Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra organické a bioorganické chemie

Studium deplece cholesterolu v lidské kožní bariéře

Diplomová práce

Pavla Audrlická

Školitelka: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

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

V Hradci Králové,

Pavla Audrlická

Děkuji kolegům ze Skin barrier research group i celé Katedry organické a bioorganické chemie, zvláště prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za možnost pracovat na zajímavém tématu a cenné rady a PharmDr. Monice Kopečné, Ph.D. za všestrannou pomoc a trpělivost. Poděkování patří též Mgr. Haně Bavlovič-Piskáčkové, Ivě Vencovské a RNDr. Jaroslavu Maixnerovi, CSc. za pomoc s částí měření.

Díky patří všem mým blízkým a kolegům, kteří mne nejen při vzniku této práce ale i po čas studia podporovali jakýmikoli prostředky.

Tato studie proběhla za finanční podpory Grantové agentury ČR prostřednictvím projektu 16-25687J a Univerzity Karlovy prostřednictvím projektů GAUK 936216 a SVV 260 401.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Pavla Audrlická

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

Název diplomové práce: **Studium deplece cholesterolu v lidské kožní bariéře**

Kožní bariéra člověka spočívá v mezibuněčné lipidové matrix nejsvrchnější vrstvy kůže, *stratum corneum* (SC). Tuto lipidovou matrix tvoří přibližně ekvimolární směs ceramidů (Cer), volných mastných kyselin (MK) a cholesterolu (Chol).[1] Cholesterol je nutný pro organizaci lipidů a tvorbu funkční bariéry. Není však znám důvod jeho přítomnosti v množství tak vysokém, že se s ostatními lipidy již nemísí a tvoří separované domény.[2] Experimenty na syntetických membránách se sníženým obsahem Chol ukázaly, že pro tvorbu a komplexní funkci lipidové bariéry je dostačující molární poměr Cer:MK:Chol 1:1:0,4.[3]

Cílem této práce bylo snížit obsah Chol v ex vivo lidském SC a zkoumat vliv takového zásahu na permeabilitu a mikrostrukturu SC.

Byla vyvinuta metoda selektivní extrakce Chol ze SC *ex vivo* od zdravých dárců pomocí methyl-β-cyklodextrinu (MβCD). Obsah Chol byl snížen na 78 % původního množství, extrahované SC nejevilo změny v obsahu Cer a MK. Permeabilita byla studována pomocí měření transepidermální ztráty vody (TEWL), elektrické impedance (EI) a propustnosti pro theofylin (TH) a indomethacin (IND). Nebyl zaznamenán signifikantí rozdíl mezi TEWL MβCD extrahovaného a kontrolního SC. Byl pozorován pokles EI a permeability pro TH a mírné zvýšení permeability pro IND. To koresponduje s výsledky ze syntetických membrán s odpovídajícím obsahem Chol a ukazuje, že bariérová funkce SC není signifikantně narušena takovým snížením přirozeného obsahu Chol. Studium molekulární organizace pomocí infračervené spektroskopie neukázalo signifikantní změny. Rentgenová difrakční analýza v oblasti malých úhlů potvrdila snížení intenzity reflexí fáze separovaného Chol ve SC po CD extrakci, přičemž intenzity smíšených lipidových fází se jevily relativně stabilní. Naše výsledky ukazují, že separované domény Chol nejsou podstatné pro vznik a bariérovou funkci SC.

Tato studie proběhla za finanční podpory Grantové agentury ČR prostřednictvím projektu 16-25687J a Univerzity Karlovy prostřednictvím projektů GAUK 936216 a SVV 260 401.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Organic and Bioorganic Chemistry
Pavla Audrlická
Supervisor: prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.
Title of diploma thesis: **Study of cholesterol depletion in human skin barrier**

Barrier function of human skin barrier dwells in intercellular lipid membranes of the uppermost skin layer, the *stratum corneum* (SC), composed of equimolar mixture of ceramides (Cer), free fatty acids (FFA) and cholesterol (Chol).[1] Chol is required for proper lipid organization of SC, however, it stays unclear, why is it present in an amount so high that it separates from other lipids.[2] Experiments using synthetic model membranes with decreased Chol content suggested that molar ratio of Cer:FFA:Chol 1:1:0,4 is sufficient for lipid barrier formation and its complex functionality.[3]

The aim of this work was to manipulate Chol content directly in human SC and to study the effects of decreased Chol content on the SC permeability and microstructure.

Ex vivo SC obtained from healthy donors was extracted by methyl-β-cyclodextrin (MβCD) to reduce natural Chol content. The extracted SC did not show significant changes in Cer or FFA whilst the amount of Chol was lowered to 78 %. SC barrier properties were evaluated by measurements of transepidermal water loss (TEWL), electrical impedance (EI) and permeabilities for theophylline (TH) and indomethacin (IND). Significant difference between TEWL of CD-extracted and control sample was not detected. Decreased EI and permeability to TH, and a slight increase in permeability to IND were found. That corresponds to synthetic membranes with similar Chol content, suggesting that barrier function of SC with lower than natural amount of Chol is not significantly impaired. Molecular organization, investigated using infrared spectroscopy, did not reveal significant changes. Furthermore, small angle X-ray diffraction suggested that the MβCD treatment decreased the intensity of the separated Chol while that of a SC mixed lipid phase appeared relatively stable. Our results suggest that the separated Chol domains are not necessary for the SC barrier formation and function.

The study was supported by the Czech Science Foundation (16-25687J) and Charles University (GAUK 936216 and SVV 260 401).

Obsah

Prohlášení 2
Poděkování 3
Abstrakt 4
Abstract 5
Obsah 6
Seznam použitých zkratek 9
1. Úvod a cíl práce: 10
2. Teoretická část 11
2.1 Kůže 11
2.1.1 Hypodermis 11
2.1.2 Dermis 11
2.1.3 Epidermis 12
2.1.4 Epidermální vrstvy 13
2.1.4.1 Stratum basale 13
2.1.4.2 Stratum spinosum 14
2.1.4.3 Stratum granulosum 14
2.1.4.4 Stratum lucidum 15
2.2 Kožní bariéra - stratum corneum 16
2.2.1 Korneocyty 17
2.2.2 Korneocytární lipidová obálka 18
2.2.3 Voda a NMF ve SC 19
2.2.4 Lipidová matrix a bariérová funkce kůže 19
2.2.5 Skladba lipidové matrix SC 21
2.2.5.1 Ceramidy 21
2.2.5.1.1 Diverzita ceramidů 22
2.2.5.2 Mastné kyseliny 23
2.2.5.3 Cholesterol 24
2.3 Mikrostruktura lipidové matrix SC 26
2.3.1 Lamelární uspořádání 26
2.3.2 Laterální uspořádání 26
2.3.3 Studium mikrostruktury SC 27
2.3.4 Teoretické modely kožní bariéry 28
3. Poznámky k použitým metodám 29
3.1 Model kožní bariéry - ex vivo SC 29
3.2 Měření bariérových vlastností kůže (permeabilitní experimenty) 29
3.2.1 Propustnost pro vodu (TEWL) 29

3.2.2 Propustnost pro nabité částice (elektrická impedance) 30
3.2.3 Propustnost pro modelové látky 30
3.3 Studium složení lipidové matrix (HPTLC) 30
3.4 Studium mikrostruktury SC 31
3.4.1 Infračervená spektroskopie 31
3.4.2 Rentgenová difrakční analýza (XRD) 32
4. Experimentální část 33
4.1 Chemikálie a materiál 33
4.2 Ex vivo SC, získání a zpracování 33
4.3 Hledání metody selektivní parciální extrakce cholesterolu ze SC 34
4.3.1 Extrakce pomocí 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu 34
4.3.2 jednoduchá zkouška rozpustností 35
4.3.3 extrakce pomocí methyl-β-cyklodextrinu 35
4.3.4. extrakce pomocí propylenglykolu 35
4.3.5 Zkouška stripování 36
4.4 Extrakce lipidové složky SC pro analýzu HPTLC 36
4.5 HPTLC 37
4.6 Studium permeability a mikrostruktury SC extrahovaného MβCD 38
4.6.1 Příprava SC 38
4.6.2 Studium mikrostruktury 41
4.6.2.1 Infračervená spektroskopie 41
4.6.2.2 Rentgenová difrakční analýza 42
4.6.3 Permeabilitní experimenty 38
4.6.3.1 Ztráta vody přes membránu (TEWL) 39
4.6.3.2 Elektrická impedance 39
4.6.3.3 Permeabilita pro modelové látky 39
4.7 Statistické zpracování dat 42
5. Výsledky a diskuse 43
5.1 Extrakce SC za účelem snížení obsahu cholesterolu v izolovaném lidském SC 44
5.1.1 Extrakce 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinem 44
5.1.2 Jednoduchá zkouška rozpustnosti 45
5.1.3 extrakce methyl-β-cyklodextrinem 47
5.1.4 Extrakce propylenglykolem 49
5.1.5 Krátké mastné kyseliny, rušivý vliv při analýze lipidů 50
5.1.6 Zkouška stripování *ex vivo* lidského SC ke snížení obsahu krátkých MK 51
5.1.7 Další možnosti experimentálního snižování obsahu Chol ve SC 52
5.2 Studium permeability a mikrostruktury SC se sníženým obsahem Chol 52

5.2.1 Snížení obsahu Chol 53
5.2.2. Permeabilitní experimenty 54
5.2.2.1 Propustnost modifikovaného SC pro modelové látky 57
5.2.2.1.1 Flux TH 58
5.2.2.1.2 Flux IND 59
5.2.2.2 Propustnost modifikovaného SC pro vodu -TEWL 54
5.2.2.3 Elektrická impedance modifikovaného SC 55
5.2.2.4 Souhrn permeabilitních experimentů 59
5.2.3 Mikrostruktura modifikovaného SC 60
5.2.3.1 IR 60
2.2.3.2 SAXRD 62
5.3 Biologický význam fázově separovaného Chol v kožní bariéře 64
5.3.1 Tvorba vitamínu D v kůži a 7-dehydrocholesterol reduktasa 64
5.3.2 Cholesterol v oční čočce a bariéra vůči kyslíku 66
5.3.3 Stárnoucí epidermis 67
5.3.4 Recesivní X-vázaná ichtyosa 67
6. Závěr 69
Literatura 71
Příloha 82

Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
ATR-FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací v módu zeslabeného úplného odrazu, z angl. attenuated total reflectance FTIR
CD	cyklodextrin(y)
Cer	ceramid(y)
dSC	*stratum corneum* s deplecí části přirozeně přítomného cholesterolu
EI	elektrická impedance
FFA	volné mastné kyseliny, z angl. free fatty acids
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourrierovou transformací
hCer	purifikovaná směs ceramidů lidského *stratum corneum*
HPβCD	hydroxypropyl-β-cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie z angl. high-performance liquid chromatography
HPTLC	vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě z angl. high-performance thin layer chromatography
Chol	cholesterol
IND	indomethacin
IR	infračervená spektroskopie, z angl. infrared
LPP	lamelární fáze s dlouhou periodou, z angl. long periodicity phase
MβCD	methyl-β-cyklodextrin
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. mass spektrometry
PBS	isotonický fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
PG	propylenglykol
RXLI	recesivní X-vázaná ichtyosa, z angl. recessive X-linked ichthyosis
SAXRD	rentgenová difrakční analýza v oblasti malých úhlů, z angl. small-angle X-ray diffraction
SC	*stratum corneum*
SG	*stratum granulosum*
SPP	lamelární fáze s krátkou periodou, z angl. short periodicity phase
TEWL	ztráta vody přes epidermis, z angl. trans-epidermal water loss
TH	theofylin
UV	ultrafialové, z angl. Ultra-violet
XRD	rentgenová difrakční analýza, z angl. x-ray diffraction
7-dehydroChol	7-dehydrocholesterol

1. **Úvod a cíl práce**

Funkční kožní bariéra je předpokladem a podmínkou suchozemského života. Bariérová funkce kůže je přitom soustředěna do její nejsvrchnější rohové vrstvy, *stratum corneum* (SC).[4]

Stavba a fyziologie rohové vrstvy kůže je předmětem detailního zkoumání několika posledních dekád, ale přestože bylo shromážděno mnoho poznatků o jejích složkách, zákonitostech propustnosti, o jejím metabolismu i stavbě, a navrženo několik modelů jejího uspořádání, zůstávají skutečná struktura a fungování SC neobjasněny. Víme, že jej tvoří zploštělé odumřelé buňky vyplněné keratinem, korneocyty, a lipidová matrix, která vyplňuje zbylé prostory mezi korneocyty, a tvoří hlavní bariéru limitující ztráty vody z vnitřního i prostup škodlivin z vnějšího prostředí. Tato lipidová matrix se dále skládá ze tří hlavních skupin bariérových lipidů, ceramidů (Cer), cholesterolu (Chol) a mastných kyselin s dlouhým řetězcem (MK), v přibližně ekvimolárním množství. Všechny tři lipidové složky se vzájemně mísí a tvoří multilamelární struktury s nízkou propustností pro nabité částice, vodu a další látky. Zatímco studiu chování Cer a MK v multilamelárních fázích bylo věnováno mnoho pozornosti, cholesterolová složka zůstávala relativně opomíjena. Bylo však zjištěno, že část Chol ve SC se na tvorbě těchto lamelárních struktur nepodílí a tvoří separované domény. Funkce tohoto nadbytečného, fázově separovaného Chol (v udržování kožní bariéry) je dosud neznámá.

Cílem této práce bylo studium vlivu deplece Chol v *ex vivo* lidském SC na permeabilitu a mikrostrukturu této vrstvy kůže, představující klíčovou složku kožní bariéry suchozemských savců, za účelem hlubšího porozumění funkci Chol v kožní bariéře. Výsledky studie na takto upraveném SC byly srovnávány s výsledky získanými dříve při studiu umělých lipidových membrán se sníženým obsahem Chol.[3] Cílem se tak stalo také posouzení vhodnosti tohoto modelu kožní bariéry a validace poznatků získaných s jejich pomocí.

2. Teoretická část

2.1 Kůže

Kůže je mezi orgány lidského těla největší, tvoří cca 7 % jeho hmotnosti.[5] Funkce, které plní, jsou četné, mnohé z nich pak nepostradatelné pro život člověka jako suchozemského savce i jako společenské bytosti. Předně odděluje otevřenou soustavu těla od okolí i naopak. I přesto, že je pro bariérové vlastnosti klíčová vrstva kůže násobně tenčí než list papíru,[6] tvoří překvapivě odolnou bariéru vůči chemickým, mikrobiálním[7-9] i fyzikálním stresorům zvenčí a zároveň vůči nadměrným ztrátám vody a elektrolytů zevnitř organismu.[5, 10, 11] Umožňuje však výměnu plynů a přes transkripční faktor HIF-1α se spolu s ostatními tkáněmi také podílí na signalizaci hypoxie a adaptaci organismu na snížený parciální tlak kyslíku ve vzduchu.[12] Podílí se též na endogenní tvorbě aktivní formy vitaminu D i na imunitní odpovědi.[13, 14] Merkelovy buňky v bazální vrstvě epidermis i množství nervových zakončení, např. Meissnerova či Vater-Paciniho tělíska, zajišťují mechanorecepci, podílí se na vnímání bolesti, kůží je zajištěno též vnímání tepla a chladu. Kůže se významně zapojuje do termoregulace. Podkožní tuková vrstva kromě energetické zásoby poskytuje teplotní izolaci a změna průtoku krve systémem kapilár umožňuje odevzdávání tepla okolí.[5, 11, 15]

Kůži dělíme na tři funkční vrstvy, z vnějšku postupně epidermis (pokožka), dermis (*corium*, škára) a třetí, která někdy nebývá ke zbylým dvěma řazena, hypodermis či *tela subcutanea* (podkožní vazivo).[5, 11]

2.1.1 Hypodermis

Hypodermis je podpůrná podkožní tkáň tvořená převážně řídkým vazivem a tukovými buňkami. Vlákna vycházející z hypodermis upevňují kůži na povázku svalů a kostí. Podkožní tuková tkáň plní zásobní funkci, ale tvoří též termoizolační vrstvu a ochranu proti mechanickému stresu.[15] Hypodermis je bohatě cévně zásobena a zajišťuje výživu vrstev kůže ležících nad ní. Najdeme zde také Vater-Paciniho tělíska, nervová zakončení uzpůsobená k čití tlaku. Jejich část se pak nachází i v dermis. [5, 11]

2.1.2 Dermis

Dermis nasedá na hlouběji uloženou hypodermis a zajišťuje kompletní výživu bezcévné epidermis ležící nad ní. Je tvořena hustou sítí pevných a elastických kolagenních a dalších vazivových vláken odolnou proti mechanickému stresu, proteoglykany, vodou, z buněk tu najdeme především fibroblasty, myofibroblasty, ale také různé buňky imunitního systému, a ve spodní části množství adipocytů tvořících dermální bílou tukovou tkáň.[15] V dermis se také

nachází většina kožních nervových zakončení. Ve spodní silnější retikulární části jsou tu obklopeny tukovými buňkami ukotveny vlasové a chlupové folikuly i potní a mazové žlázy. Horní část dermis tvoří v kůži člověka papilární výběžky zasahující výše do epidermis. Skrze tyto výběžky jsou hustou sítí vlásečnic dopravovány živiny pro aktivně se dělící epidermální buňky.[5, 16, 17]

2.1.3 Epidermis

Epidermis navazuje na dermis. Je poslední, vnější vrstvou kůže, a je v neustálém kontaktu s okolním prostředím. Není cévně zásobená a neobsahuje zásobní tukové buňky, závisí tedy zcela na výživě z hlubších kožních vrstev.

Najdeme zde 4 rodiny buněk. Převažujícím buněčným typem jsou keratinocyty, kožní buňky, které vznikají ze zárodečné vrstvy sousedící s dermis a během svého životního cyklu putují výše k povrchu kůže, mění tvar i metabolismus, aby byly nakonec odloučeny při procesu odlupování svrchních kožních vrstev.

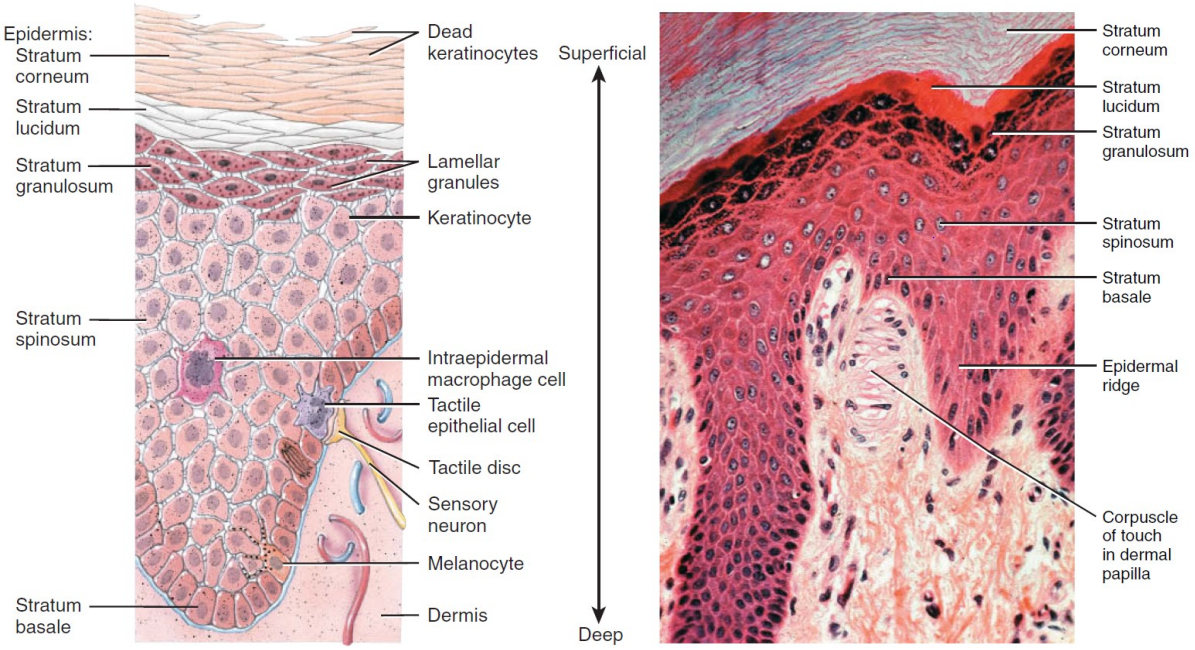
Kolem 8 % buněk epidermis tvoří melanocyty. Kožní melanocyty jsou usazeny mezi zárodečnými buňkami nejhlubší vrstvy epidermis, ale jejich výběžky zasahují mezi keratinocyty vyšších vrstev. Produkují pigment melanin, který v podobě granul dopravují skrze své výběžky do keratinocytů. V keratinocytech je melanin využit k tvorbě vrstvičky nad jádrem, chránící jadernou informaci před UV-zářením.[5, 18]

Kůže je významným orgánem imunity, a i v epidermis najdeme antigen-prezentující Langerhansovy buňky, připravené pohotově fagocytovat a prezentovat navazujícím imunitním buňkám antigeny z vnějšího prostředí.[14]

Poslední populací buněk epidermis jsou pozoruhodné Merkelovy buňky. Epidermis není inervovaná, Merkelovy buňky jsou však v kontaktu s výběžky senzorických nervů (tzv. Merkelovými disky, viz obr. 1 vlevo „Tactile epithelial cell“ a „Tactile disc“) v níže ležící dermis a umožňují tak čití dotyku z nejvzdálenější myslitelné periferie těla. Původ Merkelových buněk je doposud kontroverzní. Podle některých autorů jsou derivátem epidermis,[19] jiní se přiklání k hledání jejich původu až v neurální liště podobně jako např. u myoepitelových buněk duhovky.[20]

2.1.4 Epidermální vrstvy

V rámci epidermis dále rozlišujeme podle diferenciace buněk, které je tvoří, několik vrstev, jak znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1 *Vpravo průřez epidermis a papilární vrstvy dermis pod světelným mikroskopem zobrazující jednotlivé epidermální vrstvy, v papilárním výběžku je patrné nervové zakončení, Merkelův disk, napojené na Merkelovu buňku ve stratum basale. Vlevo schematické znázornění podobné oblasti s naznačenou morfologií keratinocytů v různých vrstvách eidermis.* [5]

2.1.4.1 Stratum basale

Na spodní dermis nasedá bazální vrstva epidermis, *stratum basale*. To je vrstva cylindrických až kubických buněk, z nichž některé mají zachovanou schopnost se dělit a z jejichž produkce pochází všechny buňky vyšších vrstev epidermis. Pro tuto vlastnost se nazývá též *stratum germinativum*. Zranění, která zasahují pod tuto vrstvu, se již zpravidla hojí jizvou, ale dojde-li pouze k poškození epidermis nad *stratum basale*, defekt jednoduše odroste spolu s další generací keratinocytů.[11, 21] Mezi keratinocyty, *stratum basale* jsou vmezeřeny zmiňované melanocyty a Merkelovy buňky, jak je vidět na obrázku 1. V cytoplasmě keratinocytů se nachází intermediární filamenta keratinu, z nichž ve vyšších vrstvách epidermis vzniká keratin. Buňky jsou propojené mezi sebou desmosomy a ke spodní tkáni je poutají hemidesmosomy.[5, 22]

2.1.4.2 Stratum spinosum

Nové keratinocyty opouští zárodečnou bazální vrstvu, mění se a tvoří další rozlišitelnou vrstvu, *stratum spinosum. Stratum spinosum* tvoří 8-10 vrstev buněk kulového tvaru. V mikroskopických preparátech se jinak okrouhlé buňky stahují a mění tvar, takže se jeví jako pokryté trnitými výběžky, odtud tedy trnitá vrstva. Každý výběžek přitom končí desmosomem, který pevně propojuje keratinocyty mezi sebou. Uvnitř trnitého výběžku se na desmosom napojují intermediární filamenta keratinu. Síťovité propojení keratinocytů desmosomy dává pokožce pevnost a mechanickou odolnost. Keratinocyty trnité vrstvy jsou ještě metabolicky aktivní a keratinová vlákna se v nich spojují ve větší svazky. Ve *stratum spinosum* dál najdeme epidermální makrofágy a zasahují sem výběžky melanocytů.[5, 11]

2.1.4.3 Stratum granulosum

Keratinocyty trnité vrstvy však vystupují výše, postupně se zplošťují a v průběhu následujících 3-5 vrstev tvoří granulární vrstvu, *stratum granulosum* (SG). Buňky granulární vrstvy procházejí řízenou buněčnou smrtí. Běžné buněčné organely přítomné u buněk nižších vrstev degenerují a mizí. Keratinocyty granulární vrstvy ztrácí metabolickou aktivitu a již netvoří keratinová mikrofilamenta. Obzvlášť patrnými v barvených preparátech jsou však granula keratohyalinu, podle nichž získala vrstva svůj název, a která soustřeďují zmíněná mikrofilamenta pro vznik samotného keratinu.[5]

V cytoplasmě zdejších buněk se dále objevují lamelární tělíska, vesikulární útvary naplněné prekurzory budoucích extracelulárních lipidů či hotovými lipidy a degradačními enzymy. Lamelární tělíska splývají s apikální buněčnou membránou keratinocytů *stratum granulosum* na přechodu SG/SC a uvolňují svůj obsah do mezibuněčného prostoru.[5, 10] Lipidy jsou poté již v extracelulárním prostoru enzymaticky uvolňovány ze svých hydrofilnějších prekurzorů (např. ceramidy z glukosylceramidů pomocí β-glukocerebrosidasy) a vytvářejí extracelulární lipidovou matrix SC.

Některé acylglukosylceramidy (prekurzory ω-hydroxyceramidů) navíc prochází oxidací na ω-hydroxylu z něhož je uvolněna kyselina linolová a jsou tímtéž hydroxylem navázány na zbytek kyseliny glutamové zesítěných proteinů korneocytární obálky (CE), především involukrinu, lorikrinu a fillagrinu, čímž vzniká základ korneocytární lipidové obálky (CLE).[23, 24] Jelikož keratinocyty s přechodem ze SG do SC ztrácí svou fosfolipidovou buněčnou membránu, slouží proteinová korneocytární obálka a na ni navázaná CLE jako její náhrada.

Kovalentně vázaná CLE navíc vytváří prostor pro kontakt hydrofilního povrchu korneocytů a lipofilní mezibuněčné matrix.[24-26]

2.1.4.4 Stratum lucidum

V některých oblastech těla, kde je kůže silnější a více namáhaná, např. dlaně, chodidla, ale i konečky prstů, je možné najít ještě 4-6 vrstev mrtvých keratinocytů se silnou plasmatickou membránou, které se v mikroskopických preparátech jeví jako světlá vrstva mezi SG a SC, odtud její název *stratum lucidum*. Keratinocyty ve *stratum lucidum* jsou vyplněny kromě keratinu i eleidinem, průhledným intracelulárním proteinem, který dává celé vrstvě její charakteristický vzhled. Tato vrstvička může sloužit jako dodatečné zpevnění v oblastech s vyšší mechanickou zátěží. Jelikož keratinocyty *stratum lucidum* již prodělaly buněčnou smrt, bývá vrstva klasifikována jako součást nejsvrchnější vrstvy epidermis, *stratum corneum*.[5, 14]

2.2 Kožní bariéra - *stratum corneum*

S*tratum corneum* je poslední a nejsvrchnější vrstvou epidermis, tvoří vnější obal našeho těla. Je funkčně nejpodstatnější bariérou oddělující organismus od okolí. Tvoří jej proměnlivé množství vrstev zploštělých mrtvých rohových buněk vyplněných keratinem, keratinocytů, a lipidová matrix vyplňující prostory mezi nimi. V místech s nejslabší kůží může mít pouhých 6 vrstev keratinocytů, na patách, kde je kůže silná, se počet vrstev může blížit stu. Na větší části trupu a končetin se počet vrstev pohybuje mezi 10 a 20.[5, 27, 28] Jeho tloušťka se liší v různých oblastech těla stejně jako počet vrstev. Nejsilnější najdeme v oblasti zad, plosek nohou či dlaní, a naopak nejslabší například v obličeji, přičemž za střední hodnotu bývá označováno 20 μm.[28, 29]

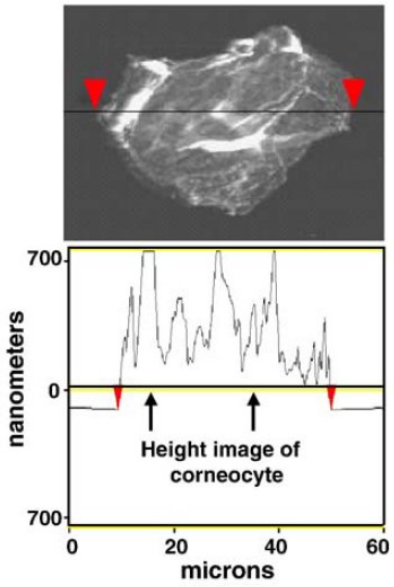
Samo SC můžeme dále rozdělit na *stratum corneum compactum*, níže uloženou kompaktně uspořádanou vrstvu odpovědnou za bariérovou funkci, a *stratum corneum disjunctum*, horní rozvolněnější vrstvu, na jejíž vnější straně v kontaktu s okolním prostředím dochází k odlupování starých kožních buněk.[30]

Celé SC je tvořeno přibližně ze tří čtvrtin hmotnostně převažující proteinovou složkou, korneocyty. Zbylá čtvrtina připadá na hydrofobní lipidovou matrix, která vyplňuje prostory mezi korneocyty. Dle „brick and mortar" modelu SC jsou korneocyty uloženy v lipidové matrix podobně jako cihly v maltě, viz obr. 2.[31]

Obrázek 2 *Podobnost vrstev korneocytů a mezibuněčné lipidové matrix s cihlovou zdí spojenou maltou.*[28, 32]

2.2.1 Korneocyty

Korneocyty jsou zploštělé bezjaderné buňky vyplněné keratinem, obsahují též NMF a vodu.[33] Vznikají dělivou aktivitou *stratum basale* jako jaderné, metabolicky aktivní keratinocyty a během svého životního cyklu vystupují postupně výše k povrchu kůže za prodělání převratných změn ve stavbě i metabolismu, které končí řízenou apoptosou.[18, 34] Během přeměny v korneocyty ztrácí keratinocyty fosfolipidovou membránu, a ve chvíli, kdy dosahují *stratum corneum*, jejich stroma již zcela vyplňuje zesítěný keratin, obaluje jej korneocytární obálka tvořená hustou sítí keratinu a dalších proteinů, a buňky jsou mezi sebou spojeny korneodesmosomy (desmosomy s obsahem korneodesmosinu),[18] čímž je vytvořena pevná síť buněk schopná odolávat mechanickému stresu, jež tvoří prostor pro ukotvení lipidových membrán zajišťujících samotnou bariérovou funkci. Postupná degradace a rozvolňování korneodesmosomů jsou pak důležité pro fyziologickou deskvamaci nejstarších vnějších vrstev buněk.[35]



Obrázek 3 *Snímek korneocytu pořízený pomocí AFM (mikroskopie atomárních sil) doplněný o záznam výškového profilu ve vyznačené linii.*[36]

Korneocyty, jakožto terminálně diferencované keratinocyty, mají typický polygonální tvar a jsou výrazně zploštělé, v horizontální rovině mají rozměry ~40 μm, ale jejich tloušťka se pohybuje v rozmezí pouhých ~0,5-1 μm, jak ukazuje AFM snímek na obrázku 3. Buňky ležící nejčastěji v 10-20 vrstvách nad sebou tak spolu s lipidovou matrix vytváří SC, jehož tloušťka v suchém stavu se pohybuje okolo pouhých 10 μm.[36]

2.2.2 Korneocytární lipidová obálka

Jak již bylo zmíněno, fosfolipidová membrána, která dříve obalovala keratinocyty, je u jejich pozdějšího vývojového stadia korneocytů, vystřídána obalem ze zesítěných proteinů, korneocytární obálkou (CE). CE obsahuje mimo keratinu též involukrin, lorikrin a také filaggrin, jehož degradační produkty mají další důležité funkce.[23, 24] Na zbytky kyseliny glutamové proteinů CE jsou kovalentně vázány především Cer s ω-hydroxyskupinou a dále ω-hydroxy-MK.[37-39]

Tato kovalentně vázaná monovrstva se nazývá korneocytární lipidová obálka (CLE), a vzniká pravděpodobně z glukosylceramidů obsažených v lamelárních tělíscích. Jejich ω-hydroxyl je zbaven mastné kyseliny a transesterifikován na volné karboxylové skupiny proteinů CE. Po navázání na CE jsou činností β-glukocerebrosidasy zbaveny cukerného zbytku stejně jako ostatní volné glukosylceramidy, a zůstává kovalentně vázaný Cer. Ceramidasa potom z takto vázaného Cer může odštěpit sfingosinovou část a navázána zůstane už jen MK. Tato přeměna je však minoritní, k odštěpení sfingosinu dojde za fyziologických podmínek u malé části vázaných Cer, takže CLE je tvořena převážně kovalentně vázanými Cer. CLE by však mohla mít ještě jiný zdroj, a to sice obal lamelárních tělísek, který splývá s apikální membránou keratinocytů SG. Tuto domněnku podporuje skutečnost, že při onemocnění harlekýnskou ichtyosou, kdy je nefunkční transmembránový lipidový přenašeč ABCA12, a do lamelárních tělísek se proto nedostávají glukosylCer (tělíska jsou celkově takřka bez obsahu, ale tvoří se ve velkých množstvích), byla vně CE nalezena normální CLE.[25, 26, 40]

Vzniklá CLE, vrstva lipidů vázaných kovalentně na povrchu rohových buněk, pak podle všeobecně přijímané teorie slouží zřejmě jako matrice pro skládání dalších, volných mezibuněčných lipidů do lipidových lamel, ale pravděpodobně také upravuje permeabilitu rozhraní korneocyt-lipidová matrix.[24, 25, 41] Někteří autoři uvádějí též možnou roli CLE v kohezi rohových buněk.[24, 25, 42, 43] V počátečních fázích maturace korneocytů jsou vázané Cer ještě glukosylované a tedy odolné vůči ceramidasám. V těchto fázích může CLE fungovat také jako semipermeabilní vrstva propouštějící vodu, ale zadržující rozměrnější hygroskopické molekuly takzvaného přirozeného zvlhčujícího faktoru (NMF), jako jsou degradační produkty fillagrinu, uvnitř korneocytů, a mohou se tak zapojovat do udržování hydratace SC.[25, 41]

Korneocyty jsou tedy v okolní matrix usazeny nejen jako cihly v maltě, ale s pomyslnou vysoce strukturovanou maltou je propojují též kovalentní vazby.

2.2.3 Voda a NMF ve stratum corneum

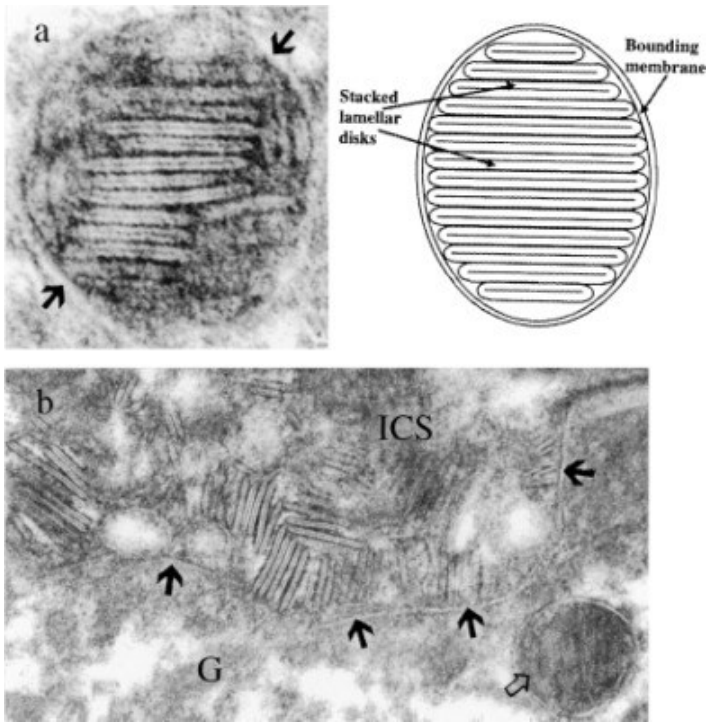
Pro vývoj a maturaci korneocytů, funkci specifických epidermálních enzymů a fyziologickou deskvamaci je klíčová přítomnost vody. Ta tvoří více než 10 %, obvykle okolo 20 %, zdravého SC.[44] Dostatečný obsah vody je zajištěn jednak nízkou propustností mezibuněčných lipidů SC, jednak skupinou látek souhrnně nazývanou přirozený zvlhčující faktor (NMF).

Tyto látky jsou především součástí stroma korneocytů, kde poutají část celkové vody SC a svými hygroskopickými vlastnostmi brání vysychání epidermis. Součástí NMF je např. glycerol vznikající degradací triglyceridů a fosfolipidů buněčných membrán keratinocytů, který je často přidáván do „hydratačních" topických formulací, dále množství aminokyselin, pyrrolidon karboxylová a urokanová kyselina vznikající proteolýzou fillagrinu v korneocytech, ale také laktát, močovina a další. Tato směs účinných humektantů tvoří přibližně 20-30 % celkového suchého podílu SC.[45] Součástí topických formulací určených k hydrataci pokožky jsou dále často různé hyaluronany, které nacházíme ve větším množství v dermis a jsou odpovědné za hydrataci hlubších vrstev kůže. Ukazuje se však, že i tyto molekuly se podílí na přirozené hydrataci SC a dalších aspektech fyziologie korneocytů.[46]

2.2.4 Lipidová matrix a bariérová funkce kůže

Lipidová matrix SC je tvořena směsí neutrálních lipidů a sfingolipidů. Obsahuje ceramidy (Cer), volné mastné kyseliny (MK) a cholesterol (Chol) v přibližně ekvimolárním množství, což představuje hmotnostně asi 45-50 % Cer, 10-15 % MK a 25 % Chol.[4, 47-49] Proporcionální zastoupení tří hlavních složek je podstatné pro bariérovou funkci a bývá změněno u poruch kožní bariéry nejrůznější etiologie.[4, 49] Zbytek tvoří estery Chol, zvláště cholesterol-sulfát (CholS), jehož klesající množství ve SC souvisí s fyziologickou deskvamací,[50, 51] a další minoritní složky např. volný sfingosin, glycerol z degradovaných triglyceridů, nebo další molekuly, jež udržují ve SC vlhkost.[45] Fosfolipidy buněčných membrán keratinocytů i fosfolipidy přítomné v lamelárních tělíscích jsou rozloženy za vzniku patřičných MK a nejsou ve zdravém SC přítomny.[48] Lipidy tvoří multilamelární struktury, o nichž máme mnoho poznatků, jejich přesné uspořádání je však stále předmětem zkoumání.

Lipidy jsou do mezibuněčných prostor SC dopravovány z nižších vrstev epidermis, kde jsou tvořeny dosud metabolicky aktivními kožními buňkami a pro transport baleny do vesikul, nazývaných lamelárními tělísky. Lamelární tělíska se oddělují pravděpodobně z Golgiho aparátu a obsahují bariérové lipidy a jejich prekurzory uspořádané do membránových disků, jak je vidět na obrázku 4 na následující straně.[39]



Obrázek 4 *Vlevo nahoře snímek pořízený pomocí elektronové mikroskopie zachycující lamelární tělísko v epidermis myši, vpravo schéma stavby lamelárního tělíska dle Landmanna (1986), dole snímek zobrazující obsah lamelárních tělísek vylévající se do mezibuněčného prostoru (ICS) na rozhraní stratum granulosum (G) a stratum corneum.*[4]

Lamelární tělíska jsou dále exocytosou vypuzena na apikální membráně příslušných keratinocytů na rozhraní granulární a rohové vrstvy (viz. obrázek 4 dole) a jejich obsah vylit do mezibuněčného prostoru, kde dochází k dalším metabolickým přeměnám. Výsledné produkty, tedy především Cer, MK a Chol, se uspořádávají do několikavrstevných lamel a začínají plnit svou hlavní funkci, totiž zajišťování bariéry pro volný prostup vody zevnitř a nežádoucích agens (mikroorganismů, UV záření, cizorodých látek) zvenčí. Tvorba a udržování této bariéry se považuje za hlavní funkci SC.[4] Disponují jí až na výjimky všichni suchozemští savci, přičemž někteří výjimeční tvorové jako rypoši lysí (obr. 5), jsou schopni ji využívat jen v určitých obdobích, kdy ji potřebují.[52]

Obrázek 5 *Rypoš lysý (Heterocephalus glaber). Rypoši představují extenzivně zkoumaný živočišný druh, a to nejen pro výjimečné vlastnosti své kožní bariéry.*[52]

My, lidé, však bez kožní bariéry nejsme života na souši schopni. Bariéra tvořená SC je vskutku podmínkou života savců na souši, neboť brání ztrátě vody z vnitřního prostředí organismu, a tedy dehydrataci relativně nezávisle na humiditě vnějšího prostředí.[4] Její důležitost se dá dokladovat fatalitou jejích poruch.[53-56]

2.2.5 Skladba lipidové matrix stratum corneum

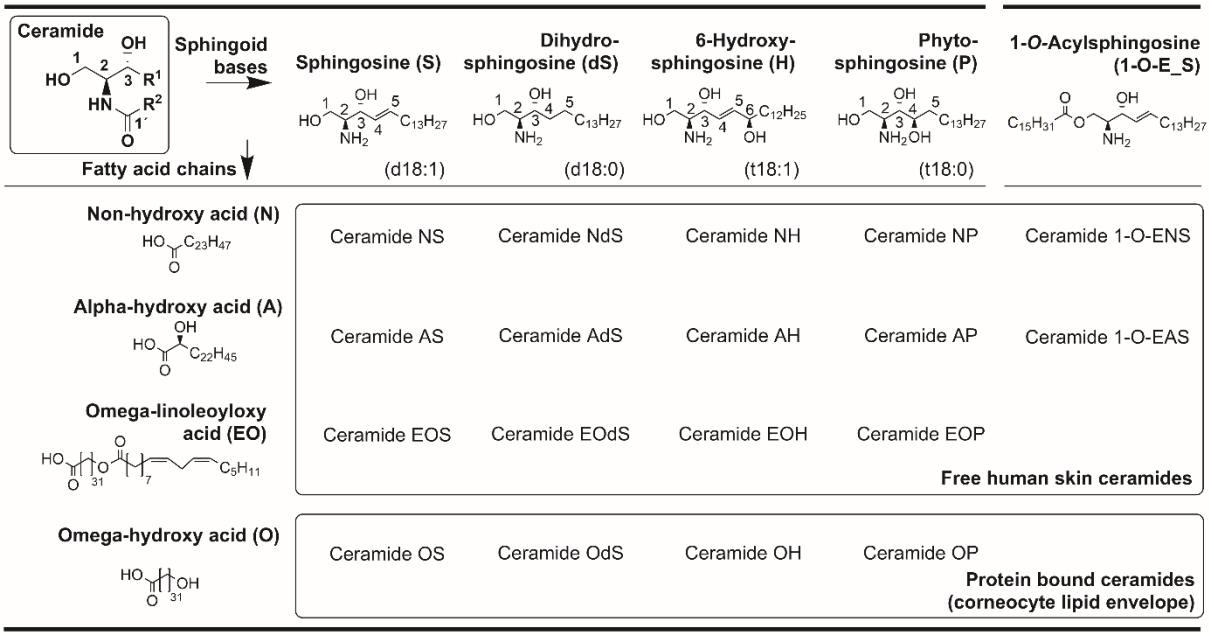
2.2.5.1 Ceramidy

Ceramidy jsou nejpočetnější třídou rodiny sfingolipidů. Nalezneme je ve většině, ne-li všech buňkách lidského těla, kde plní široké spektrum funkcí, často jako součásti signálních drah. Ve SC jsou přítomny v neobvykle vysokém množství, tvoří kolem 50 % hmotnosti lipidické složky[56, 57] a najdeme zde i širokou škálu jejich podtypů, z nichž některé se zdají být specifické pouze pro SC.[58] Zároveň se jim přikládá největší důležitost pro tvorbu funkční bariéry, jsou nezbytné pro specifické lamelární uspořádání lipidů SC.[56, 59]

Po chemické stránce jsou Cer amidy aminoalkoholu (sfingoidní base) a mastné kyseliny. Podobně jako známější fosfolipidy mají i Cer amfifilní strukturu. Hydrofilní hlavu Cer tvoří amidová vazba mezi sfingoidní basí a karboxylem MK a také hydroxylové skupiny sfingoidní base. Hydrofobní část je pak tvořena uhlíkatým řetězcem sfingoidní base a druhým uhlíkatým řetězcem přináležejícím MK. V Cer najdeme nejčastěji vázané MK s délkou řetězce 16 až 38 C. ω-hydroxyceramidy mají na distálním konci řetězce MK ještě hydroxyl, který může být esterifikován další MK za vzniku ultradlouhých ω–acylceramidů.[37, 56]

2.2.5.1.1 Diverzita ceramidů

Cer se dělí podle uspořádání hydrofilní hlavy a podle délky acylových řetězců. Dosud bylo v lidském SC identifikováno minimálně 19 typů volných Cer, což v kombinaci s různými možnými délkami řetězců implikuje více než tisíc konkrétních struktur,[37, 60] ale ani tento počet pravděpodobně nebude konečný. Nejdéle známé jsou Cer vznikající kombinací čtyř základních sfingoidních basí s různě substituovanými MK (tři typy substituce), které se tradičně pojmenovávají kombinací písmene značícího konkrétní basi a písmene či písmen značících typ substituce MK (viz obr. 6) na základě názvosloví poprvé publikovaného Mottou et al. 1993.[61]



Obrázek 6 *Přehled sfingoidních basí, a druhů substituce MK, které se podílí na tvorbě nejzastoupenějších typů ceramidů.*[65]

Nejvyšší zastoupení ze čtyř sfingoidních basí má mononenasycený sfingosin (S, C18:1) s dvojnou vazbou v poloze 4, jeho nasyceným derivátem je dihydrosfingosin (sfinganin, dS, C18:0). S těmito dvěma sfingoidními basemi se setkáme i v jiných tkáních člověka a dalších eukaryot např. součást myelinu jako glukosylované Cer, cerebrosidy či gangliosidy.[62, 63] Pro SC člověka jsou specifické hydroxylované sfingoidní base fytosfingosin (P, C18:0) a především 6-hydroxysfingosin (H, C18:1).[58, 61] Skupina těchto čtyř sfingoidních basí SC byla v posledních letech rozšířena o dihydroxysfinganin (T) identifikovaný v lidském SC. Přesná poloha jeho dvou hydroxylů zatím nebyla potvrzena.[60]

Řetězec MK v Cer může být buď nesubstituovaný (N), α-hydroxylovaný (A) nebo ω-hydroxylovaný (O).[61] α-hydroxykyseliny bývají zpravidla 16-26uhlíkaté, zatímco ω-hydroxykyseliny mívají ultradlouhé 28-38uhlíkaté řetězce. Jejich koncová hydroxylová

skupina je většinou dále esterifikována. U volných Cer je tak ultradlouhý řetězec prodloužen ještě o kyselinu linolovou (EO). Jsou to právě ω-hydroxyceramidy, jež jsou vázány koncovým hydroxylem se zbytkem kyseliny glutamové z proteinů korneocytární obálky a tvoří CLE, korneocytární lipidovou obálku.[25, 37, 41] Relativní novinkou jsou 1-O-acylceramidy, u nichž je na hydroxyl v poloze 1 sfingosinu vázána další MK. Jsou to tedy Cer se třemi uhlíkatými řetězci vystupujícími z jedné polární hlavy. Zatím byly identifikovány v myším a lidském SC.[64]

2.2.5.2 Mastné kyseliny

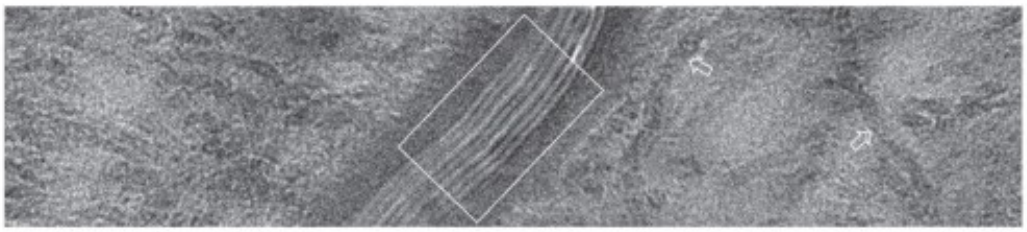
Volné mastné kyseliny jsou ve SC zastoupeny jak nasycenými, tak nenasycenými zástupci se sudým i lichým počtem uhlíků a s délkou řetězce obvykle mezi 14 a 32 C.[56, 65-67] Převažují ale nasycené MK s více než 20 C a největší podíl připadá na dlouhé nasycené MK behenovou (C22:0) a lignocerovou (C24:0). Nenasycené MK ve SC mají vždy sudý počet uhlíků a byli zde nalezeni mono i polynenasycení zástupci, ponejvíce kyselina olejová (C18:1) a linolová (C18:2), v malém množství byly nalezeny i kyseliny s hydroxylovou skupinou.[66, 67] Esenciální nenasycené MK SC jako kys. linolová a arachidonová pocházejí z potravních zdrojů. Jsou zachycovány přednostně ze systémové cirkulace a ve SC koncentrovány. Jejich případný nedostatek vede ke komplexním poruchám kožní bariéry.[55, 68, 69] Zdá se, že některé MK včetně esenciálních mohou být do SC běžně inkorporovány také zvenčí, z produkce mazových žláz jejíž jsou součástí.[66, 70] To koresponduje s pozorováním vyšší koncentrace MK a nenasycených MK s kratším řetězcem ve svrchnějších vrstvách SC.[71, 72]

MK se kromě podílu na tvorbě kožní bariéry účastní i okyselování SC. Udržování kyselého prostředí je potřebné pro činnost mnoha enzymů zapojených do metabolismu kožních lipidů, např. β-glukocerebrosidas, které uvolňují hotové Cer z jejich transportní formy. Důležitost této funkce si můžeme demonstrovat např. u novorozenců či novorozených myší, kde je hodnota pH SC blízká neutrální. To se projeví pomalejší obnovou kožní bariéry při jejím narušení. Schází totiž vhodné acidobazické prostředí potřebné pro pohotové zvýšení aktivity příslušných enzymů a urychlené doplnění Cer ze zásobních forem, jak ho známe u dospělých.[73-75] Kyselost je důležitá i při vývoji kožní bariéry a MK se v nižších vrstvách, kde jsou ještě viabilní buňky, podílejí na buněčné signalizaci a pomáhají tak udržovat homeostázu pokožky.[76, 77]

2.2.5.3 Cholesterol

Jako jedna ze tří převažujících složek lipidové matrix se volný Chol spolu s Cer a MK podílí na tvorbě bariéry proti transepidermálním ztrátám vody z organismu i proti průniku škodlivin z vnějšího prostředí. Spolu s Cer a MK je obsažen v lipidových lamelách s periodickou mezirovinnou vzdáleností, takzvaných lamelárních fázích.[78, 79]

Podle starších prací je nezbytnou složkou pro správné uspořádání lipidových lamel a tvorbu funkční kožní bariéry.[2, 49, 79, 80] Prací, které by se systematicky zabývaly jeho vlivem na detailnější organizaci lipidů SC, však není mnoho, navíc jsou obvykle založeny na studiu jednoduchých modelů.[81] Experimenty na modelech lipidové matrix SC donedávna naznačovaly, že přítomnost Chol je nutnou podmínkou tvorby obou známých lamelárních fází, krátké SPP i dlouhé LPP, jež jsou zároveň pokládány za podmínku dobré bariérové funkce SC. SPP ani LPP nevznikaly ve směsi prasečích ani lidských Cer bez přítomnosti Chol. Obě fáze se pak tvořily při poměru obsahu Chol, Cer a MK vyšším než 0,2:1:1.[82, 83] Podobných výsledků bylo dosaženo při studiu membrán tvořených uměle připravenými Cer, které tvořily buď pouze SPP nebo LPP.[79] Další experimenty s komplexnějším modelem, membránami na bázi purifikované frakce Cer lidského SC (hCer), však nepotvrdily nutnost Chol pro tvorbu LPP, přičemž tato lamelární fáze vznikala i ve vzorku samotných hCer.[3]



Obrázek 7 *Snímek pořízený pomocí kryo-TEM (transmisní elektronové mikroskopie) zachycující lipidové lamely mezi dvěma korneocyty SC (bílý obdélník, periodické proužky s rozdílnou elektronovou hustotou). Šipky ukazují na keratinová intermediární filamenta rozvolněná v důsledku zvýšené hydratace.*[84]

Detailněji byla studována i pozice Chol v rámci LPP. Autoři vycházeli z předchozího modelu LPP složené ze tří vrstev,[85] a studiem deuterovaných lipidů v modelových membránách tvořících LPP došli ke zjištění, že Chol je přítomen ve dvou vnějších vrstvách tvořících LPP, přičemž jeho hydroxyl tvoří vodíkový můstek s esterovou skupinou přítomného acylceramidu.[2] Práce kombinující kryo-TEM lamel SC (viz obr. 7) a molekulové modelování potom předkládá

model SC, podle něhož jsou Cer v rámci lamel v plně otevřené konformaci a Chol je v této modelové struktuře soustředěn v oblasti sfingosinových částí molekul Cer.[84]

Dále byl popsán vliv Chol na denzitu uspořádání lipidů SC. Obsah Chol zvyšuje podíl ortorhombického uspořádání lipidů, které umožňuje jejich těsnější přiblížení a tvorbu nepropustnější bariéry.[79] Chol svou přítomností v lipidových membránách přispívá také k jejich přiměřené fluiditě, zlepšuje mísitelnost ostatních kožních lipidů a tím pružnost SC.[2, 79]

Volný Chol tvoří cca 25 % hmotnostního podílu lipidů SC. S dalšími dvěma majoritními složkami, Cer a FFA, je v přibližném molárním poměru 1:1:1. Podle některých studií je toto množství ve směsi lipidů nadbytečné. Část Chol se s lipidy v lamelách plně nemísí a tvoří separované domény, a to již při polovičním než fyziologickém molárním množství.[2, 79] Dle měření na modelových membránách na bázi hCer tvoří mezi 40 a 60 % fyziologického množství Chol separované domény,[3] a to je ve shodě s publikovanými zjištěními, že méně než polovina Chol je ve SC zapojena do tvorby smíšených lipidových lamel.[2, 79] Příčina tohoto jevu ani role samostatných Chol domén není dosud známá.

Chol najdeme ve SC nejen volný, ale i vázaný ve formě esterů organických a anorganických kyselin. Nejvíce zastoupeným esterem Chol ve SC je cholesterol-sulfát (CholS), jehož obsah graduje od 1 % v nejnižších vrstvách epidermis po 5 % ve SG, poté klesá a na povrchu SC tvoří opět 1 %.[71] Podle všeobecně přijímaného předpokladu snižování obsahu CholS ve SC směrem k povrchu souvisí s jeho hlavní funkcí – zajišťováním soudržnosti korneocytů v hlubších vrstvách SC a regulací deskvamace, tedy postupného odlupování horních vrstev pokožky. Předpokládá se též jeho podíl na regulaci diferenciace keratinocytů.[50, 51] Studie na modelech lipidové složky lidského SC naznačují, že obsah CholS také snižuje separaci Chol do samostatných domén.[82] CholS vzniká z volného Chol v hlubších vrstvách epidermis aktivitou sulfotransferasy (SULT2B1b). Může být také převeden zpět na Chol cholesterolsulfatasou. Při onemocnění recesivní X-vázanou ichtyosou cholesterolsulfatasa nejen v horních vrstvách epidermis chybí, což vede k poruše deskvamace a může způsobit závažnou dysfunkci kůže.[50]

2.3 Mikrostruktura lipidové matrix *stratum corneum*

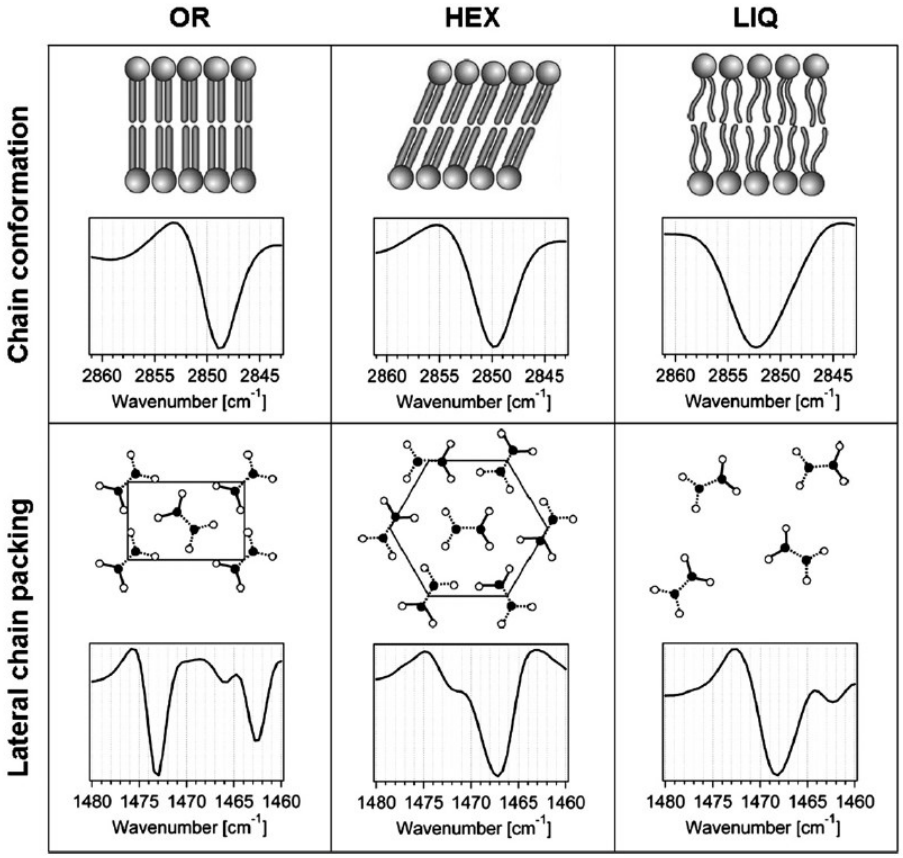
SC se vyznačuje složitou strukturou, kterou přes nepatrnou tloušťku SC stále přesně neznáme. Z dosavadních poznatků však plyne, že je podstatná pro bariérovou funkci kůže a nejrůznější poruchy vedoucí k jejím změnám mají pro organismus závažné následky. Mikrostruktura lipidové matrix SC představuje stále otevřené pole studia.[86]

2.3.1 Lamelární uspořádání

Stran lipidových lamel SC byly popsány fáze s krátkou periodicitou (SPP) s mezirovinnou vzdáleností okolo 6 nm, kterou tvoří společně Cer, MK i Chol, a fáze s dlouhou periodicitou (LPP). Na tvorbě LPP se pak významně podílejí ultradlouhé ω-esterifikované ceramidy. Tato fáze je charakteristická mezirovinnou vzdáleností okolo 13 nm a je pokládána za nezbytnou pro optimální bariérovou funkci kůže.[87, 88] V nepřítomnosti LPP (způsobeno např. vlivem nedostatku patřičných Cer při některých chorobách) je podle poznatků získaných na modelech propustnost kožní bariéry zvýšená.[89] Kromě zmíněných dvou fází tvořených směsí lipidů byla ve SC popsána i fáze separovaného Chol s mezirovinnou vzdáleností přibližně 3,4 nm[79, 90, 91], jejíž původ ani funkce v kožní bariéře nejsou dosud uspokojivě vysvětleny. Proto se středem zájmu předkládané práce stalo právě ovlivnění této složky lipidové matrix.

2.3.2 Laterální uspořádání

Řetězce lipidů v lamelách jsou zároveň uspořádány do struktur s odlišnou těsností a z ní vyplývající pohyblivostí, což popisujeme jako laterální uspořádání. Za fyziologických podmínek a při obvyklé teplotě kožního povrchu cca 32 °C zaujímá větší část lipidů ortorhombické (kosočtverečné) uspořádání, které je pevné, brání volnému pohybu řetězců, řetězce jsou rigidní, *all-trans* konformované a tvoří pevnou bariéru. Menší část lipidů potom nalezneme ve volnějším hexagonálním uspořádání (též gelová fáze) kdy je umožněn omezený pohyb řetězců a zvýšení podílu méně uspořádaných *gauche*-konformerů. Mezi lipidy SC nejméně zastoupená je kapalně-krystalická fáze umožňující největší míru rotace a pohybu řetězců.[92] Některé modely SC uvažují výskyt ortorhombického a hexagonálního uspořádání v rámci jedné molekuly, kdy distální část řetězců dál od polární hlavy vykazuje pohyblivější gelové chování, zatímco polární hlavy spolu s proximální částí řetězců jsou uspořádány rigidně.[93] Intramolekulární výskyt volnějšího a rigidnějšího uspořádání byl zaznamenán v molekule ceramidu EOS.[94] Přehled konformačního chování lipidových řetězců a známých možností jejich laterálního uspořádání v rámci lamel spolu s odpovídajícími IR vibracemi podává shrnutí na následující straně (obr. 8).



Obrázek 8 *Přehled molekulární organizace lipidů a jejího studia pomocí IR. Možnosti konformačního uspořádání lipidových řetězců a odpovídající odezva symetrické valenční vibrace metylenové skupiny v IR spektrech (horní část), možnosti laterálního uspořádání s odpovídajícími signály v oblasti nůžkové vibrace téže skupiny (spodní část). OR-ortorhombická, HEX-hexagonální, LIQ-kapalně-krystalická fáze.*[92]

2.3.3 Studium mikrostruktury SC

Ke studiu mikrostruktury SC se využívá mnoha, především spektroskopických a mikroskopických, metod. Elektronová mikroskopie, která provází debatu o lamelárním uspořádání lipidové matrix SC od počátku, dovoluje zobrazit lamely tvořené lipidy, CLE, desmosomy spojující jednotlivé keratinocyty etc.[84, 95] Kromě konvenční světelné mikroskopie, jež je značně limitována, co se týče rozměrů zobrazitelných struktur SC, se hojně využívá mikroskopie fluorescenční. Fluorescenční mikroskopie vyžaduje zanesení fluoroforu do zkoumaného vzorku. Může posloužit ke zobrazení průchodu značené látky skrze kožní bariéru, využití však nalézá spíše při studiu modelů kožní bariéry s obsahem značených molekul a rekonstruovaných modelů epidermis.[96, 97] Vibrace v infračervené oblasti poskytují informace o konformaci a intramolekulárním uspořádání dlouhých uhlovodíkových řetězců lipidů, jejich intermolekulárním uspořádání i o proteinech keratinocytů. Spektroskopie v této oblasti má při studiu kožní bariéry široké využití, dovoluje také sledovat fázové přechody.[36, 92]

V případě komplementární Ramanovy spektroskopie je dokonce možné studovat SC *in vivo*.[98] Rentgenová difrakční analýza umožňuje studovat uspořádání na dlouhou vzdálenost, v případě SC tedy vzdálenosti strukturních rovin, především lipidových lamel. Může však poskytnout i informace o laterálním uspořádání lipidových řetězců a s její pomocí je také možné zkoumat uspořádání proteinů keratinocytů.[89] Neutronová difrakční analýza má podobné využití jako rentgenová difrakce, navíc rozlišuje izotopy prvků tvořících lipidové řetězce a poskytuje tak vhled do struktury modelů SC při využití deuterovaných molekul.[2] Kalorimetrické metody pak umožňují zaznamenat energetické změny související se změnami mikrostruktury.[99] SC je také možné analyzovat pomocí nukleární magnetické rezonance na pevné fázi.[94] Ani tento výčet metod studia mikrostruktury SC však ještě není, samozřejmě, úplný.

2.3.4 Teoretické modely kožní bariéry

Během let byly předloženy různé modely předpokládaného uspořádání lipidů SC s ohledem na poznatky o lamelárních fázích získané pomocí XRD studia převážně modelových membrán i na další informace o složení uspořádání lipidů SC a o chování SC. Brick and mortar model, tedy model cihel a malty jmenovaný výše patří dosud k nejzmiňovanějším, a svou střízlivostí poskytuje jednoduchý vstup k prvotnímu myšlenkovému obrazu stavby celého SC.[31] Další modely poskytovaly propracovanější pohled na stavbu samotné lipidové matrix. V roce 1994 byl Forslindem předložen mozaikový model, který počítal s přítomností gelové a kapalně-krystalické lipidové fáze zároveň.[100] Kapalně-krystalická složka by přitom nebyla kontinuální ve směru kolmém k povrchu SC, což by znamenalo zachování nutnosti pro případný permeant projít při průchodu SC krystalickou fází. Bariéra by tedy nebyla omezena zvýšenou propustností volněji uspořádané fáze, ale kapalná fáze by vysvětlila pružnost lipidové matrix. Sendvičový model předložený Bowstrou a kol. se Forslindovu podobá.[101] Počítá s mozaikou pevněji uspořádaných lipidových domén obklopených kapalně krystalickou fází, do níž volně přechází. Autoři předpokládali (a později předpoklad rozvíjeli) odlišné složení obou fází, jistou separaci různých lipidů, přičemž tekuté fázi přisuzovali pravděpodobný vyšší obsah Chol, případně kratších MK v kontaktu s linoleátem ultradlouhých Cer, jejichž zbývající část by již byla součástí gelové fáze.[78, 102] Brzy nato přibyl Norlénův model spojité gelové fáze, který oproti předchozím předpokládá naopak vysokou homogenitu uspořádání bez tvorby jakýchkoli separovaných domén. Koherentní gelovou fázi označuje za nejodolnější a validitu modelu podkládá mimo jiné informacemi o fázových přechodech, které v SC nejsou příliš ostré, a to může být dáno právě nahodilým vcelku homogenním uspořádáním velmi heterogenní lipidové matrix.[93]

3. Poznámky k použitým metodám

3.1 Model kožní bariéry - *ex vivo* SC

Modely kožní bariéry umožňují zkoumat její vlastnosti v systému omezených proměnných, kde je snazší spojovat experimentální výsledky v určité souvislosti. V praxi jsou k takovému studiu využívány kožní modely různého stupně komplexnosti od uměle vytvořených membrán složených z rozličných směsí lipidů až po in vitro kultivovanou epidermis. V předkládané práci bylo pro ověření výsledků získaných v experimentech na lipidových membránách použito *ex vivo* lidské *stratum corneum* (SC) jakožto model vyšší, avšak komplementární, jelikož je i přes jeho křehkost možné pozměnit složení jeho lipidové složky (a sledovat vliv takového zásahu na jeho propustnost). V této práci byl ze SC částečně extrahován Chol. Experimenty tedy byly prováděny na SC *ex vivo* s modifikovanými vlastnostmi jakožto modelu kožní bariéry.

3.2 Měření bariérových vlastností kůže (permeabilitní experimenty)

Bariérové vlastnosti kůže lze zkoumat mnoha metodami. Mezi nimi patří ke klíčovým měření permeability během permeabilitních experimentů, jejichž cílem je zjistit, do jaké míry je daná membrána, v případě předkládané práce různě modifikované izolované lidské SC, propustná pro nejrůznější modelové permeanty.[90, 103]

3.2.1 Propustnost pro vodu (TEWL)

Zkratka TEWL z anglického trans-epidermal water loss značí ztrátu vody přes epidermis. Obecně je tato zkratka používána také pro měření ztráty vody přes kůži nebo modelové membrány. Jedná se o metodu měření množství vody prošlého přes plochu membrány za jednotku času. Výslednou hodnotou je flux vody přes membránu. Vztáhneme-li jej na lidské tělo, potom je to charakteristika úniku vody směrem zevnitř ven, tedy právě ten pohyb vody, který funkční kožní bariéra značně limituje. Čím je tedy hodnota TEWL nižší, tím lepší bariéru vůči prostupu vody daným směrem membrána představuje. Při narušení kožní bariéry ztráta vody z těla, a tedy i hodnota TEWL, stoupá.[11]

Měření je možné provádět pomocí přístrojů několika principů uspořádání. V předkládané práci použitý přístroj (AquaFlux AF (Biox Systems Ltd, VB) funguje na principu kryokondenzační komůrky. Voda prošlá přes membránu je nad ní zachycena na podchlazeném povrchu čidla, které její množství stanovuje monitorováním hmotnosti příbytku ledu během měření

3.2.2 Propustnost pro nabité částice (elektrická impedance)

Elektrická impedance (EI) je elektrochemická veličina charakterizující odpor materiálu vůči průchodu střídavého proudu. Bylo zjištěno, že její hodnota negativně koreluje s permeabilitou kožní bariéry.[104] Při studiu propustnosti kožní bariéry a jejích modelů lze EI využít k charakterizaci propustnosti pro nabité částice.

3.2.3 Propustnost pro modelové látky

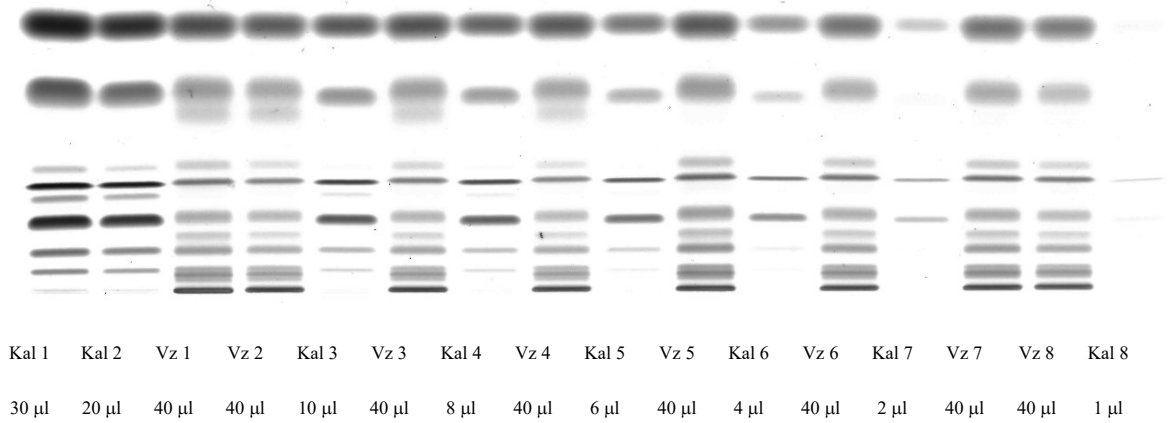
Testování propustnosti pro modelové látky patří k nejužívanějším metodám experimentálního studia kožní bariéry. Kožní bariéra totiž představuje hlavní překážku při formulaci transdermálních lékových forem, které umožňují výhodný způsob podání léčiv zvláště v případech, kdy jiné cesty podání nejsou možné. Bylo vynaloženo mnoho úsilí k matematicko-fyzikálnímu popisu zákonitostí průchodu látek charakteru léčiv skrze bariéru představovanou především SC, přičemž se jako vhodný přístup ukázalo zohlednění velikosti molekuly permeantu a jeho lipofilita.[105] Experimentální zjištění permeability však zůstává nenahraditelným. Látky mohou kožní bariéru překonávat v základu dvěma cestami, a to buď skrze póry, nebo přes lipidové a buněčné struktury SC, kde je limitující schopnost látky projít právě přes mezibuněčné lamely lipidové matrix[11, 105] Při studiu bariérových vlastností kůže a jejích modelů je výhodné testovat permeabilitu pro více modelových látek, které mají odlišný potenciál interagovat s různými složkami bariéry (hydrofilními korneocyty, lipidovou matrix). Proto byly i ve zvolené práci ke studiu permeability použity dvě modelové látky odlišných vlastností, theofylin (TH, menší molekula, vyvážené hydrofilně-lipofilní vlastnosti) a indomethacin (IND, větší molekula, vyšší lipofilita).

3.3 Studium složení lipidové matrix (HPTLC)

Složení lipidové matrix kožní bariéry je studováno po mnoho dekád a až do současnosti se v popředí drží metody chromatografické, avšak v dnešní době již spojené i s detekcí vysoce sofistikovanými metodami jako je hmotnostní spektrometrie (MS).[60] V předkládané práci bylo lipidové složení kontrolních membrán (SC) i membrán se sníženým obsahem Chol (dSC) studováno pomocí vysokoúčinné chromatografie na tenké vrstvě (high-performance thin layer chromatography, HPTLC).

HPTLC umožňuje rozdělit lipidy SC na základě jejich afinity ke stacionární a mobilní fázi podobně jako konvenční chromatografie na tenké vrstvě. Od té se však odlišuje precizností a citlivostí, díky níž je možné při zvolení vhodné metodiky na jedné chromatografické desce oddělit Chol, MK, ale i jednotlivé druhy Cer. Detekce je denzitometrická, kvantifikace

se provádí za pomoci vnějších standardů. Ukázka vyvinuté desky s vizualizovanými rozdělenými lipidy viz obr. 9.



Obrázek 9 *Příklad nanesení vzorků (Vz 1-8) a kalibrace (Kal 1-8) na chromatografickou desku a rozdělené lipidy jednotlivých nanášek po vyvinutí a vizualizaci.*

3.4 Studium mikrostruktury *stratum corneum*

3.4.1 Infračervená spektroskopie

Pomocí infračervené spektroskopie (IR) bylo studováno laterální uspořádání lipidů SC. V této práci bylo využito techniky ATR-FTIR což je technika zeslabeného úplného odrazu (ATR, attenuated total reflectance) infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Paprsek prochází jedno (v našem případě) či víceodrazovým ATR krystalem na který je umístěn měřený vzorek. Výhodou tohoto uspořádání je, že vzorek je možné měřit bez větších úprav a hydratovaný, tedy v co možná přirozených podmínkách.

Sledovali jsme především pás symetrické valenční vibrace methylenové skupiny. Fyziologicky se hodnoty maxim absorpčních pásů této vibrace nacházejí v oblasti vlnočtu 2847-2849 cm^{-1}, což značí *all-trans* konformaci dlouhých řetězců membránových lipidů, která umožňuje těsnější uspořádání těchto lipidů v rámci lamel a odpovídá ortorhombické či hexagonální fázi.[36] Posun k vyšším hodnotám vlnočtu se pak považuje za indikátor nárůstu podílu méně uspořádaných *gauche*-konformerů lipidových řetězců a posun k volnějšímu uspořádání lipidů, vedoucímu až v postupný rozvrat mikrostruktury membrány spolu se zhoršením až ztrátou její bariérové funkce.[89]

3.4.2 Rentgenová difrakční analýza (XRD)

Lamelární uspořádání lipidů SC bylo studováno pomocí rentgenové práškové difrakce. Byla využita technika SAXRD (angl. small angle X-ray diffraction), rentgenová difrakce využívající nízké úhly dopadu rentgenového záření. Metoda umožňuje zkoumat, na základě vyhodnocení mezirovinných vzdáleností, struktury s pravidelným uspořádáním např. lipidové lamelární fáze, podle Braggova zákona

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad ,$$

kde n je řád difrakce (kladný celočíselný násobek vlnové délky), λ vlnová délka dopadajícího záření, θ úhel dopadu tohoto záření na strukturní rovinu a d je mezirovinná vzdálenost, charakterizující např. šířku lipidové lamely. [89]

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie a materiál

Gentamicin-sulfát (z Micromonospora purpurea, 700 U/mg), trypsin (z vepřového pankreatu, ~1500 U/mg), cholesterol (Chol, z lanolinu, 99%), kys. palmitová (99%), kys. lignocerová (LIG, 96%), theofylin (TH, 99%), indomethacin (IND, 99%), propylenglykol (PG, 99,5%), methyl-β-cyclodextrin (MβCD, průměrná Mn 1310), hydroxypropyl-β-CD (HPβCD, průměrná Mn 1380), další chemikálie k přípravě pufrů a rozpouštědla HPLC stupně čistoty byly zakoupeny od Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (Schnelldorf, Německo).

Superčistá voda byla připravena s využitím systému Millipore Q purification.

Membránové filtry s velikostí pórů 0,45 μm (Magna Nylon filters) byly zakoupeny od GVS Life Sciences (Maine, USA), HPTLC chromatografické desky (silica gel 60, 20x10 cm) dodala firma Merck (Darmstadt, Německo)

Standardy pro HPTLC: CerNS AS, NP, AP (99%) byl získán od Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA), CerEOS a EOP připravili kolegové z Katedry organické a bioorganické chemie FaF UK.[106]

4.2 Ex vivo SC, získání a zpracování

Kůže byla s informovaným souhlasem získána od zdravých dárců, kteří podstupovali plastickou operaci. Její použití bylo schváleno etickou komisí chirurgické kliniky Sanus (4/6/2015) a probíhalo v souladu s principy Helsinské deklarace. Jednalo se o kůži z oblasti břicha nebo prsou. Po excizi byla kůže mechanicky pomocí skalpelu zbavena podkožního tuku a do doby experimentu skladována v plastovém obalu při - 20 °C. Před experimentem byla takto připravená kůže vždy ponechána při laboratorní teplotě do rozmrznutí, následoval proces oddělení SC od hlubších kožních vrstev.

SC bylo pro všechny experimenty odděleno již dříve popsaným postupem.[107] Rozmrazené čtverce kůže o rozměru cca 4x4 cm byly na 90 s ponořeny do destilované vody o teplotě 60 °C, poté byla pomocí pinzet opatrně stažena epidermis. Oddělená epidermis byla dále zpracována. K rozrušení jejích nižších vrstev a získání SC byl použit proteolytický enzym trypsin, s jehož roztokem v PBS (cca 0,1%) byla epidermis inkubována 12 h při 32 °C. Získané SC bylo následně opláchnuto PBS, mechanicky zbaveno případných zbytků zlyzované epidermální tkáně, opláchnuto krátce acetonem k odstranění povrchových lipidů a případných nečistot, následoval závěrečný oplach PBS.

V části pokusů bylo využito stripování SC s cílem odstranit část jeho povrchové vrstvy, takzvaného *stratum corneum disjunctum* Kůže byla po rozmrazení stripována opakovaným nalepením a stržením lepicí pásky. Poté byla provedena výše popsaná separace SC stejným způsobem jako u kůže nestripované. Stripování samotného SC by nebylo pro jeho křehkost proveditelné.

Získané SC bylo dále zpracováno v závislosti na typu dalšího studia. V počátečních experimentech sloužilo vždy čerstvě izolované SC k testování vlivu různých extrakcí a stripování na jeho lipidové složení, jak je popsáno v kapitole 4.3. V rámci experimentu se SC upraveným vybranou extrakcí pak byla provedena extrakce lipidové složky SC pro analýzu lipidů pomocí HPTLC. Po extrakci finální metodou většina SC posloužila k provedení permeabilitních experimentů, sloužících ke zjištění vlivu částečné extrakce Chol na propustnost této jinak velmi nepropustné tkáně, několik vzorků bylo připraveno pro měření rentgenové difrakce v oblasti malých úhlů (SAXRD), další pro studium uspořádanosti pomocí infračervené spektroskopie (IR).

Ve všech pokusech posloužilo za kontrolu souběžně připravené SC, do jehož lipidového složení nebylo zasaženo.

4.3 Hledání metody selektivní parciální extrakce cholesterolu ze SC

4.3.1 Extrakce pomocí 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu

V prvním pokusu byl k extrakci použit vodný roztok 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu (HPβCD), který podle Legendre et al.[108] selektivně extrahoval Chol z potkaního SC. Experiment sloužil jako pilotní zkouška pro adaptaci publikovaných výsledků pro naše potřeby.

Z izolovaného SC byly pomocí kruhové raznice vyseknuty kousky o ploše ~ 2 cm^2, 4 ks kontrolní a 3 ks pro každý extrakční čas (2, 6, 12, 24 h), vloženy do předvážených skleněných vialek o objemu cca 8 ml, vysušeny v exsikátoru nad P_2O_5, a suché přesně zváženy.

Vysušené fragmenty SC v 8 ml vialkách byly zality 2 ml čerstvě připraveného vodného roztoku HPβCD (100 mg/ml), a ponechány při 4 °C po dobu 2, 6, 12 nebo 24 h. Kontrolní vzorky byly bez extrakce rovnou zpracovány dál. Po uplynutí doby extrakce bylo SC vytaženo z roztoku CD, opláchnuto vodou, umístěno do předvážené 4 ml vialky, vysušeno v exsikátoru a suché přesně zváženo.

Ze SC po extrakci HPβCD a SC kontrolního byl dále popsaným způsobem (viz kapitola 4.4) získán lipidový podíl a obsah lipidů analyzován pomocí HPTLC.

Vzhledem k nedostatečné selektivitě extrakce HPβCD jsme byli nuceni hledat jinou metodu extrakce.

4.3.2 Jednoduchá zkouška rozpustností

Tento jednoduchý experiment posloužil ke srovnání rozpustnosti Chol a MK v roztocích dvou odlišných cyklodextrinů (MβCD a HPβCD) a následnému rozhodnutí, který z těchto jmenovaných bude použit pro další extrakce SC.

Oba CD byly rozpuštěny v H_2O na koncentraci 100 mg/ml. Byl použit Chol a kyseliny palmitová a lignocerová, reprezentativní MK, které patří v lidském SC k nejzastoupenějším.[64-66] Do vialky bylo naváženo buď 2 mg Chol nebo 1 mg k. palmitové a 1 mg k. lignocerové. K rozpouštěným látkám se po 100 µl přidával roztok jednoho nebo druhého CD do vytvoření čirého roztoku.

Na základě výsledků tohoto experimentu jsme k další extrakci SC použili MβCD.

4.3.3 Extrakce pomocí methyl-β-cyklodextrinu

Z vyizolovaného SC byly stejně jako u extrakcí HPβCD připraveny kruhové výseky o ploše přibližně 2 cm^2, po 3 vzorcích pro každý extrakční čas a 4 kontroly.

Vzorky byly v Petriho miskách s roztokem MβCD ve vodě (100 mg/ml) zatíženy gázou, aby byly ponořeny, a takto byly inkubovány při teplotě 4 °C po zvolenou dobu. Byly zvoleny celkem 4 extrakční časy a to 6, 12, 24 a 48 hodin. Po daných časových intervalech byly vzorky SC vyňaty z extrakční lázně, opláchnuty vodou a stejně jako kontroly vysušeny a přesně zváženy. Kontrolní vzorky extrahovány nebyly.

Popsanou metodou (kapitola 4.4) byla získána lipidová složka ze vzorků SC po extrakci MβCD stejně jako ze vzorků kontrolních. Zbytky SC po extrakci lipidů byly opět vysušeny a přesně zváženy, vysušené a přesně zvážené lipidy byly analyzovány pomocí HPTLC. Z hmotností SC před a po extrakci lipidové složky a hmotnosti vyextrahovaných lipidů byla zjišťována návratnost extrakce.

Na podkladě tohoto experimentu byla jako finální metoda ke snížení obsahu Chol ve SC zvolena extrakce MβCD po dobu 24 h.

4.3.4. Extrakce pomocí propylenglykolu

Extrakce PG sloužila k ověření, zda samotný PG během 24h permeace nevymývá ze zkoušeného SC Chol.

Zkoumané vzorky byly extrahovány na Petriho miskách v čerstvě připraveném roztoku 60% PG. Vzorky SC mají běžně tendenci držet se na hladině vodných roztoků, proto byly (stejně jako při extrakcích SC cyklodextriny) zatíženy gázou, aby byla zajištěna rovnoměrná extrakce z obou stran SC. S kontrolními vzorky bylo provedeno totéž, ale ponořeny byly pouze v čištěné vodě. Všechny vzorky byly pak po dobu extrakce inkubovány při 32 °C, teplotě, při které jsme prováděli i permeační experimenty. Abychom ještě posílili efekt extrakce PG, byl extrakční roztok během 24h trvání pokusu 2x nahrazen čerstvým.

Po 24 h bylo SC vyňato z extrakční lázně a abychom se zbavili případných zbytků PG, důkladně vypláchnuto v kádince s čištěnou vodou, osušeno a opláchnuto čištěnou vodou ze střičky, přičemž tento postup se 3x opakoval vždy s čerstvou vodou.

Takto připravené vzorky včetně kontrol byly poté uloženy do suchých předvážených vialek, vysušeny v exsikátoru a přesně zváženy. Ze suchého SC byly směsí chloroform/ methanol 2:1 (v/v) podle popsané metodiky (kapitola 4.4) extrahovány lipidy, které byly následně analyzovány pomocí HPTLC.

4.3.5 Zkouška stripování

Zkouška stripování sloužila ke zjištění, zda lze stripováním omezit obsah krátkých MK, které rušily během HPTLC analýzy, ve SC, a zda lze s takto ošetřeným SC provést permeační experimenty. Za tím účelem bylo testováno stripování různým počtem stripů.

Kůže byla po rozmrznutí podrobena stripování 2×, 5×, 10×, 15× nebo 20×, paralelně byly ze stejné kůže připraveny i kontrolní vzorky, které stripovány nebyly.

Následovala izolace takto ztenčeného SC, sušení, extrakce lipidů a jejich HPTLC analýza. Totožným procesem prošly i vzorky kontrolní.

4.4 Extrakce lipidové složky SC pro analýzu HPTLC

Ze SC ze všech experimentů byly lipidy pro HPTLC analýzu extrahovány obdobně. Vysušené fragmenty SC byly ve vialkách zality směsí chloroform/methanol 2:1 (v/v) a extrahovány na třepačce po dobu 2 h. Poté byl extrakt převeden do čistých předvážených vialek, SC zalito dalšími 2 ml směsi a cyklus se opakoval. Po uplynutí 2 h na třepačce byl druhý podíl extraktu spojen s prvním, SC bylo ještě opláchnuto 0,5 ml směsi (spojeno s extrakty), vysušeno a zváženo. Extrakty byly zahuštěny pod proudem dusíku, vysušeny v exsikátoru, zváženy a analyzovány pomocí HPTLC.

4.5 HPTLC

Provedení bylo obdobné pro všechny získané lipidové extrakty. Vysušené lipidy získané extrakcí směsí chloroform/methanol 2:1 (v/v) (viz kapitola 4.4) byly pomocí směsi chloroform/methanol 2:1 (v/v) naředěny na koncentraci 1 mg/ml. Ve stejné směsi rozpouštědel byla připravena směs o známé koncentraci jednotlivých lipidů, která sloužila jako standard.

Na HPTLC chromatografické desky aktivované promytím mobilní fází a vyžíháním při 120 °C po dobu 30 minut bylo sprejováním v proudu dusíku za použití Linomatu 5 (Camag, Muttenz, Švýcarsko) naneseno vždy 40 µl vzorku lipidů ze zkoumaného SC v několika opakováních.

Zároveň se vzorky byla na desku nanesena standardní směs lipidů v kalibrační řadě pro kvantitativní vyhodnocení. Na jednu desku bylo naneseno vždy 8 kalibračních a 8 testovaných vzorků. Množství jednotlivých standardů ve všech užitých kalibračních hladinách zobrazuje následující tabulka 1:

Tabulka 1 *Standardy pro HPTLC analýzu. Horní řádek-objem standardní směsi lipidů jednotlivých nanesených kalibračních hladin. Sloupce-obsah jednotlivých lipidů v dané kalibrační hladině [µg].*

	30 µl	20 µl	10 µl	8 µl	6 µl	4 µl	2 µl	1 µl
LIG [µg]	7,5	6,0	3,0	2,4	1,8	1,2	0,6	0,3
Chol [µg]	7,5	6,0	3,0	2,4	1,8	1,2	0,6	0,3
Cer NS [µg]	3,0	2,0	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Cer NP [µg]	5,550	3,700	1,850	1,480	1,110	0,740	0,370	1,185
Cer EOS [µg]	1,000	0,500	0,250	0,200	0,150	0,100	0,050	0,025
Cer EOP [µg]	0,450	0,300	0,150	0,120	0,090	0,060	0,030	0,015
Cer AS [µg]	2,00	1,00	0,50	0,40	0,30	0,20	0,06	0,03
Cer AP [µg]	2,00	1,00	0,50	0,40	0,30	0,20	0,06	0,03

Po nanesení a zaschnutí byla deska dvakrát vyvíjena ve vyvíjecí komoře směsí chloroform/methanol/kys. octová 95:4,5:0,75. Při prvních pokusech byla použita horizontální vyvíjecí komora Camag (Camag, Muttenz, Švýcarsko). V dalších pokusech jsme pracovali s plně automatickou ADC2 komorou pro vertikální vyvíjení (Camag, Muttenz, Švýcarsko). Po každém vyvíjení byla deska vysušena horkým vzduchem (do 45 °C). Lipidy byly vizualizovány ponořením desky na 10 s do derivatizační směsi následujícího složení (dle tabulky 2).

Tabulka 2 *Složení derivatizační směsi.*

$CuSO_4 \times 5H_2O$	126 g
H_3PO_4 85 %	76 ml
methanol	40 ml
voda	684 ml

a následným vyžíháním desky při 160 °C. Množství lipidů bylo poté hodnoceno denzitometricky pomocí TLC Scanner 3 (Camag, Muttenz, Švýcarsko). Při počátečních pokusech v programu Wincats (Camag, Muttenz, Švýcarsko), později za použití softwaru visionCATS software (Camag, Muttenz, Švýcarsko) pomocí něhož byla ovládána i automatická vyvíjecí komora.

Množství MK, Chol i jednotlivých typů Cer ve vzorcích lipidů extrahovaných ze SC bylo vypočteno podle známých množství strukturně nejbližších lipidů v kalibraci. Každý vzorek byl hodnocen v několika opakováních. Prezentované výsledky jsou kombinací jednotlivých hodnot.

4.6 Studium permeability a mikrostruktury SC extrahovaného MβCD

4.6.1 Příprava *stratum corneum* se sníženým obsahem cholesterolu

Izolované SC bylo podrobeno 24h extrakci MβCD, v polovině extrakčního času byl roztok MβCD nahrazen novým, aby byla zajištěna co největší extrakční kapacita CD pro Chol. Kontrolní vzorky SC byly smontovány do teflonových držáků (viz kap. 4.6.2) a ponechány při 4 °C v zaparafilmovaných Petriho miskách nad PBS, aby byla zachována jejich hydratace do doby provedení společných permeačních experimentů.

K ověření lipidového složení analýzou HPTLC posloužily 3 vzorky dSC a 4 vzorky kontrolního SC. Lipidová složka SC po manipulaci s lipidovým složením pro analýzu lipidů pomocí HPTLC byla získávána extrakcí směsí chloroform/methanol 2:1 (v/v) podle metodiky popsané v kapitole 4.4.

4.6.2 Permeabilitní experimenty

Pro experimenty jsme použili modifikované Franzovy difúzní cely. Jde o skleněné cely sestávající z horní-donorové a spodní-akceptorové části. Ze spodní části je vyvedeno raménko pro odběr vzorků akceptorové tekutiny. Mezi horní a spodní část cely se fixuje zkoušená membrána upevněná v teflonovém držáku. Tento držák je opatřen kruhovým výřezem

definujícím plochu pro aplikaci donorového vzorku na studovanou membránu, který tak bude v přímém kontaktu se zkoušenou membránou právě na dané ploše.

Po uplynutí doby extrakce bylo SC opláchnuto PBS, převedeno na filtry a upevněno do Franzových cel s permeační plochou 0,5 cm^2 epidermální stranou dolů, směrem k akceptoru. Filtr nemá potenciál ovlivňovat průchod permeantů skrz SC, ale značně ulehčuje manipulaci s křehkým SC. Akceptorový kompartment cel byl naplněn fosfátovým pufrem (PBS) o pH 7,4, tedy pH lidské plasmy, s přídavkem 0.005 % (w/v) gentamicin-sulfátu pro zajištění mikrobiální stability. Objem akceptoru byl pro každou celu zvlášť zaznamenán a zohledněn při výpočtech. Cely byly umístěny do vodní lázně o teplotě 32 °C, která odpovídá teplotě povrchu lidské kůže,[109] a za míchání magnetickou míchačkou ponechány 2 h ustálit. Po uplynutí této doby byla měřena transepidermální ztráta vody (TEWL).

4.6.2.1 Ztráta vody přes membránu (TEWL)

Hodnota TEWL byla měřena přístrojem AquaFlux AF (Biox Systems Ltd, VB) po smontování Franzových cel a jejich ustálení po dobu alespoň 2 h v lázni při teplotě 32 °C za míchání akceptorové fáze. Měření probíhala po odstranění horní skleněné části cely, v úrovni 1 cm nad SC (horní hrana teflonového držáku), při vlhkosti vzduchu cca 30-36 % za laboratorní teploty. Následně bylo do donorového prostoru cel napipetováno 250 µl PBS a po 20 minutách změřena elektrická impedance.

4.6.2.2 Elektrická impedance (EI)

EI byla měřena na SC smontovaném do Franzových cel za pomoci digitálního multimetru LCR meter 4080 (Conrad Electronic, Hirschau, Německo). Měření navazovala na měření TEWL. Do prostoru určeného pro donor bylo napipetováno 250 µl PBS, cely byly před měřením ponechány k ustálení alespoň 30 min. Jedna elektroda byla skrz raménko zavedena do akceptorové části cely, druhá byla ponořena do PBS v donorovém prostoru. EI každé cely měřena ve 2 opakováních. Po měření byl povrch SC vysušen a před nanesením donorových vzorků opět ponechán ustálit.

4.6.2.3 Permeabilita pro modelové látky

Každá smontovaná cela byla pečlivě zkontrolována a ty cely, jejichž hodnoty TEWL a impedance vypovídaly o makroskopickém poškození, přítomnosti trhlin apod., byly z experimentu vyřazeny. Povrch SC byl po měření EI zbaven PBS, vysušen pomocí celulosových čtverečků a po uplynutí 12 h začalo měření permeability pro modelové látky.

Oba permeanty byly na SC nanášeny ve formě suspenze v 60% PG (5% TH, 2% IND). Donorové suspenze byly po přípravě minimálně 24 h inkubovány při 32 °C, aby došlo k jejich ustálení.

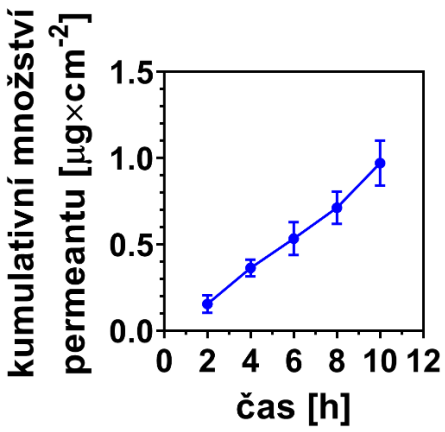
Při zahájení experimentu bylo na horní, vnější stranu SC naneseno 100 μl donorové suspenze theofylinu nebo indomethacinu. Celé uspořádání tak simulovalo podmínky průchodu permeantů zvenčí do organismu.

Po nanesení donoru byla mezi horní skleněnou část cel a teflonový držák vsunuta sklíčka, aby bylo zabráněno excesivnímu odpařování donorů. V intervalech 2, 4, 6, 8, 10 a 24 h byl odebrán vzorek 300 μl akceptorové tekutiny, který byl ihned nahrazen stejným objemem čerstvého PBS předehřátého na teplotu 32 °C. Tato manipulace byla zohledněna při výpočtech. Během dané doby byl dosažen ustálený stav.

V odebraných vzorcích byl poté pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) stanoven obsah modelových permeantů. V obou případech jsme kvantifikovali pomocí kalibrační křivky podle dříve validovaných metod[110] na sestavě Shimadzu Prominence instrument (Kyoto, Japonsko) na koloně LiChroCART 250-4 s náplní LiChrospher 100 RP-18 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo).

Jako mobilní fáze pro TH byla použita směs methanol/0.1 M NaH_2PO_4 4:6 (v/v) o průtoku 1,2 ml/min při teplotě 35 °C a tlaku ~18,4 MPa, pro IND pak směs acetonitril/voda/kys. octová 90:60:5 (v/v/v), průtok 2 ml/min při teplotě 40 °C a tlaku ~17 MPa. TH byl detekován pomocí detektoru diodového pole DAD SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) při vlnové délce 272 nm a IND při 260 nm.

Při výpočtech byly pro každou celu zohledněny odběry, přídavky čistého PBS i přesný objem akceptoru. Z výsledků byl sestaven permeační profil dané látky pro danou membránu, tedy závislost kumulativního množství permeantu prošlého přes jednotku plochy membrány (zde SC) na čase. Příklad takové závislosti ukazuje obrázek 10. Směrnicí vzniklé křivky v jejím lineárním úseku, kdy je dosažen setrvalý stav tzv. steady state, je flux čili tok léčiva přes membránu, v našem případě přes SC. Obecně, vyšší flux látky přes membránu vypovídá o vyšší propustnosti této membrány pro danou látku.



Obrázek 10 *Modelový permeační profil. Výsledkem permeačních experimentů je flux (J, [μg × cm² × h⁻¹]) modelové látky přes danou membránu. Vynesením závislosti kumulativního množství modelového permeantu v akceptorovém médiu na jednotku plochy membrány na čase vznikne křivka, jejíž směrnice v lineárním úseku odpovídá fluxu látky přes membránu.*

4.6.3 Studium mikrostruktury

Vzorky SC připravené v rámci předkládané práce byly studovány pomocí infračervené spektroskopie a rentgenové difrakce. Vzorky pro studium oběma metodami byly připravovány zároveň se vzorky pro permeace, ze stejného SC, které bylo v rámci experimentu extrahováno CD ke snížení obsahu Chol, aby byla zachována homogenita výsledků. Jako kontrolní posloužila část připravovaného SC, která neprošla extrakcí.

Byly připraveny 3 vzorky dSC, 3 kontroly pro měření SAXRD, 5 vzorků dSC a 5 kontrol pro měření IR. Příprava a měření proběhly podle dále popsaných metod.

4.6.3.1 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IR) byla využita ke studiu laterálního uspořádání lipidů SC.

Hydratované fragmenty SC určené pro měření IR byly převedeny do skleněných vialek a uloženy při teplotě – 20 °C. Před samotným měřením byly za laboratorní teploty ponechány do rozmrznutí a poté měřeny bez dalších úprav.

K měření byl použit spektrometr Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybavený jednoodrazovým MIRacle ATR ZnSe krystalem (PIKE Technologies, Madison, USA). Měření probíhalo za konstantního zatížení, finální spektrum je výsledkem průměrování 128 skenů s rozlišením 2 cm^{-1}. Spektra byla analyzována pomocí software OPUS (Bruker Billerica, Massachusetts, USA).

4.6.3.2 Rentgenová difrakční analýza

Lamelární uspořádání lipidů SC bylo studováno pomocí rentgenové difrakce v oblasti malých úhlů (small angle X-ray diffraction, SAXRD).

Hydratované SC bylo převedeno na podložní sklíčko a takto připravený vzorek zmrazen a uložen při teplotě – 20 °C. Další zpracování proběhlo bezprostředně před měřením na externím pracovišti, kde byly vzorky rozmrazeny a před měřením hydratovány 12 h při 100% relativní vlhkosti vzduchu.

Měření bylo prováděno za laboratorní teploty (25 °C). K měření byl použit rentgenový difraktometr pro práškové vzorky X´Pert PRO θ-θ (PANalytical B.V., Almelo, Holandsko) s parafokusovacím Bragg-Brentanovým goniometrem s využitím Cu Kα záření (λ = 1,7902 Å, U = 40 kV, I = 30 mA) v úhlovém rozsahu 0,6–30° s detekcí provedenou X´Celerator ultrafast detektorem s délkou kroku 0,0167° a měřicím časem 20,32 s/ krok, Získaná data byla vyhodnocena s využitím software HighScore Plus (PANalytical B.V., Almelo, Holandsko) podle popsané metodiky.[3]

4.7 Statistické zpracování dat

Zpracování veškerých dat probíhalo za pomoci softwaru GraphPad (GraphPad SoftwarePro, San Diego, USA). Pro porovnání dvou sad výsledků byl využit nepárový Studentův t-test, při srovnávání více sad výsledků potom one-way ANOVA (z angl. analysis of variance, analýza rozptylu) s Bonferroniho post hoc analýzou. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou pravděpodobnosti pod hladinou významnosti 0,05.

5. Výsledky a diskuse

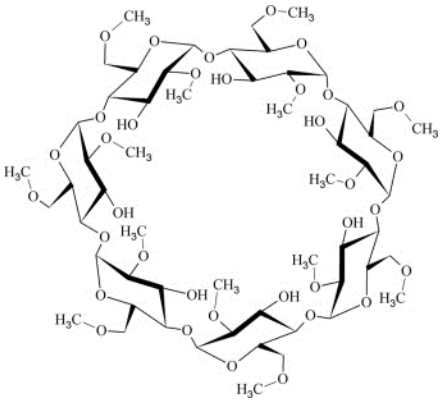
Předmětem této práce bylo studium vlivu deplece cholesterolu (Chol) v *ex vivo* lidském *stratum corneum* (SC) na permeabilitu a mikrostrukturu této vrstvy kůže, která představuje klíčovou složku kožní bariéry suchozemských savců. Výsledky studie na takto upraveném SC byly srovnávány s výsledky získanými při studiu umělých lipidových membrán se sníženým obsahem Chol.[3]

Cílem experimentů bylo ověřit výsledky dřívějšího studia syntetických lipidových membrán se sníženým podílem Chol, provedeného kolegy z naší pracovní skupiny, na lidském SC *ex vivo*. SC má oproti zmíněným umělým membránám nativní uspořádání lipidů, navíc se z cca 80 % skládá z rohových buněk, korneocytů, což jej jako model oproti membránám tvořeným pouze lipidy posunuje na podstatně vyšší úroveň složitosti a blíže skutečným *in vivo* podmínkám.

Nejprve bylo nutné zajistit modelové vzorky SC se sníženým obsahem Chol. V případě modelových membrán nebylo složité připravit model s nižším podílem Chol složky. Při mísení lipidů pro přípravu membrány jej bylo jednoduše přidáno pouze kýžené množství. Takto byly připraveny a zkoumány membrány se 100, 80, 70, 60, 50, 40 a 20 % běžného množství Chol i zcela Chol složku postrádající.[3] V případě *ex vivo* SC se však jednalo o náročnější proces a výsledné snížení obsahu Chol bylo limitováno.

5.1 Extrakce za účelem snížení obsahu cholesterolu v izolovaném lidském SC

Snížení podílu Chol ve SC jsme zamýšleli docílit pomocí extrakce. Ta však musela být dostatečně selektivní, aby nebyly dotčeny ostatní lipidy. Vzhledem k povaze všech lipidů SC se jednalo o nelehký úkol. Rozdíly v jejich vlastnostech, díky kterým by bylo možné jednu složku selektivně odstranit, jsou totiž mizivé. Na podkladě literatury jsme zvolili extrakci pomocí vodných roztoků cyklodextrinů (CD).[108]

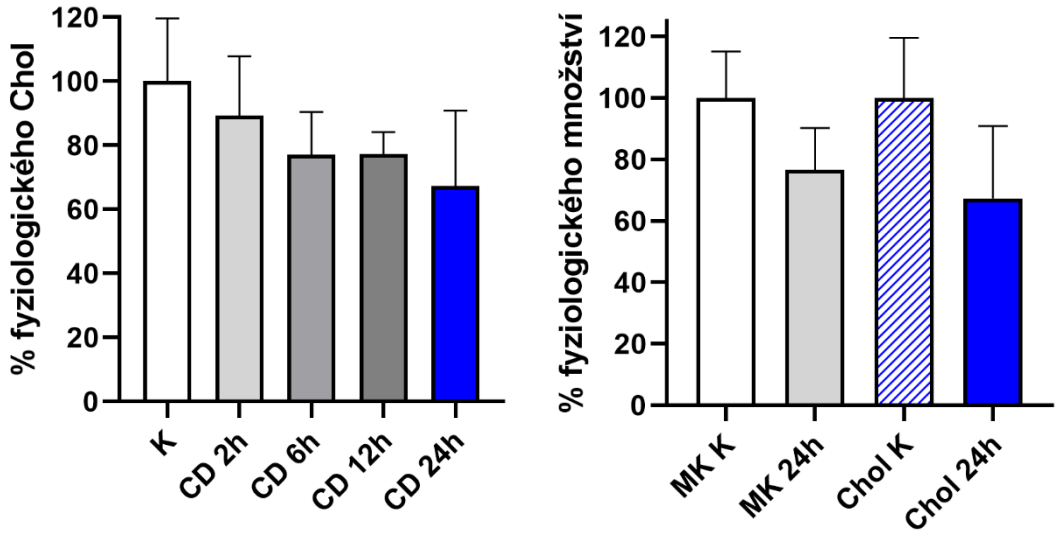


Obrázek 10 *Strukturní vzorec heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-cyklodextrinu.*[111]

Pro extrakce byly použity konkrétně 2-hydroxypropyl-β-CD (HPβCD, průměrná Mn 1380) a methyl-β-CD (MβCD, průměrná Mn 1310). Množství a poloha methylových substituentů u komerčně dostupných methyl-β-CD jsou obvykle proměnlivé vyjma zcela methylovaného trimethyl-β-CD.[111] Průměrná Mn použitého MβCD odpovídá stupni substituce o něco méně než 2, tedy Mn molekuly s o něco méně než dvěma methylovými zbytky na každý monomer glukosy v cyklu, jako je tomu u *heptakis*-(2,6-di-O-methyl)-β-CD na obrázku 11.

5.1.1 Extrakce 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinem

Na základě studie Legendre *et al*. na potkaním SC jsme nejprve testovali extrakci HPβCD, který ve zmíněné studii projevil selektivitu v extrakci Chol.[108] Tento CD v naší studii sice zbavoval části Chol i lidské SC, avšak toto snížení bylo doprovázeno zjevným snižováním obsahu mastných kyselin (MK). Časově závislé snižování relativního obsahu Chol během extrakce je zobrazeno v grafu 1. Graf 2 potom ukazuje porovnání poklesu množství Chol oproti kontrole s poklesem v obsahu MK při nejdelším extrakčním času 24 h. Relativní množství Chol po 24h extrakci je v obou grafech zvýrazněno modře.



***Graf 1** (vlevo) Postupné snižování obsahu Chol v lidském SC s rostoucí délkou extrakce HPβCD oproti kontrole (K, odpovídá obsahu před extrakcí), **a graf 2** (vpravo) Srovnání poklesu množství mastných kyselin (MK) a Chol v lidském SC oproti kontrolám (MK K, Chol K) po 24h extrakci HPβCD. Rozdíly nebyly statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 3$.*

Výsledná množství lipidů, které ve SC zbyly po extrakci vodným HPβCD, potvrdila, že extrakcí bylo docíleno úbytku Chol, který narůstal s delší dobou extrakce. Po 24 h zůstávalo ve SC 67 ± 14 % Chol, ale bez statistické významnosti oproti kontrole. Zároveň však docházelo k úbytku části MK (77 ± 8 % FFA po 24 h), což byl pro naše potřeby nežádoucí jev vypovídající o nedostatečné selektivitě extrakce HPβCD v případě lidského SC.

Bylo tedy zjištěno, že selektivita extrakce HPβCD není pro naše účely dostatečná, což je patrně dáno rozdílnými vlastnostmi lidského a potkaního SC. Dá se předpokládat např. odlišná penetrace poměrně rozměrné molekuly CD do obou typů membrán ovlivněná jednak jejich rozdílnou tloušťkou, jednak možnými rozdíly v jejich stavbě.[112]

5.1.2 Jednoduchá zkouška rozpustnosti

Po neuspokojivých výsledcích dosažených pomocí HPβCD, které se příliš neshodovaly se zdrojovou literaturou (publikovaná data se však týkala SC potkaního, nikoli lidského)[108], jsme se rozhodli provést jednoduchý experiment, který by nám poskytl informace o rozpustnosti samotného Chol a MK ve vodném roztoku tohoto CD. Ve zmíněné studii byl použit i MβCD (avšak ve výchozí studii vůči Chol vykazoval menší selektivitu než HPβCD), který jsme se po neúspěchu s HPβCD pokusili jednoduchou zkouškou rozpustnosti s tímto CD porovnat. Zjišťovali jsme objem vodného roztoku každého ze zmíněných CD (100 mg/ml)

potřebný k rozpuštění přibližně 2 mg Chol a přibližně 2 mg směsi MK. Uspořádání experimentu shrnuje následující tabulka 3:

Tabulka 3 *Uspořádání a výsledky experimentu zjišťování rozpustnosti Chol a MK ve vodných roztocích 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu (HPβCD) a methyl-β-cyklodextrinu (MβCD).*

	HPβCD	HPβCD	MβCD	MβCD
k. palmitová [mg]	1,00	-	1,04	-
k. lignocerová [mg]	1,11	-	1,16	-
Chol [mg]	-	1,96	-	1,96
spotřeba roztoku CD na rozpuštění [ml]	>>10	>10	>7,7	3

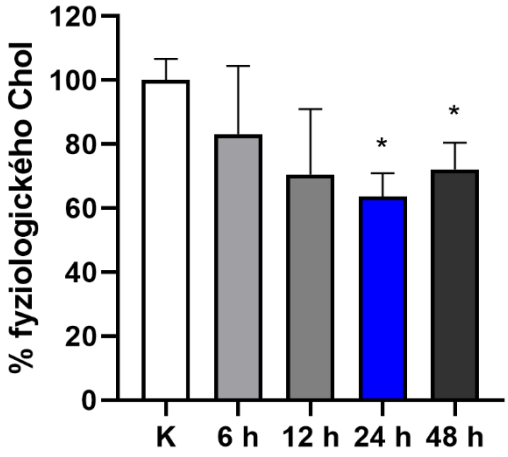
Výsledky jsou též vyneseny v tabulce 3. K úplnému rozpuštění 2 mg Chol nestačilo ani 10 ml roztoku HPβCD, v případě MK měl tento CD při stejném objemu k jejich rozpuštění zjevně ještě dále. Překvapením byl ale roztok MβCD. Na rozpuštění 2 mg Chol stačily 3 ml jeho roztoku, kdežto MK se zcela nerozpouštěly ani po přidání 7,7 ml roztoku MβCD. Solubilizační kapacita MβCD pro Chol a MK se tak zdála značně rozdílná, přestože zdrojová studie uváděla, že tento CD extrahoval z potkaního SC všechny lipidy bez významných rozdílů, oproti HPβCD, který preferoval Chol.[108]

Že MβCD vykazoval ve zdrojové studii odlišný vliv na množství Chol a ostatních lipidů ve SC po extrakci mohlo být dáno, podobně jako v případě HPβCD, odlišností potkaního a lidského SC. Na solubilizační kapacitu CD nejen pro Chol má však významný vliv také konkrétní stupeň, rozložení a homogenita substituce, což bylo pro různě substituované MβCD při rozpouštění Chol detailně popsáno.[111] Zdrojová studie sice uvádí stupeň substituce 1,8.[108], což je hodnota blízká našemu MβCD, avšak homogenita substituce konkrétní chemikálie mohla být značně odlišná.

Tímto experimentem jsme si ověřili, že roztok HPβCD nevykazuje kýženou aktivitu a selektivitu v rozpouštění Chol, zjistili jsme však, že roztok MβCD má vyšší rozpouštěcí kapacitu pro Chol než HPβCD, a navíc se zdálo, že MK jsou v něm rozpustné o něco méně. Na základě výsledků tohoto pokusu jsme se rozhodli vyzkoušet MβCD v obdobném experimentu jako prve HPβCD a zjistit, zda podobně uspokojivé výsledky poskytne i při extrakci reálného SC.

5.1.3 Extrakce methyl-β-cyklodextrinem

Extrakce pomocí MβCD byla provedena podobně jako první experiment s HPβCD. Bylo izolováno SC, část vzorků z každé kůže byla podrobena extrakci a část ponechána jako kontrolní. Vzhledem k výsledkům předchozí extrakce jsme se rozhodli úplně vynechat nejkratší extrakční čas, a naopak vyzkoušet čas delší. Zvolili jsme 4 extrakční časy a to 6, 12, 24 a 48 h. Změny v obsahu Chol pro jednotlivé extrakční časy zjištěné HPTLC analýzou zobrazuje následující graf 3:



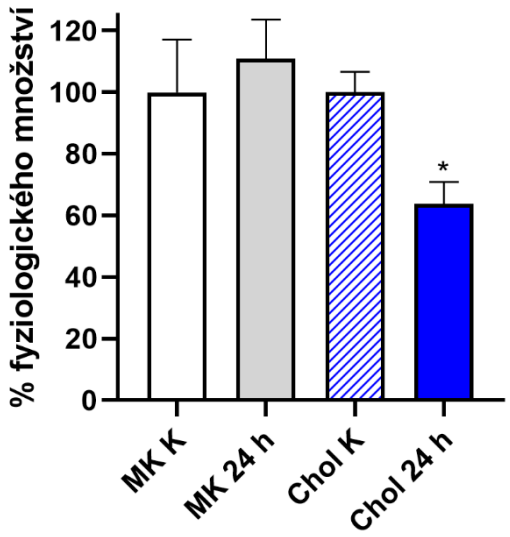
Graf 3 *Relativní obsah Chol oproti kontrole (K) při různých délkách extrakce SC methyl-β-cyklodextrinem. Hvězdička značí statisticky signifikantní odlišnost od kontroly na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 3$.*

HPTLC analýza zbytkových lipidů ukázala signifikantní úbytek Chol po extrakci vodným roztokem MβCD 24 h a 48 h. Úbytek byl v případě kratších extrakčních časů jednoznačně časově závislý, pro extrakční čas 24 h nabývalo množství zůstatku Chol ve SC hodnoty 64 ± 4 % oproti kontrole (100 %).

Po 48 h již nebyl úbytek oproti 24h extrakci signifikantně vyšší, což mohlo být způsobeno naplněním extrakční kapacity CD roztoku, případně uplatněním dalších mechanismů. V minulosti bylo např. studováno též obohacování buněčných membrán a buněčných kultur Chol a dalšími lipidy, pomocí cyklodextrinů. Bylo popsáno, že při ošetření roztokem CD může docházet buď k depleci části Chol nebo obohacování membrán či buněk Chol v závislosti na poměru Chol a CD v daném roztoku. Jinými slovy, roztok CD může Chol z buněčných membrán či buněk extrahovat, jak vidíme při extrakčních časech 6 až 24 h, ale za určitých podmínek, zejména při vysokém obsahu Chol v roztoku CD, může docházet ke zcela opačnému jevu, totiž dopaci membrán či buněk Chol.[113, 114] Dosažení takového nasycení roztoku CD

vyextrahovaným Chol by mohlo vysvětlit, proč po 48h extrakci nebylo v extrahovaném SC Chol méně než po extrakci 24h. Naopak, nasycený CD by už mohl hypoteticky vracet Chol do membrán, avšak ne nutně tak, jak v nich byl původně přítomen. I proto jsme již delší extrakční časy nestudovali a dále byla využívána 24h extrakce.

Na rozdíl od extrakce HPβCD zde nebyl pozorován zásah do množství ostatních sledovaných lipidů. Pro příklad, po 24h extrakci bylo množství zbytkových MK 111 ± 7 % oproti kontrole, jak ukazuje následující graf 4.



Graf 4 *Relativní obsah Chol a MK oproti kontrole (K) po 24h extrakci SC methyl-β-cyklodextrinem. Hvězdička značí statisticky signifikantní odlišnost od kontroly na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 3$.*

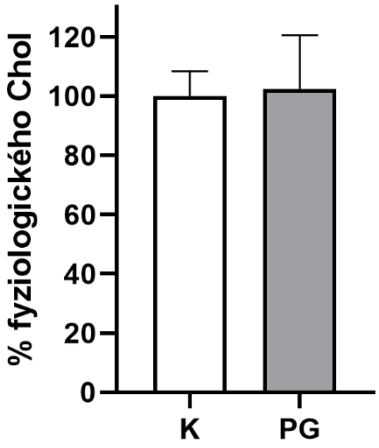
Z hmotností SC před extrakcí chloroform/methanol, hmotností po této extrakci a hmotností vyextrahovaných lipidů byla zkontrolována návratnost extrakce. Součet hmotnosti vyextrahovaných lipidů a SC po extrakci by měl být co nejbližší hmotnosti SC před extrakcí. V případě kontrol byl rozdíl mezi součtem hmotnosti vyextrahovaných lipidů s hmotností SC po extrakci a hmotností SC před extrakcí zanedbatelný. U vzorků po extrakci MβCD byl rozdíl vždy kladný a ačkoli ne signifikantně, vždy větší než v případě kontrol, což mohlo být způsobeno zbytkovým CD navázaným na SC a případně vodou, kterou váže. Proto jsme v dalších experimentech SC po extrakci vodným roztokem CD důkladněji oplachovali.

Metoda snižování obsahu Chol v *ex vivo* SC za účelem studia vlivu jeho částečné deplece na bariérové vlastnosti a mikrostrukturu SC tedy byla založena na extrakci vodným roztokem MβCD. A vzhledem k malým rozdílům mezi výsledky extrakce po dobu 24 a 48 h a také vzhledem k možnosti nežádoucí výměny Chol mezi CD v roztoku a extrahovanou tkání

při vyšší koncentraci Chol v roztoku, jsme se rozhodli využívat v dalších experimentech 24 h extrakci s výměnou extrakčního roztoku v polovině času.

5.1.4 Extrakce propylenglykolem

Nalezli jsme též referenci, podle které by Chol mohl ze SC selektivně extrahovat samotný propylenglykol.[88] Vzhledem k tomu, že 60% propylenglykol (PG) používáme jako vehikulum pro donory při permeabilitních experimentech, připadalo nám zajímavé vyzkoušet, jaký vliv má samotný PG na lipidy zkoušeného SC v našich podmínkách. Jelikož naše permeace na SC trvají obvykle 10-24 h, byl navržen experiment pro zjištění změny lipidového spektra SC po 24h extrakci 60% PG. Výsledek vlivu 24h extrakce 60% PG na obsah Chol zkoušeného SC ukazuje graf 5.



Graf 5 *Relativní obsah Chol v lidském ex vivo SC (PG) po extrakci propylenglykolem ve srovnání s neošetřeným SC (K). Rozdíly nebyly statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 3$.*

Po extrakci lidského SC pomocí PG provedené v rámci předkládané práce jsme oproti kontrolním vzorkům neshledali žádný úbytek Chol, ani dalších dvou hlavních skupin bariérových lipidů. Tento výsledek odlišný od výsledků výše zmíněné publikace může být způsoben kromě atypického složení modelových membrán ve zmíněné studii simulujících psoriatickou kůži (mimo jiné zvýšený obsah Chol a méně MK) opět např. rozdílnou penetrací molekul PG do lidského SC. To je totiž oproti modelovým membránám studovaným Bowstrou a kol. tvořeno nejen lipidy, ale jeho převážnou část představují korneocyty.[33,91] Lipidová matrix přitom vyplňuje prostory mezi korneocyty, a tvoří jen asi 10 % objemu SC. Autoři konkrétní tloušťku membrán neuvádějí. V případě čistě lipidových membrán bývá množství lipidů obvykle vyšší než ve SC o stejné ploše, tloušťka membrán však stále zůstává nižší než u SC. Už pouhá tloušťka SC je tak pravděpodobně odlišná od Bouwstrou a kol. studovaných

modelových membrán, což může mít nepochybně vliv na průběh extrakce a množství vyextrahovaných lipidů. Mnohem významnější vliv se pak dá očekávat vlivem případné odlišnosti v uspořádání lipidů membrán skrze nepřítomnost korneocytární lipidové obálky (CLE).[24, 25, 115] Nutno zmínit, že původ rozdílu může být též v koncentraci PG (Bouwstra a kol. uvádějí použití 100% PG) či v provedení analýzy a citlivosti detekce obsahu lipidů.

Pro naši pracovní skupinu byl experiment s extrakcí SC propylenglykolem zároveň přínosným ověřením, že 60% PG používaný jako vehikulum pro donory při permeačních experimentech neinterferuje s výsledky měření dodatečným vymýváním Chol během pokusů. Vliv 60% PG během permeabilitních experimentů na složení modelových lipidových membrán byl již také studován a stejně jako z *ex vivo* SC ani z lipidových membrán PG lipidy neextrahoval.[103]

5.1.5 Krátké mastné kyseliny, rušivý vliv při analýze lipidů

Analýzu lipidového složení pomocí HPTLC nám v předchozích experimentech poněkud komplikovaly krátké mastné kyseliny, které byly na HPTLC desce viditelné hned pod skvrnou MK a ztěžovaly jejich kvantifikaci.

Krátké mastné kyseliny jsou především součástí povrchových lipidů SC, které pochází z produkce mazových žláz, nejbohatší je na ně tedy povrch SC. Právě z tohoto důvodu je SC během procesu izolace oplachováno krátce acetonem, který jej má této nežádoucí složky zbavit. Co se samotného izolovaného SC týče, větší množství krátkých MK nalezneme ve *stratum corneum disjunctum*, rozvolněnější svrchní vrstvě SC.[71]

Že se skutečně jedná o krátké MK jsme si po separaci lipidů vyvinutím HPTLC desky ověřili extrakcí silikagelu z příslušné oblasti se sledovaným chromatografickým proužkem pomocí směsi chloroform/methanol 2:1 (v/v) a analýzou získaných lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). MS analýza byla provedena Mgr. Hanou Bavlovič-Piskáčkovou.

Situaci mírně ztěžovala skutečnost, že pro vizualizaci lipidů na chromatografické desce je používána pro sloučeniny destruktivní metoda vyžíhání desky po jejím ponoření do detekční směsi obsahující kyselinu fosforečnou a měďnaté ionty. Pro MS analýzu jsme potřebovali získat lipidy v původním stavu, proto byla deska se dvěma identickými nanesenými vzorky po vyvinutí rozdělena na dvě části, jedna část prošla běžnou destrukční vizualizací, a podle polohy zviditelněné neznámé skvrny na této polovině jsme odebrali příslušnou část silikagelu z druhé, nedetekované části desky.

Náš předpoklad byl potvrzen a podle výsledků MS analýzy byla ve vyextrahované části silikagelu původně směs MK s řetězci ≤ 16 uhlíků.

5.1.6 Zkouška stripování *ex vivo* lidského SC ke snížení obsahu krátkých MK

Vzhledem ke komplikacím, které působily krátké MK v HPTLC analýze lipidů v předešlých experimentech, jsme se rozhodli vyzkoušet experiment s využitím SC zbaveného několika svrchních vrstev. S přihlédnutím k tomu, že pro bariérovou funkci má rozhodující vliv především spodní kompaktní část SC,[93] by tím mohl být v ideálním případě odstraněn nežádoucí vliv krátkých MK, zatímco validita modelu by zůstala zachována.

Je zavedenou praxí docilovat plynulého odstraňování jednotlivých vrstviček SC stripováním, tedy opakovaným nalepováním a strháváním lepicí pásky.[71] Dalo se předpokládat, že SC bude po této modifikaci ještě křehčí a náročnější na manipulaci než obvykle. Proto jsme nejprve menším experimentem ověřili, jak se bude SC chovat po různém počtu stripů. Potřebovali jsme zjistit po kolika stripech ještě bude technicky možné SC použít pro permeační experimenty, a jaký vliv bude stripování mít na lipidové složení, především na množství přítomných krátkých MK. Cílem bylo najít počet stripů, který zajistí co nejnižší množství krátkých MK a zároveň bude se vzniklou membránou ještě možné přijatelně manipulovat. V neposlední řadě bylo třeba dávat pozor na to, aby si takto připravené SC zachovalo své bariérové vlastnosti a odpovídající obsah bariérových lipidů.

Se SC po stripování 2, 5 a 10× ještě bylo možné manipulovat, i když 10× stripované SC bylo křehké a nebylo snadné získat větší plochu této tkáně vcelku. 15× stripované SC bylo již velmi křehké a manipulace s ním obtížná. V případě 20× stripovaného SC nebylo možné získat cca 4×4 cm velký fragment bez trhlin a děr, jeho využití pro permeační experimenty tedy nepřipadalo v úvahu.

Výsledky HPTLC analýzy lipidů vyextrahovaných směsí chloroform/metanol 2:1 z takto stripovaných fragmentů SC však nevypovídaly o žádaném snížení množství krátkých MK ve vzorcích. Stripování množství krátkých MK výrazně neovlivnilo, což znamená, že krátké MK ve vzorcích zřejmě nepocházely jen z povrchu SC, ale byly přítomny i v hlubších vrstvách. To však nemusí nutně znamenat, že by nepocházely z produkce mazových žláz. Již dříve byla diskutována možná inkorporace povrchových lipidů, zvláště kratších a nenasycených MK, do lamel bariérových lipidů SC.[70]

Na základě výsledků tohoto pokusu, kdy stripování nemělo žádaný efekt, jsme od jeho použití v permeačních experimentech upustili.

5.1.7 Další možnosti experimentálního snižování obsahu Chol ve SC

Jako alternativní způsob získání SC s ještě nižším obsahem Chol se nabízí lokální podání statinů u zdravých dobrovolníků, od nichž by následně bylo SC získáno biopsií, jako v některých specifických studiích.[91] V našich podmínkách by případně bylo možné zvážit lokální podávání statinů v období před plánovanou operací dárců.

Jak však ukázaly pokusy na myších, použití statinů v míře, která by podle předpokladů měla místně znemožnit produkci Chol, by s nejvyšší pravděpodobností ovlivnilo mikrostrukturu lipidů komplexnějším způsobem a na více úrovních než prosté odstranění Chol ze zdravého SC.[116, 117]

Chol se totiž v hlubších vrstvách epidermis podílí i na enkapsulaci lipidů a jejich prekurzorů do transportních lamelárních tělísek, a při zásahu do fyziologie jedné skupiny lipidů na této úrovni se dá očekávat ovlivnění fyziologie skupin ostatních. Navíc u zvířat vykazovala statiny dlouhodobě ošetřovaná epidermis dokonce normální obsah Chol. K tomuto došlo vlivem upregulace HMG CoA-reduktázy, pravděpodobně spuštěné blokádou části tohoto enzymu statiny a vzniklým poklesem množství Chol.[116, 117] Feingold et al. tak připisují pozorované zhoršení bariérové funkce kůže myší ošetřovaných topickými statiny spíše současné upregulaci syntézy MK a následnému narušení fyziologického poměru lipidů kožní bariéry excesivním množstvím MK.[116]

I u lidského SC by se tak po lokální aplikaci statinů dalo očekávat, že změny v propustnosti i mikrostruktuře budou způsobené spíše zásahem do transportních mechanismů, metabolických drah a celkového složení lipidové matrix než prostou absencí Chol. Extrakce *ex vivo* SC tak zůstává nejvhodnější možností získání modelu SC s nižším než fyziologickým obsahem Chol.

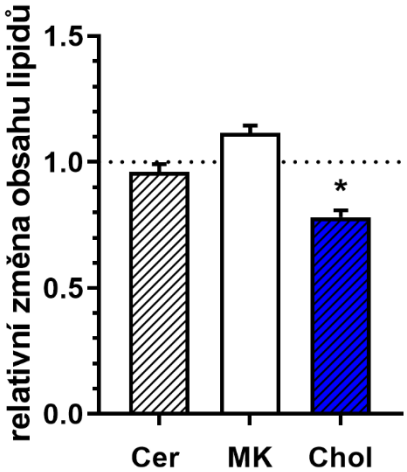
5.2 Studium permeability a mikrostruktury SC se sníženým obsahem Chol

Majíce metodu pro extrakci alespoň části Chol přítomného ve SC, mohli jsme přistoupit k primárnímu cíli zájmu, tj. ke zkoumání změn, které po odstranění části Chol ze SC nastanou. Před experimentem byly připraveny vzorky SC se sníženým obsahem Chol (dSC), lipidové složení připravených dSC vzorků oproti kontrolám, které nebyly extrahovány CD, bylo ověřeno pomocí HPTLC analýzy. SC se sníženým obsahem Chol i SC kontrolní pak byly podrobeny permeačním experimentům, během nichž byly zjišťovány změny v propustnosti pro modelové látky theofylin (TH) a indomethacin (IND), vodu a ionty. Mikrostruktura SC i dSC byla zkoumána pomocí infračervené spektroskopie (IR) a rentgenové difrakce (SAXRD).

V dřívějších experimentech, provedených kolegy z naší výzkumné skupiny, byly studovány lipidové modelové membrány s vlastnostmi co nejbližšími lipidové složce SC. Kontrolní membrány byly připraveny z ekvimolární směsi hCer, FFA a Chol s přídavkem 5 % (w/w) CholS, v dalších membránách pak bylo postupně snižováno množství Chol oproti fyziologickému (100 %) až k jeho úplné nepřítomnosti (0 %).[3] Námi připravené SC se sníženým obsahem Chol (dSC) bylo studováno stejnými metodami jako tyto membrány. Jelikož účelem experimentů s *ex vivo* dSC bylo také porovnání s výsledky získanými na zmíněných modelových membránách, budou výsledky obou modelů kožní bariéry s částečně depletovaným obsahem Chol pro porovnání uváděny paralelně a diskutovány společně.

5.2.1 Snížení obsahu Chol

Ke snížení obsahu Chol v kožní bariéře jsme po výsledcích pilotních pokusů využili metody extrakce vodným roztokem MBβCD po dobu 24 h. HPTLC analýza, jejíž souhrnné výsledky jsou vyneseny v následujícím grafu č. 6, potvrdila selektivitu vůči Chol, jehož množství v takto extrahovaném SC pokleslo oproti kontrole (100 %) na 78 ± 3 %, zatímco množství MK a Cer zůstalo nezměněno. Výsledky permeačních experimentů a studia mikrostruktury dSC je tak možné porovnávat s výsledky ze syntetických membrán s obsahem Chol sníženým na 80 % fyziologické hodnoty, který je nejblíže hodnotám v námi upraveném SC.[3]



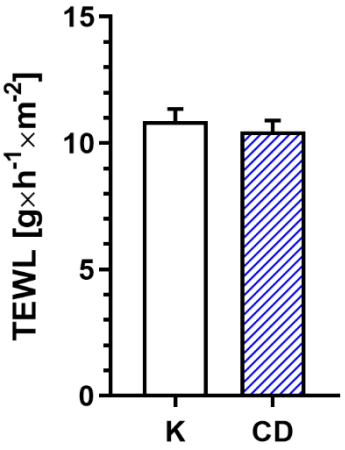
Graf 6 *Relativní změna obsahu tří hlavních skupin lipidů ve SC po 24h extrakci methyl-β- cyklodextrinem oproti kontrole. Hvězdička značí statisticky signifikantní odlišnost od kontroly na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 3$.*

5.2.2. Permeabilitní experimenty

Permeabilita SC byla testována pomocí měření propustnosti pro čtyři běžně užívané markery, konkrétně vodu, střídavý elektrický proud a dva modelové permeanty (TH a IND).[3, 90, 103] Byly záměrně vybrány stejné markery jako v předchozích experimentech na modelových membránách.[3]

5.2.2.1 Propustnost modifikovaného SC pro vodu (TEWL)

Čím je hodnota ztráty vody (TEWL) nižší, tím menší je propustnost SC pro vodu a tím lepší je jeho bariérová funkce. Jak ukazuje graf 7, hodnota TEWL byla u dSC blízká kontrolním vzorkům SC ($10{,}5 \pm 0{,}4$ g × h^{-1} × m^{-2} vs. $10{,}87 \pm 0{,}49$ g × h^{-1} × m^{-2}). Tento parametr tedy vypovídá o zachování bariérové funkce u dSC.



Graf 7 *Změna hodnoty TEWL u dSC (CD) oproti kontrole (K) nebyla signifikantní na hladině významnosti $p < 0{,}05$. $N \geq 20$.*

Výsledek měření koreluje s vývojem pozorovaným na modelových membránách, u nichž mělo snižování obsahu Chol překvapivě zjevný pozitivní účinek na bariérovou funkci vůči ztrátě vody. TEWL u zkoumaných membrán s postupnou deplecí Chol v porovnání s kontrolou zvolna klesal až k nejnižší hodnotě u membrán bez Chol.[3]

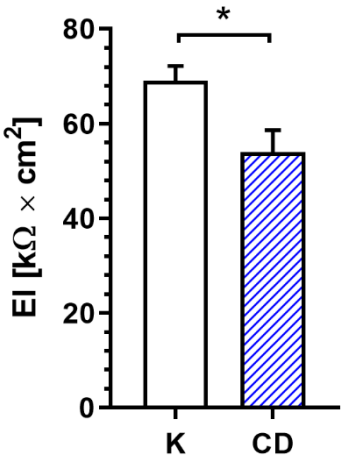
Dle Deamera a Bramhalla[120] je průchod vody přes membrány v základu možné popsat pomocí dvou modelů. Prvním z nich je prostá difuze jednotlivých molekul vody, druhý model předpokládá existenci náhodně vznikajících přechodných defektů membrány, které poskytnou permeantu cestu. V případě fosfolipidových membrán bylo popsáno, že Chol snižuje výskyt takových defektů a snižuje permeabilitu. Ačkoli SC dle výše zmiňované studie vykazuje obecně podstatně nižší propustnost než fosfolipidové membrány, dá se u něj předpokládat podobný efekt Chol jako ve fosfolipidových membránách, zvláště v množství, kdy je ještě s ostatními

lipidy smísen, pod hranicí, nad níž vzniká separovaná fáze, což je mezi 40 a 60 % fyziologického množství Chol.[2, 3, 79]

To, že se propustnost dSC pro vodu neměnila, a že bariérová funkce modelových membrán proti prostupu vody zůstala zachována i u vzorků s nižším obsahem Chol, než se podařilo docílit v případě dSC, by se za platnosti takové premisy dalo vysvětlit tak, že voda prochází přes SC především prostou difuzí, resp. že se v případě SC jako membrány uplatní spíše první model předpokládaného mechanismu průchodu vody.[3, 120] Chybějící Chol a s deficitem spojený chybějící efekt Chol na snížení výskytu přechodných defektů by tak měl na výslednou permeabilitu SC pro vodu minimální vliv, jak to vidíme na reálných výsledcích.[3]

5.2.2.2 Elektrická impedance modifikovaného SC

Elektrická impedance (EI) vyjadřuje odpor membrány vůči průchodu střídavého proudu. Její hodnota koreluje s permeabilitou SC.[104, 121] Čím vyšší je hodnota EI, tím nižší je propustnost membrány a bariérová funkce je tak lepší.



Graf 8 *Signifikantní pokles elektrické impedance SC se sníženým obsahem Chol (CD) oproti kontrole (K). $p < 0,05$. $N \geq 20$.*

Pokud jde o SC, odstranění cca 20 % Chol vedlo k signifikantnímu poklesu EI, z 69 ± 3 kΩ × cm^2 (kontrolní SC bez zásahu do množství Chol) na 54 ± 5 kΩ × cm^2 (dSC), jak zobrazuje graf 8.

Tento přibližně 20% pokles je jen o něco menší než pokles pozorovaný u membrán s 80% obsahem Chol (viz tabulka 4 shrnující relativní permeability). EI modelových membrán při snižování Chol podílu nejprve signifikantně poklesla, a to ještě o něco více než v případě dSC. S dalším snižováním obsahu Chol pak mírně stoupala k hodnotám bez signifikantního

rozdílu oproti kontrole. Modelové membrány s nejnižším obsahem Chol (20 %) a zcela Chol postrádající však jevily známky vážného porušení bariéry vůči střídavému proudu, což reflektoval výrazný pokles EI daných membrán.[3]

Nutno zmínit, že v dřívějších pracích již byly studovány i membrány tvořené pouze Chol, připravené stejnými postupy jako směsné membrány. Ty mohly velmi hrubě napodobovat vlastnosti separovaných Chol domén. Propustnost těchto membrán tvořených pouze Chol byla vzhledem ke směsi SC lipidů 10 × vyšší pro TH, 5 × vyšší pro IND a 2 × vyšší pro vodu, což svědčí o výrazně nižších bariérových vlastnostech separovaného Chol oproti skutečné bariéře zabezpečované směsí lipidů. Hodnoty EI byly naproti tomu jediné, které u čistě Chol membrán vypovídaly o výrazně lepší bariéře vůči prostupu střídavého proudu, potažmo iontů, než u kontrol (10 × vyšší EI).[3]

Při poklesu Chol o 20 %, jako u dSC, se dá předpokládat přednostní vymizení samostatných Chol domén, spíše než úbytek Chol rozptýleného v lamelách. Tomu nasvědčují i výsledky SAXRD analýzy dSC a také dřívější studium modelových membrán s 80% obsahem Chol.[3] To by nám spolu se signifikantním poklesem hodnot EI při takto sníženém obsahu Chol a s výše zmíněným pozorováním vysoké EI čistě Chol membrán[3] poskytovalo důvod se domnívat, že tyto domény separovaného Chol mají funkci především ve zvyšování odporu SC vůči průchodu střídavého proudu, což koreluje s odporem vůči průchodu nabitých částic (např. fyziologických iontů, solutů, protonů).

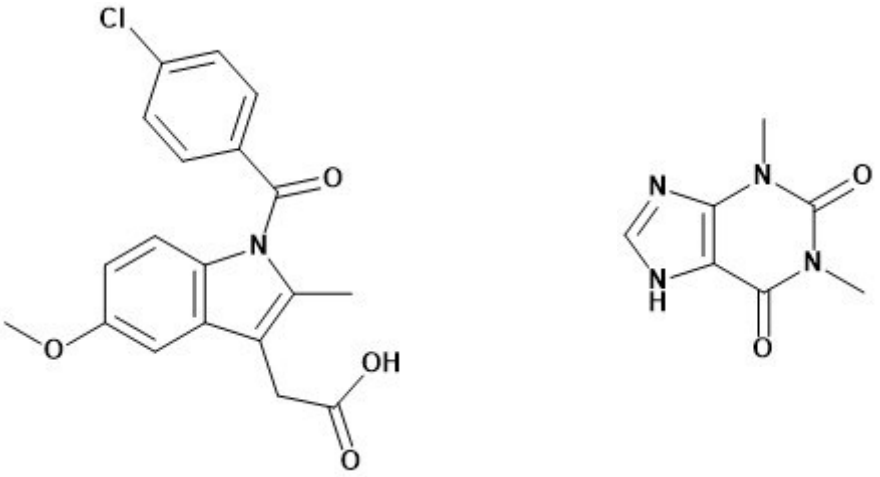
Pokud by tomu tak skutečně bylo, odstraněním části (možná až poloviny, viz kapitola 2.2.3.2 o výsledcích SAXRD) těchto domén bychom připravili SC o část složky zabezpečující vysokou EI, a dSC by mělo vykazovat EI výrazně sníženou. Pozorovaný pokles byl přitom signifikantní, ale ne tak výrazný, pouze cca o 20 % (viz tabulka 4 shrnující relativních permeability).

Je však nutné mít na paměti odlišnost souvislých membrán tvořených čistým Chol a domén separovaného Chol ve SC, o jejichž (ne)propojenosti, velikosti ani zákonitostech propustnosti fázových rozhraní mezi nimi a ostatními lipidy nemáme dostatek informací. Ačkoli se Chol domény na základě zmíněného studia Chol membrán zdají být méně propustné pro ionty, bude ve SC tato vlastnost modulována propustností fázových rozhraní, která může být vysoká.[3] Takový pohled by vysvětloval nepřítomnost tak výrazné změny v impedanci dSC. K dalšímu výraznějšímu zvýšení permeability pro ionty pak došlo u modelových membrán po dalším snížení obsahu Chol na 20 až 0 %, kdy podle SAXRD separované domény chybí.[3]

Násobně zvýšená permeabilita čistě Chol membrán pro vodu, TH a IND, která velmi volně napodobuje permeabilitu separovaných domén (nikoli však fázových rozhraní),[3] může částečně vysvětlit také snížení permeability u dSC, z něhož byla část těchto separovaných domén odstraněna.

5.2.2.3 Propustnost modifikovaného SC pro modelové látky

Permeabilita SC i modelových membrán byla testována také pomocí dvou modelových permeantů s odlišnými vlastnostmi (viz obrázek 12). Theofylin (TH) má malou molekulu (180,16 g/mol) a vyvážené hydro-lipofilní vlastnosti (logP 0), naproti tomu indomethacin (IND) má přibližně dvojnásobnou molekulovou hmotnost (357,8 g/mol) a je značně lipofilní (logP 4,3).[118, 119]

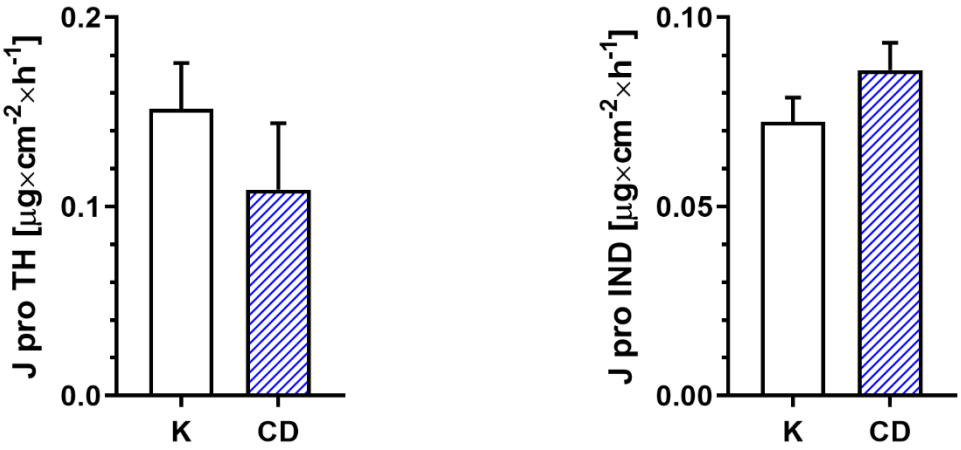


Obrázek 12 *Strukturní vzorce indomethacinu a theofylinu.*

Na základě rozdílů v těchto vlastnostech zvolených permeantů je předpokládáno jejich odlišné chování při průchodu komplexní membránou, jakou je SC. Je známo, že SC může vykazovat rozdílnou permeabilitu pro látky různých vlastností a flux těchto látek přes SC může být značně odlišný.[105] Může tedy vypovídat také o různém vlivu změn v lipidovém složení SC na různý způsob průchodu látek skrze SC.

Obě látky byly nanášeny na testované SC ve formě suspenze v 60% PG. (5% TH, 2% IND). Použití suspenzního donoru představuje elegantní způsob, jak v donoru po dobu trvání pokusu zajistit stálou koncentraci rozpuštěného permeantu, neboť úbytek rozpuštěné modelové látky z donorového roztoku do akceptorového média je kompenzován jejím dalším rozpouštěním z pevných částic.

Změny propustnosti SC po odstranění části Chol extrakcí CD (CD) v porovnání s propustností kontrolního SC, z nějž Chol odstraňován nebyl (K), pro obě modelové látky jsou znázorněny grafy 9 a 10 na následující straně. Propustnost membrány v tomto případě vyjadřuje flux modelové látky přes membránu. Čím je hodnota fluxu nižší, tím nižší je propustnost membrány pro tuto látku.



***Graf 9** (vlevo) Flux (J) TH **a graf 10** IND (vpravo) Flux (J) přes kontrolní (K) a cyklodextrinovou extrakcí modifikované (CD) SC. Změny nejsou ve srovnání s kontrolou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 10$.*

5.2.2.1.1 Flux TH přes modifikované SC

Permeabilita dSC pro TH (malá molekula s vyváženou lipofilitou) představovaná hodnotou fluxu byla oproti kontrole snížena přibližně o 30 %, avšak s vysokou hodnotou směrodatné odchylky, jak je vidět v grafu 9. Toto mírné zlepšení bariéry vůči prostupu TH odpovídalo výsledkům studia modelových membrán s 80 % běžného množství Chol.

I když není zlepšení bariéry statisticky signifikantní (stejně jako u modelových membrán s podobnou hladinou Chol), velmi slibně koreluje právě s výsledky pokusů pro modelové membrány s množstvím Chol sníženým o 20 %. U membrán pak došlo s dalším snižováním podílu Chol ke statisticky významnému snížení fluxu (plynulý pokles až do dosažení minimální hodnoty při obsahu 40 % fyziologického množství Chol) a tím potvrzení trendu patrně počínajícího již při poklesu množství Chol na 80 %.[3]

Mírné snížení permeability a s ním spojené zlepšení bariéry vůči TH u námi upraveného SC je tedy zcela ve shodě s výsledky pozorovanými na syntetických membránách na bázi hCer.

5.2.2.1.2 Flux IND přes modifikované SC

Druhou modelovou látkou jejíž prostup dSC jsme sledovali, byl lipofilnější indomethacin s rozměrnější molekulou. Flux IND vykazoval u dSC oproti fluxu TH naopak vzestupný trend a byl nepatrně vyšší než flux přes kontrolní SC, avšak opět bez statistické signifikance, jak je patrné z grafu 10.

Tento výsledek pro *ex vivo* SC odpovídá též nesignifikantnímu zvýšení fluxu IND přes modelové membrány s 80% obsahem Chol a u obou modelů shodně naznačuje při úbytku Chol mírnou změnu spíše směrem k vyšší propustnosti pro IND. Při 40 % Chol ale propustnost membrán náhle signifikantně poklesla, takže byla při tomto obsahu Chol nejnižší, což značí nejlepší bariéru. S dalším poklesem Chol podílu v membránách na 20% a 0% se pak permeabilita opět vrátila k vyšším hodnotám bez signifikantní odlišnosti od kontroly podobně jako v případě TH.[3]

5.2.2.4 Souhrn permeabilitních experimentů

Výsledky permeabilitních experimentů shrnuje následující tabulka 4 doplněná o výsledky stejných experimentů na modelových membránách s odpovídajícím obsahem Chol.[3] Hodnoty charakterizující propustnost SC a modelových membrán pro každý ze 4 markerů jsou doplněny hodnotami relativních permeabilit, tj. poměrů permeabilitních ukazatelů pro SC či membrány s nižším obsahem Chol a pro kontrolní SC či membrány.

Tabulka 4 *Souhrnné porovnání permeabilit a relativních permeabilit SC a modelových membrán na bázi hCer[3] pro 4 modelová agens použitá v předkládané práci.*

	flux TH [μg × cm^{-2} × h^{-1}]	**flux IND [μg × cm^{-2} × h^{-1}]**	**EI [kΩ × cm^2]**	**TEWL [g × h^{-1} × m^{-2}]**
kontrolní SC (100 % Chol)	0,15 ± 0,03	0,07 ± 0,01	69 ± 3	10,87 ± 0,49
dSC (78 ± 3 % Chol)	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,01	54 ± 5	10,5 ± 0,40
Relativní permeabilita dSC/SC [%]	**73**	**129**	**78**	**97**
membrána (100 % Chol)[3]	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	203 ± 15	8,64 ± 0,01
membrána (80 % Chol)[3]	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	130 ± 14	6,76 ± 0.01
Relativní permeabilita 80 %/100 % Chol [%][3]	**90**	**117**	**64**	**78**

Je třeba si uvědomit, že číselné hodnoty permeabilit SC a modelových membrán nelze přímo srovnávat, neboť jsou odlišné, podobně jako samotné modely. Jedná se mimo jiné o modely

s odlišnou tloušťkou. Zatímco SC může mít v závislosti na hydrataci tloušťku rámcově několik desítek μm,[36, 122] modelové membrány představují především simulaci lipidové matrix, která ve zdravém SC tvoří ~10 % celkového objemu.[123] Modelové membrány se za účelem přiblížení vlastnostem SC vytváří z většího množství lipidů, než by obsahovala stejná plocha SC, přesto nedosahují tloušťky SC. Především však modelové membrány postrádají korneocytární složku včetně CLE. Proto má skutečný význam srovnávat spíše poměry hodnot upravených vzorků (dSC, membrány se sníženým obsahem Chol) vůči kontrolám (SC, kontrolní membrána s množstvím Chol odpovídajícím fyziologickému), tedy relativní permeability. Na nich můžeme, jak bylo výše nastíněno, pozorovat trendy, které ukazují, že deplece Chol má podobný vliv na sledované parametry u čistě lipidových modelových membrán i u *ex vivo* lidského SC se všemi jeho zbývajícími součástmi. Takováto shoda pak do značné míry potvrzuje relevanci výsledků získaných na syntetických membránách, a tedy jejich vhodnost jako modelu pro tento konkrétní účel studia.

Výsledky našich studií permeability celkově ukazují, že za klidových podmínek je esenciální bariérová funkce SC, tedy restrikce ztrát vody z těla a průniku potenciálních škodlivin do organismu, pravděpodobně relativně nezávislá na určitých změnách v obsahu Chol.

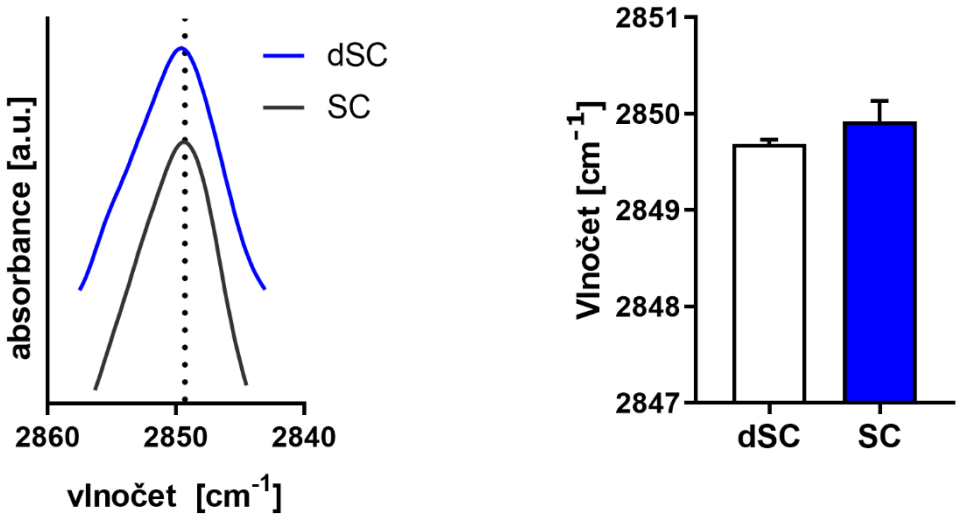
5.2.3 Mikrostruktura modifikovaného SC

5.2.3.1 IR

IR spektra dSC nevykazovala známky signifikantních změn v konformaci a laterálním uspořádání lipidových řetězců oproti spektrům kontrolního SC. To je možné demonstrovat na pásu symetrické valenční vibrace methylenové skupiny, jejíž vlnočet u dSC ($2849{,}6 \pm 0{,}2$ cm^{-1}) byl takřka shodný s vlnočtem téže vibrace ve spektrech kontrolních vzorků ($2849{,}6 \pm 0{,}1$ cm^{-1}). Tato hodnota nižší než 2850 cm^{-1} je považována za fyziologickou a odpovídá vysoké organizovanosti uspořádání lipidových řetězců, která se považuje za indikátor dobrých bariérových vlastností kůže.[3, 124, 125] Posun maxima pásu této vibrace k vyšším hodnotám vlnočtu by pak indikoval nárůst množství prostorově rozvolněnějších řetězců v *gauche* konformaci.[36, 126] Tento posun však nebyl u měřených vzorků pozorován. O nárůstu množství konformačně rozvolněnějších řetězců by mohlo svědčit také případné zvýšení hodnoty šířky v polovině výšky zmíněného vibračního pásu.[127] Ani tato změna nebyla pozorována.

Výsledky studia dSC pomocí IR jsou prezentovány formou pásu valenční vibrace methylenové skupiny v grafech 11 a 12. Je patrné, že hodnota vlnočtu této vibrace vzorků dSC zůstává

pod hranicí 2850 cm^{-1} a neliší se od kontrolních vzorků (porovnání formou sloupcového grafu vpravo), což svědčí o nezměněném organizovaném uspořádání lipidových řetězců stejně jako porovnání hodnot šířky v polovině výšky pásu ve spektrech dSC a kontrol.



Graf 11 *(vlevo) Výňatek z IR spekter zobrazující pás symetrické valenční metylenové vibrace. Křivka černé barvy odpovídá kontrolnímu SC, modrá křivka odpovídá dSC.* ***a graf 12*** *(vpravo) Porovnání hodnot polohy maxim tohoto pásu u kontrolního SC (K) a dSC (CD). Změna není statisticky významná na hladině významnosti $p < 0,05$. $N \geq 6$.*

Tyto výsledky jsou ve shodě se studií, která se zabývala extrakcí Chol ze SC potkanů pomocí různě substituovaných β-cyklodextrinů.[108] Ačkoli, jak je zmíněno v kapitole 5.1, bylo jejich pozorování selektivity úbytku Chol v potkaním SC odlišné od našeho, a selektivita byla zjištěna u HPβCD, spíše než u MβCD, jejich analýza modifikovaného SC se sníženým obsahem Chol pomocí infračervené spektroskopie stejně jako naše neukázala na významné změny mikrostruktury.[108]

Konformace a laterální uspořádání zůstaly zachovány i v případě modelových membrán s obsahem Chol podobným dSC, jejichž spektra také vypovídala o vysoké uspořádanosti. FTIR spektroskopie navíc neodhalila žádné či pouze nepatrné změny uspořádání vlivem postupné Chol deplece i v případě modelových membrán s obsahem Chol výrazně nižším, než se podařilo docílit u dSC. To znamená, že u modelových membrán zůstaly lipidy dobře organizované i po odstranění části Chol odpovídající separovaným doménám.[3]

Podle zjištění Mojumdara et al. Chol zvyšuje relativní zastoupení ortorhombického uspořádání lipidů v modelových membránách tvořících LPP (40 % Cer EOS)[79] a tento vliv Chol na uspořádání řetězců je popsán i v případě dvojvrstev jiných lipidů s dlouhými uhlovodíkovými řetězci.[128, 129] My jsme však u dSC, kde chybělo přibližně 20 % Chol, kromě drobných nuancí nepozorovali žádné signifikantní změny v uspořádání lipidů. Tyto změny navíc nebyly pozorovány ani u modelových membrán s postupně se snižujícím obsahem Chol. MK a hCer dokonce vykazovaly vysokou organizovanost řetězců nezávisle na množství přítomného Chol, a i samotné hCer nebo samotné mastné kyseliny s dlouhými řetězci zaujímaly v podobně vytvořených membránách většinově ortorhombické uspořádání.[3]

Tato zjištění poněkud umenšují předpokládaný význam Chol v udržování ortorhombického uspořádání bariérových lipidů. Pokud by však poruchy struktury byly omezeny pouze na některé lipidy či některé oblasti a struktury, připadala by v úvahu možnost, že tyto anomálie nejsme schopni pomocí našich měření zachytit, že odezva této pozměněné a minoritní skupiny je při měření překryta odezvou uspořádané většiny ostatních lipidů, případně dalších struktur SC. Stejně dobře je však možné, že směs tří hlavních skupin bariérových lipidů je připravena na možné změny a narušení homeostázy, a že heterogenita MK a Cer lidského SC je schopna do jisté míry zajistit náhradu zásahů do obsahu Chol.

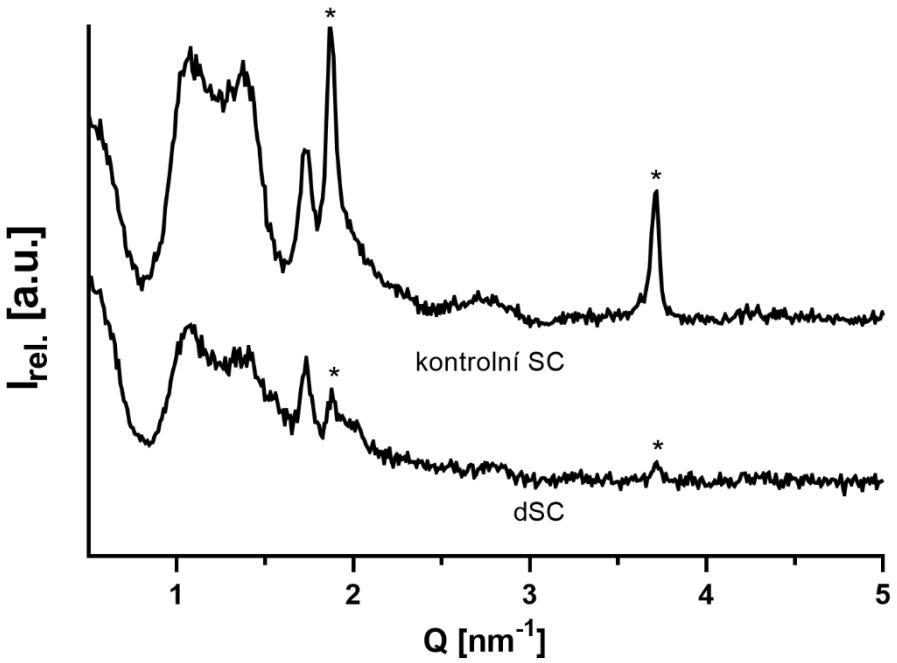
Bylo by škoda nezmínit, že byla pozorována i vibrace charakteristická pro samotný Chol při 1055 cm^{-1} přisuzovaná deformační vibraci kruhů cholesterolového skeletu.[130, 131] Chol byl v dřívějších pracích považován v IR spektrech SC za tichý.[132] Tato vibrace byla patrná ve spektrech modelových membrán, kde se spolu se snižujícím se % Chol lineárně snižovala její intenzita,[3] i ve spektrech SC, kde však nebyla dobře čitelná.

2.2.3.2 SAXD

Rentgenovou difrakční analýzou bylo studováno lamelární uspořádání lipidů dSC po odstranění části Chol i SC bez zásahů. Výsledkem analýzy vzorků jsou difraktogramy (graf 13 na následující straně), kde na ose x je vynesena reciproká vzdálenost případných fází a na ose y intenzita reflexí.

Difraktogramy celého SC jakožto *ex vivo* tkáně jsou podstatně hůře čitelné než ty z lipidových modelů, především kvůli přítomnosti korneocytů a vlivem většího množství dalších interferujících struktur. I proto dosud nebyla publikována studie, která by nalezla SPP a LPP s jednoznačnou periodicitou právě v *ex vivo* SC. Ani v našem případě tomu nebylo jinak a přestože reflexe, které by mohly odpovídat oběma smíšeným lamelárním fázím, jsou

v difraktogramech patrné, není je možné s uspokojivou mírou jistoty přiřadit konkrétním fázím s jednoznačnou periodicitou.



Graf 13 *Difraktogramy kontrolního a Chol-depletovaného SC. Hvězdičkou jsou označeny reflexe fáze separovaného Chol. $I_{rel.}$ je relativní intenzita, Q reciproká vzdálenost.*

Jsou však patrné dvě reflexe (v grafu 13 označené hvězdičkami), které s nejvyšší pravděpodobností odpovídají fázi separovaného Chol s mezirovinnou vzdáleností přibližně 3 nm. Mezirovinná vzdálenost fází separovaného Chol se u dSC oproti kontrole signifikantně nelišila, ale byla pozorována odlišná intenzita obou příslušných reflexí. Zjevný a statisticky významný úbytek v intenzitě těchto reflexí u dSC oproti kontrole můžeme považovat za potvrzení předpokladu, že Chol, který ze SC odstraňujeme extrakcí, je převážně ten ze separovaných domén, kdežto Chol ve smíšené lipidové fázi zůstává nedotčen.

Východiskem pro naše studium vlivu odstranění separovaného Chol na permeabilitu a mikrostrukturu SC byl mimo jiné předpoklad, že snížením obsahu Chol v *ex vivo* SC extrakcí přibližně na 80 % (dSC) dojde především k odstranění části domén separovaného Chol a Chol přítomný v lamelách zůstane nedotčen. Ve prospěch našeho předpokladu o úbytku Chol primárně v separované fázi svědčí i tyto výsledky SAXRD měření dSC, které ukazují signifikantní snížení intenzity reflexí fáze separovaného Chol oproti kontrole. Nesignifikantní změny intenzity byly pozorovány i v případě reflexí smíšených lipidových fází, které ale z důvodu obtížné čitelnosti difraktogramů není možné s přijatelnou jistotou přiřadit

konkrétním fázím. Můžeme se však domnívat, že extrakcí CD byl odstraněn především fázově separovaný Chol, kdežto Chol zapojený do tvorby lamelárních fází s ostatními lipidy zůstal pravděpodobně z většiny nedotčen.

Tuto domněnku dále podporují výsledky dřívějších pokusů na modelových membránách, kdy v modelových membránách s 60 % Chol byly pomocí SAXRD detekovány LPP, SPP i fáze separovaného Chol, avšak v membránách se 40 % Chol při zachování LPP i SPP nebyla již fáze separovaného Chol patrná a s největší pravděpodobností tedy došlo k její eliminaci.[3] Pro předkládanou práci má dále hodnotu zjištění, že fáze separovaného Chol představuje více než 40 % (až 60 % obvyklého množství Chol). To je ve shodě s dříve publikovaným údajem, že separovaný Chol představuje asi polovinu celkového Chol.[2, 79] Extrakcí cca 20 % Chol ze SC jsme tak odstranili nejvýše asi polovinu separovaného množství.

Naše výsledky jsou zároveň ve shodě s výsledky z modelových membrán, kde k pozorovatelným výraznějším změnám v uspořádání lipidů docházelo až při podstatnějším snížení množství Chol,[3] a potvrzují zjištění z IR, totiž že odstranění cca 20 % přirozeně přítomného Chol výrazně nenarušuje mikrostrukturu lipidů a bariérová funkce SC zůstává v tomto smyslu i po takovém zásahu zachovaná. Fakt, že takovýto zásah do SC neměl vliv na jeho bariérovou funkci, lze dále podpořit výsledky z permeačních experimentů na modelových membránách, kdy bylo pozorováno, že k optimální bariérové funkci postačuje 40 % fyziologicky přítomného množství Chol, který se zcela mísí s ostatními lipidy v lamelárních fázích a fázi separovanou již netvoří.[3]

V uměle připravených membránách na bázi hCer s odpovídajícím obsahem Chol byly detekovány obě lamelární fáze, SPP i LPP, s mezirovinnými vzdálenostmi odpovídajícími současným poznatkům o SC, a stejně jako v dSC také fáze separovaného Chol. Bylo patrné postupné snižování intenzity reflexí separovaného Chol s jeho snižujícím se celkovým obsahem, podobně jako v případě dSC. Reflexe separovaného Chol v modelových membránách zcela vymizely při 40 % původního množství celkového Chol.[3]

5.3 Biologický význam fázově separovaného Chol v kožní bariéře

5.3.1 Tvorba vitamínu D v kůži a 7-dehydrocholesterol reduktasa

Jestliže nadbytečný Chol tvořící separovanou fázi primárně neslouží jako aktivní součást kožní bariéry, jak se zdá dle našeho pozorování, nabízí se rozmanité možnosti, jak jeho přítomnost zdůvodnit. Separované domény by například mohly představovat způsob, jakým se tělo zbavuje případného nadbytečného Chol. Proti této představě mluví relativně stabilní obsah Chol ve SC

napříč studiemi i testovanými dobrovolníky, kteří téměř jistě měli rozdílné dlouhodobé hladiny lipidů v krvi.

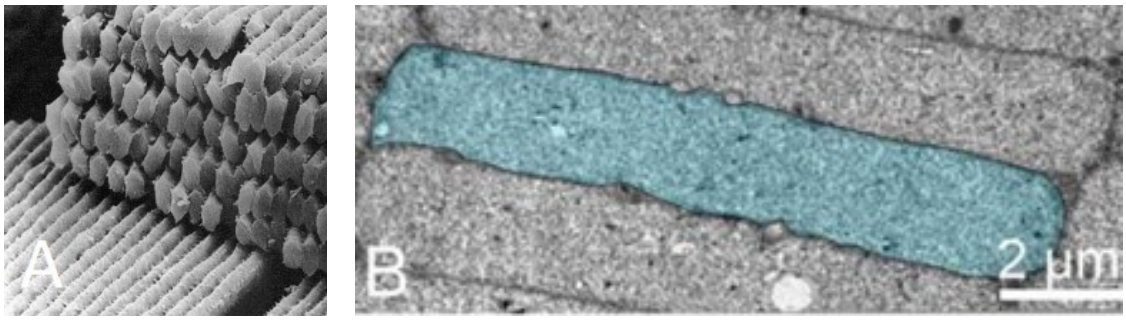
Je známo, že Chol je tvořen *de novo* epidermálními buňkami a jeho obsah v keratinocytech se směrem ke SC zvyšuje. Nebylo ale dosud prokázáno, že by všechen Chol přítomný v epidermis byl tamtéž tvořen, a nemohl tedy pocházet z krevního řečiště, tedy buď získaný alimentární cestou nebo z produkce jiných orgánů. Buňky *stratum basale* jsou v kontaktu s kapilárami v dermis a exprimují LDL receptory. Přesto se zdá, že hladina Chol v séru nemá na množství Chol v epidermis vliv.[133, 134]

Přes tato zjištění se nabízí otázka, zda se takto epidermis nezbavuje např. jiných sterolů, které by byly přeměňovány na Chol. Jedním z adeptů by mohl být 7-dehydrocholesterol (7-dehydroChol), jenž v kůži slouží jako substrát pro fotochemickou reakci, při níž z něj za působení UVB záření vzniká vitamin D_3. Za fyziologických podmínek je množství 7-dehydroChol dostupného pro přeměnu mnohonásobně vyšší než množství vyprodukovaného vitaminu D_3.[13, 135] Chol ve SC tak s nejvyšší pravděpodobností alespoň z části pochází z tohoto zdroje, a separované domény by mohly být dost dobře pouze způsobem, jakým se epidermis zbavuje odpadního sterolu, který nebyl využit k přeměně na vitamín D_3.

Přeměna 7-dehydroChol na Chol se děje redukcí dvojné vazby na C7 činností 7-dehydrocholesterol reduktasy, enzymu, který je posledním krokem syntézy Chol (Kandutsch-Russellovou cestou). Byla také nalezena zřejmá souvislost mezi různými genetickými variantami 7-dehydroChol reduktasy a rozdíly v hladinách cirkulujícího 25-hydroxyvitaminu D (kalcifediolu).[136] Při absenci funkční 7-dehydroChol reduktasy vede akumulace 7-dehydroChol spolu s nízkými hladinami Chol k závažné vývojové poruše Smith-Lemli-Opitz syndromu.[137-140] Podle všeho však může nižší aktivita tohoto enzymu do jisté míry představovat pro organismus i výhodu.[136, 141] Snížená aktivita enzymu totiž vede ke hromadění 7-dehydroChol a zvýšení tvorby vitaminu D_3. Aktivita 7-dehydroChol reduktasy je posttranslačně regulována konečným produktem dráhy, cholesterolem, který urychluje degradaci enzymu v proteasomu.[138] Jistá přemíra Chol v místech s aktivitou 7-dehydroChol je tak i pojistkou dostatečné nabídky substrátu pro produkci vitaminu D_3.

5.3.2 Cholesterol v oční čočce a bariéra vůči kyslíku

Další cestu k vysvětlení funkce domén separovaného Chol v kůži by mohlo poskytnout srovnání s vlákny oční čočky, *fibrae lentis*. Velmi zjednodušeně se jedná o soubor koncentrických vrstev protáhlých šestibokých buněk (viz obr. 13), v horních vrstvách převážně bezjaderných, které tvoří vnější obal čočky. Tyto buňky vznikají z níže uložených progenitorů, projdou řízenou buněčnou smrtí podobně jako korneocyty a jsou asi ze 40 % vyplněné specializovanými proteiny a převážně zbavené organel, díky čemuž jsou průhledné.[142] Plasmatická membrána *fibrae lentis* obsahuje podobně vysoké množství Chol jako membrány lipidové matrix SC, molární poměr Chol a fosfolipidů je zde 1:1 až 4:1.[143-145]



Obrázek 13 A *Snímek charakteristického hexagonálního průřezu vláken čočky (fibrae lentis) pořízený pomocí skenovací elektronové mikroskopie.*[146] ***B*** *Snímek vlákna čočky člověka pořízený transmisní elektronovou mikroskopií. Jedna buňka o velikosti přibližně 2 µm × 10 µm je zvýrazněná modře. Osa buňky je kolmá na linii průběhu povrchu čočky.*[145]

Zdá se, že dobře organizované domény Chol jsou pro fyziologii těchto buněk významné, a to zejména k zajištění propustnosti čočky jakožto refrakční struktury oka pro světlo, a bránění nežádoucí agregaci proteinů,[143, 144] Chol domény činí dvouvrstvu fosfolipidové buněčné membrány hladší, čímž omezují nežádoucí světelné jevy a podporují její propustnost pro světlo.[147] Saturace dvojvrstvy Chol, jištěná právě separovanými doménami Chol, pravděpodobně přispívá ke stabilitě vlastností čočky při proměnlivém fosfolipidovém složení membrán. V neposlední řadě pak uspořádané domény separovaného Chol činí membránu rezistentní vůči průchodu kyslíku.[147] Zjištění, jaký vliv má přítomnost separovaného Chol ve SC na jeho prostupnost pro kyslík by do budoucna mohlo přinést velmi zajímavé informace pro srovnání.

5.3.3 Stárnoucí epidermis

Odpověď na otázku po funkci fyziologického množství Chol v kožní bariéře můžeme hledat také srovnáním našich výsledků se situacemi, kdy je Chol v kožní bariéře méně, ať už vlivem chorob nebo stárnutí organismu.

Snižující se syntéza Chol ve stáří negativně ovlivňuje homeostázu kožní bariéry. Je znám pokles v syntéze Chol i v aktivitě HMG-CoA-reduktasy u starých zvířat.[148] Stejně jako celkový pokles množství extracelulární matrix ve SC lidí nad 75 let věku a starších myší, který sice nenarušuje normální bariérovou funkci v klidovém stavu, ale při akutním poškození bariéry je jím oslabená celková reakce. Ta spočívá ve zvýšení uvolňování lamelárních tělísek a syntézy lipidů, a obvykle vede k rychlému obnovení homeostázy SC.[148, 149] U starých myší navíc topické podání exogenního Chol či mevalonátu významně zlepšilo homeostázu kožní bariéry.[149, 150] Tyto závěry zdůrazňují význam vysokého množství Chol v povrchových vrstvách kůže nikoli jen pro její bariérovou funkci v klidu, ale zejména při akutním poškození této tkáně. Naše zjištění, že určité snížení množství Chol nevede přímo ke zhoršení bariéry, je s těmito pozorováními v souladu, přestože u pozorovaných SC ať už lidí či zvířat vysokého věku se jednalo o jistý pokles ve všech skupinách bariérových lipidů.

Naše *in vitro* experimenty bohužel nedovolují zkoumat mechanismy narušení a obnovy homeostázy po akutním poškození kožní bariéry. Ani tento děj však nemůžeme ve výčtu možných významů fyziologicky vysokého množství Chol ve SC zanedbat.

5.3.4 Recesivní X-vázaná ichtyosa

Jiným stavem, kdy je Chol v kožní bariéře méně, je onemocnění recesivní X-vázanou ichtyosou.[50, 151, 152] Jedná se o úplné nebo částečné chybění aktivity cholesterolsulfatasy, enzymu, který katalyzuje přeměnu cholesterolsulfátu (CholS) na Chol.[153] Hromadící se CholS navíc inhibuje HMG-CoA-reduktasu, syntéza Chol je tak ve výsledku narušena na více úrovních.[50]

Pokud se na problematiku RXLI podíváme letmo, vidíme defekt v enzymu, jenž se podílí na metabolismu Chol v kožní bariéře, který se projevuje poruchou funkce kůže. V nepřítomnosti enzymu nevzniká dostatek Chol, a tak je jeho poměr vůči Cer a MK podstatně nižší než 1:1:1 (uvádí se asi poloviční)[151], a kůže v různé míře vykazuje znaky onemocnění. To představuje pravý opak našeho experimentálního pozorování, podle nějž úbytek obsahu Chol v *ex vivo* SC parametry funkční bariéry kůže spíše zlepšil, aniž by poškodil mikrostrukturu. Pozorování na modelových membránách pak dokonce ukázalo pro bariérovou funkci nejvhodnější vzájemný poměr Chol, Cer a FFA 0,4:1:1, tedy s méně než polovinou Chol

přítomného u zdravých jedinců.[3] Bylo by důvodné na základě takových zjištění očekávat, že bariérová funkce kůže pacienta trpícího RXLI bude ve srovnání se zdravým jedincem ještě lepší právě proto, že obsahuje méně Chol.

Při detailnějším pohledu zjistíme, že kožní bariéra pacienta s RXLI zpravidla vykazuje nanejvýše mírné abnormality. Za klidového stavu se kůže těchto pacientů může jevit naprosto zdravá,[152] což je v souladu s naším pozorováním, kdy ztrátou části Chol ze SC nedocházelo k narušení bariérové funkce a naše zjištění, že bariéra není snadno narušena ztrátou části Chol, tedy není mylné. To se týká statické bariéry, kterou umíme dostupnými metodami popsat *in vitro*. Defekt se ale, stejně jako u zestárlé kůže, projeví ve chvíli, kdy dojde k akutnímu poškození bariéry. Ta se bude u pacienta s RXLI obnovovat signifikantně déle než u zdravého probanda.[152, 154] Tehdy totiž přichází na řadu dynamická složka fungování kožní bariéry, aktivní zachovávání homeostázy, a na něm se podílí celá epidermis. Kůže pacienta s RXLI, která se vlivem defektu cholesterolsulfatasy po akutním poškození v iniciálních fázích reparace opožďuje syntézou a uvolňováním Chol za syntézou a uvolňováním ostatních bariérových lipidů,[152, 154] bude vykazovat významné změny v propustnosti pro vodu, která bude v našem případě akutního poškození kůže i pětinásobně zvýšená. To může být způsobeno nejen nedostatečnou tvorbou Chol, ale i tím, že pacientovo SC obsahuje také zvýšené množství CholS, jehož možný efekt na destabilizaci bariéry proti prostupu vody může být významný. [151]

6. Závěr

Předmětem této práce bylo studium vlivu deplece cholesterolu v *ex vivo* lidském *stratum corneum* na permeabilitu a mikrostrukturu této tkáně a srovnání získaných dat s výsledky získanými dříve na umělých lipidových membránách se sníženým obsahem cholesterolu.

Byla vyvinuta metoda parciální extrakce cholesterolu ze *stratum corneum* s minimálním zásahem do množství ostatních bariérových lipidů. Po zjištění nedostatečné selektivity extrakce pomocí 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu, který dle literatury extrahoval selektivně cholesterol z potkaního *stratum corneum*, jsme jej jednoduchou zkouškou rozpustnosti srovnali s methyl-β-cyklodextrinem. Na základě slibného poměru rozpustnosti cholesterolu a směsi mastných kyselin ve vodném roztoku methyl-β-cyklodextrinu jsme pak tento cyklodextrin otestovali také při extrakci lidského *stratum corneum*. I zde došlo k časově závislému úbytku cholesterolu v extrahovaných tkáních, na rozdíl od 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu jsme však nepozorovali zásah do obsahu ostatních lipidů, a proto byla dále používaná metoda extrakce založena na použití vodného roztoku methyl-β-cyklodextrinu.

Pomocí extrakce vodným roztokem methyl-β-cyklodextrinu se podíl cholesterolu ve *stratum corneum* určeném pro další studium podařilo snížit na 78 % původního množství, což je srovnatelné s modelovými membránami s 80% obsahem cholesterolu. Odstraněných 20 % cholesterolu může představovat až polovinu separovaného cholesterolu ve *stratum corneum*. Dosažení nižšího obsahu cholesterolu ve *stratum corneum* by bylo možné, ale nikoli bez zasažení dalších lipidových složek této bariéry.

Vzhledem k tomu, že při permeačních pokusech jsou donorové vzorky nanášené v 60% propylenglykolu, zkoumali jsme, zda i tento neextrahuje lipidy *stratum corneum* a neovlivňuje tímto způsobem jeho permeabilitu, jak bylo upozorňováno.[88] Po 24h extrakci *stratum corneum* 60% propylenglykolem jsme však nenalezli signifikantní úbytek v žádné ze tří převažujících skupin bariérových lipidů, čímž bylo ověřeno, že výsledky 24h permeačních experimentů na *stratum corneum* nejsou zkreslovány extrakcí cholesterolu propylenglykolem, který je složkou donorového vehikula.

Studium *stratum corneum* se sníženým obsahem cholesterolu pomocí infračervené spektroskopie a rentgenové difrakční analýzy neodhalilo známky porušení mikrostruktury a organizace lipidů. Intramolekulární organizace řetězců pozorovaná pomocí infračervené spektroskopie vypovídala o stejně organizovaném uspořádání jako u kontrolního *stratum*

corneum. Rentgenová difrakční analýza neukázala přítomnost změn v lamelárních fázích po odstranění části cholesterolu oproti kontrole. Byla nalezena fáze separovaného cholesterolu s rozdíly v intenzitě u *stratum corneum* po odstranění části cholesterolu, úbytek cholesterolu tedy nastal v této a nikoli smíšené lipidové fázi. To odpovídá výsledkům z příslušných modelových membrán.[3]

Ačkoli jsme ze *stratum corneum* odstranili jen přibližně 20 % cholesterolu a pozorovali především trendy bez statistické signifikance, relativní permeability (vztažené na kontrolní *stratum corneum*) jsou v dobré shodě s relativními permeabilitami modelových membrán s 80 % cholesterolu.[3] Propustnost pro ionty reprezentovaná hodnotou elektrické impedance byla mírně, avšak statisticky významně zvýšená. Bariéra proti prostupu vody zůstala zachována, stejně jako bariéra proti prostupu indomethacinu, modelového permeantu s větší molekulou a vyšší lipofilitou. Bariéra proti prostupu menšího theofylinu s vyváženou lipofilitou však byla mírně zvýšena stejně jako u modelových membrán, kde tento trend narůstal se snižujícím se podílem cholesterolu. Všechny tyto trendy odpovídají výsledkům pozorovaným na modelových membránách, kde se jako optimální obsah cholesterolu z hlediska bariérových vlastností jevilo 40 % obvyklého množství.[3]

Výsledky z extrahovaného *ex vivo* lidského *stratum corneum* tedy potvrzují výsledky získané na modelových membránách, které se tak pro tento konkrétní účel zdají být vhodným modelem umožňujícím navodit podmínky v případě *ex vivo stratum corneum* nedosažitelné, navíc bez velké spotřeby lidských tkání, jejichž získání může být komplikované.

Z výsledků pak vyplývá, že obsah cholesterolu, který se již nepodílí na tvorbě lamelárních fází a tvoří separované fáze ve směsi bariérových lipidů (pravděpodobně přibližně 50 % celkového fyziologického obsahu cholesterolu) nepřispívá k bariérové funkci *stratum corneum*. Statická bariéra se naopak jeví lépe funkční bez tohoto nadbytečného množství.

Přesný původ a funkce nadbytečného fázově separovaného cholesterolu ve *stratum corneum* tedy zůstávají nevysvětleny. Jestliže však funkce cholesterolových domén nespočívá v příspěvku k bariérové funkci v klidovém stavu, může být součástí mechanismů dynamického udržování homeostázy epidermis nebo může být její skutečná funkce s bariérovou funkcí nesouvisející a zcela specifická. Z dalších možností se nabízí např. role při procesu tvorby prekurzorů vitaminu D v dermis, či modulace průchodu kyslíku skrze *stratum corneum.*

Literatura

1. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2014,** *1838* (8), 2115-2126.

2. Mojumdar, E.; Gooris, G.; Groen, D.; Barlow, D. J.; Lawrence, M.; Demé, B.; Bouwstra, J., Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2016,** *1858* (8), 1926-1934.

3. Sochorová, M.; Audrlická, P.; Červená, M.; Kováčik, A.; Kopečná, M.; Opálka, L.; Pullmannová, P.; Vávrová, K., Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *Journal of colloid and interface science* **2019,** *535*, 227-238.

4. Madison, K. C., Barrier function of the skin:"la raison d'etre" of the epidermis. *Journal of investigative dermatology* **2003,** *121* (2), 231-241.

5. Gerard, J. T., *Principles of Anatomy and Physiology 14th Edition*. Incorporated: 2013.

6. Mousavi, P.; Haran, F.; Jez, D.; Santosa, F.; Dodge, J. S., Simultaneous composition and thickness measurement of paper using terahertz time-domain spectroscopy. *Applied optics* **2009,** *48* (33), 6541-6546.

7. Bibel, D. J.; Aly, R.; Shinefield, H. R., Antimicrobial activity of sphingosines. *Journal of Investigative Dermatology* **1992,** *98* (3), 269-273.

8. Niyonsaba, F.; Nagaoka, I.; Ogawa, H., Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties. *Critical Reviews™ in Immunology* **2006,** *26* (6).

9. Niyonsaba, F.; Suzuki, A.; Ushio, H.; Nagaoka, I.; Ogawa, H.; Okumura, K., The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *British Journal of Dermatology* **2009,** *160* (2), 243-249.

10. Elias, P. M.; Wakefield, J. S., Skin barrier function. In *Nutrition for healthy skin*, Springer: 2010; pp 35-48.

11. Williams, A., *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice*. Pharmaceutical Press: 2003.

12. Zhu, H.; Bunn, H. F., How do cells sense oxygen? *Science* **2001,** *292* (5516), 449-451.

13. PREVITAMIN, C. P. O., The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* **1981,** *76*, 51-58.

14. Nguyen, A. V.; Soulika, A. M., The dynamics of the skin's immune system. *International journal of molecular sciences* **2019,** *20* (8), 1811.

15. Driskell, R. R.; Jahoda, C. A.; Chuong, C. M.; Watt, F. M.; Horsley, V., Defining dermal adipose tissue. *Experimental dermatology* **2014,** *23* (9), 629-631.

16. Woodley, D. T., Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: implications for wound healing. *Dermatologic clinics* **2017,** *35* (1), 95-100.

17. Shirshin, E. A.; Gurfinkel, Y. I.; Priezzhev, A. V.; Fadeev, V. V.; Lademann, J.; Darvin, M. E., Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. *Scientific reports* **2017,** *7* (1), 1-10.

18. Ovaere, P.; Lippens, S.; Vandenabeele, P.; Declercq, W., The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences* **2009,** *34* (9), 453-463.

19. Morrison, K. M.; Miesegaes, G. R.; Lumpkin, E. A.; Maricich, S. M., Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Developmental biology* **2009,** *336* (1), 76-83.

20. Szeder, V.; Grim, M.; Halata, Z.; Sieber-Blum, M., Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Developmental biology* **2003,** *253* (2), 258-263.

21. Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C. A.; Gurtner, G. C., Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews* **2019,** *99* (1), 665-706.

22. Elias, P. M.; Feingold, K. R., *Skin barrier*. CRC Press: 2005.

23. Harding, C.; Aho, S.; Bosko, C., Filaggrin–revisited. *International journal of cosmetic science* **2013,** *35* (5), 412-423.

24. Behne, M.; Uchida, Y.; Seki, T.; de Montellano, P. O.; Elias, P. M.; Holleran, W. M., Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *Journal of investigative dermatology* **2000,** *114* (1), 185-192.

25. 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). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (3), 314-318.

26. Elias, P. M.; Fartasch, M.; Crumrine, D.; Behne, M.; Uchida, Y.; Holleran, W. M., Origin of the corneocyte lipid envelope (CLE): observations in harlequin ichthyosis and cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **2000,** *115* (4), 765.

27. Menon, G. K.; Cleary, G. W.; Lane, M. E., The structure and function of the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics* **2012,** *435* (1), 3-9.

28. Ya-Xian, Z.; Suetake, T.; Tagami, H., Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin–relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Archives of dermatological research* **1999,** *291* (10), 555-559.

29. Feingold, K.; Elias, P., The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier. 2014.

30. Marks, R.; Leveque, J.-L.; Voegeli, R., *The essential stratum corneum*. CRC Press: 2001.

31. Michaels, A.; Chandrasekaran, S.; Shaw, J., Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *AIChE Journal* **1975,** *21* (5), 985-996.

32. Clark, D.*;* Highlights and pitfalls of opening your own brick and mortar shop [online]. Citováno dne 3.5.2020. Dostupné z: https://handmade-business.com/just-ask-highlights-and-pitfalls-of-opening-your-own-brick-and-mortar-shop/.

33. Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M., The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* **2008,** *17* (12), 1063-1072.

34. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G., The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology* **2005,** *6* (4), 328-340.

35. Jonca, N.; Leclerc, E. A.; Caubet, C.; Simon, M.; Guerrin, M.; Serre, G., Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the s tratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *European Journal of Dermatology* **2011,** *21* (2), 35-42.

36. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2006,** *1758* (7), 923-933.

37. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (3), 422-434.

38. Marekov, L. N.; Steinert, P. M., Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry* **1998,** *273* (28), 17763-17770.

39. Coderch, L.; López, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L., Ceramides and skin function. *American journal of clinical dermatology* **2003,** *4* (2), 107-129.

40. Akiyama, M.; Sugiyama-Nakagiri, Y.; Sakai, K.; McMillan, J. R.; Goto, M.; Arita, K.; Tsuji-Abe, Y.; Tabata, N.; Matsuoka, K.; Sasaki, R., Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *The Journal of clinical investigation* **2005,** *115* (7), 1777-1784.

41. Wertz, P. W., Lipids and barrier function of the skin. *Acta Dermato-Venereologica* **2000,** *80*.

42. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Covalently bound ω-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1987,** *917* (1), 108-111.

43. Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T., The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *Journal of investigative dermatology* **1989,** *93* (1).

44. Blank, I. H., Factors which influence the water content of the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology* **1952,** *18* (6), 433-440.

45. Verdier-Sévrain, S.; Bonté, F., Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of cosmetic dermatology* **2007,** *6* (2), 75-82.

46. Sakai, S.; Yasuda, R.; Sayo, T.; Inoue, S.; Ishikawa, O., Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *Journal of investigative dermatology* **2000,** *114* (6), 1184-1187.

47. Wertz, P. W.; van den Bergh, B., The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and physics of lipids* **1998,** *91* (2), 85.

48. Feingold, K. R., Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of lipid research* **2007,** *48* (12), 2531-2546.

49. Feingold, K. R.; Elias, P. M., Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (3), 280-294.

50. Elias, P. M.; Williams, M. L.; Choi, E.-H.; Feingold, K. R., Role of cholesterol sulfate inepidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (3), 353-361.

51. Shimada, M.; Matsuda, T.; Sato, A.; Akase, T.; Matsubara, T.; Nagata, K.; Yamazoe, Y., Expression of a skin cholesterol sulfotransferase, St2b2, is a trigger of epidermal cell differentiation. *Xenobiotica* **2008,** *38* (12), 1487-1499.

52. Menon, G. K.; Catania, K. C.; Crumrine, D.; Bradley, C.; Mauldin, E. A., Unique features of the skin barrier in naked mole rats reflect adaptations to their fossorial habitat. *Journal of morphology* **2019,** *280* (12), 1871-1880.

53. Vasireddy, V.; Uchida, Y.; Salem Jr, N.; Kim, S. Y.; Mandal, M. N. A.; Reddy, G. B.; Bodepudi, R.; Alderson, N. L.; Brown, J. C.; Hama, H., Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids (≥ C28) and the unique ω-O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Human molecular genetics* **2007,** *16* (5), 471-482.

54. Li, W.; Sandhoff, R.; Kono, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Ding, B. C.-H.; Proia, R. L.; Deng, C.-X., Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *International journal of biological sciences* **2007,** *3* (2), 120.

55. Herrmann, T.; Van der Hoeven, F.; Gröne, H.-J.; Stewart, A. F.; Langbein, L.; Kaiser, I.; Liebisch, G.; Gosch, I.; Buchkremer, F.; Drobnik, W., Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *The Journal of cell biology* **2003,** *161* (6), 1105-1115.

56. Meckfessel, M. H.; Brandt, S., The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2014,** *71* (1), 177-184.

57. Hannun, Y. A.; Obeid, L. M., Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology* **2008,** *9* (2), 139-150.

58. Kováčik, A.; Roh, J.; Vávrová, K., The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem* **2014,** *15* (11), 1555-1562.

59. Bouwstra, J. A.; Gooris, G.; Dubbelaar, F.; Weerheim, A.; Ijzerman, A.; Ponec, M., Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *Journal of lipid research* **1998,** *39* (1), 186-196.

60. 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. *Analytical chemistry* **2012,** *84* (1), 403-411.

61. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1993,** *1182* (2), 147-151.

62. Schnaar, R. L., Gangliosides of the vertebrate nervous system. *Journal of molecular biology* **2016,** *428* (16), 3325-3336.

63. Dasgupta, S.; Ray, S. K., Diverse biological functions of sphingolipids in the CNS: Ceramide and sphingosine regulate myelination in developing brain but stimulate demyelination during pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neurology and psychology* **2017,** *5* (1).

64. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Gröne, H.-J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R., 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *Journal of lipid research* **2013,** *54* (12), 3312-3321.

65. Vávrová, K.; Kováčik, A.; Opálka, L., Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal* **2017,** *64* (2), 28-35.

66. Norlén, L.; Nicander, I.; Lundsjö, 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. *Archives of dermatological research* **1998,** *290* (9), 508-516.

67. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (1), 70-79.

68. Schürer, N. Y.; Stremmel, W.; Grundmann, J.-U.; Schliep, V.; Kleinert, H.; Bass, N. M.; Williams, M. L., Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and a human hepatoma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1994,** *1211* (1), 51-60.

69. Moulson, C. L.; Martin, D. R.; Lugus, J. J.; Schaffer, J. E.; Lind, A. C.; Miner, J. H., Cloning of wrinkle-free, a previously uncharacterized mouse mutation, reveals crucial roles for fatty acid transport protein 4 in skin and hair development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003,** *100* (9), 5274-5279.

70. Ananthapadmanabhan, K.; Mukherjee, S.; Chandar, P., Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *International journal of cosmetic science* **2013,** *35* (4), 337-345.

71. Weerheim, A.; Ponec, M., Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of dermatological research* **2001,** *293* (4), 191-199.

72. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S., The lipid organisation in human stratum corneum and model systems. *The Open Dermatology Journal* **2010,** *4* (1).

73. Fluhr, J. W.; Mao-Qiang, M.; Brown, B. E.; Hachem, J.-P.; Moskowitz, D. G.; Demerjian, M.; Haftek, M.; Serre, G.; Crumrine, D.; Mauro, T. M., Functional consequences of a neutral pH in neonatal rat stratum corneum. *Journal of investigative dermatology* **2004,** *123* (1), 140-151.

74. Fluhr, J. W.; Behne, M. J.; Brown, B. E.; Moskowitz, D. G.; Selden, C.; Mao-Qiang, M.; Mauro, T. M.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *Journal of investigative dermatology* **2004,** *122* (2), 320-329.

75. Behne, M. J.; Barry, N. P.; Hanson, K. M.; Aronchik, I.; Clegg, R. W.; Gratton, E.; Feingold, K.; Holleran, W. M.; Elias, P. M.; Mauro, T. M., Neonatal development of the stratum corneum pH gradient: localization and mechanisms leading to emergence of optimal barrier function. *Journal of investigative dermatology* **2003,** *120* (6), 998-1006.

76. Fluhr, J. W.; Kao, J.; Ahn, S. K.; Feingold, K. R.; Elias, P. M.; Jain, M., Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *Journal of Investigative Dermatology* **2001,** *117* (1), 44-51.

77. Lin, M.-H.; Khnykin, D., Fatty acid transporters in skin development, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014,** *1841* (3), 362-368.

78. Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponec, M., Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in lipid research* **2003,** *42* (1), 1-36.

79. Mojumdar, E.; Gooris, G.; Bouwstra, J., Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft matter* **2015,** *11* (21), 4326-4336.

80. Feingold, K. R.; Man, M.; Menon, G. K.; Cho, S. S.; Brown, B. E.; Elias, P. M., Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice. *The Journal of clinical investigation* **1990,** *86* (5), 1738-1745.

81. Zbytovská, J.; Kiselev, M.; Funari, S.; Garamus, V.; Wartewig, S.; Palát, K.; Neubert, R., Influence of cholesterol on the structure of stratum corneum lipid model membrane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008,** *328* (1-3), 90-99.

82. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F.; Ponec, M., Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *Journal of lipid research* **2001,** *42* (11), 1759-1770.

83. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Cheng, K.; Weerheim, A.; Bras, W.; Ponec, M., Phase behavior of isolated skin lipids. *Journal of lipid research* **1996,** *37* (5), 999-1011.

84. Iwai, I.; Han, H.; Den Hollander, L.; Svensson, S.; Öfverstedt, L.-G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloeuf, A.; Nosek, D., The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *Journal of Investigative Dermatology* **2012,** *132* (9), 2215-2225.

85. Groen, D.; Gooris, G.; Bouwstra, J., New insights into the stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis. *Biophysical journal* **2009,** *97* (8), 2242-2249.

86. Elias, P. M., Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *Journal of Investigative Dermatology* **2012,** *132* (9), 2131-2133.

87. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W., Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *Journal of investigative dermatology* **1991,** *97* (6), 1005-1012.

88. Basse, L. H.; Groen, D.; Bouwstra, J. A., Permeability and lipid organization of a novel psoriasis stratum corneum substitute. *International journal of pharmaceutics* **2013,** *457* (1), 275-282.

89. Bouwstra, J. A.; Ponec, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2006,** *1758* (12), 2080-2095.

90. Sochorová, M.; Staňková, K.; Pullmannová, P.; Kováčik, A.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Permeability barrier and microstructure of skin lipid membrane models of impaired glucosylceramide processing. *Scientific reports* **2017,** *7* (1), 1-8.

91. Schreiner, V.; Pfeiffer, S.; Lanzendörfer, G.; Wenck, H.; Diembeck, W.; Gooris, G. S.; Proksch, E.; Bouwstra, J., Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *Journal of investigative dermatology* **2000,** *114* (4), 654-660.

92. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V., Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2008,** *1778* (5), 1344-1355.

93. Norlén, L., Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *Journal of investigative dermatology* **2001,** *117* (4), 830-836.

94. Pham, Q. D.; Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A.; Sparr, E.; Topgaard, D., Solid and fluid segments within the same molecule of stratum corneum ceramide lipid. *Quarterly reviews of biophysics* **2018,** *51*.

95. 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. *Journal of Investigative Dermatology* **1987,** *88* (6), 714-718.

96. Kopečná, M.; Kováčik, A.; Kučera, O. e.; Macháček, M.; Sochorová, M.; Audrlická, P.; Vávrová, K. i., Fluorescent penetration enhancers reveal complex interactions among the enhancer, drug, solvent, and skin. *Molecular pharmaceutics* **2019,** *16* (2), 886-897.

97. Mathes, S. H.; Ruffner, H.; Graf-Hausner, U., The use of skin models in drug development. *Advanced drug delivery reviews* **2014,** *69*, 81-102.

98. Darvin, M. E.; Choe, C.-S.; Schleusener, J.; Lademann, J., Non-invasive depth profiling of the stratum corneum in vivo using confocal Raman microscopy considering the non-homogeneous distribution of keratin. *Biomedical optics express* **2019,** *10* (6), 3092-3103.

99. Silva, C.; Nunes, S.; Eusebio, M.; Pais, A.; Sousa, J., Thermal behaviour of human stratum corneum. *Skin pharmacology and physiology* **2006,** *19* (3), 132-139.

100. Forslind, B., A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta dermato-venereologica* **1994,** *74* (1), 1-6.

101. Bouwstra, J.; Dubbelaar, F.; Gooris, G.; Ponec, M., The lipid organisation in the skin barrier. *Acta dermato-venereologica* **2000,** *80*.

102. Bouwstra, J.; Gooris, G.; Ponec, M., The lipid organisation of the skin barrier: liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. *Journal of biological physics* **2002,** *28* (2), 211-223.

103. Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepička, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K., Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophysical chemistry* **2017,** *224*, 20-31.

104. Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S., Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *Journal of Controlled Release* **2006,** *110* (2), 307-313.

105. Mitragotri, S., Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *Journal of Controlled Release* **2003,** *86* (1), 69-92.

106. Opálka, L. s.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kunes, J.; Lenčo, J.; Vávrová, K. i., Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Organic letters* **2015,** *17* (21), 5456-5459.

107. KLIGMAN, A. M.; CHRISTOPHERS, E., Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Archives of dermatology* **1963,** *88* (6), 702-705.

108. Legendre, J.; Rault, I.; Petit, A.; Luijten, W.; Demuynck, I.; Horvath, S.; Ginot, Y.; Cuine, A., Effects of β-cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. *European journal of pharmaceutical sciences* **1995,** *3* (6), 311-322.

109. Wood, D.; Brown, M.; Jones, S., Understanding heat facilitated drug transport across human epidermis. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2012,** *81* (3), 642-649.

110. Školová, B.; Kováčik, A.; Tesař, O.; Opálka, L.; Vávrová, K., Phytosphingosine, sphingosine and dihydrosphingosine ceramides in model skin lipid membranes: permeability and biophysics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2017,** *1859* (5), 824-834.

111. Fenyvesi, É.; Szemán, J.; Csabai, K.; Malanga, M.; Szente, L., Methyl-beta-cyclodextrins: the role of number and types of substituents in solubilizing power. *Journal of pharmaceutical sciences* **2014,** *103* (5), 1443-1452.

112. MORIMOTO, Y.; HATANAKA, T.; SUGIBAYASHI, K.; OMIYA, H., Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *Journal of pharmacy and pharmacology* **1992,** *44* (8), 634-639.

113. Christian, A.; Haynes, M.; Phillips, M.; Rothblat, G., Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research* **1997,** *38* (11), 2264-2272.

114. Zidovetzki, R.; Levitan, I., Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2007,** *1768* (6), 1311-1324.

115. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T., Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *Journal of Investigative Dermatology* **1987,** *88* (6), 709-713.

116. Feingold, K. R.; Mao-Qiang, M.; Proksch, E.; Menon, G. K.; Brown, B. E.; Elias, P. M., The lovastatin-treated rodent: a new model of barrier disruption and epidermal hyperplasia. *Journal of investigative dermatology* **1991,** *96* (2).

117. Menon, G. K.; Feingold, K. R.; Mao-Qiang, M.; Schaude, M.; Elias, P. M., Structural basis for the barrier abnormality following inhibition of HMG CoA reductase in murine epidermis. *Journal of investigative dermatology* **1992,** *98* (2).

118. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Theophylline, CID=2153 [online]. Citováno dne 30.3.2020. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline/.

119. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Indomethacin, CID=3715 [online]. Citováno dne 30.3.2020. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin/.

120. Deamer, D. W.; Bramhall, J., Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chemistry and physics of lipids* **1986,** *40* (2-4), 167-188.

121. Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S., Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. *Nature biotechnology* **2004,** *22* (2), 192-197.

122. Hadgraft, J., Skin deep. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2004,** *58* (2), 291-299.

123. Elias, P. M.; Friend, D. S., The permeability barrier in mammalian epidermis. *The Journal of cell biology* **1975,** *65* (1), 180-191.

124. Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R., Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of lipid research* **2012,** *53* (12), 2755-2766.

125. Van Smeden, J.; Janssens, M.; Boiten, W. A.; Van Drongelen, V.; Furio, L.; Vreeken, R. J.; Hovnanian, A.; Bouwstra, J. A., Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. *Journal of Investigative Dermatology* **2014,** *134* (5), 1238-1245.

126. Mendelsohn, R.; Moore, D. J., Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chemistry and physics of lipids* **1998,** *96* (1-2), 141-157.

127. Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., Applications of infrared spectroscopy to biology and medicine. *Journal of Molecular Structure* **1990,** *217*, 347-362.

128. Bhattacharya, S.; Haldar, S., Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain–backbone linkage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2000,** *1467* (1), 39-53.

129. Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Vattulainen, I.; Karttunen, M., Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2009,** *1788* (1), 97-121.

130. Gupta, U.; Singh, V. K.; Kumar, V.; Khajuria, Y., Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials Focus* **2014,** *3* (3), 211-217.

131. Raman, R. G.; Selvaraju, R., FTIR spectroscopic analysis of human gallstones. *Rom. J. Biophys* **2008,** *18* (4), 309-316.

132. Mendelsohn, R.; Selevany, I.; Moore, D. J.; Mack Correa, M. C.; Mao, G.; Walters, R. M.; Flach, C. R., Kinetic evidence suggests spinodal phase separation in stratum corneum models by IR spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014,** *118* (16), 4378-4387.

133. Wu-Pong, S.; Elias, P. M.; Feingold, K. R., Influence of altered serum cholesterol levels and fasting on cutaneous cholesterol synthesis. *Journal of investigative dermatology* **1994,** *102* (5), 799-802.

134. Menon, G. K.; Feingold, K. R.; Moser, A. H.; Brown, B. E.; Elias, P. M., De novo sterologenesis in the skin. II. Regulation by cutaneous barrier requirements. *Journal of lipid research* **1985,** *26* (4), 418-427.

135. Norman, A. W., Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. Oxford University Press: 1998.

136. Wang, T. J.; Zhang, F.; Richards, J. B.; Kestenbaum, B.; Van Meurs, J. B.; Berry, D.; Kiel, D. P.; Streeten, E. A.; Ohlsson, C.; Koller, D. L., Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet* **2010,** *376* (9736), 180-188.

137. Waterham, H. R.; Wijburg, F. A.; Hennekam, R. C.; Vreken, P.; Poll-The, B. T.; Dorland, L.; Duran, M.; Jira, P. E.; Smeitink, J. A.; Wevers, R. A., Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *The American Journal of Human Genetics* **1998,** *63* (2), 329-338.

138. Prabhu, A. V.; Luu, W.; Sharpe, L. J.; Brown, A. J., Cholesterol-mediated degradation of 7-dehydrocholesterol reductase switches the balance from cholesterol to vitamin D synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2016,** *291* (16), 8363-8373.

139. Tint, G. S.; Irons, M.; Elias, E. R.; Batta, A. K.; Frieden, R.; Chen, T. S.; Salen, G., Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *New England Journal of Medicine* **1994,** *330* (2), 107-113.

140. Porter, F. D., Smith–Lemli–Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European Journal of Human Genetics* **2008,** *16* (5), 535-541.

141. Ahn, J.; Yu, K.; Stolzenberg-Solomon, R.; Simon, K. C.; McCullough, M. L.; Gallicchio, L.; Jacobs, E. J.; Ascherio, A.; Helzlsouer, K.; Jacobs, K. B., Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Human molecular genetics* **2010,** *19* (13), 2739-2745.

142. Santos, E., Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System 3rd edition Remington 2012.

143. Jacob, R. F.; Cenedella, R. J.; Mason, R. P., Direct evidence for immiscible cholesterol domains in human ocular lens fiber cell plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry* **1999,** *274* (44), 31613-31618.

144. Mason, R. P.; Tulenko, T. N.; Jacob, R. F., Direct evidence for cholesterol crystalline domains in biological membranes: role in human pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2003,** *1610* (2), 198-207.

145. Costello, M. J.; Mohamed, A.; Gilliland, K. O.; Fowler, W. C.; Johnsen, S., Ultrastructural analysis of the human lens fiber cell remodeling zone and the initiation of cellular compaction. *Experimental eye research* **2013,** *116*, 411-418.

146. Levin, L. A.; Nilsson, S. F.; Ver Hoeve, J.; Wu, S.; Kaufman, P. L.; Alm, A., *Adler's Physiology of the Eye E-Book*. Elsevier Health Sciences: 2011.

147. Subczynski, W. K.; Raguz, M.; Widomska, J.; Mainali, L.; Konovalov, A., Functions of cholesterol and the cholesterol bilayer domain specific to the fiber-cell plasma membrane of the eye lens. *The Journal of membrane biology* **2012,** *245* (1), 51-68.

148. Ghadially, R.; Brown, B. E.; Hanley, K.; Reed, J. T.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Decreased epidermal lipid synthesis accounts for altered barrier function in aged mice. *Journal of investigative dermatology* **1996,** *106* (5), 1064-1069.

149. Ghadially, R.; Brown, B. E.; Sequeira-Martin, S. M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *The Journal of clinical investigation* **1995,** *95* (5), 2281-2290.

150. Zettersten, E. M.; Ghadially, R.; Feingold, K. R.; Crumrine, D.; Elias, P. M., Optimal ratios of topical stratum corneum lipids improve barrier recovery in chronologically aged skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1997,** *37* (3), 403-408.

151. Williams, M.; Elias, P., Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis. *The Journal of clinical investigation* **1981,** *68* (6), 1404-1410.

152. Johansen, J.; Ramsing, D.; Vejlsgaard, G.; Agner, T., Skin barrier properties in patients with recessive X-linked ichthyosis. *Acta dermato-venereologica* **1995,** *75* (3), 202-204.

153. Shapiro, L.; Weiss, R.; Webster, D.; France, J., X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *The Lancet* **1978,** *311* (8055), 70-72.

154. Zettersten, E.; Man, M.-Q.; Farrell, A.; Ghadially, R.; Williams, M. L.; Feingold, K. R.; Elias, P. M.; Sato, J.; Denda, M., Recessive x-linked ichthyosis: role of cholesterol-sulfate accumulation in the barrier abnormality. *Journal of investigative dermatology* **1998,** *111* (5), 784-790.

Příloha

Sochorová, M.; Audrlická, P.; Červená, M.; Kováčik, A.; Kopečná, M.; Opálka, L.; Pullmannová, P.; Vávrová, K., Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid membranes and human stratum corneum. *Journal of colloid and interface science* **2019,** *535*, 227-238.