

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: **Mgr. Michaela Sochorová**

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

Název disertační práce: **Studium bariérových lipidů v kůži a kožních modelech**

Jako „bariérové“ označujeme lipidy nacházející se v nejsvrchnější vrstvě epidermis – stratum corneum (SC). Jedná se o přibližně ekvimolární směs ceramidů (Cer), volných mastných kyselin (MK) a cholesterolu (Chol). Tato směs je jedinečná svým složením i strukturou a zajišťuje bariéru, která chrání organismus před negativními vlivy vnějšího prostředí a současně brání nadměrným ztrátám vody a reguluje tak homeostázu organismu.

Narušení kožní bariéry, včetně pozměněného složení a organizace bariérových lipidů, bylo popsáno u řady onemocnění postihujících kůži, jako je atopická dermatitida, psoriáza či rakovinná onemocnění kůže. Studium a terapie těchto onemocnění jsou limitovány jejich komplexní patofyziologií a nedostatkem biologického materiálu (lidské tkáně). Kožní modely tak představují vhodnou alternativu a užitečný nástroj pro studium kožních onemocnění. Modely využívané ve studiu kožní bariéry se liší svojí jednoduchostí/složitostí, způsobem přípravy a tudíž i druhem informací, které mohou poskytnout.

Jednoduchým modelem mezibuněčné lipidové směsi SC jsou lipidové membrány. První studované modely napodobovaly narušený metabolismus Cer ve SC u Gaucherovy choroby. Cer za normálních okolností vznikají z jejich prekurzorů – glukosylCer (GlcCer), u tohoto onemocnění je však přeměna omezena či znemožněna. Připravili jsme modely se sníženým obsahem Cer, které byly nahrazeny jejich prekurzorem – GlcCer. U modelových membrán jsme studovali jejich permeabilitu pomocí 4 permeačních markerů a lamelární uspořádání lipidů jsme hodnotili rentgenovou práškovou difrakcí. Náhrada malého množství Cer za GlcCer vedla ke zhoršení bariérových vlastností membrán a narušení jejich mikrostruktury. Naopak, záměna polovičního a většího množství Cer za GlcCer způsobila tvorbu nové lamelární fáze a membrány měly lepší bariérové vlastnosti v porovnání s kontrolní membránou. Výsledky naznačují, že akumulace GlcCer pravděpodobně není hlavní příčinou zvýšené ztráty vody u pacientů s Gaucherovou chorobou.

Obdobně, pomocí modelových lipidových membrán, jsme studovali vliv množství Chol v lipidové směsi na bariérové vlastnosti připravených membrán. Rentgenová prášková difrakce odhalila, že jen přibližně polovina ekvimolárního množství Chol je promíšena s ostatními složkami směsi a začleněna do lamelárních fází. Větší množství Chol vytváří separovanou fázi ve struktuře membrán. Permeabilita membrán nebyla s úbytkem Chol negativně ovlivněna, naopak, membrána s 40 % fyziologického množství Chol měla nejlepší bariérové vlastnosti. Z toho vyplývá, že ekvimolární množství Chol má ve SC pravděpodobně jinou než bariérovou funkci.

Složitějšími modely pokožky či kůže jsou rekonstruované kožní modely. Obsahují kožní buňky, které vytvářejí pokožku rozčleněnou do jednotlivých vrstev. Tyto modely jsou výhodné

pro biochemické analýzy, kdy je zpravidla sledován vliv mutace specifického genu, či přítomnost specifických buněk. Mutace v genu pro filaggrin (FLG) je jednou z významných predispozic pro rozvoj atopické dermatitidy. Kolegové z Německa připravili kožní modely s normální a sníženou expresí FLG. FLG-deficitní modely mají prokázaný vyšší obsah MK ve SC a horší organizaci lipidů. V připravených modelech jsme sledovali vliv vybraných PPAR agonistů na složení, organizaci a funkci kožní bariéry. Selektivní PPAR α agonista zvýšil expresi FLG a ostatních strukturních proteinů, normalizoval hladinu a složení MK, čímž došlo ke zlepšení organizace lipidů a snížení permeability FLG-deficitních modelů. Látky ze skupiny agonistů PPAR by tak mohly být využity v léčbě kožních onemocnění souvisejících s nedostatkem FLG.

Jelikož atopická dermatitida je chronické zánětlivé onemocnění, studovali jsme FLG-deficitní modely s přidavkem aktivovaných imunitních buněk a jejich vliv na homeostázu a kožní bariéru kožních modelů. Zvýšená hladina pro-zánětlivého cytokinu TSLP byla nalezena v modelu se sníženou expresí FLG, po přidavku imunitních buněk došlo ke zvýšení TSLP i v kontrolních modelech. Oba typy modelů vykazovaly po přidavku imunitních buněk zvýšenou permeabilitu a vyšší povrchové pH. Výhradně ve FLG-deficitních modelech byla pozorována migrace aktivovaných T-lymfocytů z místa aplikace do dermální části modelu. Toto zjištění naznačuje, že TSLP přímo podněcuje migraci imunitních buněk, což nebylo dosud popsáno.

Rekonstruované kožní modely mohou být cenným pomocníkem při hledání cílené léčby rakoviny kůže. Za tímto účelem jsme studovali kožní modely rakoviny kůže (v různém rozsahu) a charakterizovali jsme jejich bariérové vlastnosti. Analýza odhalila porušené uspořádání lipidových řetězců i pozměněné složení lipidové matrix. Defekt kožní bariéry a zvýšená propustnost modelů byla úměrná rozsahu karcinomu (počtu rakovinných buněk). Studované kožní modely tak simulují lokální změny bariérové funkce pokožky v místě lézí *in vivo*.

Lidská kůže *ex vivo*, v celé její tloušťce nebo její vrstvy, se využívá v řadě pokusů. Kůže v celé její tloušťce jsme použili v permeačních pokusech k porovnání výsledků získaných z pokusů s modelovými membránami. Topická aplikace GlcCer na intaktní lidskou kůži narušila kožní bariéru, což je patrné z vyšších hodnot ztráty vody přes pokožku a nižších hodnot elektrické impedance. V druhé studii, selektivní extrakce Chol z izolovaného lidského SC potvrdila výsledky z modelových membrán se stejným zastoupením Chol. Ačkoli bylo možné extrahovat Chol jen z 20 %, porovnatelné hodnoty z modelových membrán a izolovaného SC dokazují vhodnost a reprodukovatelnost modelových membrán v tomto typu studie.

Odběr vzorku pokožky pacientů s kožními onemocněními je limitujícím krokem v diagnostice a výzkumu kožních onemocněních. Neinvazivní metody odběru by značně zlepšily pohodlí pacientů v porovnání s invazivní biopsií. Ve spolupráci s Dr. Svobodou jsme porovnávali dvě metody odběru – „stripování páskou“ a „tvorbu puchýře podtlakem“. Druhá uvedená metoda poskytuje intaktní epidermis v množství, které je dostačující pro izolaci proteinu, RNA, k přípravě histologických preparátů i ke kvalitativní a kvantitativní analýze bariérových lipidů.

Výsledky práce ukazují praktické využití kožních modelů různých úrovní ve vědeckých studiích. Získané poznatky přispěly k lepšímu porozumění funkce bariérových lipidů ve zdravé i nemocné kůži.