNS24.¹⁸¹ Kromě konformace ceramidů a mísitelnosti lipidových složek membrán SC mohou být příčinou rozdílné permeability membrán odlišné složení fází. V modelových membránách obsahující CerNS24 jsou při teplotě kožního povrchu (32 °C) všechny její složky převážně v **krystalické fázi** (CerNS24 v 84 %, kyselina lignocerová v 79 % a cholesterol v 94 %). V membráně s CerNS16 jsou kyselina i cholesterol v podobném zastoupení krystalické fáze (73, 91 %), avšak CerNS16 je přítomen především v propustnější **gelové fázi** (v 95 %).

Význam trans-dvojných vazby v molekule ceramidů: dihydroceramidy přispívají k rozmanitosti kožních lipidů

Publikace (přílohy 3 a 4):

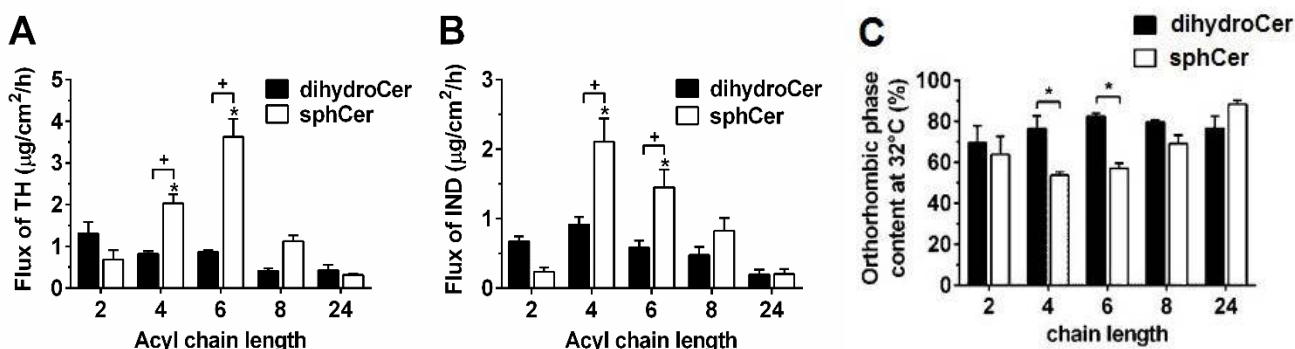
Stahlberg, S., **Školová, B.**, Madhu, P. K., Vogel, A., Vávrová, K., Huster, D. Probing the Role of the Ceramide Acyl Chain Length and Sphingosine Unsaturation in Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ²H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2015**, *31* (17), 4906-4915. [IF 2014: 4,5]

Školová, B., Jandovská, K., Pullmannová, P., Tesař, O., Roh, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. 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), 5527-5535. [IF 2014: 4,5]

Dihydroceramidy (dihydroCer) jsou přirozenou složkou mezibuněčné hmoty SC, jsou dokonce prekurzorem sfingosinových, fytosfingosinových a pravděpodobně i 6-hydroxysfingosinových ceramidů.^{14, 20-21} DihydroCer mají své specifické funkce v buněčných procesech, např. regulují apoptózu nebo navozují autofagii.¹⁸²⁻¹⁸³ U myšího modelu došlo po vyřazení genu pro transkripční

faktor ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator; regulující genovou expresi v procesech odpovědi na vnější vlivy, např. xenobiotika) k uhynutí zvířat krátce po narození v důsledku vysokých transepidermálních ztrát vody. Lipidové lamely SC byly poškozeny jen mírně, avšak byl nalezen zvýšený poměr dihydroCer na úkor sfingosinových ceramidů (sphCer).¹⁸⁴ V chemické syntéze analogů ceramidů je zavedení *trans*-dvojně vazby jedním z problematických kroků, proto nás zajímalo, jak důležitá je přítomnost *trans*-dvojně vazby v molekule ceramidů pro bariérové vlastnosti kůže.

Význam *trans*-dvojně vazby v molekule ceramidu jsme studovali pomocí modelových membrán SC – **permeačními pokusy, DSC, IR a ²H NMR spektroskopii** a hodnotili jsme také vliv zkrácení acylového řetězce u dihydroCer na 2, 4, 6 a 8 uhlíků. **Permeační pokusy** (obrázek 25) ukázaly, že propustnost membrán obsahující dihydroCer se zkráceným acylem je ve srovnání s membránami s přirozeným dihydroCer (24C acyl) vyšší, avšak rozdíl není statisticky významný. Ve srovnání s membránami obsahující sphCer analogy je však jejich permeabilita nižší, např. **membrány obsahující sphCer s 6C acylem jsou až 4,2x propustnější pro TH** (obrázek 25, panel A) a **2,5x propustnější pro IND** (obrázek 25, panel B) než dihydroCer se stejnou délkou acylu. Vysvětlením rozdílné permeability membrán může být **podíl těsného orthorhombického uspořádání lipidů** v membránách (při 32 °C), které je u sphCer analogů nižší (obrázek 25, panel C). Pro přirozené ceramidy s 24C acylem však toto tvrzení naplatí.

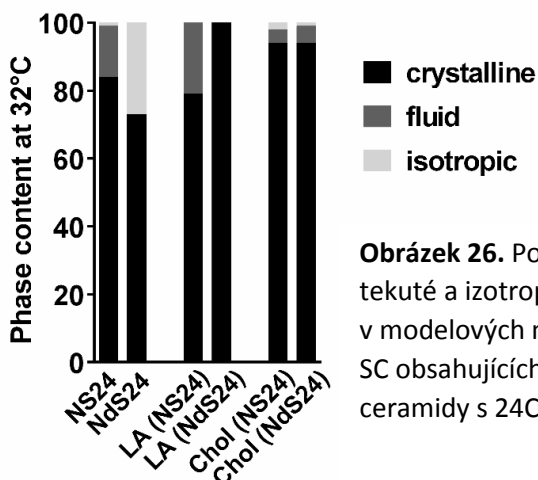


Obrázek 25. Permeabilita modelových membrán SC pro dvě modelové látky - TH (panel A) a IND (panel B). Podíl orthorhombického uspořádání v modelových membránách SC (panel C).

Vysoké transepidermální ztráty vody u zmíněného myšičího modelu mohly být spíše než narušením lamelárního uspořádání lipidů způsobeny celkovým snížením množství sfingolipidů.¹⁸⁴ Organizace lipidů SC je pravděpodobně podmíněna jak hydrofobními interakcemi uhlovodíkových řetězců, tak vlastnostmi polární hlavy.^{148, 185} Zatímco v ekvimolární směsi sphCer nebo dihydroCer, mastných kyselin a cholesterolu převládá orthorhombické uspořádání, náhradou ceramidu za fytosfingosinový narůstá podíl hexagonálně uspořádaných lipidů.¹⁴⁸ Vyšší podíl orthorhombické fáze v membráně obsahující přirozený SphCer by mohl být vysvětlen stabilizací *trans*-dvojně vazby vodou vodíkovými vazbami, která může mít za následek také velmi těsné uspořádání sphCer v monovrstvách.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Těsné uspořádání ovlivňuje také krátký acylový řetězec. Ve fosfolipidových dvojrstvách je sphCer s dvou uhlíkatým acylem podobně jako sfingosin dobře začleněn.¹⁸⁶ Řetězce ceramidů s 4 a 6C acylem k sobě

pravděpodobně nepřiléhají, spíš se kývají v prostoru a tím uspořádání fosfolipidů narušují.¹⁸⁶ Zkrácení acylu u fytosfingosinového ceramidu zvyšuje propustnost kůže i modelových membrán.¹⁸⁷⁻¹⁸⁸

Kromě odlišného podílu orthorhombického uspořádání v membráně obsahující přirozené ceramidy s 24C acylem, je při teplotě kožního povrchu (32 °C) **rozdíl ve fázovém složení lipidů** (obrázek 26). V lipidové membráně je dihydroCer (NdS24) z 27 % v méně uspořádané **izotropní fázi**, zatímco sphCer (NS24) pouze v 1 %. Tento pokles krystalické fáze v membráně je vyrovnán kyselinou lignocerovou (LA) - u NdS24 100 %, u NS24 79 %), cholesterol (Chol) je v obou membránách krystalický v 94 %.



Obrázek 26. Podíl krystalické, tekuté a izotropní fáze v modelových membránách SC obsahujících přirozené ceramidy s 24C acylem.

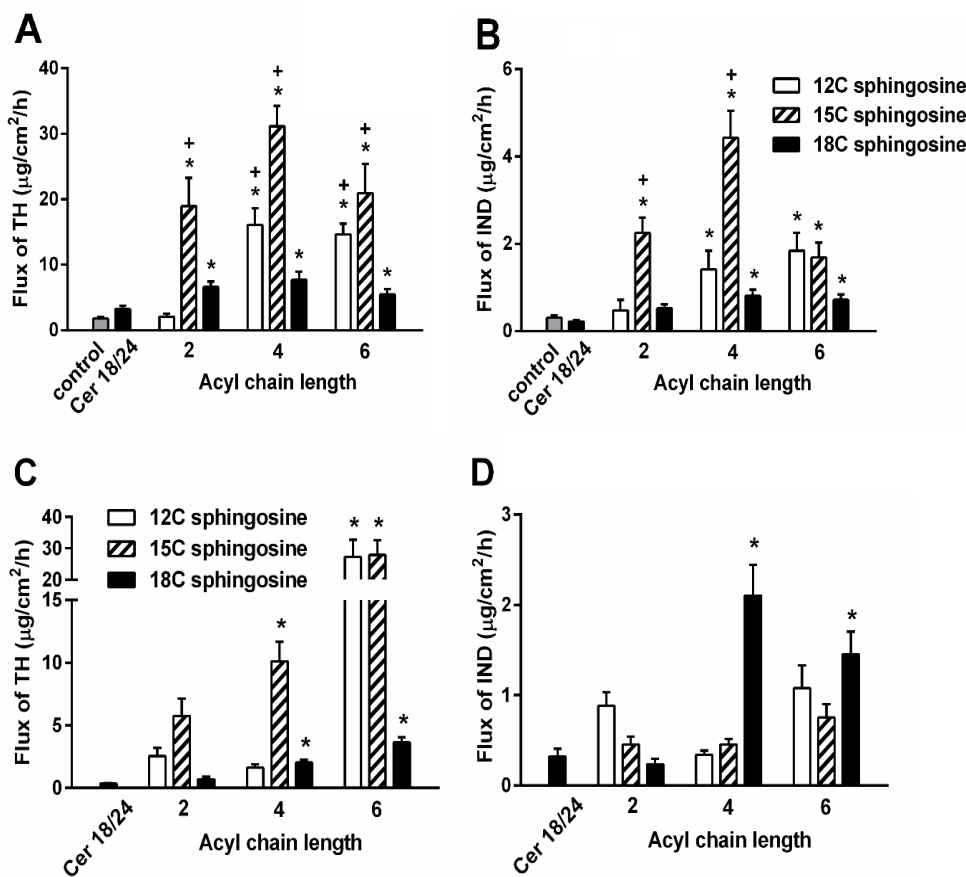
Ceramidy s 15C sfingosinem a krátkými acyly mnohonásobně zvyšují permeabilitu kůže i modelových lipidových membrán

Publikace (příloha 5):

Školová, B., Janůšová, B., Vávrová, K. Ceramides with a Pentadecasphingosine Chain and Short Acyls Have Strong Permeabilization Effects on Skin a Model Lipid Membranes. **2015.** *V recenzním řízení.*

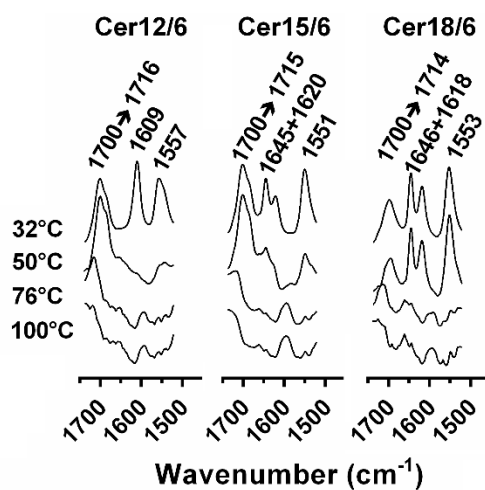
Obsah této publikace vychází z výsledků mé diplomové práce, v níž jsem se zabývala syntézou ceramidových analogů se zkráceným sfingosinovým (15C a 8C) a acylovým (2, 4 a 6C) řetězcem a jejich vlivu na permeabilitu kůže.¹⁸⁹ V doktorském studiu jsem připravila modelové lipidové membrány, které obsahovaly 12 a 15C sfingosinové deriváty s krátkým (2-6C) acylem, abych studovala molekulové uspořádání, které by mohlo vysvětlit značný vliv těchto ceramidových analogů na permeabilitu kůže.¹⁹⁰ Nejprve jsem studovala permeabilitu modelových membrán a posléze jejich biofyzikální vlastnosti pomocí **IR spektroskopie** a **X-ray difrakce**. Označení ceramidů je dále vyjádřeno jako CerX/Y, kde X znamená délku sfingosinu a Y délku acylu.

Propustnost kůže (obrázek 27, panely A a B) **po aplikaci 15C sfingosinových ceramidů** (resp. 15C sfingosinového ceramidu s 4C acylem, **Cer15/4**) **byla až 15x** (flux TH, obrázek 27, panel A), **resp. 14x vyšší** (flux IND, obrázek 27, panel B) ve srovnání s kontrolou, která neobsahovala žádný ceramid (control). Podobný trend zvýšené permeability byl sledován u **modelových membrán, nejpropustnější byly membrány obsahující Cer 15/6** (flux TH až 79x vyšší ve srovnání s kontrolou obsahující přirozený Cer18/24, obrázek 27, panel C), **resp. Cer18/4** (flux IND 10x vyšší ve srovnání s kontrolou obsahující přirozený Cer18/24, obrázek 27, panel D).



Obrázek 27. Propustnost kůže po aplikaci ceramidů se délkou sfingosinu 12, 15 a 18C a acylu 2, 4 a 6C vyjádřená jako flux modelových léčiv - TH (panel A) a IND (panel B). Permeabilita modelových membrán SC obsahující tytéž ceramidové analogy vyjádřená stejným parametrem – TH (panel C) a IND (panel D).

IR spektroskopie neukázala rozdíly v uspořádání lipidů, fázových přechodech, separaci domén ani v chování karboxylové skupiny u nejpropustnějších membrán, avšak **amidová vibrace I** (obrázek 28) se mezi membránami lišila, přestože všechny ceramidy **mají stejnou polární hlavu**. Je zajímavé, že ve spektru velmi propustné membrány obsahující Cer12/6 je **nízký vlnočít této vibrace** (1609 cm^{-1}) a **zároveň vysoký vlnočít amidové vibrace II** (1557 cm^{-1}), které naznačují velmi silné vodíkové vazby. U membrán obsahujících Cer12/4, Cer 15/4, Cer15/6 a Cer18/6 je zřejmý dublet v této vibraci, který by mohl nasvědčovat interakcím mezi amidovými skupinami.^{144, 191-192} Zkrácený ceramidový acyl pravděpodobně nezaujímá vlásenkovou konformaci a spíše narušuje uspořádání v okolí polární hlavy ceramidů.^{186, 193}



Obrázek 28. Oblast polární hlavy v IR spektru vybraných lipidových membrán.

V modelových membránách SC se zkrácenými sfingosinovými a acylovými řetězci bylo popsáno těsné orthorhombické uspořádání lipidů a zároveň pomocí **X-ray difrakce** několik především **velmi krátkých** (s periodicitou nižší než 3 nm) **lamelárních fází**. Narušená lamelární struktura SC se zvýšenou permeabilitou byla popsána u pacientů s atopickou dermatitidou, psoriázou a lamelární ichtyózou.^{12, 81, 194} Větší počet krátkých lamelárních fází by mohl být příčinou zvýšené propustnosti lipidových membrán.¹⁰⁴

Závěr

Cílem této práce bylo studium vztahů struktury ceramidů na bariérovou funkci kůže. Modelové lipidové membrány SC umožňují popis chování kožních lipidů na molekulární úrovni, jsou nástrojem k hodnocení permeačních i biofyzikálních vlastností membrán. Studovat **význam lipidových složek a strukturních prvků v jejich molekulách** umožňuje jejich definované složení a také využití značených látek. Jedná se však o značně zjednodušený model, což musí být bráno v úvahu při interpretaci výsledků.

Jedním z důležitých strukturálních parametrů v molekule ceramidů je délka acylového řetězce. Výsledky této práce dokazují, že **délka ceramidového acylu je pro bariérové vlastnosti kůže zásadní**. Zkrácení acylu o třetinu řetězce (z 24 na 16C) může ovlivnit uspořádání lipidových lamel SC, které má za následek snížení bariérové funkce kůže např. u pacientů s atopickou dermatitidou. Přestože si membrány obsahující ceramidy se zkráceným acylem zachovávají některé vlastnosti (přítomnost orthorhombické laterální uspořádání), v jiných se liší (krystalická vs. gelová fáze) a může se měnit jejich chování v lipidových směsích (mísitelnosti/separace složek).

Kromě délky acylu má na vlastnosti ceramidů vliv také **počet uhlíků ve sfingosinovém řetězci**. Ceramidy s 15C sfingosinovým řetězcem a velmi krátkým acylem (4 a 6C) mnohonásobně zvyšují propustnost kůže a mohly by tak být využity při návrhu struktur akcelerantů transdermální permeace.

Přítomnost **trans-dvojně vazby** v molekule ceramidu pravděpodobně není zásadní pro permeabilitu modelových membrán, avšak její záměna za jednoduchou vazbu mění jejich fyzikální vlastnosti. Proto budou rozdíly v oblasti polární hlavy nejspíš přispívat k rozmanitosti lipidového složení SC a tím lepší odolnosti či schopnosti vyrovnávat se s nepříznivými podmínkami. Překvapivě, zkrácení acylového řetězce u dihydrosfingosinových ceramidů zásadně nezvyšuje permeabilitu modelových membrán.

Výsledky této práce rozšířily poznatky o vlastnostech lipidů SC a objasnily význam strukturních prvků v molekule ceramidů, které mohou přispět k lepšímu porozumění (pato)fyzilogie kůže.

Literatura

1. Čihák, R., *Anatomie 3*. 1 ed.; Grada: Praha, 1997; p 559-574.
2. Trojan, S., *Lékařská fyziologie*. 4 ed.; Grada: Praha, 2003; p 417-422.
3. Bouwstra, A.; Pilgram, G.; Ponec, M., Structure of the skin barrier. In *Skin barrier*, 1 ed.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Eds. Taylor & Francis Group: New York, 2006; pp 65-96.
4. Struktura a funkce kůže. Eucerin.cz (online). <http://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze> (accessed 2015-07-12).
5. Vokurka, M.; Hugo, J., *Velký lékařský slovník*. 9 ed.; Maxdorf: Praha, 2009; p 414.
6. Elias, P. M.; Cooper, E. R.; Korc, A.; Brown, B. E., Percutaneous Transport in Relation to Stratum-Corneum Structure and Lipid-Composition. *J Invest Dermatol* **1981**, *76* (4), 297-301.
7. Williams, M. L.; Elias, P. M., Stratum-Corneum Lipids in Disorders of Cornification - Increased Cholesterol Sulfate Content of Stratum-Corneum in Recessive X-Linked Ichthyosis. *J Clin Invest* **1981**, *68* (6), 1404-1410.
8. Elias, P. M., Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization. *Int J Dermatol* **1981**, *20* (1), 1-19.
9. Yardley, H. J.; Summerly, R., Lipid-Composition and Metabolism in Normal and Diseased Epidermis. *Pharmacol Therapeut* **1981**, *13* (2), 357-383.
10. Lampe, M. A.; Burlingame, A. L.; Whitney, J.; Williams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, P. M., Human Stratum-Corneum Lipids - Characterization and Regional Variations. *J Lipid Res* **1983**, *24* (2), 120-130.
11. Feingold, K. R.; Elias, P. M., Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 280-294.
12. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 295-313.
13. Bartke, N.; Hannun, Y. A., Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* **2009**, *50*, S91-S96.
14. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 422-434.
15. Uchida, Y., Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 453-462.
16. Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T., 6-Hydroxy-4-Sphingenine in Human Epidermal Ceramides. *J Lipid Res* **1994**, *35* (11), 2060-2068.
17. Wertz, P. W.; Miethke, M. C.; Long, S. A.; Strauss, J. S.; Downing, D. T., The Composition of the Ceramides from Human Stratum-Corneum and from Comedones. *J Invest Dermatol* **1985**, *84* (5), 410-412.
18. Stewart, M. E.; Downing, D. T., A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* **1999**, *40* (8), 1434-1439.
19. Ponec, M.; Weerheim, A.; Lankhorst, P.; Wertz, P., New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *120* (4), 581-588.
20. Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K., Characterization of overall ceramide species in human Stratum corneum. *J Lipid Res* **2008**, *49* (7), 1466-1476.
21. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res* **2011**, *52* (6), 1211-1221.

22. Boncheva, M., The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *Int J Cosmetic Sci* **2014**, *36* (6), 505-515.
23. Breiden, B.; Sandhoff, K., The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 441-452.
24. t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K., Profiling and Characterizing Skin Ceramides Using Reversed-Phase Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (1), 403-411.
25. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide Composition of the Psoriatic Scale. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182* (2), 147-151.
26. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Ceramides of Pig Epidermis - Structure Determination. *J Lipid Res* **1983**, *24* (6), 759-765.
27. Mandon, E. C.; Ehses, I.; Rother, J.; Vanechten, G.; Sandhoff, K., Subcellular-Localization and Membrane Topology of Serine Palmitoyltransferase, 3-Dehydrosphinganine Reductase, and Sphinganine N-Acyltransferase in Mouse-Liver. *J Biol Chem* **1992**, *267* (16), 11144-11148.
28. Merrill, A. H.; Wang, E., Biosynthesis of Long-Chain (Sphingoid) Bases from Serine by Lm Cells - Evidence for Introduction of the 4-Trans-Double Bond after Denovo Biosynthesis of N-Acylsphinganine(S). *J Biol Chem* **1986**, *261* (8), 3764-3769.
29. Michel, C.; vanEchtenDeckert, G.; Rother, J.; Sandhoff, K.; Wang, E.; Merrill, A. H., Characterization of ceramide synthesis - A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem* **1997**, *272* (36), 22432-22437.
30. Ternes, P.; Franke, S.; Zahringer, U.; Sperling, P.; Heinz, E., Identification and characterization of a sphingolipid Delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* **2002**, *277* (28), 25512-25518.
31. Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784-790.
32. Jennemann, R.; Rabionet, M.; Gorgas, K.; Epstein, S.; Dalpke, A.; Rothermel, U.; Bayerle, A.; van der Hoeven, F.; Imgrund, S.; Kirsch, J.; Nickel, W.; Willecke, K.; Riezman, H.; Grone, H. J.; Sandhoff, R., Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* **2012**, *21* (3), 586-608.
33. Chan, D. I.; Vogel, H. J., Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem J* **2010**, *430*, 1-19.
34. Nugteren, D. H., Enzymic Chain Elongation of Fatty Acids by Rat-Liver Microsomes. *Biochim Biophys Acta* **1965**, *106* (2), 280-&.
35. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jakobsson, A., Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* **2006**, *45* (3), 237-249.
36. Guillou, H.; Zadavec, D.; Martin, P. G. P.; Jakobsson, A., The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* **2010**, *49* (2), 186-199.
37. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Metabolism of Linoleic-Acid in Porcine Epidermis. *J Lipid Res* **1990**, *31* (10), 1839-1844.
38. Lin, M. H.; Khnykin, D., Fatty acid transporters in skin development, function and disease. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 362-368.
39. Abe, A.; Shayman, J. A.; Radin, N. S., A novel enzyme that catalyzes the esterification of N-acetylsphingosine - Metabolism of C-2-ceramides. *J Biol Chem* **1996**, *271* (24), 14383-14389.
40. Voynova, N. S.; Vionnet, C.; Ejsing, C. S.; Conzelmann, A., A novel pathway of ceramide metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **2012**, *447*, 103-114.

41. Odland, G. F., A Submicroscopic Granular Component in Human Epidermis. *J Invest Dermatol* **1960**, *34* (1), 11-15.
42. Uchida, Y.; Hara, M.; Nishio, H.; Sidransky, E.; Inoue, S.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Hamanaka, S., Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* **2000**, *41* (12), 2071-2082.
43. Voelker, D. R.; Kennedy, E. P., Cellular and Enzymic-Synthesis of Sphingomyelin. *Biochemistry-U.S.* **1982**, *21* (11), 2753-2759.
44. Tafesse, F. G.; Ternes, P.; Holthuis, J. C. M., The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* **2006**, *281* (40), 29421-29425.
45. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Imokawa, G.; Jackson, S.; Lee, J. M.; Elias, P. M., Beta-Glucocerebrosidase Activity in Murine Epidermis - Characterization and Localization in Relation to Differentiation. *J Lipid Res* **1992**, *33* (8), 1201-1209.
46. Bowser, P. A.; Gray, G. M., Sphingomyelinase in Pig and Human Epidermis. *J Invest Dermatol* **1978**, *70* (6), 331-335.
47. Feingold, K. R., The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res* **2007**, *48* (12), 2531-2546.
48. Ansari, M. N. A.; Nicolaid.N; Fu, H. C., Fatty Acid Composition of Living Layer and Stratum Corneum Lipids of Human Sole Skin Epidermis. *Lipids* **1970**, *5* (10), 838-845.
49. van Smeden, J.; Boiten, W. A.; Hankemeier, T.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Vreeken, R. J., Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (1), 70-79.
50. Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Composition and Morphology of Epidermal Cyst Lipids. *J Invest Dermatol* **1987**, *89* (4), 419-425.
51. Norlen, L.; Nicander, I.; Lundsjo, A.; Cronholm, T.; Forslind, B., A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch Dermatol Res* **1998**, *290* (9), 508-516.
52. Weerheim, A.; Ponec, M., Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res* **2001**, *293* (4), 191-199.
53. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Evidence That the Corneocyte Has a Chemically Bound Lipid Envelope. *J Invest Dermatol* **1987**, *88* (6), 709-713.
54. Stewart, M. E.; Downing, D. T., The omega-hydroxyceramides of pig epidermis are attached to corneocytes solely through omega-hydroxyl groups. *J Lipid Res* **2001**, *42* (7), 1105-1110.
55. Marekov, L. N.; Steinert, P. M., Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* **1998**, *273* (28), 17763-17770.
56. Steinert, P. M.; Marekov, L. N., Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide crosslinked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem* **1997**, *272* (3), 2021-2030.
57. Elias, P. M.; Gruber, R.; Crumrine, D.; Menon, G.; Williams, M. L.; Wakefield, J. S.; Holleran, W. M.; Uchida, Y., Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Bba-Mol Cell Biol L* **2014**, *1841* (3), 314-318.
58. Lopez, O.; Cocera, M.; Wertz, P. W.; Lopez-Iglesias, C.; de la Maza, A., New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Bba-Biomembranes* **2007**, *1768* (3), 521-529.
59. Hill, J. R.; Wertz, P. W., Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Bba-Biomembranes* **2003**, *1616* (2), 121-126.
60. Breathna.As; Goodman, T.; Stolinsk.C; Gross, M., Freeze-Fracture Replication of Cells of Stratum Corneum of Human Epidermis. *J Anat* **1973**, *114* (Jan), 65-81.

61. Madison, K. C.; Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Downing, D. T., Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum-Corneum. *J Invest Dermatol* **1987**, *88* (6), 714-718.
62. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Molecular-Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum-Corneum. *J Invest Dermatol* **1989**, *92* (2), 251-257.
63. Iwai, I.; Han, H. M.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloef, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L., 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), 2215-2225.
64. Landmann, L., Epidermal Permeability Barrier - Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J Invest Dermatol* **1986**, *87* (2), 202-209.
65. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Ponec, M., Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J Lipid Res* **2001**, *42* (11), 1759-1770.
66. White, S. H.; Mirejovsky, D.; King, G. I., Structure of Lamellar Lipid Domains and Corneocyte Envelopes of Murine Stratum-Corneum - an X-Ray-Diffraction Study. *Biochemistry-U.S.* **1988**, *27* (10), 3725-3732.
67. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Vanderspek, J. A.; Bras, W., Structural Investigations of Human Stratum-Corneum by Small-Angle X-Ray-Scattering. *J Invest Dermatol* **1991**, *97* (6), 1005-1012.
68. Hou, S. Y. E.; Mitra, A. K.; White, S. H.; Menon, G. K.; Ghadially, R.; Elias, P. M., Membrane Structures in Normal and Essential Fatty-Acid Deficient Stratum-Corneum - Characterization by Ruthenium Tetroxide Staining and X-Ray-Diffraction. *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (2), 215-223.
69. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Weerheim, A. M.; IJzerman, A. P.; Ponec, M., Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res* **1998**, *39* (1), 186-196.
70. McIntosh, T. J.; Stewart, M. E.; Downing, D. T., X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: Reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry-U.S.* **1996**, *35* (12), 3649-3653.
71. Bouwstra, J.; Gooris, G., The lipid organization in human stratum corneum and model systems. *The Open Dermatology Journal* **2010**, *4*, 10-13.
72. Kessner, D.; Kiselev, M.; Dante, S.; Hauss, T.; Lersch, P.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix: new aspects revealed by neutron diffraction studies. *Eur Biophys J Biophys* **2008**, *37* (6), 989-999.
73. Schroter, A.; Kessner, D.; Kiselev, M. A.; Hauss, T.; Dante, S.; Neubert, R. H. H., Basic Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Matrices Based on Ceramides [EOS] and [AP]: A Neutron Diffraction Study. *Biophys J* **2009**, *97* (4), 1104-1114.
74. Garson, J. C.; Doucet, J.; Leveque, J. L.; Tsoucaris, G., Oriented Structure in Human Stratum-Corneum Revealed by X-Ray-Diffraction. *J Invest Dermatol* **1991**, *96* (1), 43-49.
75. Groen, D.; Gooris, G. S.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; van Mechelen, J. B.; Deme, B.; Bouwstra, J. A., Disposition of Ceramide in Model Lipid Membranes Determined by Neutron Diffraction. *Biophys J* **2011**, *100* (6), 1481-1489.
76. Norlen, L., Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (4), 830-836.
77. Kitson, N.; Thewalt, J.; Lafleur, M.; Bloom, M., A Model Membrane Approach to the Epidermal Permeability Barrier. *Biochemistry-U.S.* **1994**, *33* (21), 6707-6715.

78. Damien, F.; Boncheva, M., The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin In Vivo. *J Invest Dermatol* **2010**, *130* (2), 611-614.
79. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758* (7), 923-933.
80. Bouwstra, J. A.; Ponec, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 2080-2095.
81. Lavrijsen, A. P. M.; Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Weerheim, A.; Bodde, H. E.; Ponec, M., Reduced Skin Barrier Function Parallels Abnormal Stratum-Corneum Lipid Organization in Patients with Lamellar Ichthyosis. *J Invest Dermatol* **1995**, *105* (4), 619-624.
82. Corkery, R. W., The anti-parallel, extended or splayed-chain conformation of amphiphilic lipids. *Colloid Surface B* **2002**, *26* (1-2), 3-20.
83. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Bba-Biomembranes* **2011**, *1808* (6), 1529-1537.
84. Hatta, I.; Ohta, N.; Inoue, K.; Yagi, N., Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758* (11), 1830-1836.
85. Forslind, B., A Domain Mosaic Model of the Skin Barrier. *Acta Derm-Venereol* **1994**, *74* (1), 1-6.
86. Forslind, B.; Engstrom, S.; Engblom, J.; Norlen, L., A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J Dermatol Sci* **1997**, *14* (2), 115-125.
87. Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E. R.; Gooris, G. S.; Ponec, M., The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm-Venereol* **2000**, 23-30.
88. Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponec, M., New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl* **2001**, *14*, 52-62.
89. McIntosh, T. J., Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: Diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophys J* **2003**, *85* (3), 1675-1681.
90. Skolova, B.; Hudska, K.; Pullmannova, P.; Kovacik, A.; Palat, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vavrova, K., Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (35), 10460-10470.
91. Schmook, F. P.; Meingassner, J. G.; Billich, A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int J Pharm* **2001**, *215* (1-2), 51-56.
92. Simon, G. A.; Maibach, H. I., The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: Qualitative and quantitative observations - An overview. *Skin Pharmacol Appl* **2000**, *13* (5), 229-234.
93. Jung, E. C.; Maibach, H. I., Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* **2015**, *35* (1), 1-10.
94. Welss, T.; Basketter, D. A.; Schroder, K. R., In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol in Vitro* **2004**, *18* (3), 231-243.
95. Mathes, S. H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U., The use of skin models in drug development. *Adv Drug Deliver Rev* **2014**, *69*, 81-102.
96. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A., The phase behaviour of skin lipid mixtures based on synthetic ceramides. *Chem Phys Lipids* **2003**, *124* (2), 123-134.

97. Kai, T.; Isami, T.; Kurosaki, Y.; Nakayama, T.; Kimura, T., Keratinized Epithelial Transport of Beta-Blocking-Agents .2. Evaluation of Barrier Property of Stratum-Corneum by Using Model Lipid Systems. *Biol Pharm Bull* **1993**, *16* (3), 284-287.
98. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponc, M.; Bouwstra, J. A., Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* **2005**, *46* (12), 2649-2656.
99. Smith, W. P.; Christensen, M. S.; Nacht, S.; Gans, E. H., Effect of Lipids on the Aggregation and Permeability of Human Stratum-Corneum. *J Invest Dermatol* **1982**, *78* (1), 7-11.
100. Friberg, S. E.; Kayali, I.; Beckerman, W.; Rhein, L. D.; Simion, A., Water Permeation of Reaggregated Stratum-Corneum with Model Lipids. *J Invest Dermatol* **1990**, *94* (3), 377-380.
101. Kovacic, A.; Roh, J.; Vavrova, K., The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBiochem* **2014**, *15* (11), 1555-1562.
102. Kligman, A. M.; Christophel, E., Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch Dermatol* **1963**, *88* (6), 702-&.
103. Janusova, B.; Zbytovska, J.; Lorenc, P.; Vavrysova, H.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Bba-Mol Cell Biol L* **2011**, *1811* (3), 129-137.
104. Skolova, B.; Janusova, B.; Zbytovska, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepicka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624-15633.
105. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141-157.
106. Moore, D. J.; Rerek, M. E., Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm-Venereol* **2000**, 16-22.
107. Garidel, P.; Folting, B.; Schaller, I.; Kerth, A., 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), 144-156.
108. Flach, C. R.; Moore, D. J., Infrared and Raman imaging spectroscopy of ex vivo skin. *Int J Cosmetic Sci* **2013**, *35* (2), 125-135.
109. Lafleur, M., Phase behaviour of model stratum corneum lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Can J Chem* **1998**, *76* (11), 1501-1511.
110. Raith, K.; Farwanah, H.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *Eur J Lipid Sci Tech* **2004**, *106* (8), 561-571.
111. Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., Properties of Ceramides and their impact on the stratum corneum structure: A review. *Skin Pharmacol Phys* **2007**, *20* (5), 220-229.
112. Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S.; Wegener, M.; Wienhold, A., Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC .2. Mixtures of ceramides and saturated fatty acids. *Chem Phys Lipids* **1997**, *89* (1), 3-14.
113. Wegener, M.; Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S., Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixtures of ceramides and cholesterol. *Chem Phys Lipids* **1997**, *88* (1), 73-82.
114. Kiselev, M. A.; Ryabova, N. Y.; Balagurov, A. M.; Dante, S.; Hauss, T.; Zbytovska, J.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. H., New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J Biophys* **2005**, *34* (8), 1030-1040.
115. Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N., Models of stratum corneum intercellular membranes: 2H NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophys J* **1994**, *67* (4), 1562-73.

116. Brief, E.; Kwak, S.; Cheng, J. T.; Kitson, N.; Thewalt, J.; Lafleur, M., Phase behavior of an equimolar mixture of N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine, cholesterol, and palmitic acid, a mixture with optimized hydrophobic matching. *Langmuir* **2009**, *25* (13), 7523-32.
117. Ouimet, J.; Lafleur, M., Hydrophobic match between cholesterol and saturated fatty acid is required for the formation of lamellar liquid ordered phases. *Langmuir* **2004**, *20* (18), 7474-81.
118. Engelbrecht, T. N.; Deme, B.; Dobner, B.; Neubert, R. H., Study of the influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on the nanostructure of stratum corneum lipid model membranes using neutron diffraction and deuterium labelling. *Skin Pharmacol Physiol* **2012**, *25* (4), 200-7.
119. Rowat, A. C.; Kitson, N.; Thewalt, J. L., Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ²H NMR. *Int J Pharm* **2006**, *307* (2), 225-31.
120. Chen, X.; Kwak, S. J.; Lafleur, M.; Bloom, M.; Kitson, N.; Thewalt, J., Fatty acids influence "solid" phase formation in models of stratum corneum intercellular membranes. *Langmuir* **2007**, *23* (10), 5548-5556.
121. de Jager, M.; Groenink, W.; van der Spek, J.; Janmaat, C.; Gooris, G.; Ponec, M.; Bouwstra, J., Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for in vitro percutaneous penetration studies. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758* (5), 636-644.
122. Mojumdar, E. H.; Helder, R. W. J.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Monounsaturated Fatty Acids Reduce the Barrier of Stratum Corneum Lipid Membranes by Enhancing the Formation of a Hexagonal Lateral Packing. *Langmuir* **2014**, *30* (22), 6534-6543.
123. Lee, D.; Ashcraft, J. N.; Verploegen, E.; Pashkovski, E.; Weitz, D. A., Permeability of model stratum corneum lipid membrane measured using quartz crystal microbalance. *Langmuir* **2009**, *25* (10), 5762-6.
124. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Investigating the barrier function of skin lipid models with varying compositions. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, *79* (2), 334-342.
125. Kuempel, D.; Swartzendruber, D. C.; Squier, C. A.; Wertz, P. W., In vitro reconstitution of stratum corneum lipid lamellae. *Bba-Biomembranes* **1998**, *1372* (1), 135-140.
126. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A., Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res* **2004**, *45* (5), 923-932.
127. Percot, A.; Lafleur, M., Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy. *Biophys J* **2001**, *81* (4), 2144-2153.
128. Eeman, M.; Deleu, M.; Paquot, M.; Thonart, P.; Dufrene, Y. F., Nanoscale properties of mixed fengycin/ceramide monolayers explored using atomic force microscopy. *Langmuir* **2005**, *21* (6), 2505-2511.
129. Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *J Phys Chem B* **2000**, *104* (9), 2159-2165.
130. Langmuir monolayer. Smos.sogang.ac.kr (online). http://smos.sogang.ac.kr/wiki/index.php/Lagmuir_monolayer (accessed 2015-07-12).
131. Ziblat, R.; Leiserowitz, L.; Addadi, L., Crystalline Lipid Domains: Characterization by X-Ray Diffraction and their Relation to Biology. *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50* (16), 3620-3629.
132. Mendelsohn, R.; Brauner, J. W.; Gericke, A., External Infrared Reflection-Absorption Spectrometry Monolayer Films at the Air-Water-Interface. *Annu Rev Phys Chem* **1995**, *46*, 305-334.
133. Vollhardt, D., Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Curr Opin Colloid In* **2014**, *19* (3), 183-197.
134. Meunier, J., Why a Brewster angle microscope? *Colloid Surface A* **2000**, *171* (1-3), 33-40.

135. Stefaniu, C.; Brezesinski, G., X-ray investigation of monolayers formed at the soft air/water interface. *Curr Opin Colloid In* **2014**, *19* (3), 216-227.
136. Barnes, G.; Gentle, I., *Interfacial Science: An Introduction*. 2 ed.; Oxford University Press Inc.: New York, 2011; p 115-149.
137. Norlen, L.; Gil, I. P.; Simonsen, A.; Descouts, P., Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films. *J Struct Biol* **2007**, *158* (3), 386-400.
138. Blodgett, K. B., Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57*, 1007-1022.
139. Cruz, A.; Pérez-Gil, J., Langmuir Films to Determine Lateral Surface Pressure on Lipid Segregation. In *Methods in Membrane Lipids*, 1 ed.; Dopico, A. M., Ed. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2010; pp 439-457.
140. Caussin, J.; Gooris, G. S.; Janssens, M.; Bouwstra, J. A., Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Bba-Biomembranes* **2008**, *1778* (6), 1472-1482.
141. Waisser, K.; Pour, M., *Organická chemie II*. 2 ed.; Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum: Praha, 2003; p 29-45.
142. Brdička, R.; Dvořák, J., *Základy fyzikální chemie*. 2 ed.; Academia: Praha, 1977; p 776-788.
143. Macphail, R. A.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G.; Elliger, C. A., C-H Stretching Modes and the Structure of Normal-Alkyl Chains .2. Long, All-Trans Chains. *J Phys Chem-Us* **1984**, *88* (3), 334-341.
144. Arseneault, M.; Lafleur, M., Cholesterol sulfate and Ca²⁺ modulate the mixing properties of lipids in stratum corneum model mixtures. *Biophys J* **2007**, *92* (1), 99-114.
145. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Bba-Biomembranes* **2008**, *1778* (5), 1344-1355.
146. Snyder, R. G., Vibrational Spectra of Crystalline N-Paraffins .2. Intermolecular Effects. *J Mol Spectrosc* **1961**, *7* (2), 116-&.
147. Snyder, R. G., Vibrational Spectra of Crystalline N-Paraffins .1. Methylene Rocking and Wagging Modes. *J Mol Spectrosc* **1960**, *4* (5), 411-434.
148. Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Infrared spectroscopy studies of mixtures prepared with synthetic ceramides varying in head group architecture: Coexistence of liquid and crystalline phases. *Bba-Biomembranes* **2009**, *1788* (3), 732-742.
149. Wang, X. J.; Ujihara, M.; Imae, T.; Ishikubo, A.; Sugiyama, Y.; Okamoto, T., Characterization of mimetic lipid mixtures of stratum corneum. *Colloid Surface B* **2010**, *78* (1), 92-100.
150. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R., FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behavior of ceramides. *J Phys Chem B* **1997**, *101* (44), 8933-8940.
151. Rerek, M. E.; van Wyck, D.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. *Chem Phys Lipids* **2005**, *134* (1), 51-58.
152. Chamlin, S. L.; Kao, J.; Frieden, I. J.; Sheu, M. Y.; Fowler, A. J.; Fluhr, J. W.; Williams, M. L.; Elias, P. M., 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), 198-208.
153. Man, M. Q.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Exogenous Lipids Influence Permeability Barrier Recovery in Acetone-Treated Murine Skin. *Arch Dermatol* **1993**, *129* (6), 728-738.
154. Vavrova, K.; Zbytovska, J.; Palat, K.; Holas, T.; Klimentova, J.; Hrabalek, A.; Dolezal, P., Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro. *Eur J Pharm Sci* **2004**, *21* (5), 581-587.

155. Vavrova, K.; Hrabalek, A.; Mac-Mary, S.; Humbert, P.; Muret, P., Ceramide analogue 14S24 selectively recovers perturbed human skin barrier. *Brit J Dermatol* **2007**, *157* (4), 704-712.
156. Huang, H. W.; Goldberg, E. M.; Zidovetzki, R., Ceramides perturb the structure of phosphatidylcholine bilayers and modulate the activity of phospholipase A(2). *Eur Biophys J Biophys* **1998**, *27* (4), 361-366.
157. Sot, J.; Goni, F. M.; Alonso, A., Molecular associations and surface-active properties of short- and long-N-acyl chain ceramides. *Bba-Biomembranes* **2005**, *1711* (1), 12-19.
158. Janůšová, B. Vliv derivátů aminokyselin a ceramidů na bariérovou funkci kůže. Dizertační práce, Karlova Univerzita v Praze, Hradec Králové, 2012.
159. Grosch, S.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G., Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res* **2012**, *51* (1), 50-62.
160. Chiantia, S.; Kahya, N.; Schwille, P., Raft domain reorganization driven by short- and long-chain ceramide: A combined AFM and FCS study. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, *23* (14), 7659-7665.
161. Oguri, M.; Gooris, G. S.; Bito, K.; Bouwstra, J. A., The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Bba-Biomembranes* **2014**, *1838* (7), 1851-1861.
162. Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. *Biophys J* **2007**, *92* (8), 2785-2795.
163. Mojumdar, E. H.; Kariman, Z.; van Kerckhove, L.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Bba-Biomembranes* **2014**, *1838* (10), 2473-2483.
164. Sparr, E.; Eriksson, L.; Bouwstra, J. A.; Ekelund, K., AFM study of lipid monolayers: III. Phase behavior of ceramides, cholesterol and fatty acids. *Langmuir* **2001**, *17* (1), 164-172.
165. Brockman, H. L.; Momsen, M. M.; Brown, R. E.; He, L. L.; Chun, J.; Byun, H. S.; Bittman, R., The 4,5-double bond of ceramide regulates its dipole potential, elastic properties, and packing behavior. *Biophys J* **2004**, *87* (3), 1722-1731.
166. Li, L.; Tang, X. P.; Taylor, K. G.; Dupre, D. B.; Yappert, M. C., Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J* **2002**, *82* (4), 2067-2080.
167. Vaknin, D.; Kelley, M. S., The structure of D-erythro-C18 ceramide at the air-water interface. *Biophys J* **2000**, *79* (5), 2616-2623.
168. Dupuy, F.; Fanani, M. L.; Maggio, B., Ceramide N-Acyl Chain Length: A Determinant of Bidimensional Transitions, Condensed Domain Morphology, and Interfacial Thickness. *Langmuir* **2011**, *27* (7), 3783-3791.
169. Dupuy, F.; Maggio, B., The hydrophobic mismatch determines the miscibility of ceramides in lipid monolayers. *Chem Phys Lipids* **2012**, *165* (6), 615-629.
170. tenGrotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; vanMiltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A., Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophys J* **1996**, *71* (3), 1389-1399.
171. Ekelund, K.; Eriksson, L.; Sparr, E., Rectangular solid domains in ceramide-cholesterol monolayers - 2D crystals. *Bba-Biomembranes* **2000**, *1464* (1), 1-6.
172. Scheffer, L.; Solomonov, I.; Weygand, M. J.; Kjaer, K.; Leiserowitz, L.; Addadi, L., Structure of cholesterol/ceramide monolayer mixtures: Implications to the molecular organization of lipid rafts. *Biophys J* **2005**, *88* (5), 3381-3391.
173. Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A., Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J Invest Dermatol* **2010**, *130* (10), 2511-2514.

174. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; Lavrijzen, A. P.; Bouwstra, J. A., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* **2012**, *53* (12), 2755-2766.
175. Park, Y. H.; Jang, W. H.; Seo, J. A.; Park, M.; Lee, T. R.; Park, Y. H.; Kim, D. K.; Lim, K. M., Decrease of Ceramides with Very Long-Chain Fatty Acids and Downregulation of Elongases in a Murine Atopic Dermatitis Model. *J Invest Dermatol* **2012**, *132* (2), 476-479.
176. Tawada, C.; Kanoh, H.; Nakamura, M.; Mizutani, Y.; Fujisawa, T.; Banno, Y.; Seishima, M., Interferon-gamma Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J Invest Dermatol* **2014**, *134* (3), 712-718.
177. Sparr, E.; Ekelund, K.; Engblom, J.; Engstrom, S.; Wennerstrom, H., An AFM study of lipid monolayers. 2. Effect of cholesterol on fatty acids. *Langmuir* **1999**, *15* (20), 6950-6955.
178. Souza, S. L.; Capitan, M. J.; Alvarez, J.; Funari, S. S.; Lameiro, M. H.; Melo, E., Phase Behavior of Aqueous Dispersions of Mixtures of N-Palmitoyl Ceramide and Cholesterol: A Lipid System with Ceramide-Cholesterol Crystalline Lamellar Phases. *J Phys Chem B* **2009**, *113* (5), 1367-1375.
179. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Salomonsdevries, M. A.; Vanderspek, J. A.; Bras, W., Structure of Human Stratum-Corneum as a Function of Temperature and Hydration - a Wide-Angle X-Ray-Diffraction Study. *Int J Pharm* **1992**, *84* (3), 205-216.
180. Mojumdar, E. H.; Groen, D.; Gooris, G. S.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; Deme, B.; Bouwstra, J. A., Localization of Cholesterol and Fatty Acid in a Model Lipid Membrane: A Neutron Diffraction Approach. *Biophys J* **2013**, *105* (4), 911-918.
181. Pullmannova, P.; Pavlikova, L.; Kovacik, A.; Skolova, B.; Slepicka, P.; Zbytovska, J.; Vavrova, K., Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. **2015**, submitted.
182. Stiban, J.; Fistere, D.; Colombini, M., Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* **2006**, *11* (5), 773-780.
183. Zheng, W.; Kollmeyer, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J. C.; Liu, Y.; Peng, Q.; Ramaraju, H.; Sullards, M. C.; Cabot, M.; Merrill, A. H., Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 1864-1884.
184. Takagi, S.; Tojo, H.; Tomita, S.; Sano, S.; Itami, S.; Hara, M.; Inoue, S.; Horie, K.; Kondoh, G.; Hosokawa, K.; Gonzalez, F. J.; Takeda, J., Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest* **2003**, *112* (9), 1372-1382.
185. Rerek, M. E.; Chen, H. C.; Markovic, B.; Van Wyck, D.; Garidel, P.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Phytosphingosine and sphingosine ceramide headgroup hydrogen bonding: Structural insights through thermotropic hydrogen/deuterium exchange. *J Phys Chem B* **2001**, *105* (38), 9355-9362.
186. Nybond, S.; Bjorkqvist, Y. J. E.; Ramstedt, B.; Slotte, J. P., Acyl chain length affects ceramide action on sterol/sphingomyelin-rich domains. *Bba-Biomembranes* **2005**, *1718* (1-2), 61-66.
187. Veryser, L.; Boonen, J.; Taevernier, L.; Guillaume, J.; Risseeuw, M.; Shah, S. N. H.; Roche, N.; Van Calenbergh, S.; De Spiegeleer, B., The Influence of the Acyl Chain on the Transdermal Penetration-Enhancing Effect of Synthetic Phytoceramides. *Skin Pharmacol Phys* **2015**, *28* (3), 124-136.
188. Tesař, O. Příprava analogů fytoceramidů a hodnocení jejich vlivu na bariérovou funkci kůže. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2013.
189. Školová, B. Syntéza analogů ceramidů s různou délkou sfingosinu a hodnocení jejich vlivu na kožní bariéru. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2010.

190. Novotny, J.; Janusova, B.; Novotny, M.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol Phys* **2009**, *22* (1), 22-30.
191. Barth, A.; Zscherp, C., What vibrations tell us about proteins. *Q Rev Biophys* **2002**, *35* (4), 369-430.
192. Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N., Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Bba-Biomembranes* **2013**, *1828* (10), 2347-2358.
193. Paloncova, M.; Vavrova, K.; Sovova, Z.; DeVane, R.; Otyepka, M.; Berka, K., Structural Changes in Ceramide Bilayers Rationalize Increased Permeation through Stratum Corneum Models with Shorter Acyl Tails. *J Phys Chem B* **2015**, in press.
194. Pilgram, G. S. K.; Vissers, D. C. J.; van der Meulen, H.; Pavel, S.; Lavrijsen, S. P. M.; Bouwstra, J. A.; Koerten, H. K., Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (3), 710-717.

Curriculum vitae

BARBORA ŠKOLOVÁ

Narozena: 15. ledna 1986 v Třinci, Česká Republika

Bydliště: Hnojník 355, 739 53 Hnojník, Česká Republika

e-mail: skolb5aa@faf.cuni.cz

tel: +420737778362

Zaměstnání:

od r. 2013: **akademický pracovník** – asistent na Katedře farmaceutické technologie Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

vědecký pracovník projektu Grantové agentury ČR “*Modely lipidových membrán – nový nástroj pro studium patofyziologie kožních onemocnění na molekulární úrovni*”, Katedra anorganické a organické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

2005 – 2013 průvodce a pracovník v depozitářích Českého farmaceutického muzea (středisko Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Kuks)

Vzdělání:

od r. 2010: studentka doktorského studijního oboru **Bioorganická chemie**, studijního programu Organická chemie na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Název dizertační práce: “*Syntéza a studium analogů ceramidů*”; školitelka: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

2005 – 2010 magisterský studijní program **Farmacie**, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Diplomová práce: “*Syntéza analogů ceramidů s různou délkou sfingosinu a hodnocení jejich vlivu na kožní bariéru*”, Katedra anorganické a organické chemie; školitelka: doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

2001 – 2005 Gymnázium v Českém Těšíně

Ocenění:

2015 3. místo v soutěži “Cena Sanofi za farmacii 2015”

2014 cena za poster na mezinárodní konferenci “Skin Forum”, Praha, ČR

2010 Cena děkana Farmaceutické fakulty UK

2010 vítězství v nadnárodním kole Studentské vědecké konference, Zentiva, Praha, ČR

Granty:

- od r. 2013 spolupracovník projektu Grantové agentury ČR *“Modely lipidových membrán – nový nástroj pro studium patofyziologie kožních onemocnění na molekulární úrovni”* (13-23891S)
- od r. 2013 spolupracovník projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy *“Studium akceleračních transdermálních permeace léčiv”* (GAUK 1404213)
- 2012 - 2014 **hlavní řešitel** projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy *“Studium vztahů mezi strukturou ceramidů a jejich bariérovou funkcí v kůži – syntéza analogů ceramidů, příprava modelových lipidových membrán, sledování jejich permeability a biofyzikálních vlastností”* (GAUK 652412)
- 2011 – 2013 spolupracovník projektu Grantové agentury ČR *“Syntéza a studium strukturních závislostí ceramidů v kůži a látek s nimi interagujících”* (207/11/0365)

Zahraniční stáže:

- 2013 Universität Leipzig, Lipsko, SRN (4 měsíce)
- 2013 Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle, SRN (2 měsíce)

Účast na konferencích:

- 2015 XV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků, Devět skal – Milovy, ČR (poster)
- 2014 44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Kodaň, Dánsko (poster)
- Skin Forum (Percutaneous penetration – measurement, modulation and modelling), Praha, ČR (přednáška, poster)
- Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, Francie (poster)
- 2013 Gordon Research Conference: Barrier Function of Mammalian Skin, Waterville, New Hampshire, USA (poster)
- 11th Meeting of the European Epidermal Barrier Research Network, International Investigative Dermatology Meeting, Edinburg, Spojené Království (poster)
- Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii “Liblice 2013”, Špindlerův Mlýn, ČR (poster)
- 2012 Perspectives in Percutaneous Penetration, La Grande Motte, Francie (poster)
- Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii “Liblice 2012”, Lázně Bělohrad, ČR (poster)
- 2011 Syntéza a analýza, Brno, ČR (přednáška)

Publikace:

1. **Školová, B.**, Jandovská, K., Pullmannová, P., Tesař, O., Roh, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. 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), 5527-5535. [IF 2014: 4,5]
2. **Školová, B.**, Hudská, K., Pullmannová, P., Kováčik, A., Palát, K., Roh, J., Fleddermann, J., Estrela-Lopis, I., Vávrová, K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (35), 10460-10470. [IF 2014: 3,3]
3. **Školová, B.**, Janůšová, B., Zbytovská, J., Gooris, G., Bouwstra, J., Slepíčka, P., Berka, P., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624-15633. [IF 2013: 4,2]
4. Stahlberg, S., **Školová, B.**, Madhu, P. K., Vogel, A., Vávrová, K., Huster, D. Probing the Role of the Ceramide Acyl Chain Length and Sphingosine Unsaturation in Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ²H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2015**, *31* (17), 4906-4915. [IF 2014: 4,5]
5. Janůšová, B., **Školová, B.**, Tükörová, K., Wojnarová, L., Šimůnek, T., Mladěnka, P., Filipický, T., Říha, M., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, A., Vávrová, K. Amino Acid Derivatives as Transdermal Permeation Enhancers. *J Control Release* **2013**, *165* (2), 91-100. [IF 2013: 7,3]
6. Diblíková, D., Kopečná, M., **Školová, B.**, Krečmerová, M., Roh, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. Transdermal Delivery and Cutaneous Targeting of Antivirals Using a Penetration Enhancer and Lysolipid Prodrugs. *Pharm Res* **2014**, *31*, 1071-81. [IF 2014: 3,4]
7. Vávrová K., Kovaříková P., **Školová B.**, Líbalová M., Roh J., Čáp R., Holý A., Hrabálek A. Enhanced Topical and Transdermal Delivery of Antineoplastic and Antiviral Acyclic Nucleoside Phosphonate cPr PMEDAP. *Pharm Res* **2011**, *28* (12), 3105-15. [IF 2011: 4,1]
8. Pullmannová, P., Staňková, K., Pospíšilová, M., **Školová, B.**, Zbytovská, J., Vávrová, K. Effects of Sphingomyelin/Ceramide Ratio on the Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838* (8), 2015-26. [IF 2014: 3,8]
9. Vávrová, K., Henkes, D., Strüver, K., Sochorová, M., **Školová, B.**, Witting, M.Y., Friess, W., Schreml, S., Meier, R.J., Schäfer-Korting, M., Fluhr, J.W., Küchler, S. Filaggrin Deficiency Leads to Impaired Lipid Profile and Altered Acidification Pathways in a 3D Skin Construct. *J Invest Dermatol* **2014**, *134* (3), 746-53. [IF 2014: 7,2]

Publikace v recenzním řízení:

1. **Školová, B.**, Janůšová, B., Vávrová, K. Ceramides with a pentadecasphingosine chain and short acyls have strong permeabilization effects on skin a model lipid membranes. **2015.**
2. Pullmannová, P., Pavlíková, L., Kováčik, A., **Školová, B.**, Slepíčka, P., Zbytovská, J., Vávrová, K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. **2015.**

Přílohy

1. **Školová, B.**, Janůšová, B., Zbytovská, J., Gooris, G., Bouwstra, J., Slepíčka, P., Berka, P., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, A., Vávrová, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, 29 (50), 15624-15633. [IF 2013: 4,2]
2. **Školová, B.**, Hudská, K., Pullmannová, P., Kováčik, A., Palát, K., Roh, J., Fleddermann, J., Estrela-Lopis, I., Vávrová, K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J Phys Chem B* **2014**, 118 (35), 10460-10470. [IF 2014: 3,3]
3. Stahlberg, S., **Školová, B.**, Madhu, P. K., Vogel, A., Vávrová, K., Huster, D. Probing the Role of the Ceramide Acyl Chain Length and Sphingosine Unsaturation in Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ²H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **2015**, 31 (17), 4906-4915. [IF 2014: 4,5]
4. **Školová, B.**, Jandovská, K., Pullmannová, P., Tesař, O., Roh, J., Hrabálek, A., Vávrová, K. 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), 5527-5535. [IF 2014: 4,5]
5. **Školová, B.**, Janůšová, B., Vávrová, K. Ceramides with a Pentadecasphingosine Chain and Short Acyls Have Strong Permeabilization Effects on Skin a Model Lipid Membranes. **2015.**
V recenzním řízení.