UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Příprava modelu lidské kožní bariéry s využitím depozice tenkých lipidových filmů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Karina Suciu-Šubert

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

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

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

V Hradci Králové Karina Suciu-Šubert

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, čas, který mi věnovala, a hlavně za trpělivost. Děkuji PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D, katedra organické a bioorganické chemie, za čištění substrátů pomocí „piranha etch“. Dále děkuji Ing. Michalovi Kurkovi, Fakulta chemicko-technologická – CEMNAT, Pardubice, za změření vzorků technikou AFM; také děkuji RNDr. Jaroslavu Mainerovi, CSc., Centrální laboratoře VŠCHT Praha, za měření vzorků pomocí XRD.

Nakonec chci poděkovat svému příteli, rodině a blízkým, kteří mě podporovali a přežili se mnou celé mé studium.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Student: Karina Suciu-Šubert

Vedoucí: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Název diplomové práce: Příprava modelu lidské kožní bariéry s využitím depozice tenkých lipidových filmů

Nejsvrchnější část lidské kůže – stratum corneum, která chrání tělo před vnějším prostředím, je tvořena zrohovatělými buňkami – korneocyty, které jsou obklopené extracelulární matrix vysoce uspořádaných lipidů: ceramidů (Cer), mastných kyselin a cholesterolu. Ochranná bariéra se neustále obnovuje dělením keratinocytů, které se diferencují na korneocyty a nakonec se z povrchu kůže odlučují. Korneocyty mají místo plazmatické membrány korneocytární obálku, která se skládá z bílkovinné části (např. involucrin) a jednomolekulární lipidové části tvořené převážně z ω-hydroxylovaných ceramidů, které jsou k bílkovinné části připojené kovalentními vazbami.

Úkolem této diplomové práce byla příprava modelu lidské kožní bariéry s využitím depozice tenkých lipidových filmů. Byly vytvořeny 2 různé směsi lipidů: směs obsahující Cer NS a směs obsahující Cer EOS a NS. Směsi se nanášely na hydrofilní a hydrofobní substrát nastřikováním Linomatem V. Při nastřikování se měnilo množství lipidů, a tím i počet teoretických vrstev na substrátu. Další metodou byla opakovaná depozice monovrstev směsi NS Langmuir-Blodgettovou technikou.

Naším cílem bylo zjistit, jakým způsobem se lipidy organizují a zda jejich seskupení závisí na jejich složení, množství, počtu vrstev nebo vlastnostech povrchu substrátu. K hodnocení vzorků nastřikovaných Linomatem V jsme použili XRD a světelnou mikroskopii. K hodnocení vzorků vzniklých Langmuir-Blodgettovou technikou jsme použili AFM.

Z XRD metody jsme zjistili, že ve směsi s Cer NS se vyskytovala 1 lamelární fáze s mezirovinnou vzdáleností ~5,3 nm. U směsi s Cer EOS a NS se vyskytovaly 2 lamelární

fáze: dlouhá s mezirovinnou vzdáleností ~12,9 nm a krátká se vzdáleností ~5,1 nm. Relativní intenzita difraktovaného záření se u vzorků směsi s Cer NS se sníženým množstvím lipidů výrazně neměnila u obou typů povrchů – hydrofilního a hydrofobního. U vzorků směsi s Cer EOS a NS se měnila jen na hydrofobním povrchu.

Světelnou mikroskopií jsme odhalili, že se snižujícím se množstvím lipidy netvoří kontinuální vrstvu, ale tvoří „hromádky“. Byly viditelné rozdíly mezi hydrofilním a hydrofobním substrátem. Došli jsme k závěru, že čím je ve vzorku méně lipidů, tím více jsou ovlivněny povrchem substrátu.

Metodou AFM jsme pozorovali vzorek směsi s Cer NS, který vznikl Langmuir-Blodgettovou technikou. Objevili jsme přítomnost domén kulatého tvaru s výškovým rozdílem mezi těmito doménami a spodní doménou až 100 nm.

Na závěr jsme na základě výsledků usoudili, že organizace lipidů závisí na jejich složení, množství, počtu vrstev a na vlastnostech povrchu substrátu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Karina Suciu-Šubert

Supervisor: Mgr. Petra Pullmannová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Preparation of the human skin barrier model by using thin lipid film deposition

The uppermost part of the human skin - the *stratum corneum*, which protects the body from the external environment, is made up of cornified cells - corneocytes, which are surrounded by the extracellular matrix of highly ordered lipids: ceramides (Cer), fatty acids and cholesterol. The protective barrier is constantly renewed with so-called keratinocytes, which differentiate to corneocytes and finally desquamate from skin to surface. The corneocyte envelope replaces plasma membrane of corneocytes. It consists of proteins (eg. involucrin) and a lipid monolayer consisting mainly of ω-hydroxyceramides which are attached to the protein segments by covalent bonds.

The task of this diploma thesis was the preparation of the human skin barrier model by using thin lipid film deposition. Two different lipid mixtures were based on Cer NS or Cer EOS and NS. The mixtures were applied on the hydrophilic or hydrophobic substrate by spraying with Linomat V. The amount of lipids and consequently the number of theoretical lipid layers on the substrate was modified in individual samples. Another thin layer was prepared by repeated deposition of monolayers of the Cer NS-based mixture using Langmuir-Blodgett technique.

Our aim was to find out how lipids organize and whether their arrangement depends on their composition, amount, number of layers or the characteristics of the substrate surface. We used XRD and light microscopy to evaluate samples created by Linomat V, and we used AFM to evaluate samples of lipid monolayers deposited by the Langmuir-Blodgett technique.

From the XRD method, we found out that 1 lamellar phase with repeat distance of ~ 5.3 nm occurred in the Cer NS-based mixture. There were 2 lamellar phases in the EOS and NS-based mixture: a long one with a repeat distance of ~12.9 nm and a short one with a repeat distance of ~5.1 nm. The relative intensity of the diffracted radiation did not change significantly in the Cer NS-based samples with reduced amount of lipids on both types of surfaces - hydrophilic and hydrophobic. The relative diffracted intensity of the Cer EOS and NS-based samples only did change on the hydrophobic surface.

Light microscopy has revealed that the thinner lipid samples did not form a continuous layer, but form mounds. Differences between hydrophilic and hydrophobic substrate were visible. We conclude that the fewer lipids in the sample, the more they are affected by the substrate surface.

By using the AFM method, we observed a Cer NS-based sample, which was created by the Langmuir-Blodgett technique. We discovered the presence of round domains with the height difference between the high and low domains up to 100 nm.

Based on the results, we concluded that the organization of lipids depends on their composition, amount, number of layers and on the surface properties of the substrate.

Obsah

1. Úvod……11

2. Teoretická část……....12

2.1 Kůže, její funkce a stavba……..12

2.2 *Stratum corneum*, keratinocyty a lipidy v kožní bariéře……....13

2.3 Povrchové napětí……....14

2.4 Surfaktanty……15

2.5 Povrchový tlak……...16

2.6 Langmuir-Blodgettova technika……17

2.6.1 Izoterma……..17

2.6.2 Typy depozic a *transfer ratio*……20

2.7 X-ray diffraction……...….22

2.8 Atomic force microscopy……..…24

3. Experimentální část……...…25

3.1 Použité chemikálie a materiály……..…25

3.2 Příprava sklíček (substrátu)……...……25

3.3 Roztoky a příprava vzorků……26

3.3.1 Směs NS…….……26

3.3.2 Směs EOS/NS……27

3.3.3 Příprava roztoku kyseliny behenové k depozici na substrát pomocí LB techniky……...……29

3.3.4 Příprava acetátového pufru pro depozici vzorku NS na substrát pomocí LB techniky…….…29

3.4 Linomat V……..……..30

3.4.1 Příprava vzorků na nastřikování ……..……30

3.5 Langmuir-Blodgettova technika……..……...32

3.5.1 Příprava vaničky a čištění pufru – obecný postup……32

3.5.2 Měření izotermy kyseliny behenové……33

3.5.3 Nanášení kyseliny behenové na substrát……..…34

3.5.4 Depozice vzorku NS na substrát……..……..…....…36

3.5.5 Čištění vaničky – obecný postup…….……...….39

3.6 Měření lipidových vrstev pomocí XRD……...…..……. 39

3.7 Měření lipidových vrstev pomocí metody AFM……....…….40

3.8 Světelná mikroskopie……..……40

4. Výsledky a diskuze……..……41

4.1 Oligolamelární model – příprava pomocí Langmuir-Blodgettovy techniky…….……41

4.1.1 Měření izotermy kyseliny behenové……41

4.1.2 Nanášení kyseliny behenové na substrát……..……43

4.1.3 Příprava substrátů určených k nanášení lipidů…….……45

4.1.4 Depozice vzorku NS na hydrofilní substrát……..…...…46

4.1.5 Měření lipidových vrstev pomocí AFM……51

4.2 Multilamelární model – příprava pomocí Linomatu V…….……57

4.2.1 Vzorky směsi NS……..….58

4.2.2 Vzorky směsi EOS/NS……..……62

4.2.3 Měření lipidových vrstev pomocí XRD……66

4.2.3.1 Vzorky směsi NS……..……68

4.2.3.2 Vzorky směsi EOS/NS……..……72

5. Závěr……..……77

6. Seznam použitých zkratek…….…….……78

7. Literatura……..……79

1. Úvod

Kůže, největší orgán těla, který mimo jiné slouží jako ochranná bariéra před vnějšími vlivy, se skládá z několika částí. Nejsvrchnější část kůže, epidermis – *stratum corneum*, je nejdůležitější složkou této bariéry. Tvoří ji zrohovatělé buňky a korneocyty, které se nacházejí v extracelulárním matrix zarovnaných lipidů. Tyto lipidy jsou složené z ceramidů, které jsou nepostradatelné pro epidermální homeostázu, volných mastných kyselin a cholesterolu. [1,2,3]

Lipidová matrix je hlavní cesta přestupu látek přes *stratum corneum*, a proto je pro bariérovou funkci kůže důležité její správné složení a organizace lipidů. [4-6] Porušení nebo odchylky od homeostázy těchto lipidů má za následek některá kožní onemocnění.[7] Zatím však pořád nevíme, jak tato organizace lipidů vzniká a mění se v čase.

Cílem této práce bylo připravit modely lidské kožní bariéry s využitím depozice tenkých lipidových filmů ze dvou různých směsí. První směs se skládala z ceramidu NS, mastných kyselin a cholesterolu (směs NS) v ekvimolárním množství. Ve druhé směsi byla část ceramidu NS nahrazena ceramidem EOS (směs EOS/NS). Tyto směsi se nanášely dvěma metodami v různém množství a na dva různé povrchy substrátů. První metodou bylo nastřikování Linomatem V a druhou byla opakovaná depozice monovrstev na substrát Langmuir – Blodgettovou technikou.

Lipidy se nanášely na substráty se dvěma různými povrchy – hydrofilním a hydrofobním. Důvodem bylo zpozorovat, zda chování a organizace lipidů závisí na vlastnostech povrchu substrátu. Dále jsme pro nastřikování měnili koncentraci směsí lipidů a počet nastřikovaných vrstev, abychom zjistili, zda organizace lipidů závisí také na jejich složení, koncentraci, resp. množství lipidů a počtu nanesených vrstev.

Vlastnosti vzorků nanesených lipidových vrstev byly zkoumány několika metodami: XRD (X-ray diffraction), AFM (Atomic force microskopy) a světelnou mikroskopií.

2. Teoretická část

2.1 Kůže, její funkce a stavba

Kůže je největším orgánem lidského těla s celkovou plochou až 1,85 m^2 a tvoří přibližně 16 % tělesné hmotnosti.[1] K základním úlohám kůže patří funkce ochranná (sluneční záření, mechanické a tepelné vlivy, ztráta vody, vstup patogenů), dýchací (v malé míře přeměna dýchacích plynů), resorpční (vstřebávání látek např. při topickém podání léčiv), metabolická (přeměna cholesterolu, tvorba cholekalciferolu, ukládání tuku), vylučovací (regulace tělesné teploty – pocení), smyslová (receptory doteku, změna teploty a tlaku) a funkce zásobárny krve (vlásečnice – krevní rezervoár).[2]

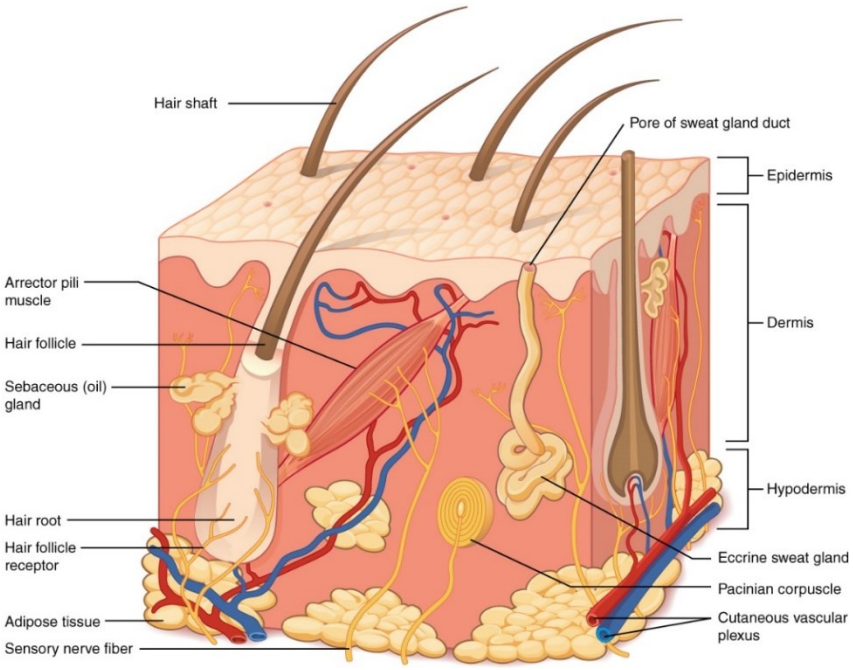
Lidská kůže se skládá ze 3 vrstev (Obr. 1):

- Epidermis – svrchní vrstva kůže; epitel, jehož základem jsou keratinocyty – zploštělé epiteliální buňky, které se během migrace k povrchu diferencují a naplňují se keratinem. Poté nahrazují původní povrchové buňky, které odumírají a odlupují se.[1,2,3] Dále obsahuje Langerhansovy buňky, Merkelovy buňky a melanocyty, které vytvářejí tmavý pigment – melanin.

  Epidermis se dělí se na 5 podvrstev:

  1. Povrch tvoří zrohovatělá vrstva *stratum corenum*, kde se vyskytují keratinocyty. Představuje především mechanickou ochranu před patogeny a vysycháním;
  2. pod ní se nachází vrstva průsvitných buněk – *stratum lucidum*;
  3. další vrstvou je *stratum granulosum*, kde začíná proces keratinizace;
  4. hlouběji je vrstva vřetenovitých ostnitých buněk – *stratum spinosum*;
  5. poslední je vrstva zárodečná, kde vznikají keratinocyty – *stratum basale.*[1,2]

- Dermis – vrstva poskytující oporu epidermis. Obsahuje vazivo s elastickými a kolagenními vlákny, nervová zakončení, cévní a lymfatický systém, vlasové folikuly a potní žlázy.[1,2,3]
- Hypodermis – nejspodnější vrstva je tvořena tukem a pojivovou tkání, má funkci endokrinní a izolační[1,2]



Obrázek 1. Stavba kůže: epidermis, dermis a hypodermis a jejich komponenty.[8]

2.2 *Stratum corneum,* keratinocyty a lipidy v kožní bariéře

Nejsvrchnější vrstva kůže pozemských savců, *stratum corneum* (SC), chrání tělo před vysycháním a vniknutím látek z venkovního prostředí. SC se skládá ze zrohovatělých buněk, korneocytů (poslední vývojové stádium keratinocytů), obklopených extracelulární matrix vysoce uspořádaných lipidů. Tyto lipidy se skládají z ceramidů (Cer), volných mastných kyselin (MK) a cholesterolu (Chol), v přibližně ekvimolárním poměru, a minoritních složek jako je cholesteryl sulfát (CholS).[4]

Ochrana mezi tělem a vnějším prostředím se musí neustále obnovovat vznikem tzv. keratinocytů, které procházejí určitým cyklem, který končí jejich diferenciací a jejich odlupováním. Diferenciované keratinocyty migrují na povrch SC a slouží jako mechanická a chemická ochrana, která společně s okolními lipidy také vytváří voděodolnou vrstvu. Korneocyty mají místo plazmatické membrány korneocytární obálku (cornified cell envelope), což je velice tuhá polymerová struktura, která je tvořena dvěma částmi: bílkovinnou obálkou a lipidovou obálkou. Bílkovinná obálka obsahuje proteiny jako např. involucrin, loricin, cystatin A nebo desmosomální bílkoviny. Lipidová obálka se nachází na vnější straně, kde je připojena k bílkovinné obálce kovalentní vazbou, a tvoří ji jednomolekulární vrstva převážně ω-hydroxylovaných ceramidů.[9]

Cer v kůži jsou heterogenní třída sfingolipidů, které jsou nepostradatelné pro epidermální homeostázu. Zatím bylo v lidské SC identifikováno 15 tříd volných Cer. Tyto třídy jsou založené na 5 různých sfingoidních základech a 3 druzích *N*-acyl řetězců včetně ultra-dlouhého acyl Cer (EO-class Cer), který obsahuje 30-34C dlouhé acylové řetězce s kyselinou linolenovou spojenou s ω-hydroxylem esterovou vazbou. Cer mají obvykle 2 řetězce.[5] Pro Cer v lidské kožní bariéře jsou typické velmi dlouhé (20-26C), nebo ultra-dlouhé (>28C) acylové řetězce.[4-6]

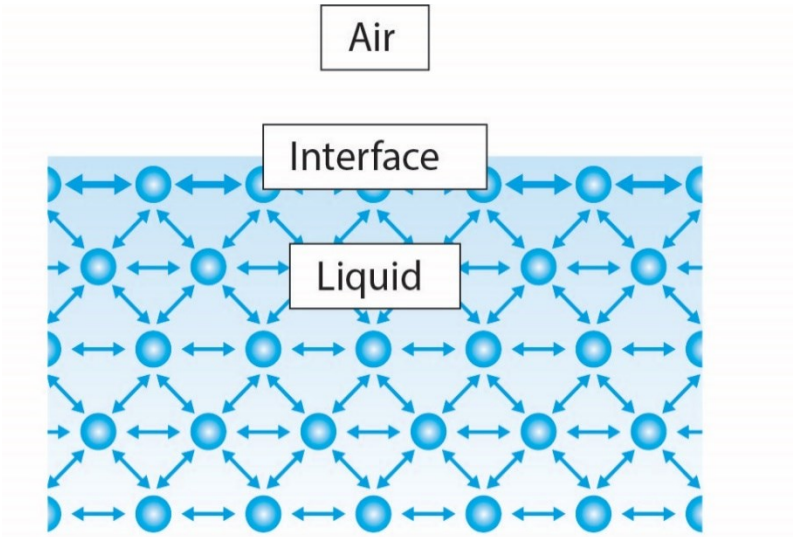
Lipidová matrix funguje jako hlavní cesta přestupu látek přes SC.[9] Proto je pro bariérovou funkci kůže důležité její správné složení a organizace lipidů. Porušení nebo odchylky od homeostázy lipidů způsobené změnou metabolismu lipidů má často za následek některá kožní onemocnění.[7] Typickým příkladem porušení kožní bariéry je atopický exém.[10]

2.3 Povrchové napětí (γ)

„Povrchové napětí je vlastnost povrchu tekutiny, která je pomocí kohezivních sil jejích molekul schopna odolat vnější síle.“ [11]

Molekula vody je tvořena 2 atomy vodíku spojených kovalentní vazbou k 1 atomu kyslíku. Kyslík má vysokou elektronegativitu, tudíž má silný parciální negativní náboj, zatímco vodíky mají parciální pozitivní náboj, což vede k elektrostatické přitažlivosti mezi atomem vodíku jedné molekuly a atomem kyslíku druhé molekuly. Vznikají tzv. vodíkové můstky.[12]

Povrchové napětí γ (Obr. 2) je tvořeno kohezivními sílami mezi molekulami tekutiny, resp. vody na hladině.[11,12] Na tyto molekuly nepůsobí síly ostatních molekul ze všech stran (tedy ne na rozhraní voda-vzduch), a tudíž se k sobě přitahují silnějšími sílami než ty, které jsou v tekutině, tedy „pod nimi“. To také zabraňuje molekulám na hladině, aby podlehly silám, které je „tahají do tekutiny“, a tak se sice hladina nehroutí, avšak se tekutina snaží vytvořit co nejmenší povrch, což je důvodem proč voda tvoří kapky.



Obrázek 2. Povrchové napětí tvoří bariéru na rozhraní fáze tekutina-vzduch.[12]

Povrchové napětí tedy tvoří bariéru mezi hladinou vody a atmosférou. Kromě merkuru (500 mM/m) má voda ze všech tekutin nejsilnější povrchové napětí (72,8 mN/m).[11-13] Například hmyz, který plave na hladině, využívá povrchového napětí vody.[11]

Povrchové napětí můžeme vyjádřit vztahem:

$$\gamma = (\delta F/\delta S)_{T,V,ni} = (\delta G/\delta S)_{T,P,ni}$$

Kde γ je povrchové napětí, S je plocha hladiny, F je Helmholtzova volná energie a G je Gibbsova volná energie. Teplota T, objem V, tlak P a množství všech komponent n_i jsou konstantní.[13]

2.4 Surfaktanty

Surfaktanty jsou povrchově aktivní látky, které jsou schopny vytvořit monovrstvu na rozhraní fáze tekutina-vzduch. Tato schopnost závisí na jejich amfifilních vlastnostech, tedy hydrofilních (ve vodě rozpustné) a hydrofobních (ve vodě nerozpustné), a dále na rovnováze mezi nimi – velikost hydrofobního řetězce a síla hydrofilní „hlavičky“ (velikost, polarita, náboj). Pokud jsou řetězce příliš krátké, látka je příliš rozpustná, disperguje se v kapalině a vytvoří micely. Pokud obsahuje s krátkým řetězcem i příliš silnou polární část, látka se v subfázi rozpustí úplně. Aby se látka nerozpustila a vytvořila stabilní monovrstvu, musí mít řetězce dlouhé s více než 12 uhlíky $(CH_2)_n$, n>12. V případě, že je řetězec zase moc dlouhý má molekula tendenci na hladině krystalizovat.

Nejběžněji zkoumanými amfifilními molekulami v membráně jsou mastné kyseliny, fosfolipidy a glykolipidy. Dále cholesterol, steroid nacházející se v buněčné membráně ve velkém množství, může vytvořit nerozpustnou monovrstvu, avšak většinou se ve studiích používá společně s jinými fosfolipidy.[14]

2.5 Povrchový tlak

Fázové rozhraní tekutina-vzduch obsahuje volnou energii vzniklou z rozdílu prostředí molekul na hladině a těch v tekutině „pod nimi“.

Povrchové napětí tekutiny může být vnímáno jako negativní tlak vznikající přitažlivými silami mezi molekulami v interfázi, který je dále snižován tvořící se monovrstvou amfifilní látky. To má za následek snížení volné energie systému, což je způsobené interakcemi mezi hydrofilními polárními skupinami a molekulami vody na hladině, a tedy snížení i povrchového napětí a zvětšení plochy interfáze vzduch/voda.[13,15]

Pokud je plocha hladiny dostatečně velká pro tvorbu monovrstvy a množství surfaktantu je dostatečně malé, aby se omezily interakce mezi amfifilními molekulami, má monovrstva minimální efekt na povrchové napětí tekutiny. Zmenšení plochy pro tvorbu monovrstvy posouváním bariér vede ke snížení mezimolekulových vzdáleností, a tudíž i ke snížení povrchového napětí. Molekuly spolu začnou interagovat a odpuzovat se navzájem.

Povrchové napětí kapaliny můžeme definovat jako sílu, která působí na jednotku délky ve směru paralelním k fázovému rozhraní.

Povrchový tlak π je roven snížení povrchového napětí přítomností mezifázové vrstvy.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad [\mathrm{mN/m}]$$

Kde γ_0 označuje povrchové napětí čisté tekutiny, γ označuje povrchové napětí tekutiny pokryté vrstvou amfifilní látky. Ze vzorečku vyplývá, že hodnota povrchového tlaku monovrstvy na hladině vody může být maximálně 72,8 mN/m při 20°C, avšak obvykle bývá mnohem nižší.[13]

2.6 Langmuir-Blodgettova technika

Langmuir-Blodgettova technika (LB) je pravděpodobně nejvhodnější metoda k manipulaci materiálů na molekulární úrovni. Umožňuje vytvoření ultratenkých supra-molekulárních organických vrstev s kontrolovanou strukturou.[16,17] Princip metody spočívá ve vytvoření monovrstev složených z amfifilních molekul, které se za konstantního povrchového tlaku depozitují z interfáze voda-vzduch na substrát.[18]

Monovrstvy vzniklé LB technikou se využívají například k modelování biomembrán (fosfolipidové modely, biomolekulární interakce), organickému a anorganickému „coating“ materiálů (*smart coatings*, nanočástice), v elektronickém průmyslu (uhlíkové nanočástice, palivo a solární buňky, polovodiče) a při vyrábění senzorů (biosensory, ion sensory).[19]

2.6.1 Izoterma

Vznik monovrstvy v interfázi vzduch/voda je zaznamenána grafem izotermy – závislosti povrchového tlaku π [mN/m] na ploše A dostupné každé molekule na fázovém rozhraní [nm^2/molekula] (*surface pressure – area*). Tato závislost ukazuje vlastnosti amfifilních látek a proces vzniku monovrstvy. Izoterma je měřena za konstantní teploty a pseudo-rovnovážných podmínek při nepřetržitým stlačování monovrstvy a měření povrchového tlaku.

Množství rozprostřeného surfaktantu je většinou zpočátku malé, tudíž jsou molekuly na hladině vody od sebe ve větší vzdálenosti a působí na sebe menšími silami – monovrstva je považována za dvou-rozměrný plyn (*two-dimensional gas)*.[13,15]

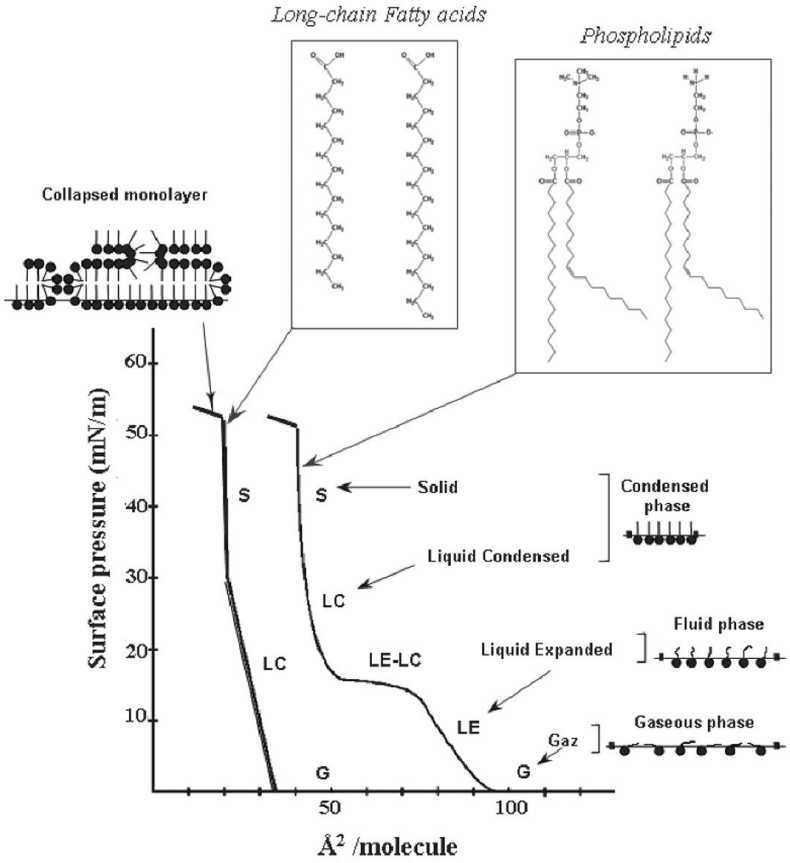
V plynné fázi má monovrstva malý vliv na volnou energii vodní subfáze, takže povrchové napětí zůstává nezměněno a povrchový tlak je velmi nízký (<1 mN/m).

Když se dostupná plocha pro molekuly lipidů zmenšuje pohybem mobilních bariér k sobě, mezi-molekulová vzdálenost a povrchové napětí se také zmenší.

Uhlíkové řetězce molekul spolu začnou interagovat a povrchový tlak stoupá (*lift-off point*). V průběhu stlačování vrstvy se amfifilní molekuly uspořádávají a monovrstva podstoupí několik fázových změn podobných fázovým přechodům mezi troj-rozměrným plynem, tekutinou a pevnou fází, až nakonec vytvoří dokonale srovnaný plovoucí film na hladině

subfáze. Tyto fáze jsou způsobené různou „volností“ molekul vzorku – van der Waalsovými silami mezi uhlovodíkovými řetězci, které jsou zodpovědné za soudržnost ve vrstvě a za sílu přitažlivých a odpudivých sil mezi „hlavičkami“.

Jak už bylo zmíněno, na začátku pokusu, kdy je průměrná dostupná plocha pro molekulu velká, se monovrstva nachází v plynné fázi (G) a hydrofobní řetězce jsou volné, jelikož jsou molekulové interakce slabé (Obr. 3). V této fázi je povrchový tlak pod 0,5 mN/m. S posouváním bariér a stlačováním lipidů se uhlíkové řetězce začnou zvedat, a v případě mastných kyselin, plynná fáze přechází rovnou na fázi tekutou. V případě fosfolipidů se tento děj dělí na několik částí; v grafu izotermy se projeví jako tzv. plateau a povrchový tlak se zvýší nad 1 mN/m. Tekutá fáze se dále přesouvá z „Liquid Expanded“ (LE), kdy je monovrstva již koherentní, ale molekuly stále mají nějakou „volnost“, přes fáze „Liquid Expanded-Liquid Condensed“ (LE-LC) a „Liquid Condensed“ (LC), až do finální kondenzované dvou-rozměrné pevné „Solid“ fáze (S). V pevné fázi jsou uhlíkové řetězce krystalizované a uniformě orientované a molekuly jsou k sobě pevně přimknuté silnými přitažlivými silami.[13] Pokud se bariéry posouvají dále, povrchový tlak je příliš velký (kolem 40mN/m)[13,20] a monovrstva zkolabuje – rozdělí se na více částí, které se na sebe nalepí. Přiměřenou rychlostí stlačování lipidů a jejich „stárnutím“ (*ageing time*) se dá předcházet kolapsu.[13]



Obrázek 3. Izoterma informuje o stabilitě monovrstvy ve vzduch/voda subfázi, uspořádávání molekul ve 2D systému a existenci fázových změn. Monovrstva přechází z plynné fáze (G) přes tekutou (LE, LE-LC, LC) po fázi pevnou (S). Přechod fází závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech amfifilní látky. U MK, které mají dlouhý uhlíkový řetězec, nemůže vzniknout LE stav. Avšak u fosfolipidů, které mají 2 uhlíkové řetězce, je tento přechod možný.
Tvar izotermy je dále závislý na podmínkách experimentu: teplota, pH, složení subfáze.[13]

Jsou dva různé způsoby, jak zaznamenat změnu povrchového tlaku: Langmuirovou váhou (*Langmuir balance*) a Wilhelmovou destičkou (*Wilhelmy plate*). Při experimentech v této diplomové práci se izoterma měřila pomocí Wilhelmovy destičky.

Metoda Wilhelmovy destičky je založena na přesném měření síly vznikající působením povrchového napětí kapaliny na platinovou destičku, jež je z části ponořena v subfázi. Měření nejprve probíhá na čisté ploše a poté na stejné ploše s vytvořenou monovrstvou. Změna povrchového napětí při kondenzaci lipidů je přepočítána na povrchový tlak π.[13]

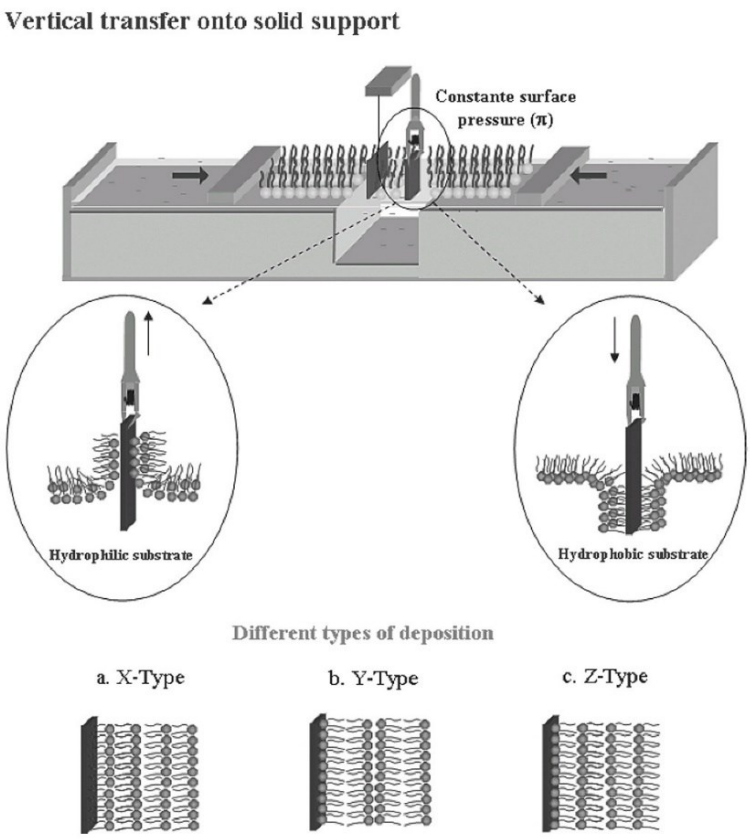
2.6.2 Typy depozic a *transfer ratio*

V závislosti na povaze substrátu se nanášení monovrstev liší startovací pozicí. Nulová poloha substrátu je vždy těsně nad hladinou. V případě hydrofobního substrátu je nad hladinou i počáteční poloha, tedy první vrstva se nanáší vsunutím sklíčka do subfáze, resp. vzorku (*downstroke*). Po první depozici se z hydrofobního substrátu stává hydrofilní – tzv. *X-type* depozice, jelikož řetězce lipidů přilnou na hydrofobním substrátu a jejich hydrofilní hlavičky jsou volné. Na ty se pak další vrstva lipidů napojí svými řetězci (Obr. 4).

V případě hydrofilního substrátu je počáteční poloha v subfázi a nanášení probíhá vysunutím sklíčka (*upstroke*) ze subfáze. Po první depozici se hydrofilní substrát rovněž mění v hydrofobní, jelikož hlavičky přilnou k substrátu a jejich hydrofobní řetězce jsou volné – tzv. *Z-type* depozice. Na jejich řetězce se svými hlavičkami připojí další vrstva lipidů.

Posledním typem depozice je *Y-type*, kdy na substrát přilnou hlavičky lipidů a na jejich volné řetězce se svými řetězci připojí další lipidy. Další vrstva se zase připojí hlavičkou na hlavičku.[13,16,20]

Typ depozice může dále záviset na podmínkách, jako jsou povrchové napětí, rychlost depozice, pH, teplota a složení subfáze.[20,21]



Obrázek 4. Startovací poloha depozice: na hydrofilní substrát se při vynoření depozitují hydrofilní hlavičky lipidů; na hydrofobní substrát se při ponoření depozitují hydrofobní uhlíkové řetězce lipidů. Typy depozice: X–type – hydrofobní substrát, kde se střídá řetězec s hlavičkou; Y-type, kde jsou 2 lipidy řetězcem k sobě a další hlavičkou k sobě; Z-type – hydrofilní substrát, kde se střídá hlavička s řetězcem.[13]

Transfer monovrstvy na substrát se charakterizuje pojmem „*transfer ratio*“ (TR). Aby se monovrstva deponovala kvantitativně, musí být pod konstantním povrchovým tlakem. Z toho důvodu se používají posuvné bariéry, které kompenzují snižující se povrchový tlak, a tím ho udržují konstantní.[13] Tahle kompenzace umožňuje změřit TR, což je ukazatel kvality depozice a je definován jako poměr zmenšení plochy obsazené monovrstvou na hladině vody k ploše nanesené na solidním substrátu.[13,20] Nejkvalitnější transfer se rovná 1.

Ideální *Y-type* film je vícevrstevný systém s konstantním TR rovno 1 pro *upstroke* i *downstroke* depozici.[22] Většinou je však pro první vrstvu TR > 1 kvůli nerovnostem povrchu substrátu. Ideální rozmezí je TR= 0,8 – 1,20.[13]

2.7 X-ray diffraction (XRD)

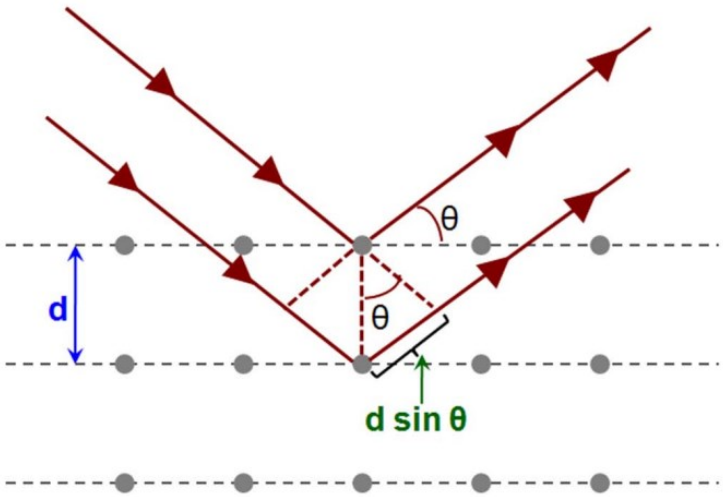
X-ray diffraction (XRD, v překladu rentgenová difrakce) je nedestruktivní analytická metoda používaná k identifikaci atomární a molekulární struktury organických a anorganických látek. Metoda je založena na interakci monochromatického rentgenového záření (*X-ray*) s krystalickým vzorkem. Jako zdroj záření se používá filtrovaná katodová trubice (Obr. 6).[23]

Při průchodu monochromatického rentgenového záření látkou dochází po interakci s elektrony vzorku k difrakci. Směr a intenzita difraktujících paprsků (*X-rays*) závisí na vnitřní struktuře vzorku a na rozmístění elektronů. Vzorek s pravidelnou strukturou (monokrystal) působí jako difrakční mřížka ve viditelném světle.[24] XRD metoda měří intenzitu a úhly difrakce. Intenzita rozptýleného záření je viděna jako funkce úhlu rozptylu (*2theta*). Struktura materiálu je stanovena z analýzy úhlu (úhel 2θ) a intenzity – velikosti píků.[25]

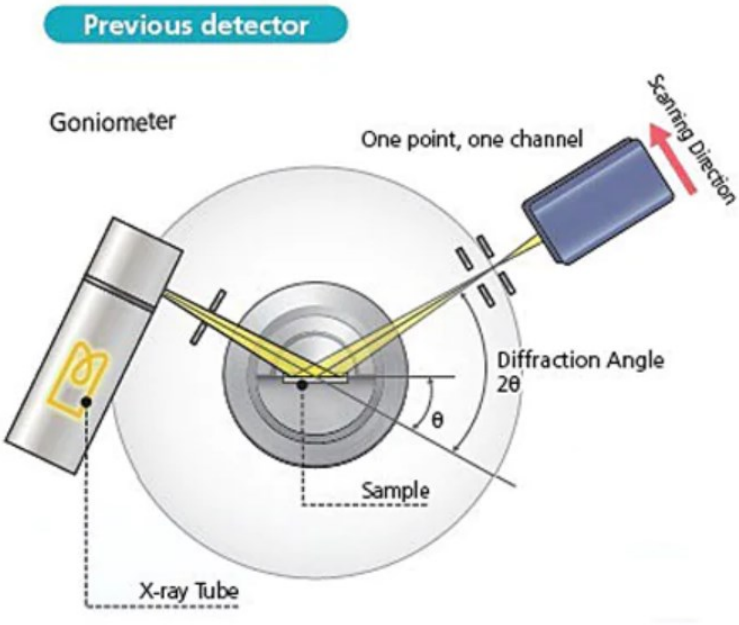
Ve většině případů se vlny záření „vyruší“, avšak při dopadu určitým směrem se podle Braggova zákona znásobí (Obr. 5):

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

Kde d je vzdálenost mezi 2 difraktujícími rovinami, θ je úhel rozptylu, n je řád (celé číslo) a λ je vlnová délka záření.[24,26]



Obrázek 5. Rozptyl záření po interakci s vrstvou elektronů. Vzdálenost rovin d a úhel rozptylu θ.[27]



Obrázek 6. XRD přístroj: zdroj záření a detektor se pohybují k sobě. Uprostřed se nachází vzorek; záření na něj dopadá z různých úhlů.[28]

Funkci difrakčního úhlu vyjadřujeme jako velikost rozptylového vektoru transferu q, který se získá z rovnice:

$$q = (4\pi \sin \theta)/\lambda \qquad [\mathrm{nm}^{-1}]$$

Kde θ je úhel rozptylu a λ vlnová délka záření.

Veličina q není závislá na vlnové délce, která závisí i na přístroji. Pomocí této veličiny, do které je vlnová délka již započítaná, jsme schopni lépe srovnat difraktogramy z různých typů měření.

Další důležitou veličinou je převrácená mezirovinná vzdálenost s ($1/d$):

$$s = q/(2*\pi) \qquad [\mathrm{nm}^{-1}]$$

Z této převrácené hodnoty získáme pomocí následujícího vzorce mezirovinnou vzdálenost d:

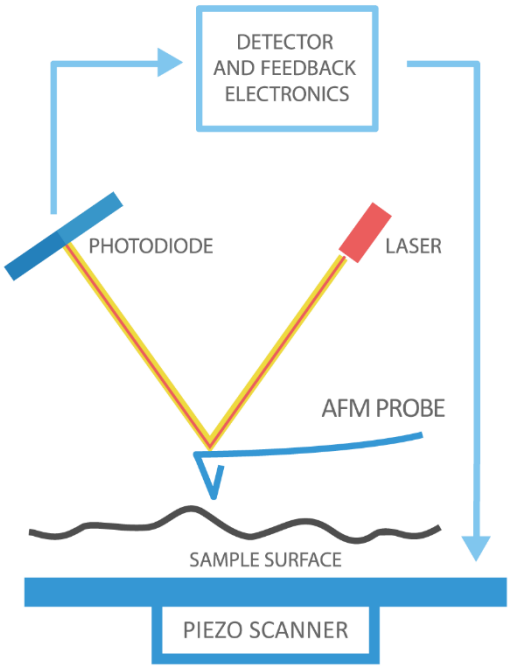
$$d = 1/s \qquad [\mathrm{nm}]$$

Využití XRD metody je široké, kromě určení krystalické struktury materiálů se dá využít ke zjištění, zda je materiál amorfní, zda obsahuje více krystalických fází, a dále například velikost mřížky.[25,26,29]

2.8 Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic force microscopy (AFM, v překladu mikroskopie atomárních sil) je mikroskopická, neoptická metoda, která se používá k troj-rozměrnému zobrazování povrchu materiálu. AFM umožňuje přesné a nedestruktivní měření topografických, elektrických, magnetických, chemických, optických a mechanických vlastností povrchu vzorků ve velmi vysokém rozlišení.[30,31]

Měření těchto vlastností materiálů probíhá pomocí AFM sondy s ostrým hrotem (Obr. 7). Hrot, který je integrován ve volném konci raménka sondy, je vyroben z křemíku nebo nitridu křemičitého. Piezoelektrický keramický skener kontroluje laterální a vertikální pozici AFM sondy vzhledem k povrchu vzorku. Zatímco se AFM hrot hýbe po nerovném povrchu s různými vyvýšeninami a dírami, poloha raménka se mění. Laserový paprsek, vycházející ze zadní části AFM raménka, sleduje tyto změny polohy a odráží se do citlivého fotodetekrotu. Polohy bodů, kterými AFM hrot projede během skenování, jsou zkombinovány a z nich je vygenerován troj-rozměrný obraz povrchu vzorku.[30]



Obrázek 7. AFM: paprsek laseru dopadá na diodu, která je na konci pohybujícího raménka. Paprsek se odrazí do fotodetektoru.[30]

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a materiály

Ceramid EOS byl připraven na katedře organické a bioorganické chemie podle publikovaného postupu.[32] Ceramid NS byl zakoupen od společnosti Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Chol a MK jsou od firmy Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (Schnelldorf, Německo).

Sklíčka se čistila ve směsi „piranha etch“, což je koncentrovaná směs H_2SO_4 a H_2O_2 (3:1) od firmy PENTA chemicals unlimited (Praha, Česká republika), a dále v ultračisté vodě MilliQ.

Roztok dichlordimethylsilanu k silanizaci sklíček byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (Schnelldorf, Německo).

Ultračistá voda MilliQ byla získána použitím filtračního systému Millipore Q (Merck Millipore, Billarica, MA).

Suroviny k přípravě acetátového pufru: octan sodný od firmy LACHEMA (Neratovice, Česká republika) a kyselina octová od firmy PENTA chemicals unlimited (Praha, Česká republika).

Organická rozpouštědla byla v analytické nebo HPLC kvalitě (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Schnelldorf, Německo).

Substrát MICA k nanášení kyseliny behenové byl zakoupen od SPI Supplies (West Chester, Pennsylvania, USA) a kyselina behenová od Fluka Chemie Gmbh (Buchs, Švýcarsko). Sklíčka byla vyrobena firmou Brand® GmbH (Wertheim, Německo).

3.2 Příprava sklíček (substrátu)

V tomto experimentu byly použity 2 typy podložních sklíček, na které se nanášely vrstvy lipidů – s hydrofilním a hydrofobním povrchem. Vždy bylo potřeba před experimentem sklíčka vyčistit.

Sklíčka se po omytí jarem a destilovanou vodou očistila v tzv „piranha etch“, což je směs koncentrované kyseliny sírové (H_2SO_4) a peroxidu vodíku (H_2O_2) v poměru 3:1. Tato

velmi nebezpečná směs sloužila k odstranění veškerých organických nečistot z povrchu sklíček. Nakonec se sklíčka opláchla v ultračisté vodě MilliQ a vložila do exsikátoru k osušení.

Pro získání sklíček s hydrofobním povrchem se sklíčka vyčištěná v „piranha etch“ nejprve opláchla MilliQ, acetonem a chloroformem ($CHCl_3$). Po osušení se vložila do komůrky speciálně pro tzv. silanizaci, která byla provedena pomocí 35 ml 1% roztoku dichlordimethylsilanu v $CHCl_3$. Proces trval 24 hodin. Nakonec následovalo čištění v ultrazvuku, oplachování v $CHCl_3$ a vysušení v exsikátoru.

3.3 Roztoky a příprava vzorků

3.3.1 Směs NS

První směs tvořil cholesterol (Chol), směs mastných kyselin (MK) a Ceramid C24 (CerNS) v molárním poměru 1:1:1. Potřebné hmotnosti se vypočítaly následujícím způsobem:

Molární poměr Chol:MK:CerNS (1:1:1)

1) Cholesterol, Sigma (3β-Hydroxy-5-cholestene, M= 386,65 g/mol)
2) MK směs (C16, C18, C20, C22, C24 (1,8%:4,0%:47,8%:38,8%; průměrná M= 345,58 g/mol)
3) C24 Ceramide NS, Avanti polar lipids (d18:1/24:0, *N*-lignoceroyl-*D-erythro*-sphingosine, M= 650,113 g/mol)

CHOL 386,65 g/mol

MK 345,58 g/mol

CerNS 650,13 g/mol

386,65 + 345,58 + 650,13 = 1382,36 g/mol

Celková m = 5 mg

386,65 …….. 1382,36

↑ x …….5 mg ↑

---

x= **1,4 mg** Chol

Látka	**Vypočtené mg**	**Vypočtené g**	**Navážené g**
Chol	1,4	0,0014	0,00315
MK	1,25	0,00125	0,00154
CerNS	2,35	0,00235	0,00257

Tabulka 1. Hmotnosti látek pro přípravu směsi NS.

Látky se navážily do 1 ml odměrných baněk, rozpustily v rozpouštědle chloroform: methanol ($CHCl_3$:MeOH) (2:1) a roztok se doplnil po rysku.

Příprava směsi NS k nastřikování Linomatem V:

Zásobní roztoky Chol, MK a CerNS se smíchaly tak, aby vznikla jejich ekvimolární směs (Tab. 2).

Směs NS

Látka	**V [µl]**
CHOL	888 ≈ 890
MK	1623 ≈ 1625
Cer NS	1830 ≈ 1825

Tabulka 2. Podle této tabulky se vytvořila směs NS.

Tento roztok se vysušil pod proudem dusíku a ve vakuu. Pak se směs NS rozpustila ve směsi Hexan:ethanol (EtOH) 96% (2:1) při koncentraci 4,5 mg/ml.

3.3.2 Směs EOS/NS

Směs EOS/NS byla tvořena cholesterolem (Chol), směsí mastných kyselin (MK) a směsí ceramidu EOS a ceramidu NS (CerEOS:CerNS) v molárním poměru 1:1:(0,3:0,7). Molární poměr Chol:MK:Cer 1:1:1, kde Cer se skládá z CerEOS:CerNS v molárním poměru 0,3:0,7.

Potřebné hmotnosti se vypočítaly následujícím způsobem:

Molární poměr Chol:MK:(CerEOS:CerNS) (1:1:(0,3:0,7)).

1) Cholesterol Sigma (3β-Hydroxy-5-cholestene, M= 386,65 g/mol)
2) MK směs (M= 345,58 g/mol)
3) C24 Ceramide NS, Avanti polar lipids (d18:1/24:0, N-lignoceroyl-Derythro-sphingosine, MW= 650,113 g/mol)
   + Ceramide EOS (M= 1040,68 g/mol) = 0,7:0,3

Chol 386,65 g/mol

MK 345,58 g/mol

CerNS 650,13 g/mol

CerEOS 1040,68 g/mol

386,65 + 345,58 + [(650,13 x 0,7) + (1040,68 x 0,3)] = 1499,515 g/mol

Celková m = 6mg

386,65 …….. 1499,515

↑ X …….6 mg ↑

---

x = **1,55 mg** Chol

Látka	**Vypočtené mg**	**Vypočtené g**	**Navážené g**
Chol	1,55	0,00155	0,00190
MK	1,38	0,00138	0,00179
CerNS	1,82	0,00182	0,00186
CerEOS	1,25	0,00125	0,00145

Tabulka 3. Hmotnosti látek pro přípravu směsi EOS/NS

Látky se navážily do 1 ml odměrných baněk, a rozpustily v rozpouštědle $CHCl_3$:MeOH (2:1), s roztok se doplnil po rysku.

Příprava směsi EOS/NS k nastřikování Linomatem V:

Zásobní roztoky Chol, MK, CerEOS a CerNS se smíchaly tak, aby vznikla jejich ekvimolární směs (Tab. 4).

Směs EOS/NS

Látka	**V [µl]**
CHOL	814 ≈ 810
MK	772 ≈ 770
Cer NS	979 ≈ 980
Cer EOS	862 ≈ 860

Tabulka 4. Podle této tabulky se vytvořila směs EOS/NS.

Tento roztok se vysušil pod proudem dusíku a ve vakuu. Pak se směs EOS/NS rozpustila ve směsi Hexan:EtOH 96% (2:1) při koncentraci 4,5 mg/ml.

3.3.3 Příprava roztoku kyseliny behenové k depozici na substrát pomocí LB techniky

Roztok o koncentraci 1 mg/ml vznikl rozpuštěním kyseliny behenové ve směsi $CHCl_3$:MeOH (3:1).

3.3.4 Příprava acetátového pufru pro depozici vzorku NS na substrát pomocí LB techniky

Při nanášení směsi NS na sklíčko se jako pufr místo vody použil acetátový pufr, jelikož je fyziologické pH kůže (SC) 5,5.

Pufr se připravil dle návodu:

pH = 5,50 10 mM

500 ml inotová síla = 0,0008 M 25 °C

Kyselina octová = 0,0007 mol M= 60,05

Octan sodný = 0,0042 mol M= 136,08 x 3 H_2O

$m_{\text{octan sodný}}$ = 0,0042 x 136,08 = **0,5715 g**

$m_{\text{k. octová}}$= 0,0007 x 60,05 = **0,042 g** (99 %)

Hustota (ρ)= 1,050 g/ml

ρ= m/V -> V= m/ρ= 0,042/1,05 = 0,04 ml

$V_{k.\ octová}$ = **40 µl**

Po přípravě se změřilo pH acetátového pufru pH-metrem.

3.4. Linomat V

Jednou z možností, jak nanést vrstvy lipidů na substrát je s použitím Linomatu V. Jedná se o přístroj, který pomocí stříkačky a plynného dusíku nastřikuje roztok lipidů na substrát. Dusík se získává z tlakové láhve, která je hadičkou připojena k Linomatu V. Při nastřikování se stolek pod stříkačkou posouvá ve směru osy x; nastřikování vzorku na plochu je zajištěno přídavným posunem ve směru osy y. Substrát se připevňuje štítkama na plochu pod jehlou.

Linomat V je ovládán počítačem pomocí aplikace winCATS, kde se přednastaví potřebné pokyny k zahájení procesu nanášení. Je potřeba si ohlídat, aby byl po spuštění Linomat V „online“, tedy spojen s počítačem a připraven k výkonu. Po každém nanesení se stříkačka znovu naplní vzorkem, posune se na startovací místo a na Linomatu V se stlačí tlačítko „Run“.

V tomto experimentu se použil Linomat V (Camaq, Muttenz, Švýcarsko).

3.4.1 Příprava vzorků na nastřikování

Směs NS:

Do vialky s vysušenou směsí NS se přidalo 1,1 ml rozpouštědla Hexan:EtOH 96% (2:1). Roztok se uchovával v mrazáku.

c = 4,5 mg/ml

m = 5 mg

---

c = m/V -> V= m/c = 5/4,5 = **1,111 ml** rozpouštědla

Směs EOS/NS:

Do vialky s vysušenou směsí EOS/NS se přidalo 1,33 ml rozpouštědla Hexan:EtOH 96% (2:1). Roztok se uchovával v mrazáku.

c = 4,5 mg/ml

m = 6 mg

---

c = m/V -> V= m/c = 6/4,5 = **1,33 ml** rozpouštědla

Po zapnutí Linomatu V se zkontroloval tlak dusíku, který se reguluje uzávěrem na velké tlakové láhvi. Na PC se spustil program winCATS -> File -> SCS-8-1-2009.cna -> run -> execute next step.

Základní schéma nastřikování

Vzorek	**m lipidu [mg]**	**Zředění**	**Počet nástřiků**	**V_1 nástřiku vzorku [µl]**
1.	1,35	x	3	100
2.	0,45	x	1	100
3.	0,0675	15 µl vzorku + 85 µl rozp.	1	100
4.	0,027	20 µl vzorku + 80 µl rozp.	3	100
5.	0,009	20 µl vzorku + 80 µl rozp.	1	100

Tabulka 4. Základní schéma nastřikování Linomatem V.

Směs NS: CerNS/MK(16-24)/CHOL =1:1:1 mol/mol/mol

hydrofilní – nástřik č. 1 byl proveden jen 2x (nedostatek vzorku)

hydrofobní – nástřik proběhl bez problémů

Směs EOS/NS (CerEOS/CerNS)/MK(16-24)/CHOL=(0.3:0.7):1:1 mol/mol/mol

hydrofilní – nástřiky 4 a 5 byly provedeny na jinou várku vyčištěných sklíček než 1, 2, 3

hydrofobní – vysušování vzorku bylo zpomalené

Sklíčka se po nastřikování nechala usušit v exsikátoru ve vakuu a vložila se do plechových kelímků na teflonový podstavec. Do kelímků se nalila voda, aby byl vzorek ve 100% relativní vlhkosti. Kelímky se vzorky se následně vložily do studené trouby, kde po zapnutí trouby docházelo k procesu „annealing“ na 70 ºC ± 2 ºC na 10 minut. Po procesu „annealing“ se vzorky nechaly 4 hodiny pomalu vychladnout na pokojovou teplotu.

3.5 Langmuir – Blodgettova technika

Další možností, jak nanést vrstvu lipidů na substrát je pomocí Langmuir-Blodgettovy techniky. Zařízení se skládá z plytké „nádobky“ nebo „vaničky“ z teflonu - hydrofobní a lipofóbní – 170 x 50 mm, 8500 mm^2. Uprostřed této „vaničky“ se nachází prohlubeň, do které se ponořuje substrát při nanášení vrstvy, tzv „dipping“ (depozice). Do vaničky se nalije pufr, do kterého se ponoří teploměr a platinový plíšek (*Wilhelmy plate*), který měří povrchový tlak π. Na oba kraje vaničky se připevní hydrofilní bariéry, které se posouvají k sobě a od sebe. Vanička je připojena dvěma hadičkami k termostatu, který reguluje a udržuje potřebnou teplotu pufru.
Vanička se ovládá aplikací v počítači nebo kontrolní jednotkou.

V tomto experimentu se použil přístroj Langmuir – Blodgett Trough (KVS NIMA, Espoo, Finsko).

3.5.1 Příprava vaničky a čištění pufru – obecný postup

Vanička byla připojena k počítači aplikací KSV NIMA. Zapnul se modem, termostat a chlazení. Nastavila se požadovaná teplota - set point.

Do čisté a suché vaničky se nalil pufr, připevnily se na oba kraje zarážky, vložil teploměr, na háček nad vaničkou se zavěsil platinový plíšek. Pokud se prováděla depozice, tak se do kolíku nad vaničkou připevnil substrát, na který se měl nanášet vzorek, a nad hladinou se vynulovala jeho poloha.

Než se mohl začít nanášet vzorek na hladinu pufru a provádět jakýkoliv experiment, bylo potřeba se ujistit, že na vaničce nebo v pufru nejsou žádné nečistoty a teplota vaničky je stálá. V otevřené aplikaci v tabulce „Manual Control Unit“ se vynulovalo „Balance

Controls“ a „Barrier 1 Controls“. Příkazem „Close“ se k sobě začaly posouvat bariéry, které se zastavily po stisknutí „Stop“, když od sebe byly v požadované vzdálenosti. Na modulu se zkontrolovala hodnota povrchového napětí; požadovaná hodnota musela být pod 0,09 mN/m. Pokud byla naměřená hodnota nad 0,09 mN/m, znamenalo to, že se v pufru nacházelo příliš mnoho nečistot, které bylo potřeba odstranit. To se provádělo Pasteurovou pipetou těsně na rozhraní bariéry po obvodu, kde se tyto nečistoty koncentrovaly nejvíce, a nabralo se malé množství pufru. Bariéry se příkazem „Open“ odsunuly od sebe, vynulovala se váha, znovu se bariéry posunuly k sobě a zkontrolovalo se napětí. V případě, že nebyla požadovaná hodnota, proces čištění se opakoval. Tyto kroky byly pro všechny následující pokusy stejné.

3.5.2 Měření izotermy kyseliny behenové

Tento pokus sloužil k seznámení se s technikou a získání představy, jak se chová tzv. Langmuirova monovrstva. Příprava vaničky a čištění subfáze bylo provedeno dle obecného postupu v předchozí podkapitole.

Při měření izotermy kyseliny behenové se jako subfáze použila ultračistá voda MilliQ. Měřila se dohromady třikrát při teplotě 25 °C.

Když bylo jisté, že je subfáze čistá a všechno bylo vynulované, nastavil se v počítači začátek zákroku. Vybrala se možnost „Iso“ – měření izotermy – a vyplnila se tabulka „Experimental setup“ následovně:

Name: Kar Behen 1,2,3		
Wilhelmy, Perim: 39,240 mm		
Subphase: voda	25,0 °C	pH 7,00
Substance: Behenová kyselina		Conc.: 1 mg/ml
MW: 340,6	Volume: 10,00 µl	
Substrate: mica		
Shape: Rectangle	Height: 15,00 mm	Width: 15,00 mm

Tabulka 5. Nastavení experimentu měření izotery kyseliny behenové.

Experimental setup:

Do stříkačky se nabralo požadované množství kyseliny behenové a na každou polovinu vaničky se nakapalo po 3 kapkách (dohromady 10 µl). Po nanesení se muselo ze vzorku nechat odpařit rozpouštědlo po dobu 20 minut.

Vyplnila se tabulka „Through1 Controls“ a stisklo se „Go“, čímž se začaly k sobě posouvat bariéry, a tím stlačovat částice vzorku blíže k sobě, dokud nebyla dosažena cílová hodnota povrchového tlaku.

Trough1 Controls:

From Go to Target	Rec On
Surface Pressure	1 Cycle
Gain control: 1,0	
Target: 60,0 mN/m	
Rate: 10,0 mm/min	

Tabulka 6. Nastavení posunu bariér.

Během tohoto procesu stlačování se na počítači ukazoval graf izotermy (Surface pressure versus Mean molecular area).

Čištění vaničky bylo provedeno dle obecného postupu (viz dále).

3.5.3 Nanášení kyseliny behenové na substrát

Tento pokus sloužil k seznámení se s technikou a získání představy, jak bude probíhat nanášení vzorku NS na substrát.

Příprava vaničky a čištění subfáze bylo provedeno dle obecného postupu.

K nanášení se použil stejný vzorek jako u předchozího pokusu. Jako subfáze se použila ultračistá voda MilliQ a jako substrát čerstvě uštíplá MICA (slída), která se přichytila do kolíku nad vaničkou a ponořila se do pufru. Vzorek se nanášel při teplotě 22 ºC.

Když bylo jisté, že je subfáze čistá, substrát ponořený v kapalině a všechno bylo vynulované, nastavil se v počítači začátek zákroku. Vybrala se možnost „Dip“ –nanášení vzorku– a vyplnila se tabulka „Experimental setup“ následovně:

Experimental setup:

Name: Kar Behen dip 1,2,3		
Wilhelmy, Perim: 39,240 mm		
Subphase: voda	22,0 °C	pH 7,00
Substance: Behenová kyselina		Conc.: 1 mg/ml
MW: 340,6	Volume: 10,00 nl	
Substrate: mica		
Shape: Rectangle	Height: 15,00 mm	Width: 15,00 mm

Tabulka 7. Nastavení experimentu nanášení kyseliny behenové na substrát.

Do stříkačky se nabralo požadované množství kyseliny behenové a na každou polovinu vaničky se nakapalo po 3 kapkách (dohromady10 µl). Po nanesení se muselo ze vzorku nechat odpařit rozpouštědlo po dobu 20 minut.

Vyplnila se tabulka „Through1 Controls“ a stisklo se „Go“, čímž se začaly k sobě posouvat bariéry, a tím stlačovat molekuly vzorku blíže k sobě, dokud se nevytvořila souvislá vrstva.

Trough1 Controls:

From Go to Target	Rec On
Surface Pressure	1 Cycle
Gain control: 1,0	
Target: 30,0 mN/m	
Rate: 10,0 mm/min	

Tabulka 8. Nastavení pohybu bariér.

Během tohoto procesu stlačování se na počítači ukazoval graf izotermy (Surface pressure versus Mean molecular area).

Jakmile byl proces dokončen, objevila se tabulka „Dipper controls“, kde se vyplnily potřebné údaje:

Dipper Controls:

Upper limit: 5,0 mm
Speed Up: 1,0 mm/min
Lower limit: -5,2 mm
Speed down: 0 s
Number of Layers: 1

Tabulka 9. Nastavení průběhu nanášení.

Kar Behen Dip 1,2: Lower limit = -5,2 mm
Kar Behen Dip 3: Lower limit = -5,8 mm

Tabulka 10. Dolní limit zasouvání substrátu při 3 různých experimentech.

Monovrstva se při tlaku (π) 30 mN/m nechala 15 minut stabilizovat, než se spustil proces depozice. Míca se pomalu vysouvala z pufru za současného přibližování bariér.

Všechno se zaznamenávalo v grafu „Transfer and Surface pressure1 Versus Layer No“.

Pokaždé se nanášela 1 vrstva, po které se vyčistila vanička, a celý proces se znovu opakoval s tím samým substrátem (MICA).

Transfer monovrstvy na substrát probíhal za povrchového tlaku 30 mN/m.

Čištění vaničky bylo provedeno dle obecného postupu (viz dále).

3.5.4 Depozice vzorku NS na substrát

Příprava vaničky a čištění pufru bylo provedeno dle obecného postupu.

K nanášení se použil vzorek NS a jako subfáze se použil acetátový pufr 10 mM, pH= 5,51. Vzorek se při každém dipu nanášel současně na 2 spojená hydrofilní sklíčka, která se přichytila na kolík za roh, aby byl vzorek na trojúhelníkové ploše. Depozice probíhala při teplotě 22 °C.

Když bylo jisté, že je pufr čistý, substrát ponořený v pufru, a všechno bylo vynulované, nastavil se v počítači začátek zákroku. Vybrala se možnost Dip –nanášení vzorku– a vyplnila se tabulka „Experimental setup“ následovně:

Experimental setup:

<table>
<tr><td colspan="4">Name: Kar NS Dip 1,2,3</td></tr>
<tr><td colspan="4">Wilhelmy, Perim: 39,240 mm</td></tr>
<tr><td colspan="2">Subphase:
acetátový pufr</td><td>22,0
°C</td><td>pH 5,50</td></tr>
<tr><td colspan="2">Substance: NS</td><td colspan="2">Conc.: 1 mg/ml</td></tr>
<tr><td>MW:
460,8</td><td colspan="3">Volume: 15,00 nl</td></tr>
<tr><td colspan="4">Substrate: glass wafer 9x9 mm^2</td></tr>
<tr><td>Shape:
Rectangle</td><td>Height: 9,00
mm</td><td>Width:
9,00 mm</td><td>Thickness:
0,15 mm</td></tr>
</table>

Tabulka 11. Nastavení experimentu nanášení vzorků lipidů na substrát.

Do stříkačky se nabralo požadované množství vzorku NS a na každou polovinu vaničky se nakapalo po 3 kapkách (dohromady 15 µl). Po nanesení se muselo ze vzorku nechat odpařit rozpouštědlo po dobu 20 minut.

Vyplnila se tabulka „Through1 Controls“ a stisklo se „Go“, čímž se začaly k sobě posouvat bariéry, a tím stlačovat molekuly vzorku blíže k sobě, dokud se nevytvořila souvislá vrstva.

Trough1 Controls:

From Go to Target	Rec On
Target options: Surface Pressure	1 Cycle
Gain control: 1,0	
Target: 30,0 mN/m	
Rate: 10,0 mm/min	

Tabulka 12. Nastavení pohybu bariér.

Během tohoto procesu stlačování se na počítači ukazoval graf izotermy (Surface pressure versus Mean molecular area).

Jakmile byl proces dokončen, objevila se tabulka „Dipper controls“, kde se vyplnily potřebné údaje:

Dipper Controls:

Upper limit: 5,0 mm
Speed Up: 0,5 mm/min
Lower limit: -9,3 mm
Speed down: 6,0 s
Number of Layers: 3 (4)

Tabulka 13. Nastavení pohybu substrátu.

Kar NS dip 1: Number of layers = 3
Kar NS dip 2,3: Number of layers = 4

Tabulka 14. Počet vrstev při 3 experimentech. Naneseno na 2 stejná sklíčka současně.

Monovrstva se při tlaku (π) 30 mN/m nechala 15 minut stabilizovat, než se spustil proces depozice. Substrát se pomalu vysouval z pufru, zpátky zasunul do pufru a nakonec zase vysunul.

Vše se zaznamenávalo v grafu „Transfer and Surface pressure1 Versus Layer No“.

Transfer monovrstvy na substrát probíhal za povrchového tlaku 30 mN/m.

Čištění vaničky bylo provedeno dle obecného postupu (viz dále).

3.5.5 Čištění vaničky – obecný postup

Vanička se čistila na konci experimentu nebo mezi nimi.

Vypnul se termostat, sklíčko s naneseným vzorkem se schovalo do zkumavky, odsávačkou se odsál pufr z vaničky a odejmuly se bariéry. Bariéry se opláchly ultračistou milliQ a pouze MeOH. Odpojily se hadičky, které vedou z termostatu od vaničky, sundal se teploměr a plíšek a vanička se vyjmula ze stojanu. Pokud na vaničce přilnula nějaká nečistota např. ve formě nějakého lipidu, vyčistila se pomocí speciálního štětce se saponátem. Po opláchnutí vodou z kohoutku a vymytí saponátu se pokračovalo ultračistou MilliQ vodou, a dále se vanička očistila směsí $CHCl_3$: MeOH (3:1) tak, aby se tento roztok nedostal na gumové hadičky. Plíšek a teploměr se také očistil MilliQ a $CHCl_3$: MeOH (3:1). Vanička se zpátky nainstalovala do stojanu, ke které se připojily hadičky a zavěsil teploměr. Plíšek se vložil do tmavé lékovky s EtOH, u které se víčko ještě obalilo laboratorním filmem. Pro dokonalejší čištění plíšku se použilo žíhání plamenem.

3.6. Měření lipidových vrstev pomocí XRD (X-ray difraction)

Měření proběhlo na VŠCHT v laboratoři rentgenové difraktometrie.

K měření lipidových vrstev se použil práškový difraktometr X’Pert PRO θ-θ (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko) s Bragg-Brentano geometrií. Data byla naskenována detektorem X’Celerator a vyhodnocena pomocí X’Pert Data Viewer software (PANalytical B.V., Almelo, Nizozemsko).

Měření se provádělo při vlnové délce 0,1790307 nm.

3.7 Měření lipidových vrstev pomocí metody AFM (Atomic force microscopy)

Měření proběhlo na Chemicko-technologické fakultě, Univerzita Pardubice, v Centru materiálů a nanotechnologií.

K měření lipidových vrstev se použil přístroj AFM NTEGRA (NT-MDT).

Hrot použitý k měření: HA_HR Etalon.

3.8 Světelná mikroskopie

Mikroskopovalo se pomocí optického mikroskopu Olympus BX51 s digitální kamerou DP72 na katedře Farmaceutické technologie na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové.

4. Výsledky a diskuse

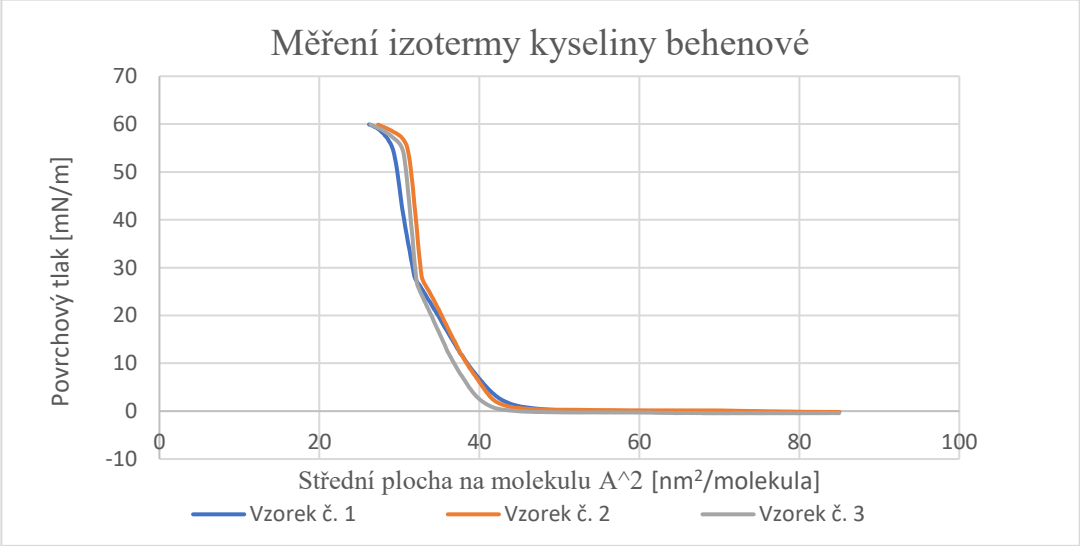
4.1 Oligolamelární model – příprava pomocí Langmuir-Blodgettovy techniky

4.1.1 Měření izotermy kyseliny behenové

Na začátku experimentu proběhlo měření izotermy kyseliny behenové. Je to dobře popsaná mastná kyselina s dlouhým nerozvětveným řetězcem. Jelikož je chování monovrstvy kyseliny behenové při kompresi známé, umožňuje měření její izotermy ověřit správnost a reprodukovatelnost celého postupu.

Izoterma, závislost povrchového tlaku π [mN/m] na střední ploše připadající na molekulu lipidu [nm^2/molekula nebo $Å^2$/molekula, 1 nm = 10 Å], ukazuje proces vzniku monovrstvy a vlastnosti měřených amfifilních látek. Izoterma je měřena za konstantní teploty, pseudo-rovnovážných podmínek a při nepřetržitém stlačování monovrstvy a měření povrchového tlaku.[12]

Roztok, použitý k měření izotermy, o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním kyseliny behenové ve směsi $CHCl_3$:MeOH (3:1). Měření proběhlo celkem 3x v subfázi MilliQ (pH= 6,998) a při teplotě 25 °C. Maximální povrchový tlak byl nastaven na 60 mN/m.



Obrázek 16. Izoterma: graf závislosti povrchového tlaku na střední ploše molekuly.

Na Obrázku 16 jsou zaznamenány izotermy kyseliny behenové, které se měřily u 3 vzorků.

Postupujeme zprava do leva: vzorek je nejprve v „plynné fázi“ (G) odpovídající povrchovému tlaku přibližně 1 mN/m, kdy je křivka paralelní s osou x. Pro systém v plynné fázi je charakteristické volné rozmístění molekul s volným uspořádáním uhlíkových řetězců a slabými interakcemi mezi molekulami.

To je způsobeno velkou průměrnou plochou dostupnou pro molekulu.

Při tlaku nad 1 mN/m začne křivka stoupat a do přibližně 27 mN/m je v kapalné fázi, kdy se molekuly lipidů k sobě přibližují a jejich uhlíkové řetězce se začnou zvedat. Na vzestupné části křivky pozorujeme kolem 27 mN/m zlom, kde dochází k fázovému přechodu z kapalné do tuhé fáze. V tuhé fázi dochází ke krystalizaci a uniformní orientaci uhlíkových řetězců a molekuly jsou k sobě pevně přimknuté silnými přitažlivými silami. Při dalším stlačování dochází jen k omezenému vzrůstu tlaku a křivka se při 60 mN/m zaobluje. Tento úsek, kde dalším stlačováním monovrstvy nedochází k nárůstu tlaku, odpovídá jejímu kolapsu. [12]

Popsaný tvar křivky je typický pro mastné kyseliny a izotermy odpovídají již publikovaným výsledkům (Obr. 17).[31]

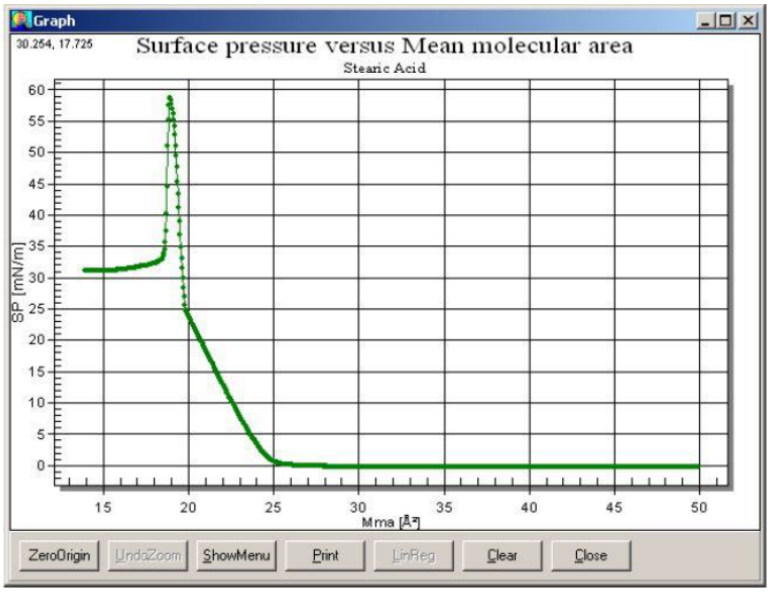


Figure 77: *A typical graph for the isotherm of stearic acid on pure water.*

Obrázek 17. Měření izotermy kyseliny stearové ve vodné subfázi. Výsledky publikované v manuálu firmy KVS NIMA.[33]

Princip vzniku monovrstvy kyseliny stearové je stejný jako u našeho experimentu s kyselinou behenovou. Nad hodnotou 0 mN/m začne křivka stoupat – z plynné fáze se stane kapalná, až při tlaku 25 mN/m dojde ke zlomu, kdy kapalná fáze přechází v pevnou. Monovrstva při tlaku 59 mN/m kolabuje a rozdělí se na menší fragmenty.[33]

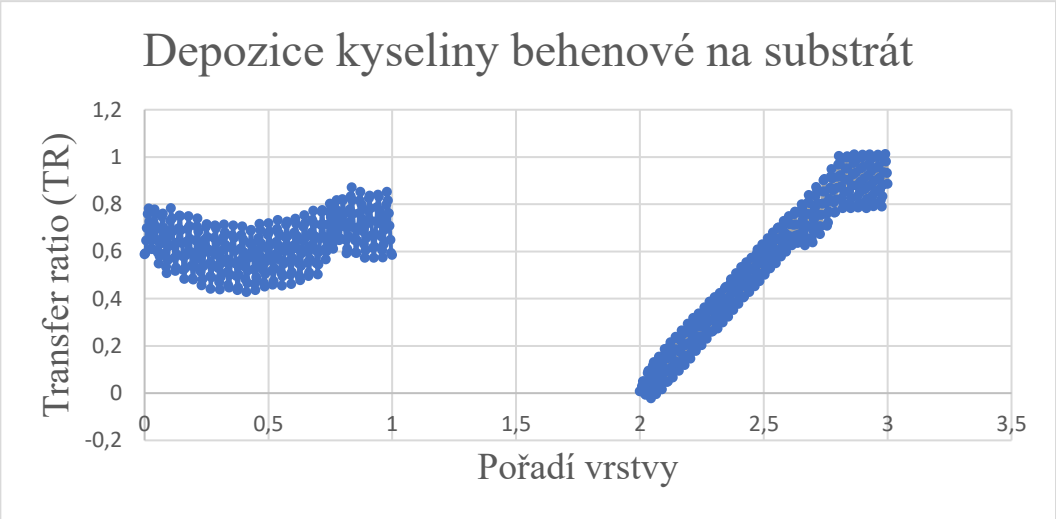
4.1.2 Nanášení kyseliny behenové na substrát

Monovrstvu, která vznikne kompresí amfifilních molekul na rozhraní subfáze (voda)-vzduch, je možné přenést na pevný podklad – substrát – Langmuir – Blodgettovou metodou. Substrát vhodný pro transfer monovrstvy musí mít atomárně rovný a ultračistý povrch. To splňuje například čerstvě uštípnutá slída (MICA, muscovite). MICA – slída je skupina minerálů podobných fyzikálních a chemických vlastností patřících mezi tzv. fylosilikáty. Tyto minerály tvoří vrstevnatou krystalovou strukturu, která se projevuje perleťovým leskem na štěpných plochách (Obr. 18). Díky tomu můžeme slídu „oloupat“ a získat tenký elastický substrát s atomárně rovným povrchem. MICA je lehký a relativně měkký, žáruvzdorný a nevodivý materiál.[34]

Obrázek 18. Fotografie minerálu MICA (slída). Je zde viditelná vrstevnatá struktura s perleťovým odleskem.[34]

K nanášení se použil stejný vzorek jako u předchozího pokusu. Experiment umožnil seznámit se s postupem tvorby lipidového filmu Langmuir-Blodgettovou technikou a získat potřebnou zručnost.

Jako subfáze se použila ultračistá voda MilliQ (pH=6,998) a jako substrát MICA (slída). Vzorek se nanášel při povrchovém tlaku 30,0 mN/m a teplotě 22 ºC. Nanášení proběhlo 3x– přenesly se 3 monovrstvy kyseliny behenové. Při nanášení na hydrofilní povrch substrátu dochází k vytažení substrátu ze subfáze do vzduchu.



Obrázek 19. Graf závislosti transfer ratio (TR) na počtu vrstev u depozice kyseliny behenové na hydrofilní substrát.

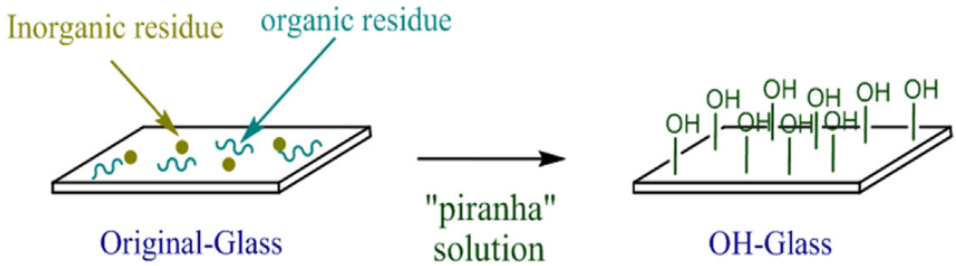
Na obrázku 19 vidíme graf závislosti TR na čísle experimentu, tedy při přenosu monovrstvy kyseliny behenové na čistý hydrofilní povrch substrátu. Aby se monovrstva převedla na substrát kvantitativně, musí být pod konstantním povrchovým tlakem, kterého se docílí posouváním bariér k sobě. Kvalita transferu monovrstvy na substrát se vyjadřuje hodnotou TR. TR je definován jako poměr zmenšení plochy obsazené monovrstvou na hladině vody k ploše nanesené na solidním substrátu.[13,20]

TR by se mělo pohybovat v rozmezí 0,8 – 1,2 a dokonalý transfer je roven 1. V grafu u transferu č. 3 vidíme, že se pohybuje mezi 0,8 a 1, byl tedy úspěšný.

U transferu č. 1 byl problém, nebo špatné nastavení parametrů na začátku, takže TR je příliš nízké, a tudíž depozice nebyla úspěšná. Transfer č. 2 byl zřejmě ukončen předčasně, jelikož je k němu příliš málo dat na vytvoření grafu.

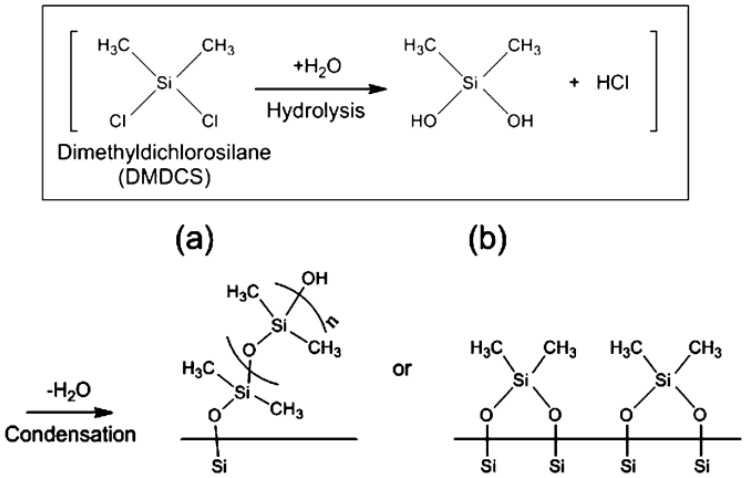
4.1.3 Příprava substrátů určených k nanášení lipidů

Hydrofilní substrát se předem připravil čištěním pomocí tzv. „piranha etch“ (směs koncentrované kyseliny sírové (H_2SO_4) a peroxidu vodíku (H_2O_2) v poměru 3:1). Na povrchu sklíčka (Obr. 20) jsou organické a anorganické nečistoty, které by interferovaly s nanášením vrstev lipidů a znehodnotily výsledky. Řešením je sklíčka vyčistit směsí „piranha etch“, která sklíčko zbaví veškerých nečistot. Během procesu je sklíčko pokryto volnými – OH skupinami, které jsou hydrofilní.



Obrázek 20. Schématické znázornění procesu čištění a hydrofilizace sklíčka.[35]

Hydrofobní povrch substrátu se po očištění „piranha etch“ získal tzv. silanizací (Obr .21) v 35 ml 1% roztoku dichlordimethylsilanu (DMDCS) v $CHCl_3$.



Obrázek 21. Znázorněný proces silanizace. Povrch sklíčka se stává hydrofobní.[36]

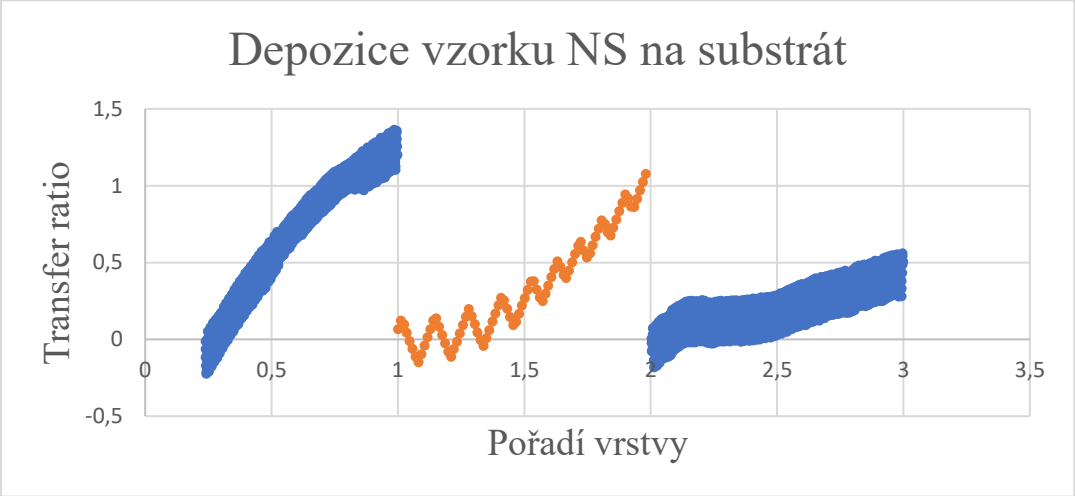
Silanizace může probíhat buď jako vertikální polymerizace (Obr. 21a), nebo následkem kondenzace (Obr. 21b).[36]

4.1.4 Depozice vzorku NS na hydrofilní substrát

Základní parametry pro postupný transfer několika monovrstev na substrát byly ověřeny v předešlých experimentech. V dalším kroku byl několikavrstvý model připraven z lipidů modelujících SC – ze směsi CerNS/MK/Chol (vzorek NS). Subfázi tvořil acetátový pufr 10 mM, pH= 5,51, který odpovídá fyziologickému pH ve SC. Vzorek se při každém transferu nanášel současně na 2 kolíkem spojená hydrofilní sklíčka při povrchovém tlaku 30,0 mN/m a teplotě 22 °C. Nanášení proběhlo ve 3 experimentech s různým počtem nanesených vrstev – transfer č. 1,2,3 (Tab. 16, 17, 18).

Transfer č. 1

Startovací poloha u nanášení vrstvy č. 1 a č. 3 byla v subfázi; startovací poloha u nanášení vrstvy č. 2 byla nad subfází (Tab. 16; Obr. 22).



Obrázek 22 Graf závislosti transfer ratio na pořadí vrstvy, který vznikl při přenosu monovrstvy vzorku NS na 2 hydrofilní sklíčka současně (transfer č. 1). Pohyb substrátu směrem nahoru je znázorněn modře, směrem dolů oranžově.

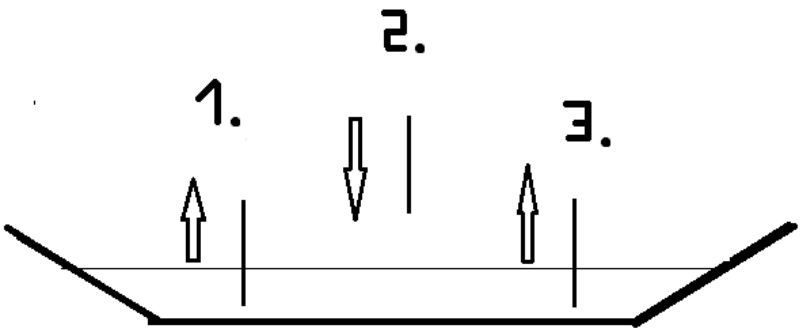
Tabulka Transfer č. 1

Vrstva	Transfer ratio (TR)	Upper limit [mm]	Lower limit [mm]	Direction
1	1,2	5	-9,30	Up
2	1,1	5	-9,30	Down
3	0,51	5	-9,30	Up

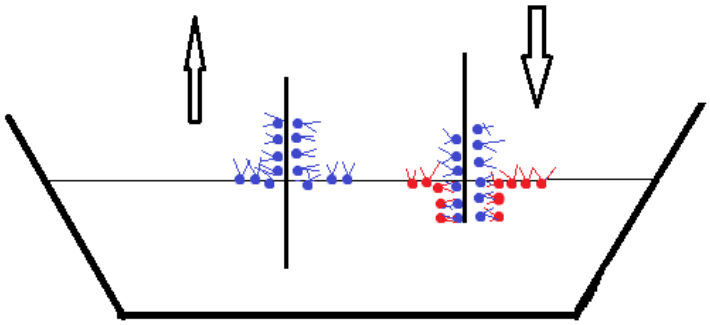
Tabulka 16. Počet vrstev, transfer ratio, horní limit polohy substrátu, dolní limit polohy substrátu a směr pohybu substrátu. Transfer č. 1

Na začátku tvorby vícevrstvého modelu (Obr. 23) jsme u vrstvy č. 1 pozorovali kladný transfer (TR= 1,2; Tab.16) ve směru nahoru – ze subfáze do vzduchu, kdy dochází k přilnutí hydrofilních skupin molekul na hydrofilní povrch substrátu (Obr. 24). Hydrofilní povrch substrátu se tak pokryje monovrstvou lipidů, které jsou orientované hydrofobními řetězci směrem ven. Povrch substrátu se tak stane hydrofobní. Transfer vrstvy č. 2 proběhl směrem dolů – ze vzduchu do subfáze, kdy se hydrofobní povrch pokryje monovrstvou lipidů orientovaných hydrofilními skupinami směrem ven. Tento transfer byl kladný (TR= 1,1), takže po jeho ukončení se povrch systému změnil na hydrofilní.

Při nanesení třetí monovrstvy směrem nahoru – ze subfáze do vzduchu – jsme pozorovali pokles TR na hodnotu 0,5. Při tomto transferu by se měl hydrofilní povrch pokrýt monovrstvou lipidů orientovaných hydrofobními řetězci ven. Tento proces proběhl pouze částečně. Při transferu č. 1 bylo kumulované TR 2,5.



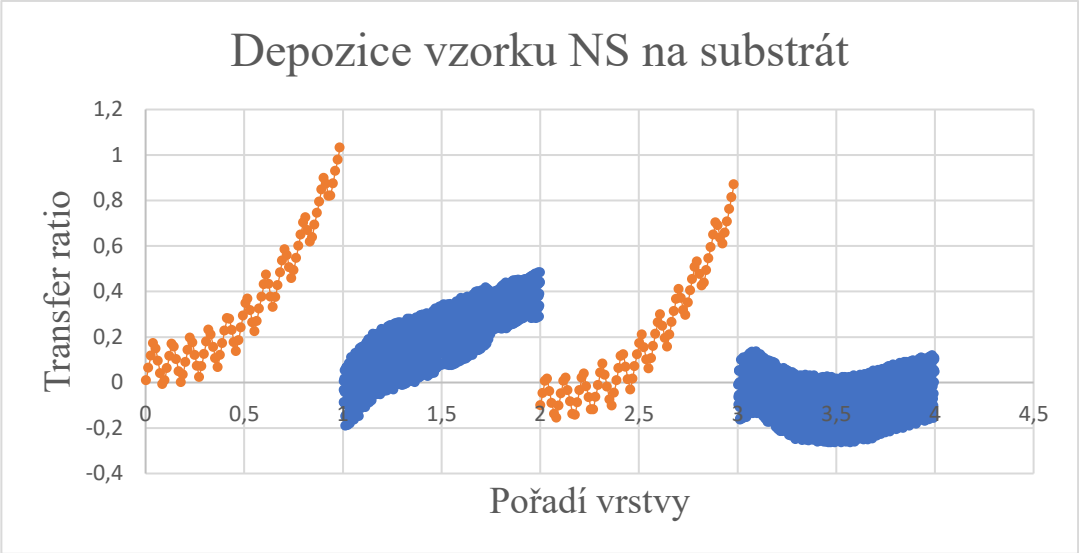
Obrázek 23. Schéma pohybu substrátu při transferu č. 1. Startovací pozice v pufru je u hydrofilního povrchu substrátu.



Obrázek 24. Opakovaná depozice lipidové monovrstvy na hydrofilní substrát. Nabalování molekul lipidů podle typu Y.

Transfer č. 2

Startovací poloha u nanášení vrstvy č. 4 a č. 6 byla nad subfází; startovací poloha u nanášení vrstvy č. 5 a č. 7 byla v subfázi (Tab. 17, Obr. 25).



Obrázek 25. Graf závislosti transfer ratio na pořadí vrstvy, který vznikl při přenosu monovrstvy vzorku NS na 2 hydrofilní sklíčka současně (transfer č. 2). Pohyb substrátu směrem nahoru je znázorněn modře, směrem dolů oranžově.

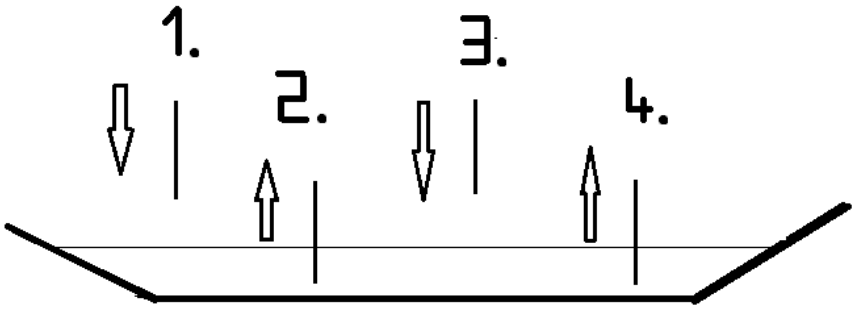
Tabulka Transfer č. 2

Vrstva	Transfer ratio	Upper limit[mm]	Lower limit [mm]	Direction
4	1	5	-9,30	Down
5	0,44	5	-9,30	Up
6	0,89	5	-9,30	Down
7	0,05	5	-9,30	Up

Tabulka 17. Počet vrstev, transfer ratio, horní limit polohy substrátu, dolní limit polohy substrátu a směr pohybu substrátu.

Transfer vrstvy č. 4 proběhl směrem dolů (Tab. 17; Obr. 26) a byl kladný s hodnotou TR= 1. Přestože předchozí transfer proběhl pouze částečně, systém se choval jako hydrofobní a monovrstva lipidů nanesených jako vrstva 4 byla (nebo by měla být) orientována hydrofilními skupinami směrem ven. Transfer vrstvy č. 5 směrem nahoru proběhl s pouze poloviční úspěšností, TR = 0,44. Transfer vrstvy č. 6 směrem dolů byl opět úspěšný; systém

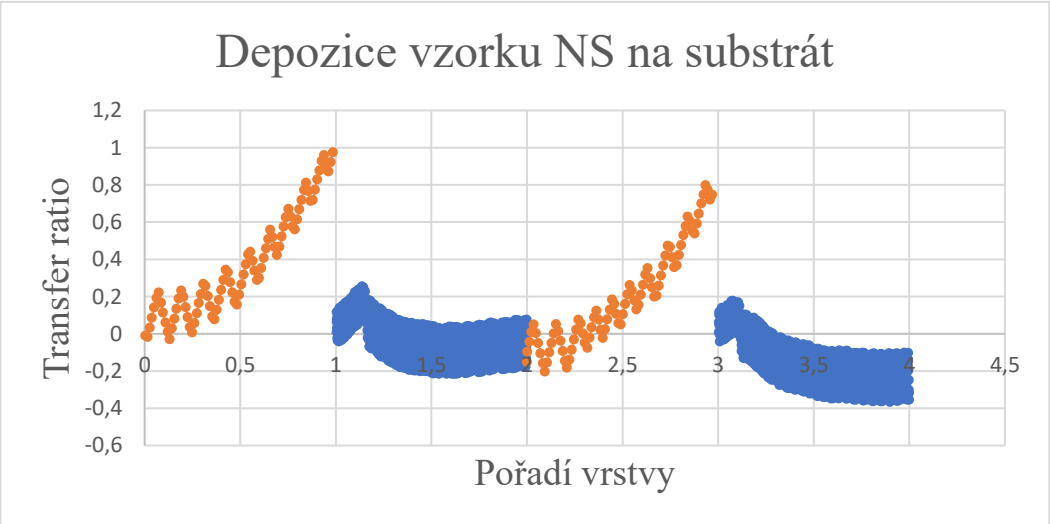
se choval jako hydrofobní. Transfer vrstvy č. 7 směrem nahoru, kdy by se měl chovat jako hydrofilní, byl neúspěšný. Při transferu č. 2 bylo kumulované TR~ 2,5 monovrstev vzorku NS. Substráty (2 sklíčka zároveň) by měly kumulovaně obsahovat 5 monovrstev vzorku NS.



Obrázek 26. Schéma pohybu substrátu při transferu č. 2 a 3. Startovací pozice nad pufrem je pro hydrofobní povrch substrátu.

Transfer č. 3

Startovací poloha u nanášení vrstvy č. 8 a č. 10 byla nad subfází; startovací poloha u nanášení vrstvy č. 9 a č. 11 byla v subfázi (Tab. 18; Obr. 27).



Obrázek 27. Graf závislosti transfer ratio na pořadí vrstvy, který vznikl při přenosu monovrstvy vzorku NS na 2 hydrofilní sklíčka současně (transfer č. 3). Pohyb substrátu směrem nahoru je znázorněn modře, směrem dolů oranžově.

Tabulka Transfer č. 3

Vrstva	Transfer ratio	Upper limit [mm]	Lower limit [mm]	Direction
8	0,99	5	-9,30	Down
9	0,04	5	-9,30	Up
10	0,76	5	-9,30	Down
11	x	5	-9,30	Up

Tabulka 18. Počet vrstev, transfer ratio, horní limit polohy substrátu, dolní limit polohy substrátu a směr pohybu substrátu. Transfer č. 3

Transfer vrstvy č. 8 směrem dolů byl, stejně jako v předchozím případě u vrstvy č. 6, úspěšný, tudíž se systém choval jako hydrofobní. U dalších transferů je zřejmé, že transfer směrem dolů probíhá úspěšně, zatímco transfer směrem nahoru neúspěšně. U transferu poslední vrstvy došlo k technickému problému, takže nebyl ukončený výpočet TR ovládacím softwarem. Podle těchto výsledků předpokládáme, že se netvoří vícevrstvý model typu Y (Obr. 24), protože u něj by měly probíhat úspěšně oba typy transferů.

Kumulativní TR pro daný vzorek je kolem 7, takže předpokládáme, že počet úspěšně nanesených vrstev odpovídá této hodnotě. Teoretický maximální počet vrstev je 11. Další výsledky, které byly získány metodou mikroskopie atomárních sil (AFM), by mohly přispět k vysvětlení pozorovaného jevu.

4.1.5 Měření lipidových vrstev pomocí AFM

Atomic force microscopy (AFM) je mikroskopická metoda, která se používá k 3D zobrazování povrchu materiálu. [30,31]

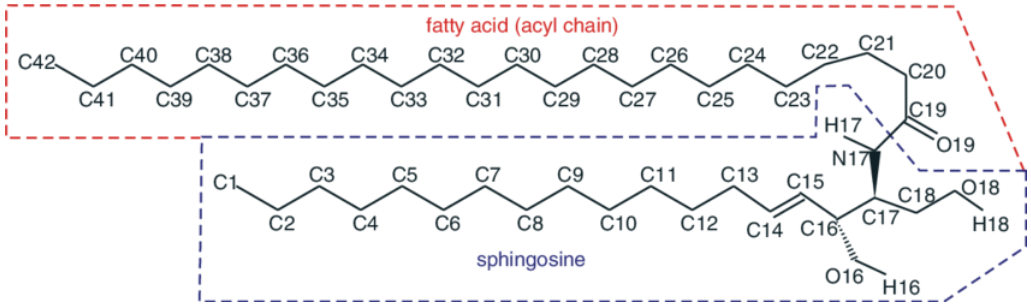
Pomocí této metody můžeme porovnat vzniklé struktury vrstev lipidů na substrát. Tato technika je velice citlivá a umožňuje nám pohlédnout na drsnost povrchu, výškové rozdíly a tvar tzv. *domén* ve struktuře povrchu.

Měření těchto vlastností materiálů probíhá pomocí AFM sondy s ostrým hrotem, který postupuje po nerovném povrchu vzorku. Laserový paprsek, vycházející ze zadní části AFM raménka, sleduje změnu polohy raménka a odráží se do citlivého fotodetekrotu. Polohy bodů, kterými AFM hrot projede během skenování, jsou zkombinovány a z nich je vygenerován 3D obraz povrchu vzorku.[31]

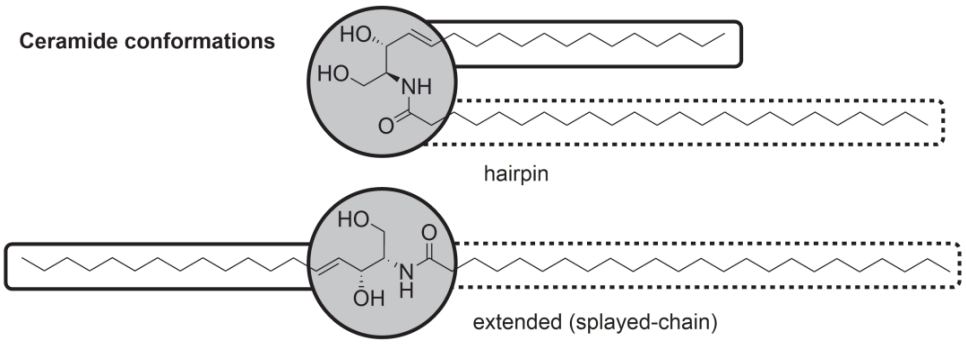
S metodou AFM jsme skenovali povrch vzorku vzniklého LB technikou na hydrofilním sklíčku. Očištěné sklíčko nemá hladký povrch jako MICA použitá v pilotním experimentu. V předešlé práci[37] byla zjištěna průměrná drsnost takto ošetřeného sklíčka 0,45 nm. Na ploše 5 x 5 μm^2 sklíčka byl zjištěn maximální výškový rozdíl (mezi nejvyšším a nejnižším bodem) 11 nm. Tyto parametry jsou uspokojivé pro tvorbu Langmuirových filmů, byly by však nedostatečné na měření monovrstev.

Vzorek obsahoval lipidovou směs následujícího složení:

Ceramid NS (Cer NS) je lipid, který má 2 dlouhé hydrofobní řetězce (Obr. 28). Acylový řetězec má přibližnou délku 3 nm a sfingozinový řetězec má přibližnou délku 2 nm. Oblast polárních chemických skupin je poměrně malá. Maximální délka této molekuly v rozevřené konformaci (Obr. 29) je kolem 5 nm.



Obrázek 28. Struktura ceramidu NS v konformaci „hairpin“.[38]

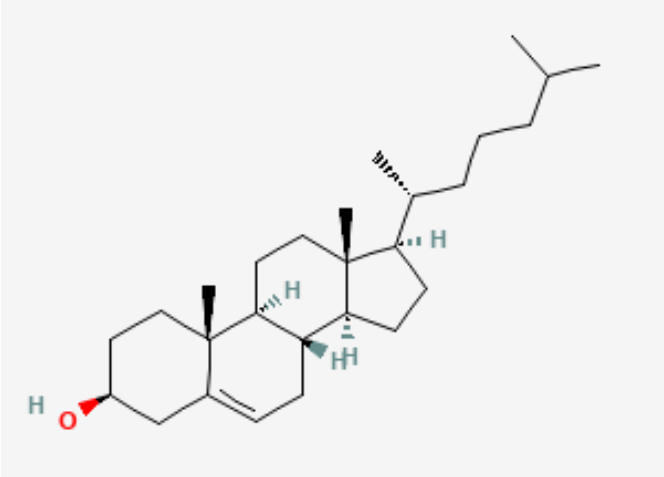


Obrázek 29. Dvě různé konformace ceramidů: tzv. „hairpin“, kdy je ceramid složený, a další konformace, kdy je ceramid „rozevřený“.[39]

Směs mastných kyselin (MK), ze kterých je nejdelší lignocerová kyselina (Obr. 30) s délkou řetězce 24 uhlíků. Přibližná maximální délka této molekuly je 3 nm.

Obrázek 30. Struktura kyseliny lignocerové s 24 uhlíky.[40]

Cholesterol (Chol) má steroidní skelet s krátkým rozvětveným řetězcem. Přibližná délka molekuly je pod 2 nm.



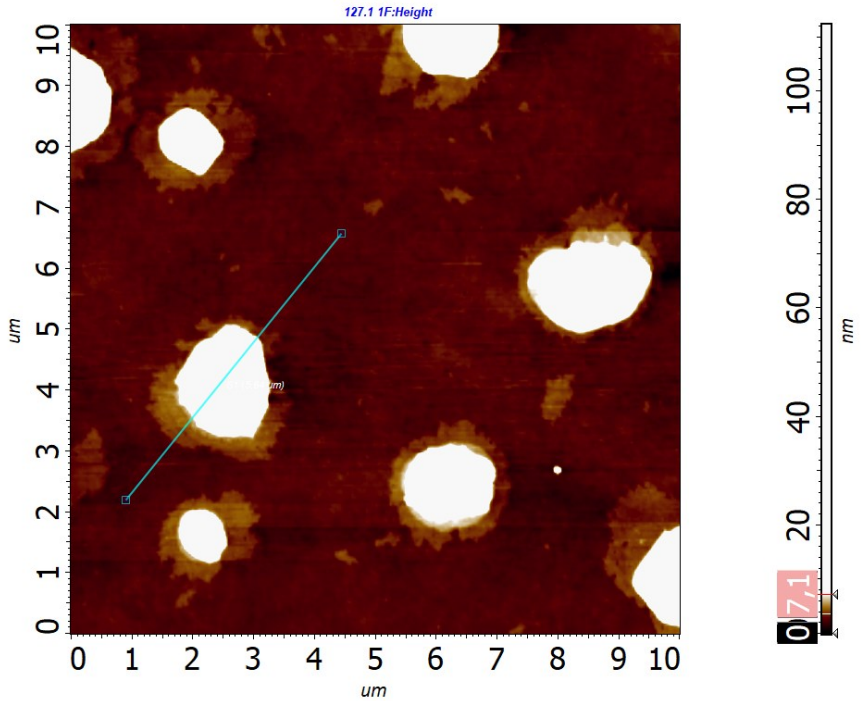
Obrázek 31. Steroidní skelet cholesterolu s krátkým rozvětveným řetězcem.[41]

Maximální teoretická tloušťka 1 monovrstvy by byla přibližně 5 nm, což odpovídá rozevřené konformaci nejdelší obsažené molekuly – Cer NS (Obr. 29). Jedná se pouze o hypotetickou hodnotu. Monovrstva na fázovém rozhraní voda/vzduch s největší pravděpodobností nebude obsahovat rozevřenou konformaci Cer NS, protože by došlo k energeticky nevýhodnému kontaktu hydrofobního řetězce s vodou.

Z předešlých publikací vyplývá, že směs na bázi ceramidů tvoří vyšší a nižší domény. Podle literatury organizace lipidů závisí na jejich složení. Bylo zjištěno, že samotné ceramidy izolované ze SC tvoří domény, které se po přidání Chol do směsi rozptýlí a vytvoří se nanokrystalky. Přidáním MK se domény stabilizují a zvětšují se.[42] Očekáváme tedy tvorbu velkých vyvýšených domén, které budou ve vzorku rozptýlené.

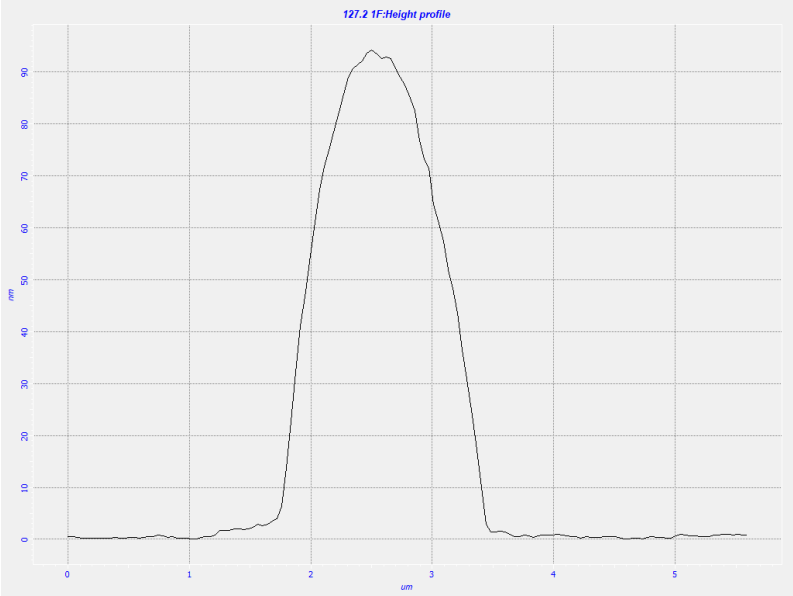
Pomocí mikroskopie atomárních sil byla změřena 2 místa na povrchu vzorku odpovídajících 10x10 μm^2.

Na mikrografu na Obrázku 32 vidíme barevnou škálu, která odpovídá relativní výšce měřené plochy vzorku. Čím světlejší je plocha, tím větší je její relativní výška. Barevná přímka na tomto obrázku označuje místo, kde byl vynesený výškový profil – závislost relativní výšky na poloze na povrchu vzorku.



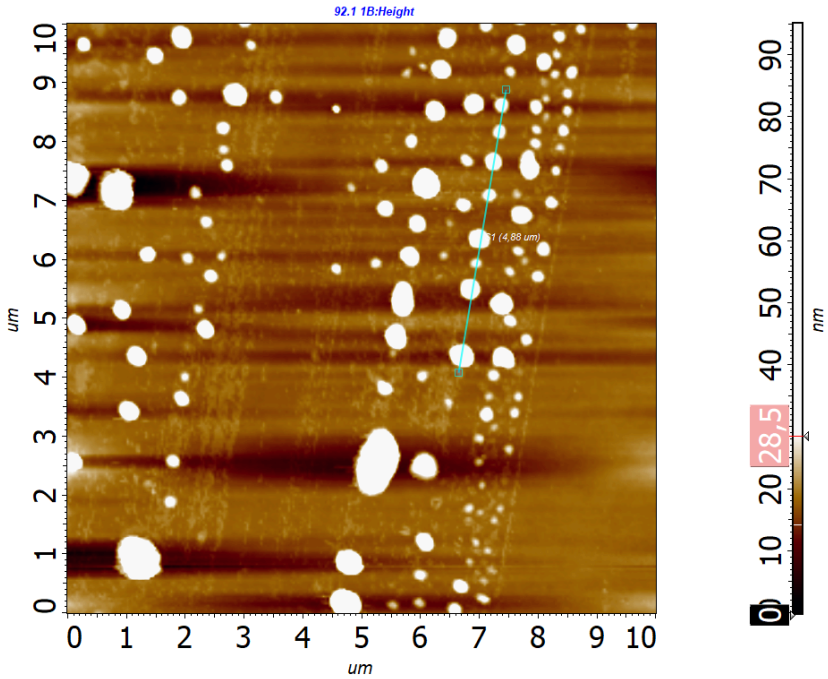
Obrázek 32. Zobrazení povrchu vzorku, v rozměru 10x10 μm^2.

Výškový profil z Obrázku 32 je na Obrázku 33. Vidíme, že světlá doména má průměr přibližně 1 – 1,5 µm a relativní výšku kolem 96 nm. Podobných domén vidíme na obrázku 32 hned několik.



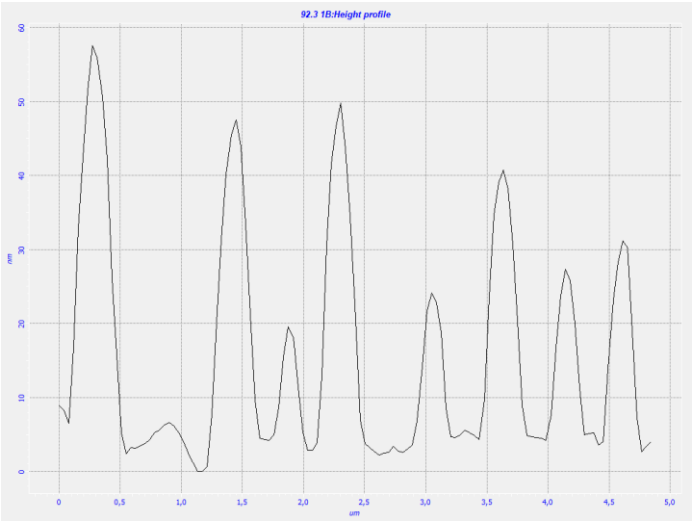
Obrázek 33. Zobrazení výškového profilu, závislosti relativní výšky na poloze vzorku, zvýrazněné domény.

Na snímku na Obrázku 34 vidíme mnohem více menších kruhových domén různých průměrů a výšek. Opět, čím světlejší je plocha, tím větší je její relativní výška. Barevná přímka na tomto obrázku označuje místo, kde byl vynesený výškový profil – závislost relativní výšky na poloze vzorku.



Obrázek 34. Zobrazení povrchu vzorku, v rozměru 10x10 µm2.

Výškový profil z Obrázku 34 je na Obrázku 35. Světlé domény mají průměr v rozmezí přibližně 0,5 – 1 µm. Relativní výška nejvyšší domény dosahuje kolem 58 nm.



Obrázek 35. Zobrazení výškových profilů zvýrazněných domén. Spektrum závislosti relativní výšky na poloze vzorku.

Povrch připraveného vzorku je velmi členitý s doménami kulatého tvaru. V jiné studii směs CerNS a Chol vytvořila domény tyčkovitého tvaru. Po přidání kyseliny palmitové do směsi se tyto domény lehce zakulatily. Citované práce studovaly různě složité modely SC bariéry

ve formě monovrstev, které představují jednodušší systém ve srovnání s vícevrstvým. Je možné, že po přidání MK do naší směsi měly tyto MK také vliv na zakulacení domén.[43]

Dále uvažujeme o možnosti, že při přenosu monovrstev na substrát vznikly díry jako následek nevhodné techniky. V tom případě by maximální možná relativní výška lipidových vrstev vůči podkladu, pokud počítáme s kumulovaným TR a teoretickou délkou molekul, byla 35 nm. Relativní výška některých zjištěných domén je však mnohem vyšší. I kdybychom počítali s tím, že každý uskutečněný transfer byl úspěšný, teoretická výška na sebe naskládaných monovrstev by odpovídala přibližně 55 nm. Chybná metoda a vznik děr nevysvětluje vznik domén s relativní výškou přibližně 100 nm.

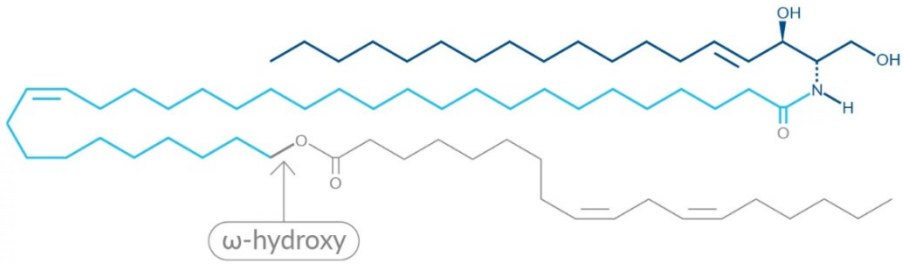
Předpokládáme, že v průběhu procesu dochází k přeuspořádání lipidových molekul na fázovém rozhraní, kterého výsledkem je vznik útvarů, které připomínají hromádky (z angl. *mounds*). Toto uspořádání je pravděpodobně způsobené velkou povrchovou energií vrstvy na povrchu hydrofilního skla, energetická nevýhodnost vrstvy rozprostřené na povrchu by mohla být hnací sílou pro přeuspořádání lipidů. Pro ověření by bylo potřeba uskutečnit více experimentů.

4.2 Multilamelární model – příprava pomocí LinomatuV

Linomat V je přístroj, který pomocí stříkačky plynného dusíku nastřikuje roztok lipidů na substrát. Při nastřikování se stolek, na kterém je připevněn substrát, pod stříkačkou posouvá ve směru osy x; dále je nastřikování vzorku na plochu zajištěno přídavným posunem ve směru osy y.

Důvodem přípravy mnohovrstevného (multilamelárního) modelu bylo zjistit rozdíly v chování tenkých vrstev lipidů v závislosti na charakteru povrchu substrátu – hydrofilní a hydrofobní.

Bylo potřeba připravit vrstvy o tloušťce v určitém rozsahu, protože není známo, jak tenká musí vrstva lipidů být, aby se na ni vliv substrátu projevil. Na přípravu vrstev jsme použili 2 různé směsi lipidů modelujících kožní bariéru. První směs odpovídá vzorku NS použitému na tvorbu vícevrstvého modelu pomocí LB techniky: směs Cer NS, MK a Chol v poměru 1:1:1 mol/mol/mol). Ve druhé směsi, vzorek EOS/NS, byla část Cer NS nahrazena Cer EOS: směs (CerEOS:CerNS) v poměru 0,3:0,7 mol/mol (aby celkový poměr ceramidů ve směsi byl 1 mol), (MK) a (Chol) celkově v poměru 1:1:1 mol/mol/mol. Cer EOS je ceramid s dlouhým řetězcem, který je součástí kožních lipidů a podílí se na vzniku fáze s mezirovinnou vzdáleností 13 nm.



Obrázek 36. Struktura ceramidu EOS s velmi dlouhým řetězcem.[44]

Přístrojem Linomat V byly nastřikovány 4 série vzorků na různé substráty. Tyto vzorky jsme pozorovali pod mikroskopem a z reprezentativních míst jsme pořídili mikroskopické snímky – mikrografy.

Cílem bylo zjistit, zda struktura vrstev nanesených lipidů závisí na jejich složení, koncentraci, počtu vrstev nebo typu substrátu – hydrofilní a hydrofobní.

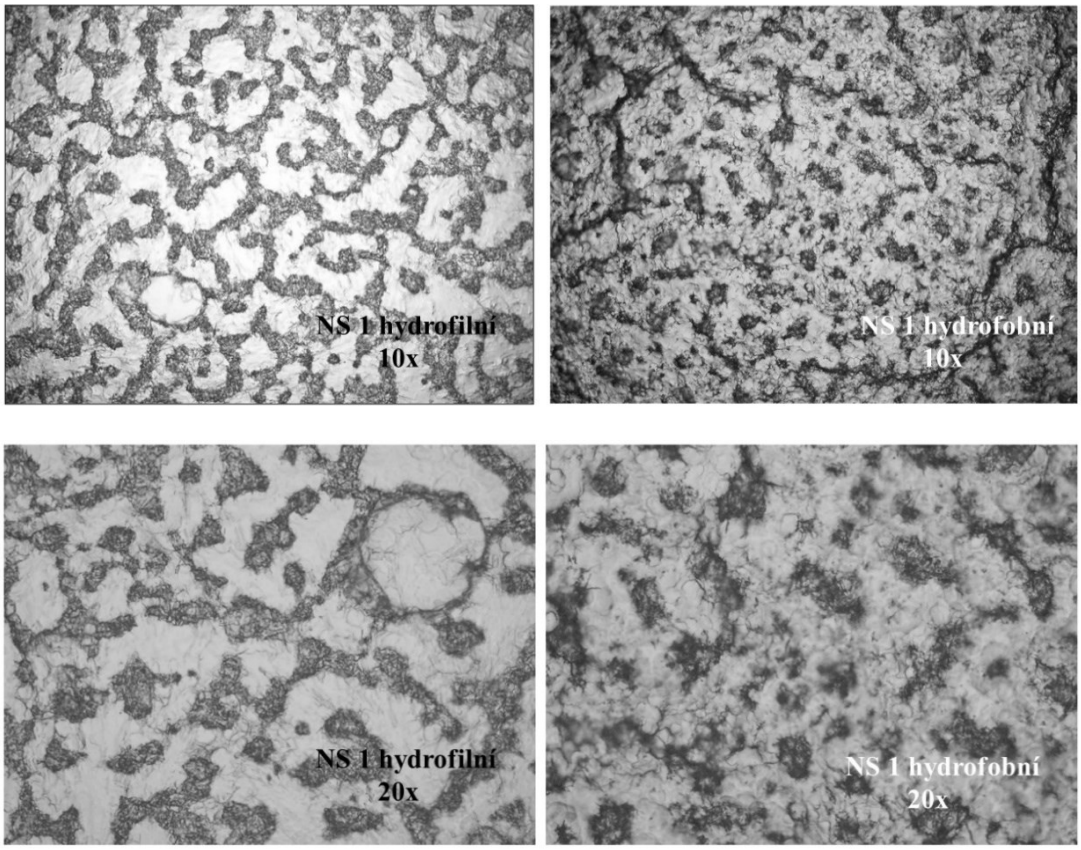
4.2.1 Vzorky směsi NS

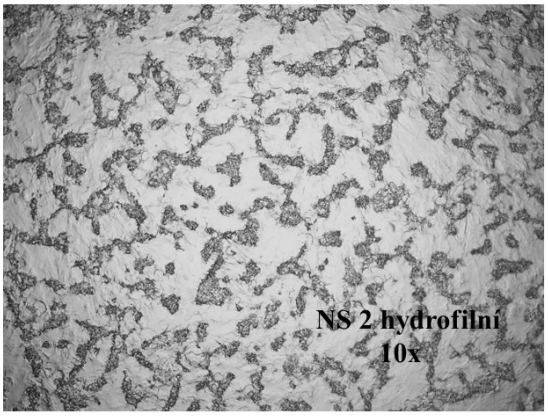
Vzorky byly osvětlené spodním osvětlením: při tomto osvětlení dojede k prosvícení celé vrstvy. Snímky vzorků se směsí NS byly pořízeny po procesu „annealing“.

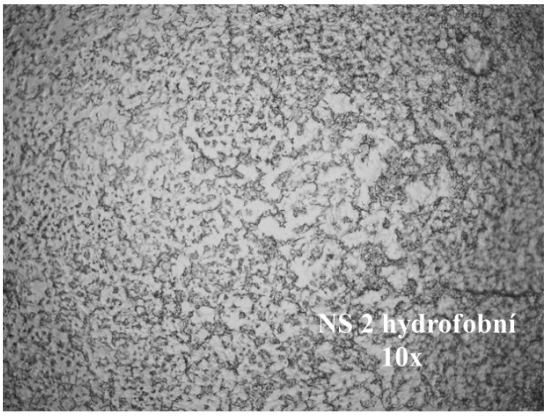
První 2 série vznikly nastřikováním směsi NS na hydrofilní a hydrofobní substrát.

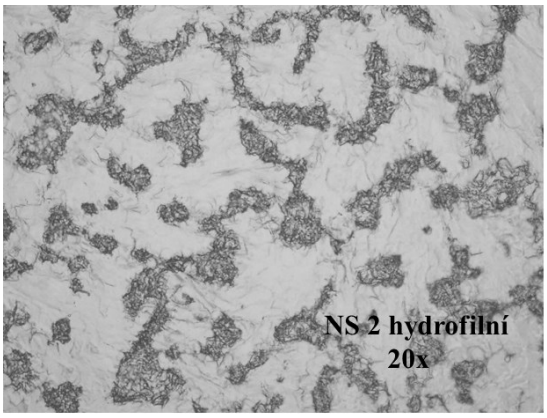
CerNS/MK(16-24)/Chol =1:1:1 mol/mol/mol		hydrofilní	hydrofóbní
NS	m lipidu [mg]	nastřikování	nastřikování
1	1,35 (v důsledku chyby méně)	2x (chyba)	3x
2	0,45	1x	1x
3	0,0675	1x	1x
4	0,027	3x	3x
5	0,009	1x	1x
annealing		70 °C/H2O	

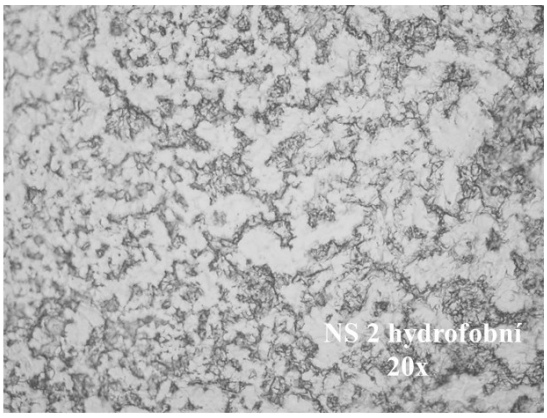
Tabulka 19. Rozpis směsi 1 nastřikování Linomatem V.

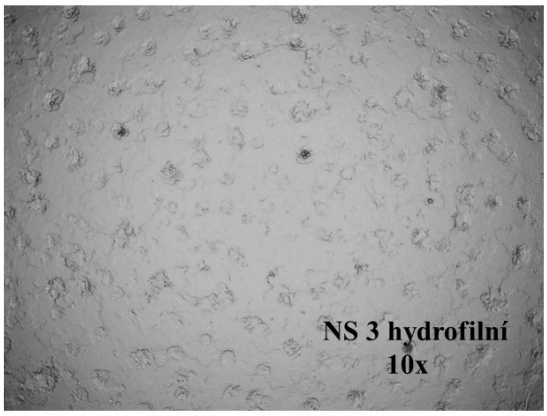


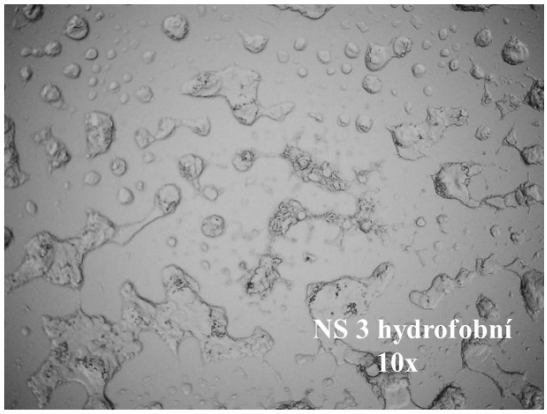

NS 2 hydrofilní
10x

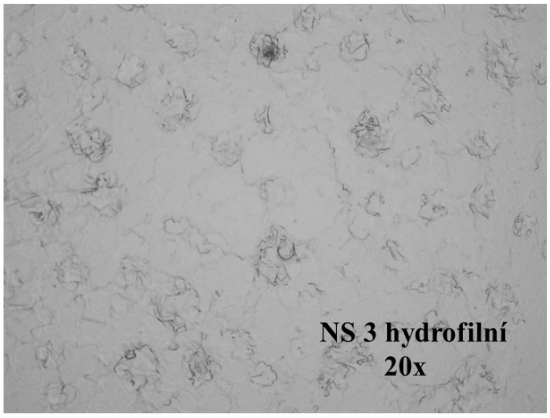

NS 2 hydrofobní
10x

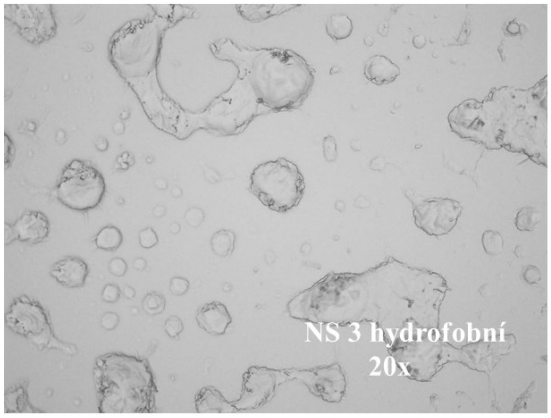

NS 2 hydrofilní
20x

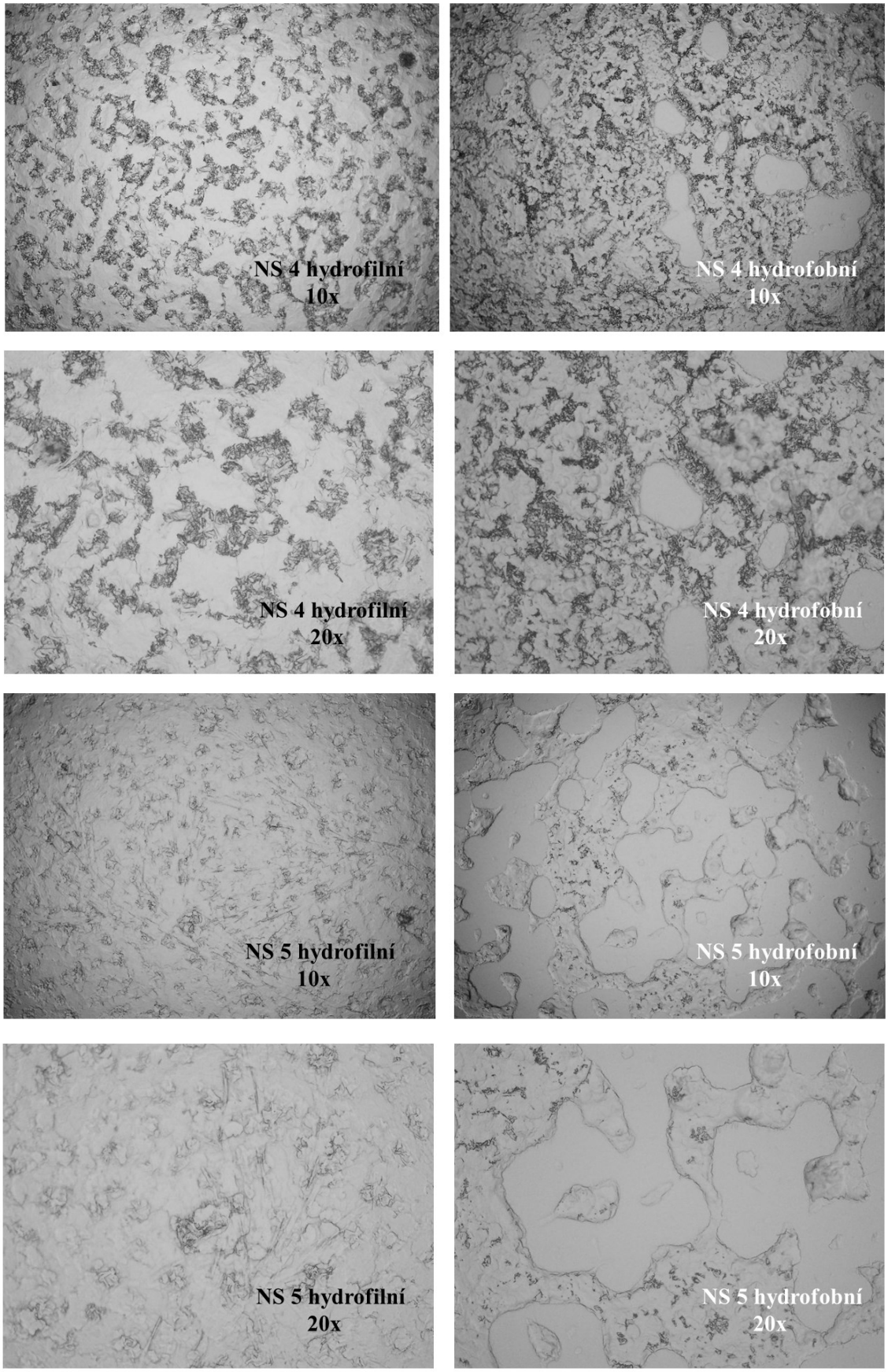

NS 2 hydrofobní
20x


NS 3 hydrofilní
10x


NS 3 hydrofobní
10x


NS 3 hydrofilní
20x


NS 3 hydrofobní
20x



Obrázek 37. První 2 série nastřikování směsi NS na hydrofilní a hydrofobní substrát.

U vzorků NS 1 a 2 (Obr. 37) nevidíme velké rozdíly mezi hydrofilním a hydrofobním povrchem. Jedná se o vzorky s neředěnou směsí (Tab. 19), vzorek NS 1 hydrofilní substrát obsahuje 2 vrstvy lipidů, hydrofobní 3, a vzorek NS 2 obsahuje 1 vrstvu u obou typů substrátu.

Pozorujeme 2 typy domén, které se v mikroskopickém obrazu liší v lomu světla, rozdíl je vidět jako světlá a tmavá doména. Zatímco jedna doména je hladká a propouští světlo bez velkých změn (světlá), tak druhá se jeví jako drsná a obsahuje náhodně orientované roviny, na kterých se světlo lomí, resp. mění se jeho směr (tmavá). Drsné domény mohou vzorkem prostupovat. Hladká doména se jeví jako téměř průhledná a celková struktura připomíná mozaiku.

U vzorku NS 3 (naředěný vzorek, 1 vrstva) vidíme změnu: na hydrofilním substrátu je většina plochy hladká a propouští světlo. Tmavé domény tu téměř nejsou. U vzorku NS 3 hydrofobní vidíme další rozdíl: povrch je diskontinuální a vyskytují se zde oblasti, které nejsou pokryté lipidem (prázdné sklíčko). Vzorek připomíná kapky vody na skle.

NS 4 (naředěný vzorek, 3 vrstvy) je podobný vzorkům NS 1 a 2. Na hydrofilním povrchu jsou slabě vidět krystalky, které tvoří pravděpodobně cholesterol, a tmavé domény zde nejsou tak výrazné. Hydrofobní povrch má více tmavých domén a méně světlých, které jsou však oproti vzorkům NS 1 a 2 větší. Vzorek vypadá jako kombinace vzorků NS 1, 2 a NS 5.

NS 5 (naředěný vzorek, 1 vrstva) hydrofilní má převážně světlou strukturu s drsnějším povrchem, je kontinuální a opět obsahuje zjevné krystaly. Všimněme si, že hydrofilní povrch viditelné krystaly neobsahuje. Hydrofobní povrch je podobný vzorku NS 3, avšak zde vidíme více tmavých domén a méně výrazné prohlubně, které jsou však rozsáhlejší. Hladké lipidové domény připomínají ostrůvky a jsou mnohem větší než u vzorku NS 3.

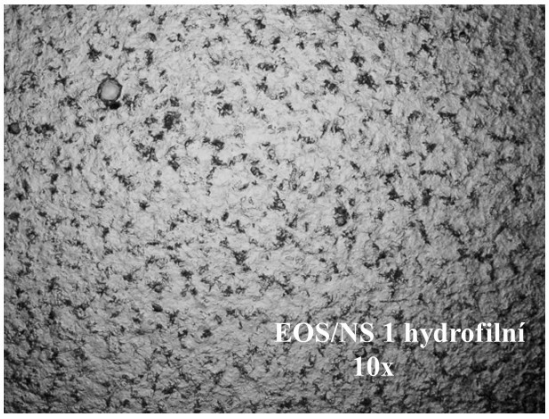
4.2.2 Vzorky směsi EOS/NS

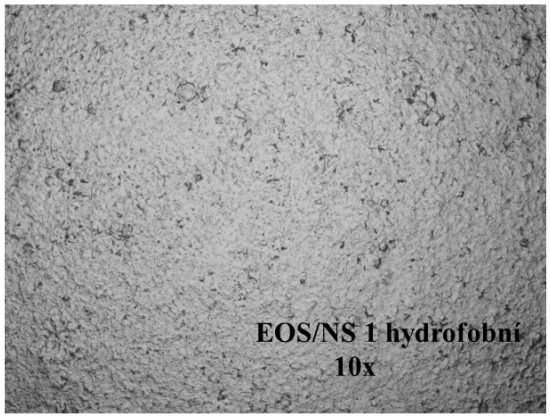
Druhé 2 série vznikly nastřikováním směsi EOS/NS na hydrofilní a hydrofobní substrát.

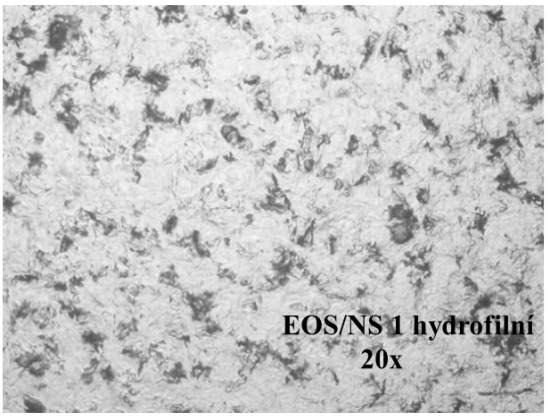
Snímky vzorků se směsí EOS/NS byly pořízeny po procesu „annealing“.

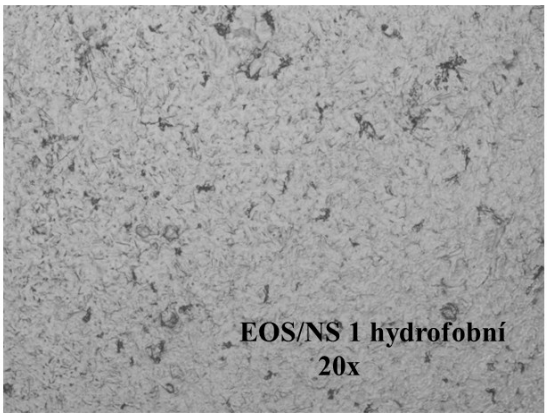
(CerEOS:CerNS)/MK(16-24)/Chol =(0,3:0,7):1:1 mol/mol/mol		hydrofilní	hydrofóbní
EOS/NS	m lipidu [mg]	nastřikování	nastřikování
1	1,35	3x	3x
2	0,45	1x	1x
3	0,0675	1x	1x
4	0,027	3x	3x
5	0,009	1x	1x
annealing		70 °C/H2O	

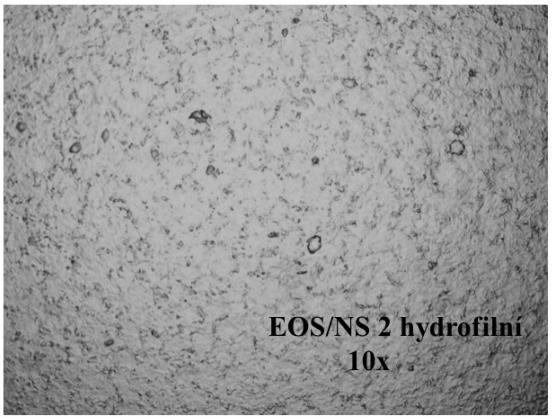
Tabulka 20. Rozpis vzorku 2 nastřikování Linomatem V

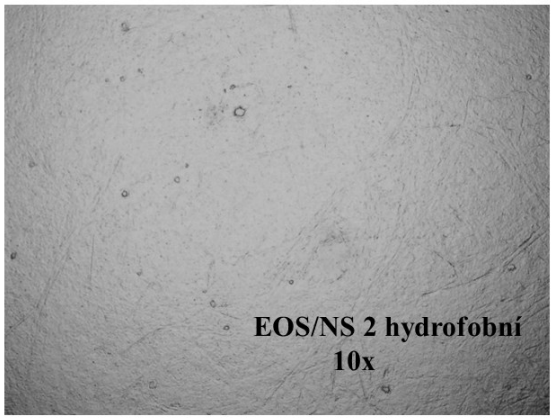


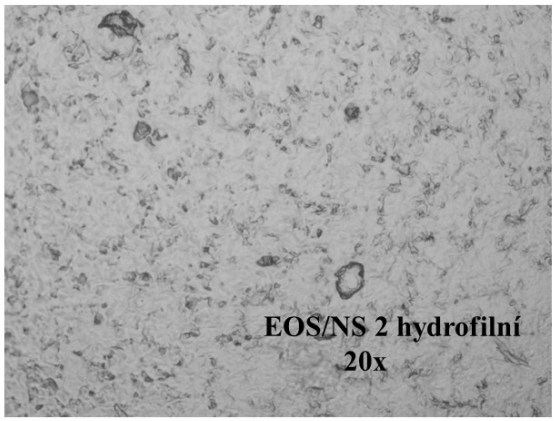


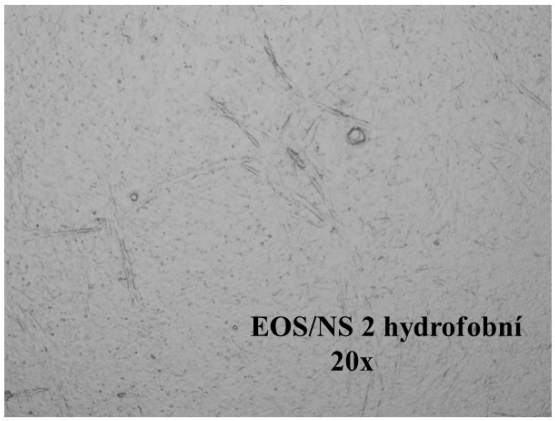


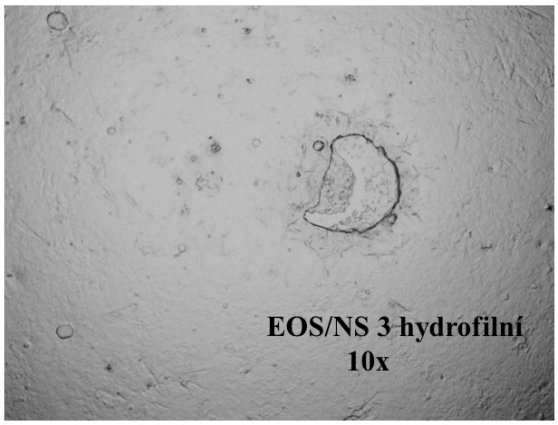


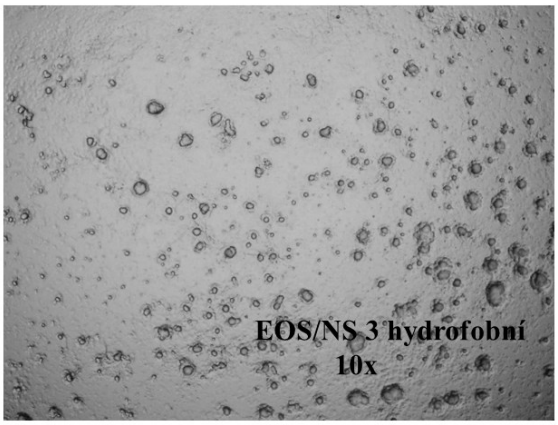

EOS/NS 2 hydrofilní
10x

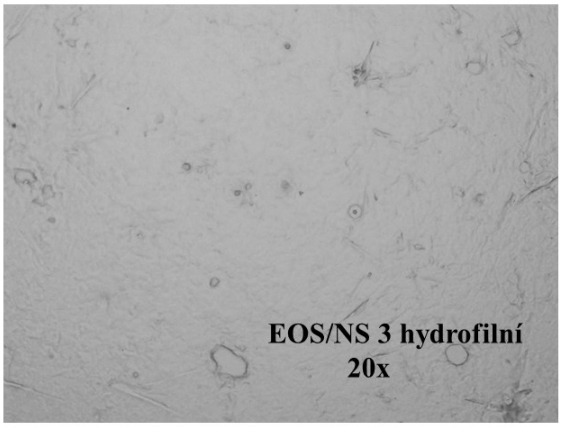

EOS/NS 2 hydrofobní
10x

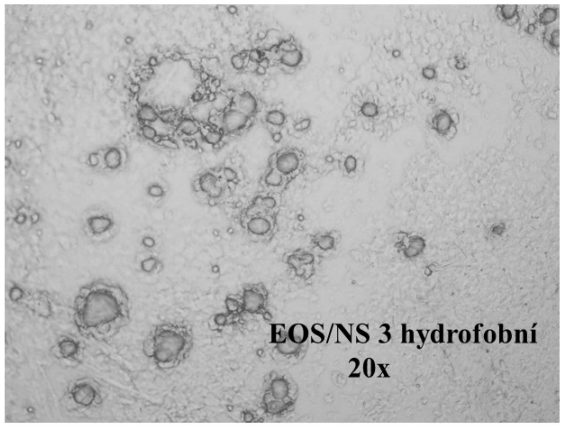

EOS/NS 2 hydrofilní
20x

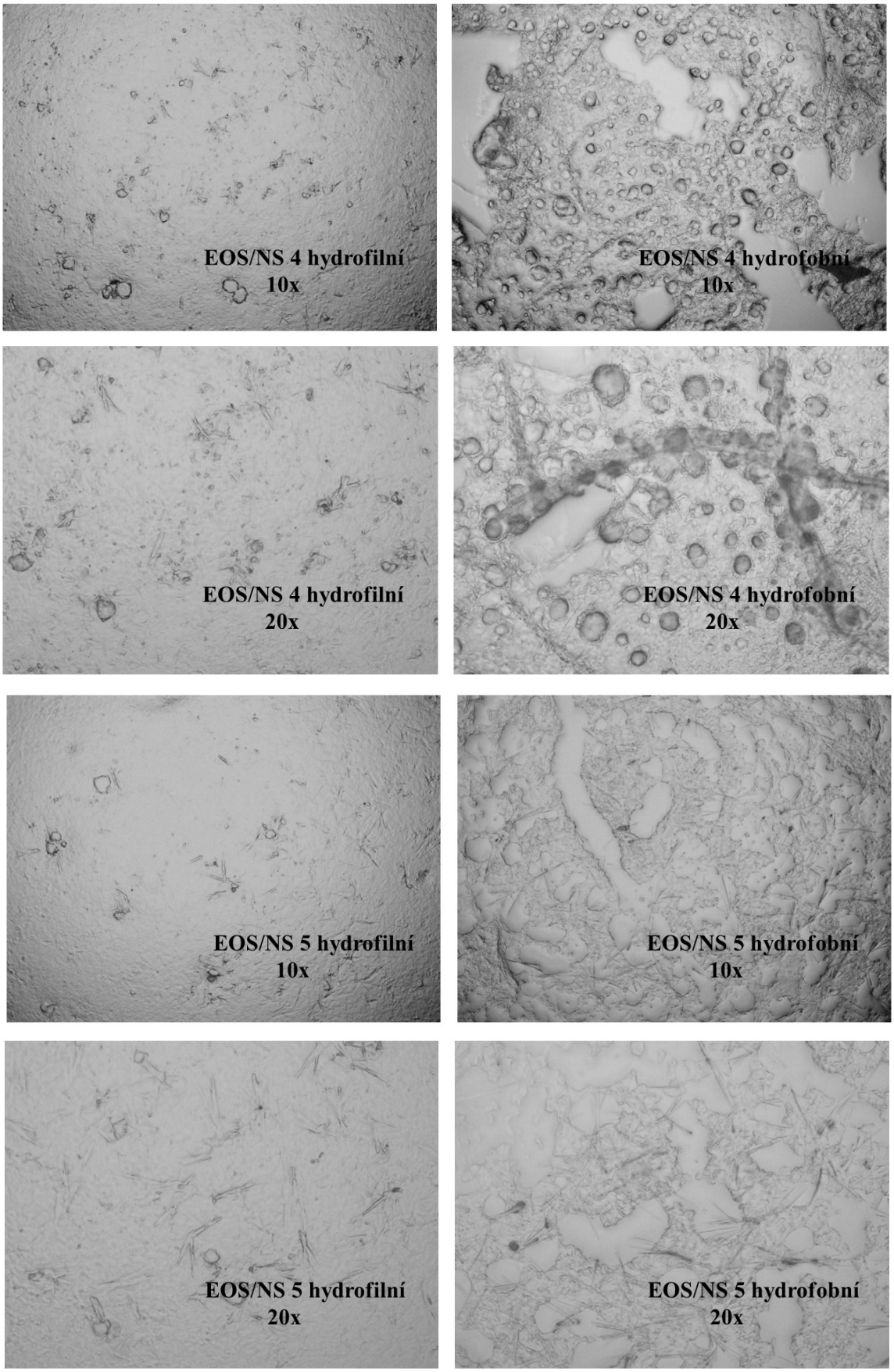

EOS/NS 2 hydrofobní
20x


EOS/NS 3 hydrofilní
10x


EOS/NS 3 hydrofobní
10x


EOS/NS 3 hydrofilní
20x


EOS/NS 3 hydrofobní
20x



Obrázek 38. Druhé 2 série nastřikování směsi EOS/NS na hydrofilní a hydrofobní substrát.

U vzorků (Obr. 38) této série je viditelný rozdíl mezi substráty v podílu tmavých a světlých domén a v rozsahu pórovitosti. Opět pozorujeme 2 typy domén.

Vzorek EOS/NS 1 (3 vrstvy lipidů, Tab. 20) je kontinuální s menšími tmavými doménami na hydrofilním povrchu. Hydrofobní povrch je téměř celý světlý.

EOS/NS 2 (1 vrstva lipidů) vypadá podobně jako ten předešlý; hydrofobní povrch je však kontinuální a celý světlý. Vyskytují se zde krystalky cholesterolu.

EOS/NS 3 (naředěný vzorek, 1 vrstva) hydrofilní je kontinuální s krystalky a neidentifikovatelným útvarem. Hydrofobní povrch je členitý a pravděpodobně obsahuje vyvýšeniny i prohlubně.

EOS/NS 4 (naředěný vzorek, 3 vrstvy) hydrofilní opět vypadá jako kombinace NS 1, 2 a NS 3 a obsahuje krystalky. Hydrofobní povrch je velmi členitý; vidíme i zcela hladké oblasti, které odpovídají s největší pravděpodobností hladkému povrchu samotné skleněné podložky. Na některých místech jsou vidět náznaky jehlicovitých krystalků cholesterolu.

EOS/NS 5 (naředěný vzorek, 1 vrstva) hydrofilní je souvislá vrstva podobná EOS/NS 3 a jsou zde krystalky. Hydrofobní vzorek tvoří diskontinuální světlou vrstvu a krystalky cholesterolu. Zcela hladké oblasti jsou pravděpodobně povrch sklíčka.

Ze série snímků jsme usoudili, že po nastřikování Linomatem V a po procesu „annealing“ mají zejména tenké vrstvy lipidů tendenci vytvořit nesouvislé vrstvy. Stejně jako u hodnocení AFM výsledků vzorku vzniklého Langmuir-Blodgettovou technikou jsme zjistili, že i zde směsi lipidů tvoří „hromádky“ a prohlubně, avšak větších rozměrů.

Cholesterol zde tvoří jehličkovité krystalky, které jsou u směsi NS vidět nejčastěji na hydrofilním povrchu. Pokud je větší koncentrace a více vrstev lipidů, vzorky vypadají podobně, jelikož se „efekt podkladu“ překryje. Jakmile je lipidů méně, vidíme velké rozdíly mezi hydrofilním a hydrofobním substrátem s tím, že se prohlubně a hromádky tvoří na hydrofobním podkladě.

Z toho vyplývá, že to, jakým způsobem se lipidy „poskládají“ závisí na podmínkách nanášení, počtu vrstev lipidů a vlastnostech povrchu substrátu.

4.2.3 Měření lipidových vrstev pomocí XRD (X-ray difraction)

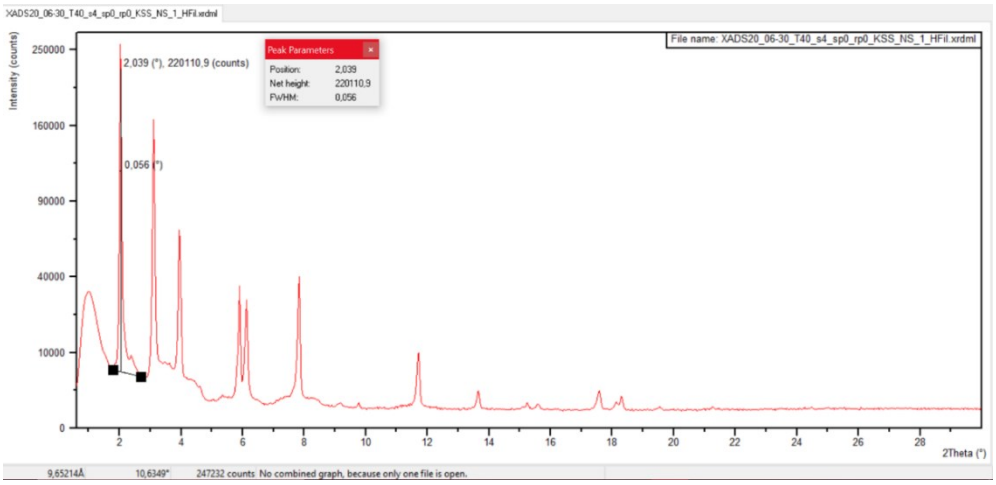
XRD je nedestruktivní analytická metoda, která se používá k identifikaci atomární a molekulární struktury organických a anorganických látek. Princip metody je založen na interakci monochromatického rentgenového záření (dále jen *X-rays*) se vzorkem, který tvoří krystalickou strukturu. Při tomto jevu dochází k difrakci paprsku poté, co dopadne na elektrony měřené látky a interaguje s nimi. Látka s pravidelnou krystalickou strukturou působí jako difrakční mřížka ve viditelném světle. Pokud se však jedná o látku s amorfní strukturou, k difrakci nedochází.[24]

Intenzita rozptýleného záření je definována jako funkce úhlu rozptylu (*2theta*) a struktura materiálu je stanovena z analýzy úhlu difrakce (úhel *2θ*) a intenzity, zobrazené jako velikost, resp. výška píků (Obr. 39).[25]

Pomocí XRD jsme pozorovali mikrostrukturu vzorků, které vznikly nastřikováním Linomatem V, a byli jsme schopni zjistit vzdálenost mezi opakujícími se rovinami molekul. Získali jsme informace o přítomnosti lamelárních fází nebo struktur a jejich mezirovinnou vzdálenost.

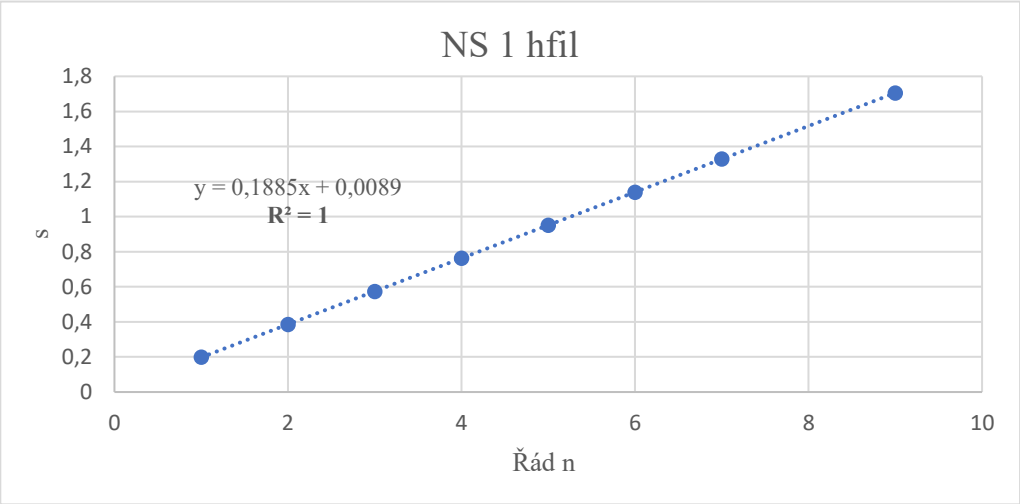
Vzorky byly měřeny při vlnové délce λ = 0,17903 nm.

Výsledky se vyhodnocovaly v programu Data Viewer (Obr.39), odkud se získávaly hodnoty poloh píků (Braggova maxima), které odpovídají *2θ* (*theta,* úhel difrakce).



Obrázek 39. Graf závislosti Intenzity na 2θ u vzorku NS 1 hydrofilní. Poloha prvního píku (při 2θ= 2,039), vyhodnocená softwarem Dataviewer.

Odečtené polohy maxim píků v úhlech *2θ* se přepočítaly na převrácené mezirovinné vzdálenosti *s*. K píkům se přiřadil řád *n* tak, aby byla závislost *s* na řádu *n* lineární (Obr. 40).



Obrázek 40. Graf závislosti s (1/d) na řádu n u vzorku NS 1 hydrofilní. Výsledkem je lineární funkce. Koeficient determinace R^2 zaokrouhled na 1.

Příklad vypočítání mezirovinné vzdálenosti *d* vzorku NS 1 hydrofilní podle Braggovy rovnice:

$$2d\sin\theta = n\lambda \qquad n=1,2,3\ldots$$

Hodnota prvního píku vzorku:

Order (řád *n*) = 1

$2\,\theta = 2{,}039°$

2θ se převedla na *θ*:

$\theta = 2\theta/2 = 1{,}0195°$

θ ve ° se přepočítala na radiány (jelikož excel umí vypočítat sinus jen v jednotkách radián):

$\theta = 0{,}017794$ rad

θ [rad] se převedlo na *sin θ*:

$\sin\theta = 0{,}017793$

K vypočítání vzdálenosti *d* se nejprve vypočítala hodnota rozptylového vektoru *q* podle vztahu:

$$q = (4*\pi*\sin\theta)/\lambda = (4*\pi*0{,}017793)/0{,}1790307 = 1{,}24889\ \mathrm{nm}^{-1}$$

Dalším krokem je vypočítání převrácené mezirovinné vzdálenosti *s*:

$$s = q/(2*\pi) = 1{,}24889/(2*\pi) = 0{,}198767\ \mathrm{nm}^{-1}$$

A následně *d*:

$$d = 1/s = 1/0{,}198767 = 5{,}031018\ \mathrm{nm}$$

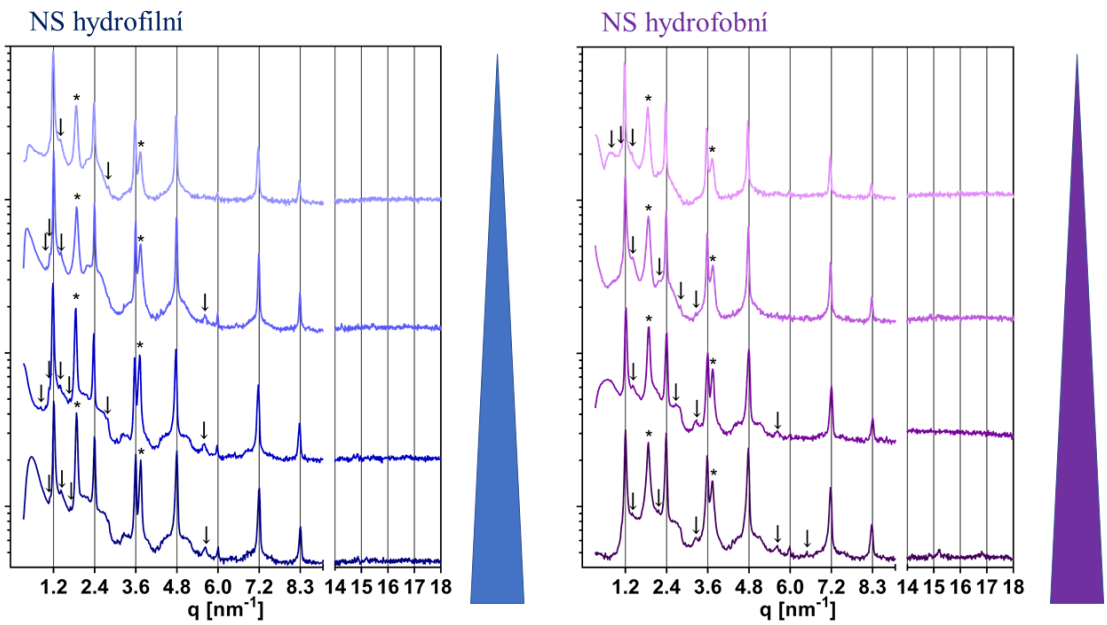
Nakonec se získá směrnice závislosti polohy píků *q* nebo *s* na *n*, pomocí funkce v Excelu „Slope“. Ze směrnice se pak vypočítá hodnota mezirovinné vzdálenosti *d*:

$$d = 5{,}306894\ \mathrm{nm}$$

Stejným způsobem se vypočetly mezirovinné vzdálenosti ostatních vzorků NS a EOS/NS na hydrofilních a hydrofobních substrátech.

4.2.3.1. Vzorky směsi NS

Na Obrázku 41 vidíme rentgenové difraktogramy (závislosti hodnoty relativní intenzity rozptýleného záření na *q*) pro hydrofilní a hydrofobní substrát se snižujícím se množstvím lipidů (od spodu nahoru, směr ubývání lipidů označen velkým trojúhelníkem vedle difraktogramů). Mřížkování ukazuje pravidelné rozmístění píků pro vypočítanou vzdálenost *d* mezi rovinami (Tab. 21). Píky (Braggova maxima), které se s mřížkováním překrývají, jsou intenzity paprsků odražených od souboru rovin té samé struktury. Jednotlivé struktury ve vzorku označujeme jako fáze.



Obrázek 41. Rentgenové difraktogramy vzorku NS na hydrofilním a hydrofobním substrátu. Barevný trojúhelník naznačuje směr ubývání lipidů ve vzorku; nejblíže ose x je vzorek s největším obsahem lipidů. Šipky naznačují přítomnost dalších píků neodpovídajících dané mezirovinné vzdálenosti. Hvězdičky označují píky separovaného krystalického cholesterolu. Relativní intenzity jsou v logaritmické škále. Mřížkování odpovídá pravidelnému rozmístění píků pro d=5,3 nm.

V následující tabulce je shrnutí vypočtených vzdáleností *d*:

CerNS/MK(16-24)/Chol		**hydrofilní**	**hydrofóbní**
NS	m lipidu na plochu [mg/cm^2]	RD [nm]	RD [nm]
1	1,35 (u hydrofilního podkladu méně důsledku chyby)	5,30	5,32
2	0,45	5,30	5,31
3	0,0675	neměřeno	neměřeno
4	0,027	5,31	5,32
5	0,009	5,31	5,31

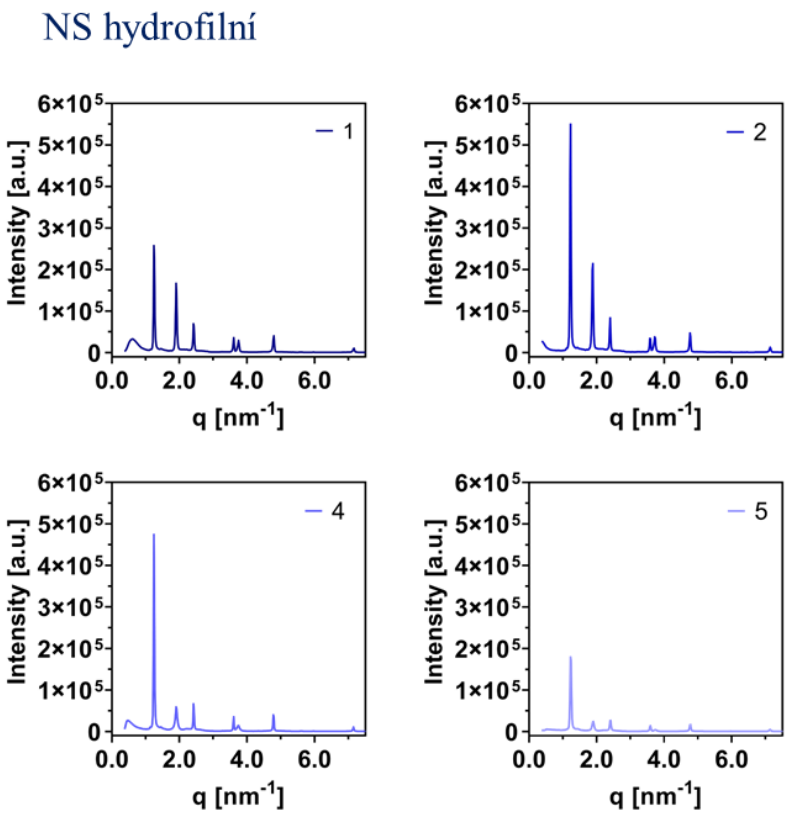
Tabulka 21. Shrnutí výsledných mezirovinných vzdáleností d u vzorků směsi NS na hydrofilním a hydrofobním substrátu. Vzdálenosti se příliš neliší.

Ve vzorcích jsme identifikovali lamelární fázi s mezirovinnou vzdáleností ~5,3 nm, separovaný cholesterol a několik dalších píků s nízkou intenzitou. V rámci obvyklé experimentální chyby se mezirovinná vzdálenost *d* lamelární fáze neměnila.

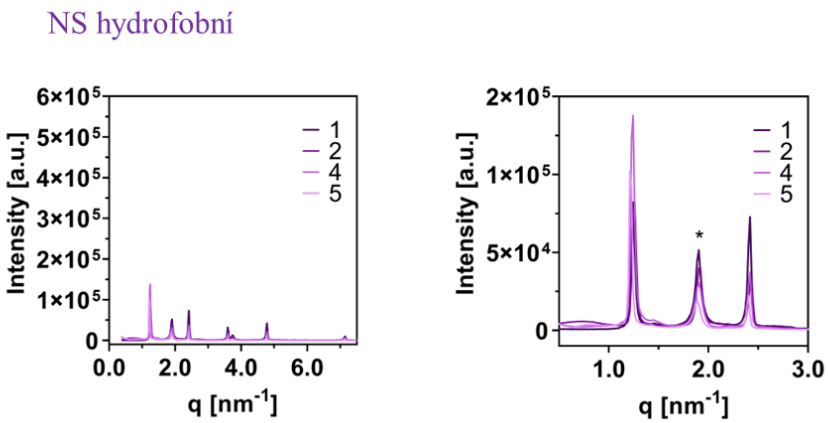
Polohy píků v difraktogramech vzorků NS na hydrofilním a hydrofobním substrátu se příliš neliší. Dále vidíme, že se zvětšujícím se *q* se výrazně snižuje intenzita píků, což se objevuje u všech vzorků. Píky mimo mřížkování, které jsou zvýrazněné šipkami, jsme nedokázali určit.

Všechny vzorky dále obsahovaly fázi separovaného Chol, který měl mezirovinnou vzdálenost kolem 3,4 nm. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanou literaturou.[45]

Difraktogramy (Obr. 41) v oblasti $q = 14 – 18\ nm^{-1}$ znázorňují difrakce při velkých úhlech. Vidíme zde jen nepatrný náznak píku u vzorku směsi NS 1 hydrofobní, jinak se zde žádné píky nevyskytují (na rozdíl od směsi EOS/NS, Obr. 44). Toto může být vysvětleno dvěma způsoby: prvním vysvětlením by byla skutečnost, že se v těchto vzorcích již nevyskytují žádné krystalické struktury s malými mezirovinnými vzdálenostmi, tudíž jsou lipidové řetězce v těchto vzorcích amorfní. Dalším vysvětlením je možnost, že jelikož byly vzorky měřeny lineárním detektorem, detekce pokrývala jen malou část prostoru vzorků, kde se mohou vyskytovat Braggovy reflexe. Tudíž je možné, že tyto struktury ve vzorku jsou, ale jejich difrakci detektor nezachytí.



Obrázek 42. Rentgenové difraktogramy vzorků směsi NS (1-5) na hydrofilním substrátu v oblasti malých úhlů. Intenzita (relativní jednotky, a.u., z angl. arbitrary units) v lineární škále.



Obrázek 43 Rentgenové difraktogramy vzorků směsi NS (1-5) na hydrofobním substrátu v oblasti malých úhlů. Intenzita (relativní jednotky, a.u., z angl. arbitrary units) v lineární škále.

Na Obrázku 42 a 43 jsou relativní intenzity vzorků NS zobrazeny v lineární škále, což je umožňuje snáze porovnávat. Rentgenová difraktometrie, v našem případě měřená na práškovém difraktometru, obecně není kvantitativní metoda. Avšak všechny vzorky byly

měřeny při tom samém nastavení přístroje a byly ve formě tenké vrstvy nanesené na stejné ploše podložky. Při určitém zjednodušení lze předpokládat, že pokud se množství difraktujícího materiálu ve vzorku snižuje, ale ostatní parametry se nemění, intenzita rozptýleného záření by měla klesat úměrně úbytku materiálu. Očekávali jsme, že se relativní intenzity na rentgenovém difraktogramu budou se snižujícím se množstvím lipidů také snižovat. Dále jsme očekávali rozdíl mezi intenzitou vzorků na hydrofilním a hydrofobním substrátu.

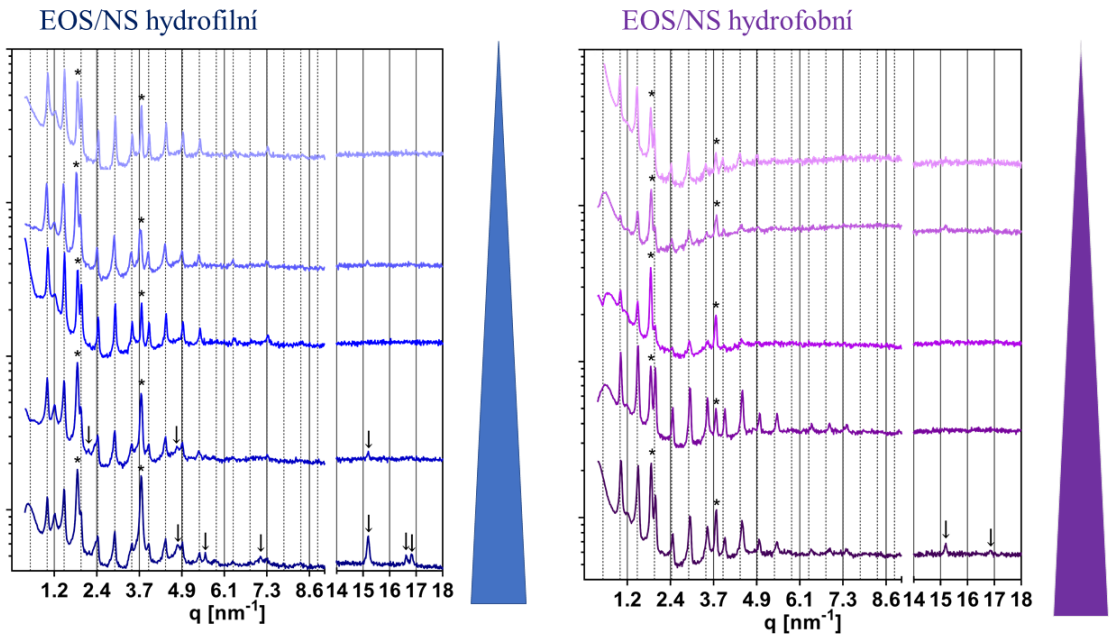
Nejvyšší relativní intenzitu v zobrazených difraktogramech (Obr. 42 a 43) má pík prvního řádu při hodnotě q kolem 1,2 nm^{-1}. Pozorujeme, že se intenzity tohoto píku ve vzorcích NS na hydrofilním povrchu pohybují v rozmezí přibližně 2–5x10^5 a.u (relativní jednotky intenzity, z angl. *arbitrary units*). Zatímco úbytek nanesených lipidů mezi vzorkem NS 1 a NS 5 je řádově 100násobný, relativní intenzity těchto vzorků 1 a 5 jsou srovnatelné. Na difraktogramech nepozorujeme trend snižování se relativní intenzity píků pro dané vzorky.

V případě vzorků NS na hydrofobním povrchu (Obr. 43) pozorujeme relativní intenzity píku 1. řádu kolem 1x10^5 a.u.; ani zde nepozorujeme trend změny intenzity tohoto píku v závislosti na množství naneseného vzorku.

Rentgenová difrakce vzorků NS ukázala, že jejich fázové složení ani opakující se vzdálenosti se v závislosti na typu povrchu použité podložky nemění. Dále jsme pozorovali, že relativní intenzity dominantního píku lamelární fáze nevykazují trend v závislosti na množství lipidu na konstantní ploše vzorku.

4.2.3.2. Vzorky směsi EOS/NS

Na Obrázku 44 vidíme rentgenové difraktogramy vzorků EOS/NS jako závislost relativní intenzity difraktovaného záření (v logaritmické škále) na velikosti rozptylového vektoru q. Lipidy jsou naneseny na hydrofilní a hydrofobní substrát a směr snižujícího se množství lipidů (od spodu nahoru) je označen barevným trojúhelníkem.



Obrázek 44. Rentgenové difraktogramy vzorků EOS/NS na hydrofilním a hydrofobním substrátu. Barevný trojúhelník naznačuje ubývání lipidů ve vzorku; nejblíže ose x je vzorek s největším množstvím lipidů. Šipky označují přítomnost dalších píků neodpovídajících daný mezirovinný vzdálenostem. Hvězdičky označují píky separovaného krystalického cholesterolu. Mřížkování odpovídá pravidelnému rozmístění píků pro d=5,1 nm (plná čára) a pro d=12,9 nm (přerušovaná čára). Relativní intenzity jsou v logaritmické škále.

V následující tabulce je shrnutí vypočtených vzdáleností *d*:

CerEOS/CerNS/MK(16-24)/Chol		**hydrofilní**		**hydrofóbní**	
EOS/NS	m lipidu na plochu [mg/cm^2]	RD [nm]		RD [nm]	
1	1,35	**12,92**	5,14	12,79	5,09
2	0,45	**12,91**	5,14	12,75	5,02
3	0,0675	12,89	5,13	12,76	5,14
4	0,027	12,89	5,14	**12,85**	5,10
5	0,009	12,89	5,12	**12,94**	5,13

Tabulka 22. Shrnutí výsledných mezirovinných vzdáleností d u vzorků směsi EOS/NS na hydrofilním a hydrofobním substrátu.

Ve vzorcích jsme identifikovali dvě lamelární fáze, jejichž mezirovinné vzdálenosti *d* jsou uvedeny v tabulce 22. Pravidelný rozestup píků těchto fází je zobrazený v Obrázku 44 jako mřížkování v podobě plných čar (pro krátkou fázi s *d* = 5,1 nm) a přerušovaných čar (pro dlouhou fázi s *d* = 12,9 nm). Podobné hodnoty byly zaznamenány v prasečím SC, kde byly popsány 2 lamelární fáze s opakující se vzdáleností: dlouhá lamelární fáze s mezirovinnou vzdáleností ~13 nm a krátká fáze s mezirovinnou vzdáleností ~6 nm.[46]

Mezirovinné vzdálenosti struktur na hydrofilním a hydrofobním substrátu byly vypočítány z polohy celkem 5 – 9 píků pro dlouhou fázi a 2 – 3 píků pro krátkou fázi, protože tato fáze nebyla v difraktogramech dostatečně rozlišená. V případě krátké fáze nepozorujeme signifikantní změny v opakující se vzdálenosti v závislosti na typu povrchu substrátu. Vzorek EOS/NS 2 hydrofrobní se od ostatních mírně lišil, ale celkový trend jsme nepozorovali.

Pozorujeme ale, že opakující se vzdálenost *d* vychází kratší (~5,1 nm) ve srovnání s *d* zjištěnou u analogické struktury ve vzorcích NS (~5,3 nm; Tab. 21). To může být způsobeno i tím, že v případě vzorků EOS/NS byly k dispozici většinou pouze 3 píky pro výpočet parametru *d* krátké fáze, takže tato hodnota může být nepřesnější.

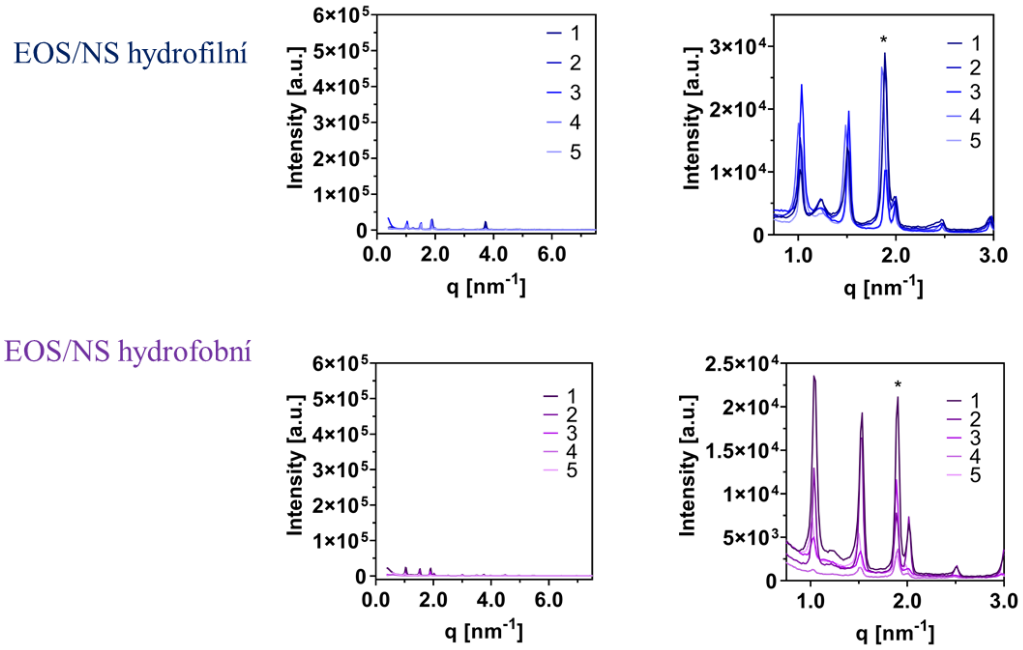
V případě dlouhé fáze je *d* konzistentně 12,9 nm u vzorků na hydrofilním substrátu. Vzorky EOS/NS na hydrofobním povrchu tvořily dlouhou fázi s variabilnější hodnotou *d*. Zjistili jsme *d* = 12,8 nm pro vzorky s větším množstvím lipidů a hodnoty *d* = 12,9 nm pro vzorky s menším množstvím lipidů. Usuzujeme, že tato variabilita je spíše nenáhodná a mohlo by jít o trend závislý na množství lipidů. Pro potvrzení je potřeba experiment zopakovat.

Difraktogramy (Obr. 44) v oblasti q = 14 – 18 nm^{-1} obsahují píky difraktované při velkých úhlech. U vzorků EOS/NS 1 a 2 hydrofilní a vzorku EOS/NS 1 hydrofobní pozorujeme v této oblasti píky (označené šipkami). Tyto píky odpovídají uspořádání hydrofobních řetězců lipidů mezi sebou, které jsou zarovnané a tvoří pravidelnou strukturu, a které u ostatních vzorků s menším množstvím lipidů nepozorujeme. Důvodem může být, že ve vzorcích bez těchto píků není pravidelné uspořádání řetězců, tedy řetězce jsou amorfní. Aby se na difraktogramu vytvořily píky, musí mít vzorek pravidelnou strukturu. Dalším vysvětlením, které je pravděpodobnější, je, že tyto píky nebyly zachyceny detektorem.

Vzorky byly měřeny lineárním detektorem, což znamená, že pokrývá jen malou část prostoru, kde se může vyskytovat difraktované záření. Je tedy pravděpodobné, že píky pravidelného uspořádání řetězců nejsou vidět, protože se vyskytují na jiném místě v prostoru než v případě vzorků, kde tyto píky detekovány byly. Jsou tedy mimo detektor.

Dále pozorujeme nezařazené píky u vzorků EOS/NS 1 a 2 hydrofilní. Všechny vzorky také obsahovaly fázi separovaného Chol, který měl mezirovinnou vzdálenost kolem 3,4 nm (označeno hvězdičkou).

Na obrázku 45 jsou difraktogramy vzorků EOS/NS s relativní intenzitou v lineární škále. To umožňuje sledovat rozdíly mezi intenzitami v závislosti na měnícím se množství lipidů a druhu povrchu substrátu.



Obrázek 45. Rentgenové difraktogramy vzorků směsi EOS/NS (1-5) na hydrofilním a hydrofobním substrátu v oblasti malých úhlů. Intenzita (relativní jednotky, a.u., z angl. arbitrary units) v lineární škále.

Na Obrázku 45 (vzorky směsi EOS/NS) mají osy y na panelech vlevo stejný rozsah jako u vzorků směsi NS (Obr. 42 a 43). Zde vidíme, že vzorky směsi EOS/NS mají celkově výrazně nižší intenzity než analogické vzorky NS. Dále vidíme, že se zvětšujícím se *q* se výrazně snižuje intenzita píků.

Panely vpravo umožňují srovnat relativní intenzity vzorků mezi sebou (1-5). Lipidy na hydrofilním povrchu mají srovnatelné intenzity nezávislé na jejich množství naneseném na povrch podložky. EOS/NS vzorky na hydrofobním povrchu se chovají jinak – jedná se o jediný systém, kde pozorujeme očekávatelný pokles relativní intenzity píků ve směru, v jakém ubývá nanesených lipidů. Pozorovaný pokles intenzity však řádově neodpovídá úbytku lipidů ve vzorku (pokles by měl být teoreticky ještě větší).

5. Závěr

Cílem této práce bylo si přiblížit, jak se lipidy ze SC organizují a jaké tvoří struktury. Zda tvorba struktury závisí na jejich množství, složení nebo vlastnostech povrchu substrátu.

Připravili jsme modely lidské kožní bariéry s využitím depozice tenkých lipidových filmů ze dvou různých směsí: směs NS a směs EOS/NS, které jsme nastřikovali Linomatem V. K hodnocení těchto vzorků bylo použito XRD a světelná mikroskopie.

Z metody XRD jsme zjistili, že ve směsi NS se vyskytuje krátká lamelární fáze s mezirovinnou vzdáleností ~5,3 nm. Relativní intenzita difraktovaného záření se u těchto vzorků se sníženým množstvím lipidů výrazně neměnila, a to u obou typů povrchů – hydrofilního a hydrofobního. Ve vzorcích se nacházely další píky, které jsme neidentifikovali, a dále separovaný cholesterol.

Ve směsi EOS/NS se vyskytovaly 2 lamelární fáze: dlouhá s mezirovinnou vzdáleností ~12,9 nm a krátká se vzdáleností ~5,1 nm. Relativní intenzita se s měnícím se množstvím lipidů neměnila u vzorků na hydrofilním povrchu. Vzorky také obsahovaly fázi separovaného cholesterolu.

Pomocí světelné mikroskopie jsme pozorovali rozdíly mikroskopické struktury vzorků na různém typu substrátu. Zjistili jme, že se snižujícím se množstvím lipidy netvoří kontinuální vrstvu, ale tvoří „hromádky“ a prohlubně. Jsou viditelné rozdíly i mezi hydrofilním a hydrofobním substrátem, kde u hydrofobního jsou vyvýšené domény výraznější. Na snímcích jsou vidět i krystalky cholesterolu. Došli jsme k závěru, že čím je ve vzorku méně lipidů, tím víc jsou ovlivněny povrchem substrátu.

Pomocí Langmuir-Blodgettovi techniky jsme depozitovali směs NS na hydrofilní sklíčko v 7 vrstvách, které se hodnotily metodou AFM. Pomocí této metody jsme pozorovali přítomnost domén kulatého tvaru, výškový rozdíl mezi těmito doménami a spodními doménami dosahoval až 100 nm.

Na závěr jsme na základě výsledků usoudili, že organizace lipidů závisí na jejich složení, koncentraci, tím pádem i počtu vrstev, a na vlastnostech povrchu substrátu.

6. Seznam použitých zkratek:

SC – stratum corneum

Cer – ceramid

MK – mastné kyseliny

Chol – cholesterol

CholS – cholesteryl sulfát

LB – Langmuir-Blodgettova technika

G – gas (plynná fáze)

LE - Liquid Expanded

LE-LC - Liquid Expanded-Liquid Condensed

LC - Liquid Condensed

S – solid (pevná fáze)

TR – *transfer ratio*

XRD – X-ray diffraction analysis

AFM – Atomic force microscopy

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

7. Literatura:

1. Hoffman, Matthew a MD. b.r. „The Skin (Human Anatomy): Picture, Definition, Function, and Skin Conditions". WebMD. https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin.

2. Kočárek, Eduard. 2010. „Kapitola 17: Kůže není jen pokrývka lidského těla“. *Biologie člověka 1*. Nakladatelství Scientia s.r.o

3. Roger, Mathilde, Nicola Fullard, Lydia Costello, Steven Bradbury, Ewa Markiewicz, Steven O'Reilly, Nicole Darling, et al. 2019. „Bioengineering the microanatomy of human skin". *Journal of Anatomy* **234** (4): 438–55. https://doi.org/10.1111/joa.12942.

4. Elias, Peter M. 1981. „Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization." *International Journal of Dermatology* **20** (1): 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1981.tb05278.x.

5. Rabionet, Mariona, Karin Gorgas, a Roger Sandhoff. 2014. „Ceramide Synthesis in the Epidermis". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1841** (3): 422–34. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.08.011.

6. Smeden, Jeroen van, Louise Hoppel, Rob van der Heijden, Thomas Hankemeier, Rob J. Vreeken, a Joke A. Bouwstra. 2011. „LC/MS Analysis of Stratum Corneum Lipids: Ceramide Profiling and Discovery [S]". *Journal of Lipid Research* **52** (6): 1211–21. https://doi.org/10.1194/jlr.M014456.

7. Boiten, Walter, Samira Absalah, Rob Vreeken, Joke Bouwstra, a Jeroen van Smeden. 2016. „Quantitative Analysis of Ceramides Using a Novel Lipidomics Approach with Three Dimensional Response Modelling". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1861** (11): 1652–61. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.07.004.

8. Biology for Majors II.*„Structure and Function of Skin“* https://courses.lumenlearning.com/suny-wmopen-biology2/chapter/structure-and-function-of-skin/

9. Nemes, Zoltan, a Peter M. Steinert. 1999. „Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier". *Experimental & Molecular Medicine* **31** (1): 5–19. https://doi.org/10.1038/emm.1999.2.

10. Smeden, Jeroen van, a Joke A. Bouwstra. 2016. „Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients". *Current Problems in Dermatology* **49**: 8–26. https://doi.org/10.1159/000441540.

11. U.S. Geological Survey.„Surface Tension and Water“ https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/surface-tension-and-water.

12. Laurén, Susanna. b.r. „Surface Tension of Water – Why Is It so High?" https://www.biolinscientific.com/blog/surface-tension-of-water-why-is-it-so-high.

13. Girard-Egrot, Agnès P., a Loïc J. Blum. 2007. „Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes”. In *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, editoval Donald K. Martin, 23–74. Fundamental Biomedical Technologies. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-37740-9_2

14. Bonn, Mischa, Sylvie Roke, Otto Berg, Juurlink, Amalia Stamouli, a Michiel Müller. 2004. „A Molecular View of Cholesterol-Induced Condensation in a Lipid Monolayer". *The Journal of Physical Chemistry B* **108** (50): 19083–85. https://doi.org/10.1021/jp0452249.

15. Brown, Rhoderick E., a Howard L. Brockman. 2007. „Using Monomolecular Films to Characterize Lipid Lateral Interactions". *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **398**: 41–58.

16. Peterson, I. R. 1990. „Langmuir-Blodgett Films". *Journal of Physics D: Applied Physics* **23** (4): 379–95. https://doi.org/10.1088/0022-3727/23/4/001.

17. Hussain, Syed Arshad, Bapi Dey, D. Bhattacharjee, a N. Mehta. 2018. „Unique Supramolecular Assembly through Langmuir – Blodgett (LB) Technique". *Heliyon* **4** (12): e01038. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01038.

18. Velázquez, María Mercedes, Teresa Alejo, David López-Díaz, Beatriz Martín-García, a María Dolores Merchán. 2016. *Langmuir-Blodgett Methodology: A Versatile Technique to Build 2D Material Films*. *Two-Dimensional Materials - Synthesis, Characterization and Potential Applications*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/63495.

19. Scientific, Biolin. b.r. „What and why: Langmuir-Blodgett films“ https://cdn2.hubspot.net/hubfs/516902/Pdf/KSV%20NIMA/Technology%20Notes/KN-TN-02-Langmuir-Blodgett-films.pdf.

20. Scientific, Biolin. b.r. „Langmuir & Langmuir Blodgett | Measurements". https://www.biolinscientific.com/measurements/langmuir-and-langmuir-blodgett

21. Blodgett, Katharine B. 1935. „Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface". *Journal of the American Chemical Society* **57** (6): 1007–22. https://doi.org/10.1021/ja01309a011.

22. Honig, E. P. 1973. „Molecular Constitution of X- and Y-Type Langmuir-Blodgett Films". *Journal of Colloid and Interface Science* **43** (1): 66–72. https://doi.org/10.1016/0021-9797(73)90347-0.

23. Techniques. b.r. „X-Ray Powder Diffraction (XRD)" https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html

24. Twi-Global. b.r. „What Is X-Ray Diffraction Analysis (XRD) and How Does It Work?" https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/x-ray-diffraction.aspx.

25. Materials Engineering | JoVE. b.r. „X-Ray Diffraction for Determining Atomic and Molecular Structure“ https://www.jove.com/v/10446/x-ray-diffraction.

26.Bunaciu, Andrei A., Elena Gabriela Udriştioiu, a Hassan Y. Aboul-Enein. 2015. „X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications". *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **45** (4): 289–99. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616.

27. Baskaran, Sulochanadevi. 2010. „Structure and Regulation of Yeast Glycogen Synthase". Thesis. https://doi.org/10.7912/C2/1815.

28. Shimadzu. b.r. „XRD" https://www.shimadzu.com/an/industries/automotive/metals/xrd/index.html.

29. Kajiwara, Kanji, a Yuzuru Hiragi. 1996. „Chapter 6 Structure Analysis by Small-Angle X-Ray Scattering". In *Analytical Spectroscopy Library*, editoval H. Saisho a Y. Gohshi, 7:353–404. Applications of Synchrotron Radiation to Materials Analysis. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0926-4345(96)80007-1.

30. NanoAndMore. b.r. „What Is AFM? Learn about Atomic Force Microscopy!“ https://www.nanoandmore.com/what-is-atomic-force-microscopy?gclid=Cj0KCQiAgP6PBhDmARIsAPWMq6laVpf6P_qA8mxNuf-gXWSdfXNVObrPZkzWeFfvb7eSqm1AJObCvLYaAtSeEALw_wcB.

31. Oxford Instruments. b.r. „Atomic Force Microscopy - An Overview from Asylum Research" https://afm.oxinst.com/outreach/atomic-force-microscopy.

32. Opálka, Lukáš, Andrej Kováčik, Michaela Sochorová, Jaroslav Roh, Jiří Kuneš, Juraj Lenčo, a Kateřina Vávrová. 2015. „Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides". *Organic Letters* **17** (21): 5456–59. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02816.

33. Scientific, Biolin. b.r. „KSV NIMA LB Software Manual“ https://nlab.pl/uploads/edytor/KSV%20NIMA%20LB%20Software%20Manual%20v1.6.pdf.

34. Minerals Education Coalition. b.r. „Mica" https://mineralseducationcoalition.org/minerals-database/mica/.

35. Dong, Yueguo, Xiaoqun Zhu, Feng Shi, a Jun Nie. 2014. „Surface Photo-Anchored PNIPAM Crosslinked Membrane on Glass Substrate by Covalent Bonds". *Applied Surface Science* **307**: 7–12. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.02.176.

36. Ahn, Wonmi, a D. Keith Roper. 2010. „Periodic Nanotemplating by Selective Deposition of Electroless Gold Island Films on Particle-Lithographed Dimethyldichlorosilane Layers". *ACS Nano* **4** (7): 4181–89. https://doi.org/10.1021/nn100338f.

37. Escribano Serrano, Sonia. 2020. „Creation of a multilayer skin barrier model based on the Langmuir-Blodgett technique". Diploma Thesis, Faculty of Pharmacy, Charles University Hradec Králové.

38. Papadimitriou, Nikolaos, M. Kainourgiakis, Stelios Karozis, a Georgia Charalambopoulou. 2014. „Studying the structure of single-component ceramide bilayers with molecular dynamics simulations using different force fields". *Molecular Simulation* **41**. https://doi.org/10.1080/08927022.2014.947483

39. Vávrová, K., A. Kováčik, a L. Opálka. 2017. „Ceramides in the Skin Barrier". *European Pharmaceutical Journal* **64** (2): 28–35. https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0004.

40. PubChem. b.r. „Tetracosanoic Acid". https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11197

41. PubChem. b.r. „Cholesterol". https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997.

42. Norlén, L. *et al.* (2007) 'Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir–Blodgett films', *Journal of Structural Biology*, **158**(3). 386–400. doi:10.1016/j.jsb.2006.12.006.

43. Sparr, E. *et al.* (2001) 'AFM Study of Lipid Monolayers: III. Phase Behavior of Ceramides, Cholesterol and Fatty Acids', *Langmuir*, **17**(1), pp. 164–172. doi:10.1021/la000271n.

44. Caymanchem. b.r. „EOS" https://www.caymanchem.com/news/eos.

45. Schreiner, V. *et al.* (2000) 'Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging', *The Journal of Investigative Dermatology*, **114**(4), pp. 654–660. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00941.x.

46. Bouwstra, J.A. *et al.* (1995) 'Lipid organization in pig stratum corneum.', *Journal of Lipid Research*, **36**(4), pp. 685–695. doi:10.1016/S0022-2275(20)40054-9.