

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

**STUDIUM LIPIDOVÝCH MEMBRÁN OBSAHUJÍCÍCH LYSOLIPIDY JAKO
MODELŮ ATOPICKÉ DERMATITIDY**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2014

Markéta Pospíšilová

PROHLÁŠENÍ

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

Květen 2014, Hradec Králové

Markéta Pospíšilová

Děkuji své školitelce, doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D., za příjemné pracovní prostředí, pozitivní přístup a cenné rady, bez kterých by se tato práce nikdy nestala skutečností.

Děkuji Mgr. Petře Pullmannové, Ph.D., Mgr. Barboře Školové a Kláře Staňkové za pomoc a rady při práci.

Děkuji svému příteli a své rodině za podporu, optimismus a chození po špičkách.

Za finanční pomoc děkuji Grantové agentuře České Republiky (13-23891S), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (260 062) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (652412).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Pospíšilová, Markéta

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

Název diplomové práce: Studium lipidových membrán obsahujících lysolipidy jako modelů atopické dermatitidy.

Před vlivem škodlivého vnějšího prostředí jsme chráněni kožní bariérou, která je lokalizovaná ve stratum corneum, a která zároveň zabraňuje nadměrným ztrátám vody kůží. Nejdůležitější roli v bariérové funkci kůže mají ceramidy. Ceramidy jsou u zdravého člověka syntetizovány z glukosylceramidů a sfingomyelinů prostřednictvím enzymů glukocerebrosidázy a sfingomyelinázy. Pokud je ve stratum corneum ceramidů nedostatek, tedy, pokud tyto mechanismy fungují nedostatečně, rozvíjí se atopická dermatitida. Ve stratum corneum pacienta s atopickou dermatitidou jsou glukosylceramidy a sfingomyeliny hydrolyzovány glukosylceramid/sfingomyelin deacylázou za vzniku lysolipidů (glukosylsfingosinu nebo sfingosinfosforylcholinu) a volné mastné kyseliny. V této práci jsme připravili modely membrán, které napodobují složení lipidů stratum corneum pacienta s atopickou dermatitidou, tedy, ve kterých jsou ceramidy částečně (25 % - 75 %) nebo úplně nahrazeny lysolipidy. Modelové membrány byly připraveny jako ekvimolární směs lysolipidů nebo ceramidu, směsi mastných kyselin (C16 – C24) a cholesterolu s přídavkem 5 % cholesterol-sulfátu na polykarbonátových filtrech. Vliv lysolipidů na rozpustnost připravených membrán byl studován pomocí modelových permeantů theofylinu a indomethacinu za použití Franzových difuzních cel. Dále byla měřena ztráta vody membránami a elektrická impedance. Množství permeantů prošlých přes membrány bylo stanoveno pomocí

HPLC. Výsledky ukázaly, že přítomnost sfingosinfosforylcholinu má za následek zvýšení ztráty vody membránou a zvýšenou propustnost membrán pro oba modelové permeanty, nejvíce při nahrazení 25 % ceramidu sfingosinfosforylcholinem. Zvýšená propustnost membrán se objevila i u glukosylsfingosinu, opět nejvíce při náhradě 25 % ceramidu glukosylsfingosinem. Tato studie prokázala, že přítomnost obou lysolipidů je zodpovědná za zvýšenou propustnost stratum corneum u atopické dermatitidy a za zvýšené ztráty vody z epidermis.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of inorganic and organic chemistry

Candidate: Pospíšilová, Markéta

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Study of lipid membranes with lysolipids as models of atopic dermatitis

We are protected against the harmful influence of the external environment by a skin barrier, which is located in the stratum corneum. The skin barrier also prevents excessive water loss through the skin. Ceramides have the most important role in the barrier function of the skin. The healthy skin's ceramides are synthesized of glucosylceramide and sphingomyelin via enzymes sphingomyelinase and glucocerebrosidase. If there is a lack of ceramide in the stratum corneum, which means, if these mechanisms work insufficiently, it gives rise to atopic dermatitis. In the stratum corneum of a patient who suffers from atopic dermatitis are glucosylceramide and sphingomyelin hydrolyzed by glucosylceramide/sphingomyeline deacylase which leads to free fatty acids and lysolipids (glucosylsphingosine and sphingosinephosphorylcholine) generation. In this work, we prepared model membranes which simulate a composition of lipids of the stratum corneum of a patient with atopic dermatitis, in which ceramides are replaced by lysolipids partially (25 % - 75 %) or completely. Model membranes were prepared as an equimolar mixtures of lysolipids, ceramide, mixtures of free fatty acids (C16 – C24) and cholesterol with the addition of cholesterol sulphate on polycarbonate filters. Effect of lysolipids on permeability prepared membranes was studied by model permeants theophylline and indomethacin by using Franz diffusion cells. Then we measured a loss of water through the

membranes and electrical impedance. The amount of permeants which passed through the membranes was determined by HPLC. Results showed that the presence of sphingosinephosphorylcholine causes increase in loss of water from the membrane and increased permeability of membranes for both model permeants. This most happened when we replaced 25 % of ceramide by sphingosinephosphorylcholine. Increased permeability of the membranes was also found at glucosylsphingosine, and it happened mostly in the case of replacing 25 % of ceramide by glucosylsphingosine. This study demonstrated that the presence of both lysolipids is responsible for the increased permeability of the stratum corneum of atopic dermatitis, and it is also responsible for increased loss of water from the epidermis.

1. OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	6
1. OBSAH.....	8
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Kožní bariéra.....	11
3.1.1 Stratum corneum	11
3.1.2 Keratinocyty	11
3.1.3 Lamelární granula.....	12
3.1.4 Ceramidy	13
3.2 Atopická dermatitida.....	13
3.2.1 Epidemiologie	13
3.2.2 Projevy.....	14
3.2.3 Etiologie	14
3.2.4 Glukosylceramid sfingomyelin deacyláza.....	15
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
4.1 Chemikálie	17
4.2 Příprava modelových lipidových membrán	18
4.2.1 Příprava směsi mastných kyselin	18
4.2.2 Příprava směsí lipidů	19
4.2.3 Příprava lipidových membrán	19
4.3 Permeační pokusy	20
4.3.1 Příprava donorových vzorků modelových permeantů.....	20
4.3.2 Příprava pufru jako akceptorové fáze.....	20
4.3.3 Příprava Franzových difuzních cel.....	20
4.3.4 Měření ztráty vody membránami	21
4.3.5 Měření elektrické impedance	21
4.3.6 Vlastní permeace	21
4.3.7 Podmínky HPLC analýzy	22
4.3.8 Statistická analýza dat	22
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	23

6. ZÁVĚR	29
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	30
8. LITERATURA	31

2. CÍL PRÁCE

Atopická dermatitida je zánětlivé kožní onemocnění ⁽¹⁾. Kožní bariéra je u tohoto onemocnění poškozena a není schopna plnit svoji funkci: chránit před škodlivinami z vnějšího prostředí a zadržovat vodu ⁽²⁾. Příčinou je nedostatek ceramidů ve stratum corneum ⁽²⁾, který se objevuje, krom jiného, i v důsledku abnormální exprese glukosylceramid/sfingomyelin deacylázy ⁽³⁾. Produktem této enzymové reakce nejsou ceramidy, ale lysolipidy (glukosylsfingosin nebo sfingosinfosforylcholin) a volné mastné kyseliny.

Cílem této práce bylo připravit modelové membrány, které by napodobovaly složení lipidů stratum corneum s tímto neobvyklým enzymem v kůži pacienta s atopickou dermatitidou, tedy, které by obsahovaly glukosylsfingosin a volné mastné kyseliny nebo sfingosinfosforylcholin a volné mastné kyseliny místo ceramidů (z 25 % až 100 %) a studovat jejich propustnost.

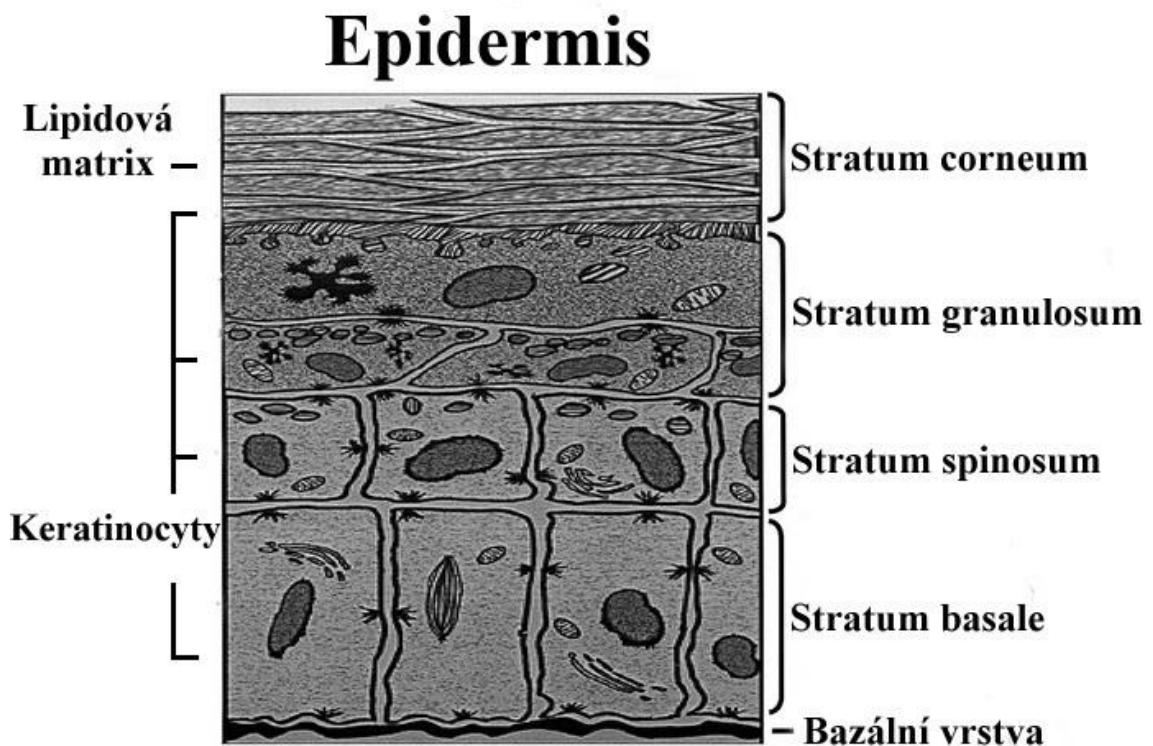
Vliv lysolipidů ve srovnání s ceramidy byl u připravených membrán hodnocen pomocí měření ztráty vody, elektrické impedance a fluxu dvou modelových látek theofylinu a indomethacinu přes membrány kvůli posouzení, do jaké míry přítomnost těchto lysolipidů ve stratum corneum pacienta s atopickou dermatitidou ovlivňuje ztráty vody a celkovou propustnost.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kožní bariéra

3.1.1 Stratum corneum

Suchozemští živočichové jsou před negativními vlivy vnějšího prostředí chráněni funkční bariérou⁽⁴⁾. Tato propustná bariéra je u savců lokalizována ve stratum corneum (SC), které je tvořeno extracelulárními lipidy (extracelulární matrix) a korneocyty (Obr. 1)^(4; 5; 6; 7; 8).



Obr. 1⁽⁹⁾. Vrstvy epidermis. Keratinocyty vznikají z bazální vrstvy epidermis a migrují ke kožnímu povrchu. Po dosažení SC jsou plně diferencované. Tento proces je nazýván keratinizace a je nezbytný pro tvorbu funkční kožní bariéry. Lipidová matrix chrání kůži před ztrátami vody a průnikem škodlivých látek^(7; 8; 10). Keratin v keratinocytech je hydratovaný, tím udržuje kůži pružnou⁽¹¹⁾.

3.1.2 Keratinocyty

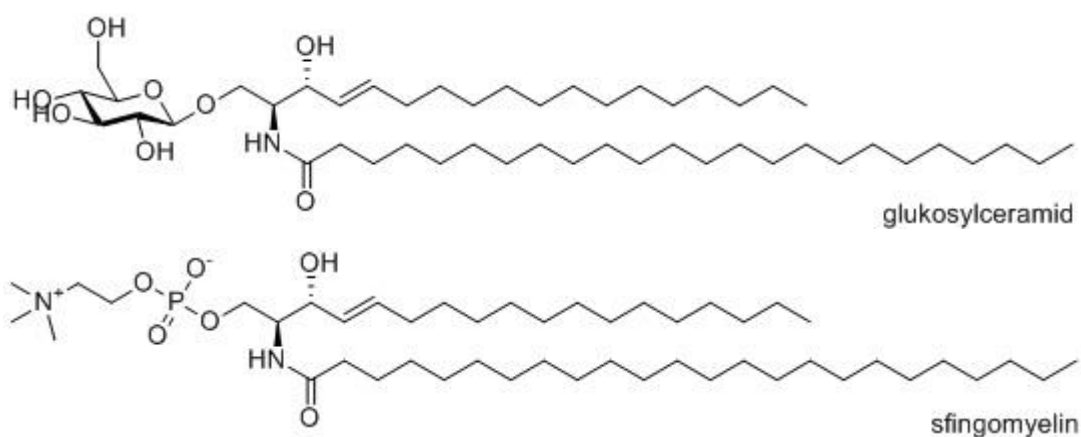
Korneocyty jsou terminálně diferencované keratinocyty. Keratinocyty vznikají z kmenových buněk bazální vrstvy na hranici dermis a epidermis. Během diferenciaci kůže migrují směrem ke kožnímu povrchu⁽⁵⁾. Během své migrace postupně ztrácí

organely a v SC se z nich stávají mrtvé zploštělé buňky zbavené organel, ale plné keratinových vláken⁽¹⁰⁾.

Keratinocyty tedy během své migrace postupně utváří všechny vrstvy epidermis: stratum basale (SB), stratum spinosum (SS), stratum granulosum (SG) a SC (Obr. 1)⁽⁴⁾.

3.1.3 Lamelární granula

Ve vrstvě SS se poprvé objevují lamelární granula, dříve zvaná také jako Odlandova tělíska. Tato lamelární granula jsou vyplněna množstvím lipidických disků, v nichž jsou skladovány prekurzory ceramidů, glukosylceramidy (GCer, Obr. 2) a sfingomyeliny (SM, Obr. 2), které jsou syntetizovány ze serinu a palmitoylkoenzymu A⁽⁴⁾. Dále jsou v nich skladovány také cholesterol (Chol), další fosfolipidy a enzymy fosfolipáza A2, glukocerebrosidáza a sfingomyelináza^(4; 12).

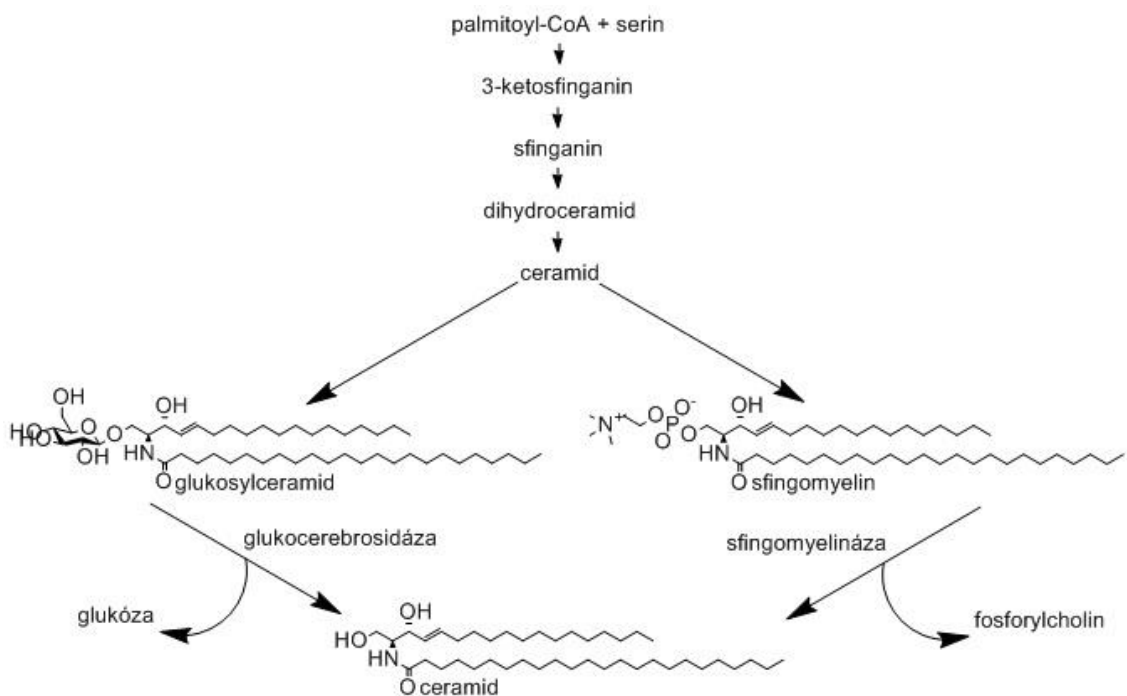


Obr. 2. Strukturální vzorce GCer a SM.

V pozdní fázi diferenciaci keratinocytů, na rozhraní SG a SC, lamelární granula migrují do vnější části keratinocytu a jejich membrány splývají (12; 13; 14; 15; 16; 17). Tím jsou hydrolytické enzymy uvolněny do extracelulárního prostoru (4; 12; 18), kde konvertují rovněž uvolněné prekurzory na ceramidy a volné mastné kyseliny (MK) (4; 5; 12; 18; 19). Vzniklé ceramidy a volné MK (4; 12; 18) spolu s uvolněným Chol vytváří lipidovou matrix. Všechny složky jsou v téměř ekvimolárním množství a přítomno je i menší množství cholesterol-sulfátu (CholS) (6).

3.1.4 Ceramidy

GCer jsou štěpeny glukocerebrosidázou ^(20; 21), SM sfingomyelinázou ⁽²²⁾. Produktem obou reakcí jsou již zmíněné ceramidy (Obr. 3) ^(4; 12). Sfingomyelináza a glukocerebrosidáza tak mají klíčovou roli v generování ceramidů pro bariérovou funkci SC ^(23; 24; 25; 26; 27) a pro nezbytné zadržování vody v kůži ^(24; 28; 29). Nasyntetizované ceramidy následně vytváří lamelární strukturu, což je klíčový faktor bariérové funkce kůže ^(30; 31).



Obr. 3 ⁽³²⁾. Biosyntéza ceramidů. Biosyntéza ceramidů vychází z palmitoylkoenzymu A a serinu ^(4; 12). Touto cestou se syntetizují prekurzory ceramidů, GCer a SM ^(4; 12), které jsou štěpeny příslušnými enzymy, glukocerebrosidázou ^(20; 21) a sfingomyelinázou ⁽²²⁾ za vzniku ceramidů a glukózy nebo fosforylcholinu.

3.2 Atopická dermatitida

3.2.1 Epidemiologie

Atopická dermatitida (AD) je zánětlivé, recidivující a svědivé onemocnění kůže ⁽¹⁾. V posledních letech je toto onemocnění čím dál běžnější. V současné době postihuje 15 – 30 % dětí a 2 – 10 % dospělých ve vyspělých zemích ^(33; 34).

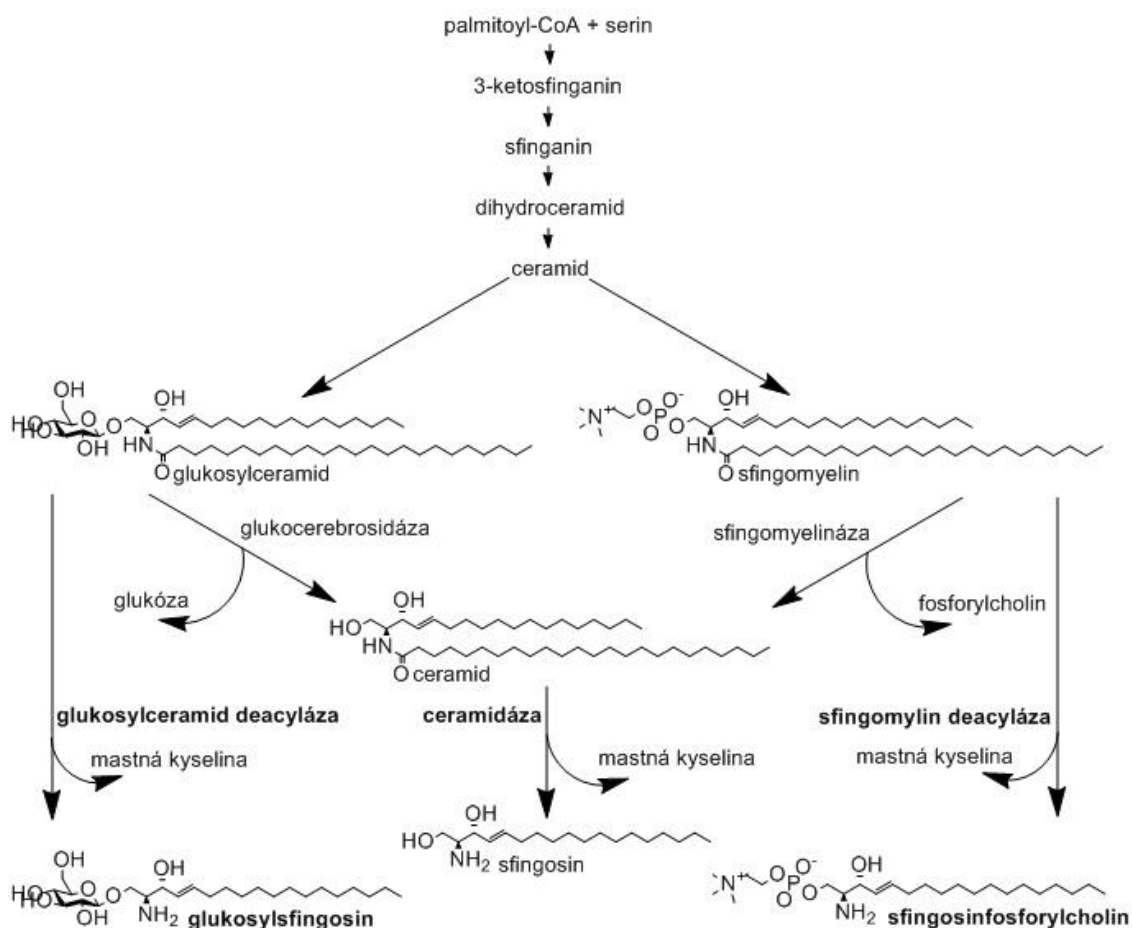
3.2.2 Projevy

Mezi projevy tohoto onemocnění patří suchá a šupinatá kůže, která pokrývá obvykle celé tělo, u dětí s výjimkou oblasti plenek, a dále intenzivně svědící zarudlé léze, které se tvoří hlavně v ohybech rukou a nohou, na obličejí a na krku ^(33; 35; 36; 37). Tyto projevy jsou způsobeny velkými ztrátami vody, k nimž dochází v důsledku poškozené funkce kožní bariéry ⁽³⁸⁾. Poškozenou kůží mohou následně velmi snadno pronikat alergeny, dráždivé látky či mikroorganismy ⁽²⁾. Průnik těchto látek má za následek rozvoj zánětu, tím dochází k dalšímu poškození kožní bariéry ⁽²⁾ a „bludný kruh“ AD se uzavírá ⁽³⁹⁾.

3.2.3 Etiologie

Mnoho studií prokázalo, že etiologickým faktorem pro vznik atopické suché kůže s narušenou bariérovou funkcí je nedostatek ceramidů v SC ^(2; 5; 29; 40; 41; 42). Nedostatek ceramidů byl prokázán v SC pacientů s AD, a to jak v ekzematické, tak i v neekzematické kůži ⁽⁴⁰⁾. Další studie prokázaly, že za nedostatkem ceramidů v SC stojí enzymy GCer/SM deacyláza ^(2; 3; 43), ceramidáza ⁽⁴⁴⁾ a dále snížená aktivita sfingomyelinázy ^(29; 40; 42; 45). Snížená aktivita sfingomyelinázy ⁽⁴⁵⁾ a zvýšené aktivity GCer/SM deacylázy ⁽⁴³⁾ a ceramidázy ⁽⁴⁴⁾ byly popsány v SC pacientů s AD, a to jak v ekzematické, tak i v neekzematické kůži ve srovnání se zdravými jedinci.

U zdravého jedince ceramidy vznikají hydrolýzou GCer a SM prostřednictvím glukocerebrosidázy ^(20; 21) a sfingomyelinázy ⁽²²⁾ za současného odštěpení glukózy a fosforylcholinu (Obr. 3). U pacienta s AD jsou ale GCer i SM hydrolyzovány v místě amidické vazby příslušnou deacylázou za vzniku příslušných lysolipidů a volných MK (Obr. 4) ⁽³²⁾. Z GCer prostřednictvím GCer deacylázy vzniká glukosylsfingosin (GS, Obr. 4) ^(2; 32; 43), a ze SM vzniká prostřednictvím SM deacylázy sfingosinfosforylcholin (SPC, Obr. 4) ^(2; 3; 43).



Obr. 4 ⁽³²⁾. Změněný metabolismus sfingolipidů v epidermis pacientů s AD. Prekurzory ceramidů, GCer a SM, jsou štěpeny příslušnými deacylázami za vzniku lysolipidů, GS ⁽³²⁾ a SPC ⁽⁴³⁾, a MK ⁽³²⁾. Ceramidáza hydrolyzuje ceramidy na sfingosin a MK. Tento enzym se vyskytuje i v SC zdravých jedinců, ale v SC pacientů s AD vykazuje vyšší aktivitu ⁽⁴⁴⁾.

Ceramidáza je enzym produkovaný bakteriemi, nejvíce bakterií *Staphylococcus aureus* ⁽⁴⁶⁾. Ceramidáza rozkládá ceramidy za vzniku sfingosinu a MK (Obr. 4) ⁽⁴⁴⁾.

3.2.4 Glukosylceramid sfingomyelin deacyláza

V roce 1995 byl popsán nový enzym se širokou specifitou, který hydrolyzuje amidickou vazbu mezi MK a sfingosinovouází. Studie prokázala, že neštěpí ceramidy, tím pádem je odlišný od ceramidázy, ale že rozkládá sfingolipidy za vzniku jejich lysoforem. Provedená studie popsala první generaci lysosfingomyelinu z SM specifickou hydrolázou. Enzym byl pojmenován jako sfingolipid ceramid N-deacyláza a byl izolován z bakterie *Pseudomonas* sp. TK4 ⁽⁴⁷⁾.

Studie zabývající se AD odhalily, že v SC pacientů s AD je snížený obsah ceramidů^(2; 5; 29; 40; 41; 42). Mechanismus nedostatku ceramidů v SC pacientů s AD byl však stále neznámý. Ve studiích orientovaných na ceramidy v SC bylo prokázáno, že hladina ceramidů je regulována dynamickou rovnováhou mezi enzymy sfingomyelinázou, glukocerebrosidázou a ceramidázou, které jsou skladovány v lamelárních granulech, a které jsou aktivovány exocytózou na rozhraní SG a SC⁽⁴⁸⁾.

V rámci studií, během kterých se pacientům s AD odebíraly vzorky kůže, byla objevena SM deacyláza⁽²⁾. SM deacyláza hydrolyzuje SM v místě amidické vazby za vzniku jeho lysoformy, SPC, a kompetuje tak se sfingomyelinázou o SM^(2; 43). Důsledkem této hydrolýzy je nedostatek ceramidů v SC pacientů v AD. Katalytická aktivita této deacylázy je závislá na pH a optimum má při pH 5,0. Molekulová hmotnost činí kolem 40 000 Da a pI hodnota je 4,2⁽³⁾. Tyto enzymatické charakteristiky dokládají, že SM deacyláza je naprosto odlišná od ostatních dosud známých a popsaných deacyláz⁽³²⁾. Připisoval se jí bakteriální původ, protože lidská epidermis je osídlena řadou mikroorganismů, a velmi často byl na kožním povrchu identifikován *Staphylococcus aureus*. Tato hypotéza ovšem byla vyvrácena důkazem, že aktivita SM deacylázy byla popsána i v „germ-free“ epidermis, tedy v epidermis zbavené všech mikroorganismů⁽⁴⁸⁾.

Protože ne všechny ceramidy jsou odvozeny od SM⁽⁴⁹⁾, byl hledán nový enzym, který by mohl komplexně objasnit nedostatek ceramidů v SC pacientů s AD. Byl objeven nový enzym, GCer deacyláza, který hydrolyzuje amidickou vazbu GCer za vzniku GS. Stanovení enzymatických charakteristik prokázalo shodu se SM deacylázou, a tento enzym je tedy nazýván SM/GCer deacyláza^(3; 32).

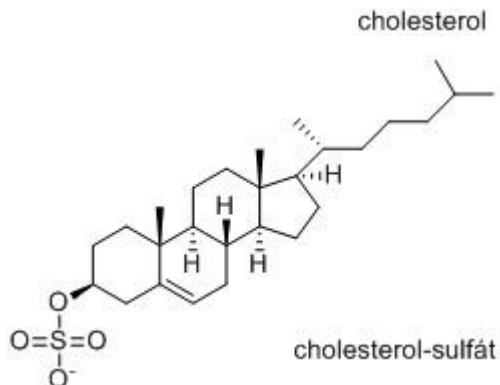
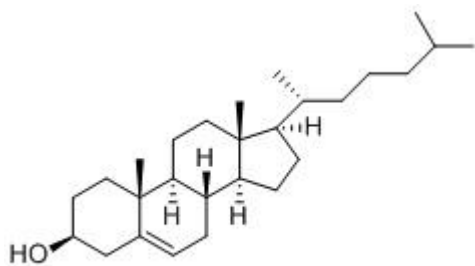
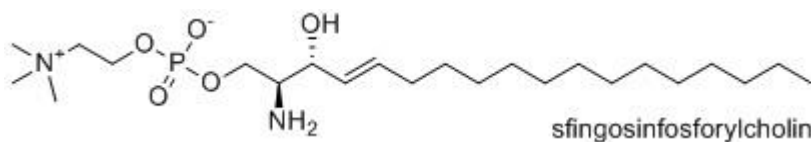
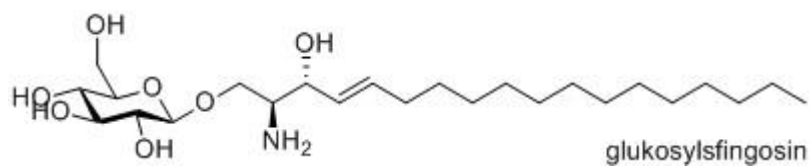
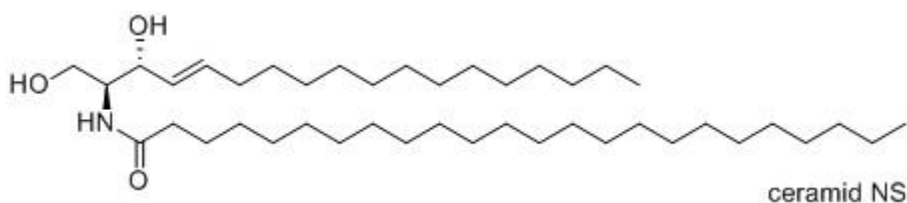
Přítomnost tohoto enzymu se předpokládá u všech pacientů s AD. Toto tvrzení vychází z poznatku, že u všech pacientů s AD, kterým byl odebrán vzorek epidermis, byl tento enzym nalezen⁽⁴⁸⁾. V SC ekzematické kůže pacienta s AD byla aktivita tohoto enzymu více než 5krát vyšší než v SC zdravého jedince, a v SC neekzematické kůže byla aktivita vyšší 3krát⁽³²⁾.

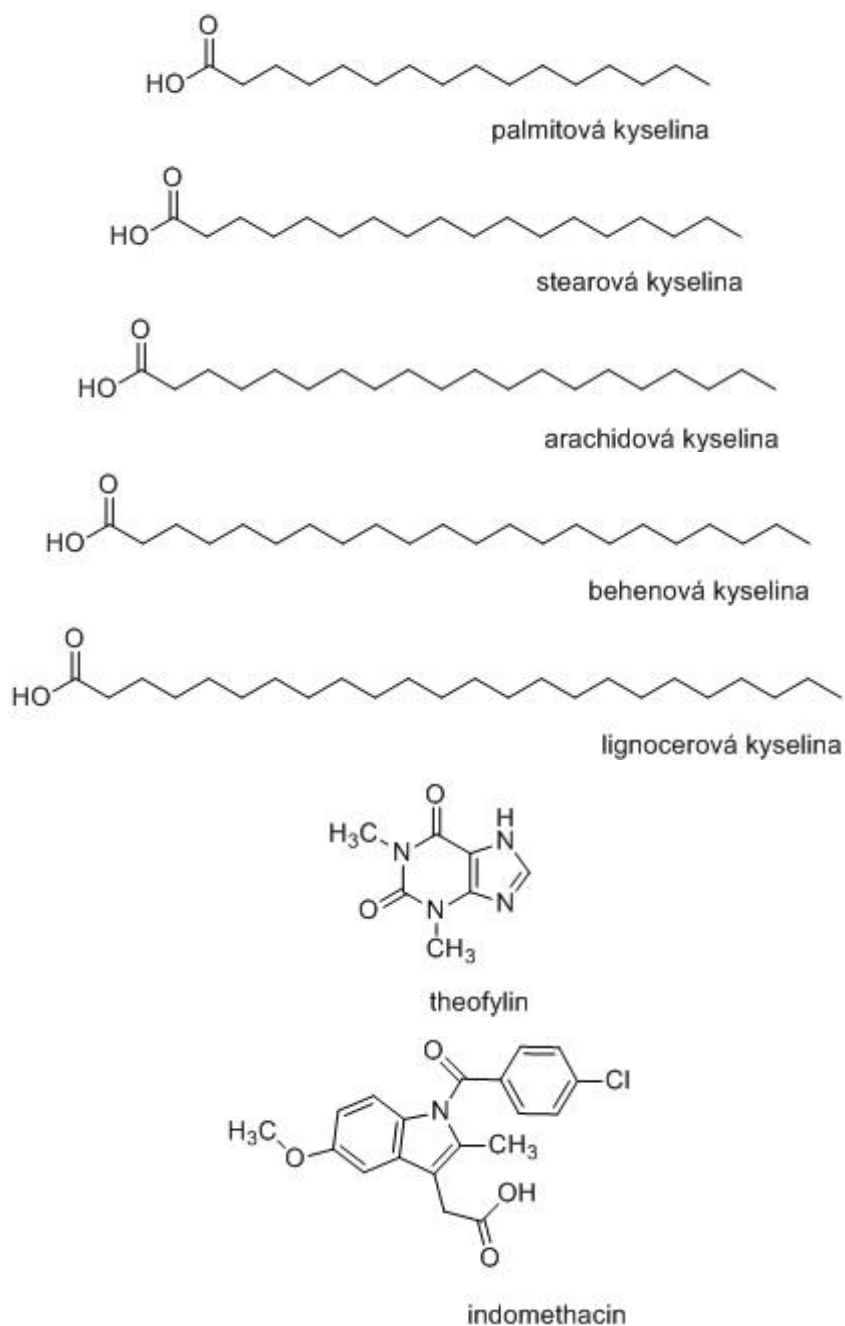
SM/GCer deacyláza je exprimována in situ ve významných hladinách v epidermis pacientů s AD. Důsledkem její přítomnosti je nedostatek ceramidů v SC, což je etiologický faktor pro vznik AD⁽⁴⁸⁾.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

N-tetrakosanoyl-D-erythro-sfingosin (Ceramid NS, Obr. 5), GS (Obr. 5) a SPC (Obr. 5) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Chol (Obr. 5), CholS (Obr. 5), kyselina palmitová (Obr. 5), kyselina stearová (Obr. 5), kyselina arachidová (Obr. 5), kyselina behenová (Obr. 5), kyselina lignocerová (Obr. 5), theofylin (TH, Obr. 5), indomethacin (IND, Obr. 5), gentamicin, propylenglykol a rozpouštědla byla zakoupena od firmy Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Německo). Všechna rozpouštědla byla analytické nebo HPLC kvality.





Obr. 5. Strukturální vzorce použitých látek.

4.2 Příprava modelových lipidových membrán

4.2.1 Příprava směsi mastných kyselin

Pro přípravu směsi byla použita kyselina palmitová (1,3 % z celkového látkového množství všech MK), kyselina stearová (3,3 %), kyselina arachidová (6,9 %), kyselina behenová (47,1 %) a kyselina lignocerová (41,4 %). Navážené MK byly rozpuštěny ve směsi hexan/96 % ethanol v poměru 2:1 (v/v) a smíchány

ve výše uvedeném poměru. Po rozpuštění byla použitá rozpouštědla odstraněna proudem dusíku a směs MK byla ponechána přes noc ve vakuu v exikátoru nad parafínem a P₂O₅ z důvodu kompletního odstranění použitých rozpouštědel.

4.2.2 Příprava směsí lipidů

Následujícím krokem byla příprava směsi zkoumaných lysolipidů (GS nebo SPC), ceramidu, výše uvedené směsi MK, Chol a CholS. Jako kontrolní vzorek (model lipidových membrán ve zdravé kožní bariéře) byla připravena ekvimolární směs ceramidu, Chol a MK s přídavkem 5 hmotnostních % CholS. V dalších vzorcích bylo 25, 50, 75 či 100 molárních % ceramidu nahrazeno ekvimolární směsí daného lysolipidu a směsi MK, což simuluje částečný či úplný deficit ceramidů kvůli rozkladu jejich prekurzorů SM/GCer deacylázou.

Lysolipidy a cholesterolulfát byly rozpuštěny v ethanolu (1 mg/100 μ l) a MK, ceramid a Chol ve směsi hexan/96 % ethanol v poměru 2:1 (1 mg/100 μ l).

Po smíchání všech lipidů v požadovaném poměru byly připravené směsi vysušeny proudem dusíku a ponechány přes noc ve vakuu v exikátoru nad parafínem a P₂O₅.

4.2.3 Příprava lipidových membrán

Abychom mohli studovat propustnost lipidových membrán, připravili jsme tyto multivrstevné lipidové lamely na podkladovém filtru. Jako podkladové filtry byly použity Nuclepore polykarbonátové filtry s póry o velikosti 0,015 μ m (Whatman, Kent, Velká Británie). Nástřík připravené lipidové směsi probíhal pomocí proudu dusíku na Linomatu IV (Camag, Muttenz, Švýcarsko), který byl pro tento účel upraven, aby se nanášecí hlava pohybovala také ve směru osy y. Pohyb zařízení byl nastaven tak, aby byla lipidová směs rovnoměrně nastříkána na celou plochu membrány.

Připravená lipidová směs byla rozpuštěna ve směsi hexan/96 % ethanol v poměru 2:1 (v/v) v koncentraci 4,5 mg/ml. Při nástřiku byly použity stříkačky o objemu 100 μ l. Na každý filtr bylo aplikováno třikrát 100 μ l roztoku lipidů, a to pokaždé z jiného úhlu kvůli dokonalému rozložení lipidové směsi. Tloušťka nanesené lipidové vrstvy byla v průměru 11 μ m⁽⁵⁰⁾.

Připravené lipidové membrány byly následně zahřáty na teplotu 90 °C. Tato teplota převyšuje teplotu hlavního fázového přechodu. Připravené lipidové membrány byly při této teplotě ponechány 10 minut. Poté se nechaly 4 hodiny chladnout

na pokojovou teplotu a po dalších 24 hodin byly temperovány v termostatu při teplotě 32 °C. Tato metoda byla validována v naší dřívější práci ⁽⁵⁰⁾.

4.3 Permeační pokusy

4.3.1 Příprava donorových vzorků modelových permeantů

Jako donorové vzorky byly použity suspenze 5 % TH v 60 % propylenglykolu a suspenze 2 % IND v 60 % propylenglykolu. Připravené suspenze byly do doby použití uchovány v termostatu při 32 °C, a těsně před použitím proběhla homogenizace na třepačce.

4.3.2 Příprava pufru jako akceptorové fáze

Akceptorová pufrovací fáze byla tvořena 10 mM fosfátovým pufrům o pH 7,4 s přídavkem gentamicinu o koncentraci 50 mg/l, který zde plnil konzervační funkci. Připravený pufr byl krátce odplyněn v ultrazvuku a přesunut do termostatu o teplotě 32 °C. V čas potřeby byly touto připravenou akceptorovou fází naplněny dolní části níže zmíněných Franzových cel. Množství akceptorové fáze bylo u každé cely zaznamenáno a použito při výpočtu toku dané látky přes membránu.

4.3.3 Příprava Franzových difuzních cel

Franzovy cely byly složeny ze dvou skleněných částí, dvou teflonových držáků, membrány a míchadla. Dolní skleněná část (akceptorová), dole uzavřená, nahoře otevřená, s objemem přibližně 6 ml, měla vzestupné raménko, kterým se při pokusu odebíraly vzorky. Dále v ní bylo vloženo míchadlo a byla naplněna akceptorovou fází. Na horním konci této spodní skleněné části byly umístěny teflonové držáky s otvory 0,5 cm², které mezi sebou držely membránu orientovanou lipidovým filmem nahoru. K utěsnění byly držáky potřeny silikonovým tukem. Horní skleněná část Franzovy cely (donorová), s horní i dolní částí otevřenou, nasedala na držáky s membránou. Celá soustava byla fixována gumičkami. Takto připravené difuzní cely, s propustnou difuzní plochou 0,5 cm², byly umístěny do vodní lázně o teplotě 32 °C a ponechány přes noc k rovnoměrné hydrataci membrán ⁽⁵⁰⁾.

4.3.4 Měření ztráty vody membránami

Transepidermální ztráta vody (TEWL) je velmi důležitou hodnotou bariérové funkce kůže ⁽⁵¹⁾. My jsme použili tento parametr pro charakterizaci připravených membrán. Měřená ztráta vody je charakterizována jako množství vody prošlé danou bariérou (kůží nebo membránou) o jednotkové ploše za jednotku času (g/h/m²). Měření TEWL probíhalo na membránách při 45,1 % vlhkosti a při teplotě 25,7 °C. Použitý přístroj byl Tewameter® TM 300 připojený k Multi Probe Adapter Cutometer® MPA 580 (CK electronic GmbH, Köln, Německo). Tento přístroj měří teplotu a relativní vlhkost vzduchu dvěma senzory umístěnými v dutém válci (výška 2 cm, průměr 1 cm) ve dvou různých vzdálenostech od měřeného povrchu ⁽⁵²⁾. K našemu měření in vitro byla vždy dočasně odstraněna horní část Franzovy cely, a měřicí sonda byla přiložena na vrchní otvor teflonového držáku, ve kterém byla upevněna lipidová membrána. Doba měření byla 80 - 100 s; výsledná průměrná hodnota v ustáleném stavu byla zaznamenána. Vzhledem k tomu, že otvor v membráně je menší (průměr 0,8 cm) než otvor v sondě, a vzdálenost sondy je 6 mm od povrchu membrány, byly naměřené hodnoty vynásobeny koeficientem 1,3, který byl dříve získán kalibrací tohoto způsobu měření (Pullmannová, P., dosud nepublikovaná data).

4.3.5 Měření elektrické impedance

Elektrická impedance lipidové membrány je měřítkem propustnosti membrány pro ionty. Pro vlastní měření byla na povrch membrány aplikována akceptorová pufrovací fáze v množství 500 µl a následně byla měřena impedance. Měření probíhalo pomocí LCR přístroje 4080 (Condar Electronic, Hirschau, Německo, měřicí rozpětí 20 Ω - 10 MΩ, chyba v kΩ hodnotách < 0,5 %), v nastaveném paralelním režimu s frekvencí 120 Hz, která zajistila získání nejlepší citlivosti pro malé změny impedance ⁽⁵³⁾. Při měření byla jedna sonda přístroje opatrně ponořena do pufru v donorové části difuzní cely, druhá sonda byla ponořena do raménka akceptorové části difuzní cely a hodnota byla zaznamenána. Měření bylo opakováno minimálně dvakrát pro každou Franzovu celu a poté byl pufr z donorové části opatrně odstraněn.

4.3.6 Vlastní permeace

V čase 0 hodin bylo do donorové části každé cely aplikováno 100 µl donorové suspenze s léčivem. Z raménka akceptorové části byly odebírány vzorky v čase 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin a 8 hodin. Tato doba byla dostatečná k dosažení ustáleného

stavu. Odebírané množství činilo 300 μl . Množství látky prošlé přes membránu bylo stanoveno pomocí HPLC (viz níže). Chybějící množství bylo ihned po odebrání vzorku doplněno 300 μl akceptorové fáze. Množství aplikovaného léčiva, které prošlo přes membránu, bylo v závislosti na čase vyneseno do grafu, a ze směrnice přímky v ustáleném stavu odečtena hodnota fluxu léčiva ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$).

4.3.7 Podmínky HPLC analýzy

TH a IND ve vzorcích akceptorové fáze byly měřeny za izokratických podmínek na reverzní fázi HPLC přístrojem Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) skládajícím se z pumpy LC-20AD s odplyňovačem DGU-20A3, autosamplerem SIL-20A HT, kolonovým termostatem CTO-20AC, diode array detektorem SPD-M20A a komunikačním modulem CBM-20A. Data byla analyzována softwarem LCsolutions 1.22.

Separace TH byla provedena na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18,5 μm , Merck) při 35 $^{\circ}\text{C}$ s použitím mobilní fáze methanol/0,1M NaH_2PO_4 4:6 (v/v) při průtoku 1,2 ml/min. Na kolonu jsme nastříkli 20 μl vzorku a TH byl měřen při vlnové délce 272 nm. Retenční čas TH byl $2,9 \pm 0,1$ min.

Vzorky IND byly analyzovány na koloně LiChroCART 250-4 (LiChrospher 100 RP-18, 5 μm , Merck) s použitím mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina octová 90:60:5 (v/v/v) při průtoku 1,2 ml/min. Na kolonu bylo nastříknuto 100 μl , teplota byla udržována na 40 $^{\circ}\text{C}$. UV absorpce byla monitorována při vlnové délce 270 nm a retenční čas byl $3,1 \pm 0,1$ min. Obě metody byly validovány dříve⁽⁵⁴⁾.

4.3.8 Statistická analýza dat

Všechna data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM), počet opakování (n) je vyznačen u příslušného obrázku ve výsledcích. Pro srovnání charakteristik připravených membrán obsahujících lysolipidy vzhledem ke kontrole (100 % ceramidů) byla použita analýza rozptylu (ANOVA) s Dunnettovým testem (na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$) v programu GraphPad Prism v. 6.01.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

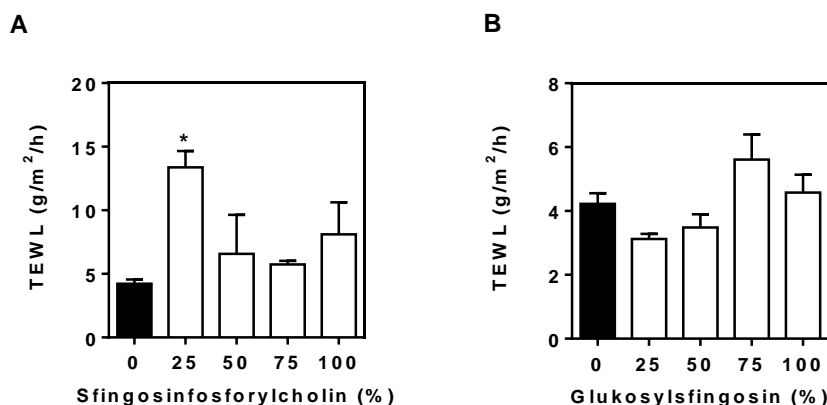
Cílem mé práce bylo připravit multivrstvenné lipidové membrány, které svým složením simulují lipidovou matrix nejsvrchnější vrstvy kůže, SC, se zvýšenou expresí enzymu SM/GC_{er} deacylázy, a sledovat propustnost těchto membrán. Tento enzym, který hydrolyzuje prekurzory ceramidů SM a GC_{er} na SPC, respektive GS, a MK, se vyskytuje u některých pacientů s AD a jeho přítomnost byla dávana do souvislosti s poruchami bariérové funkce kůže u těchto pacientů⁽³⁾. Přímý důkaz však chybí, protože u lidské kůže je nemožné izolovat poškození bariéry kvůli expresi tohoto enzymu od jiných faktorů. Není také známo, jestli je příčinou zvýšené propustnosti nedostatek ceramidů či samotné rozkladné produkty SPC či GS. Proto jsme se rozhodli studovat lipidové membrány, kde jsou ceramidy postupně (z 25 % - 75 %) až úplně nahrazovány ekvimolární směsí SPC a MK či GS a MK.

Modelové membrány byly připraveny podle již dříve publikovaného a validovaného postupu jako multivrstvenné lamelární útvary na podkladových filtrech⁽⁵⁵⁾. Míra jejich propustnosti byla určována pomocí čtyř různých markerů: TEWL, tok dvou látek TH a IND, a pomocí elektrické impedance. Měření TEWL, což je jeden z nejdůležitějších parametrů správně fungující kožní bariéry⁽⁵¹⁾, byly zjištěny ztráty vody přes studované membrány. Přestože v našem případě nešlo o „transepidermální“ ztrátu vody, používáme zde ustálenou zkratku TEWL, protože jde o stejnou veličinu a byla měřena stejným přístrojem, jakým se TEWL měří in vivo u pacientů⁽⁵²⁾. Dalším parametrem, který jsme využili k charakterizaci lipidových membrán, bylo měření toku dvou modelových látek TH a IND membránami v ustáleném stavu. Použité látky jsou shodou okolností léčiva, ale pro tuto práci byly vybrány pro jejich různé fyzikálně-chemické vlastnosti. TH je poměrně malá molekula (180,17 g/mol) s vyváženou lipofilitou ($\log P \sim 0$), molekula IND má velikost dvojnásobnou (357,79 g/mol) a je lipofilnější ($\log P \sim 3,1$). Měření elektrické impedance nám poskytlo údaje, které se dají zjednodušeně interpretovat jako měřítko propustnosti membrán pro ionty.

Všechna měření byla porovnávána s kontrolním vzorkem, což je membrána simulující lipidovou bariéru zdravé kůže.

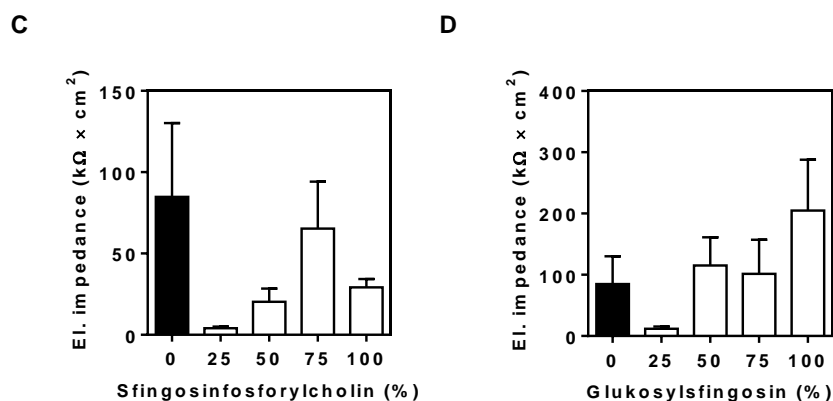
Naměřené hodnoty TEWL ukazují srovnatelnou ztrátu vody u připravených membrán s GS ve srovnání s kontrolním vzorkem ($4,23 \pm 0,33 \text{ g/m}^2/\text{h}$) (Obr. 6: B).

Hodnoty TEWL membrán se SPC rovněž ukazují srovnatelnou transepidermální ztrátu vody v porovnání s kontrolním vzorkem, s výjimkou membrány, kde 25 % ceramidu bylo nahrazeno SPC ($13,37 \pm 1,28 \text{ g/m}^2/\text{h}$) (Obr. 6: A). Hodnota TEWL je zde 3krát vyšší, což je statisticky významné zvýšení vůči kontrole.



Obr. 6. Naměřené hodnoty TEWL při různém složení membrán (A, B). Černé sloupce představují kontrolní vzorek, bílé sloupce pak membrány se vzrůstajícím množstvím SPC (graf A) a GS (graf B). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 7$. * značí statisticky významné zvýšení TEWL oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

Elektrická impedance membrán se SPC je v průměru nižší ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 7: C). Elektrická impedance kontrolního vzorku je $84,85 \pm 45,35 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, elektrické impedance membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno SPC, jsou $4,0 \pm 1,08 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, $20,29 \pm 8,17 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, $65,33 \pm 28,84 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ a $29,17 \pm 5,17 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$. Oproti tomu elektrická impedance membrán s GS je v průměru vyšší, než ve srovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 7: D). Elektrická impedance kontrolního vzorku je $84,85 \pm 45,35 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, elektrické impedance membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno SPC, jsou $11,83 \pm 3,60 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, $115,20 \pm 46,09 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$, $101,70 \pm 55,36 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ a $204,80 \pm 83,05 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$. Žádný z pozorovaných rozdílů mezi kontrolním vzorkem a membránami s lysolipidy není statisticky významný, což je zřejmě způsobeno značnou variabilitou impedancí kontrolních vzorků.



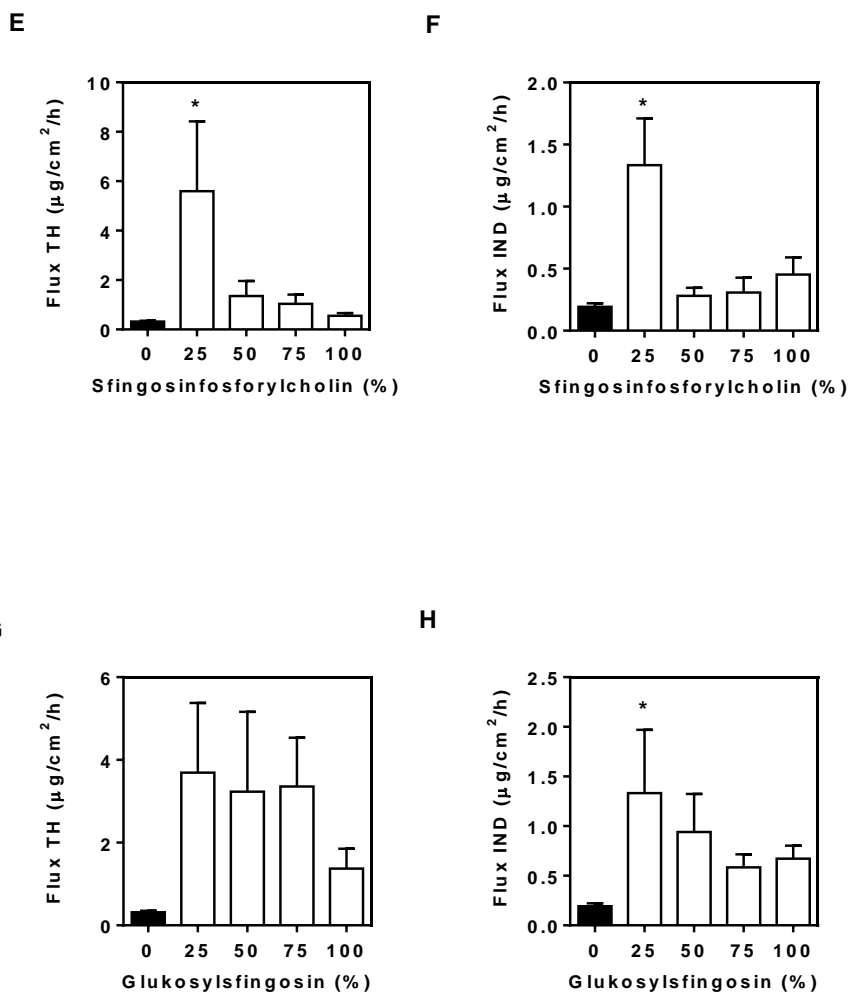
Obr. 7. Naměřené hodnoty elektrické impedance při různém složení membrán (B, C). Černé sloupce představují kontrolní vzorek, bílé sloupce pak membrány se vzrůstajícím množstvím SPC (graf C) a GS (graf D). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 7$.

Flux (tok) TH membránami se SPC zvýšen u všech připravených membrán v porovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 8: E). Flux TH je u kontrolního vzorku $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, flux TH u membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno SPC, je $5,60 \pm 2,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $1,35 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $1,04 \pm 0,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a $0,56 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Na membránách, kde bylo 25 % ceramidu nahrazeno SPC, je flux statisticky významně vyšší (téměř 18krát), než u ostatních připravených membrán.

Flux IND membránami se SPC je rovněž zvýšený u všech připravených membrán v porovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 8: F). Flux IND je u kontrolního vzorku $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, flux IND u membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno SPC, je $1,33 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $0,28 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $0,31 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a $0,45 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Opět na membráně, kde bylo 25 % ceramidu nahrazeno SPC, je flux IND 7krát vyšší než u kontrolní membrány bez lysolipidů. Porovnáme-li flux TH a IND na membránách se SPC, přítomnost 25 % SPC má větší vliv na flux TH než na flux více lipofilního IND.

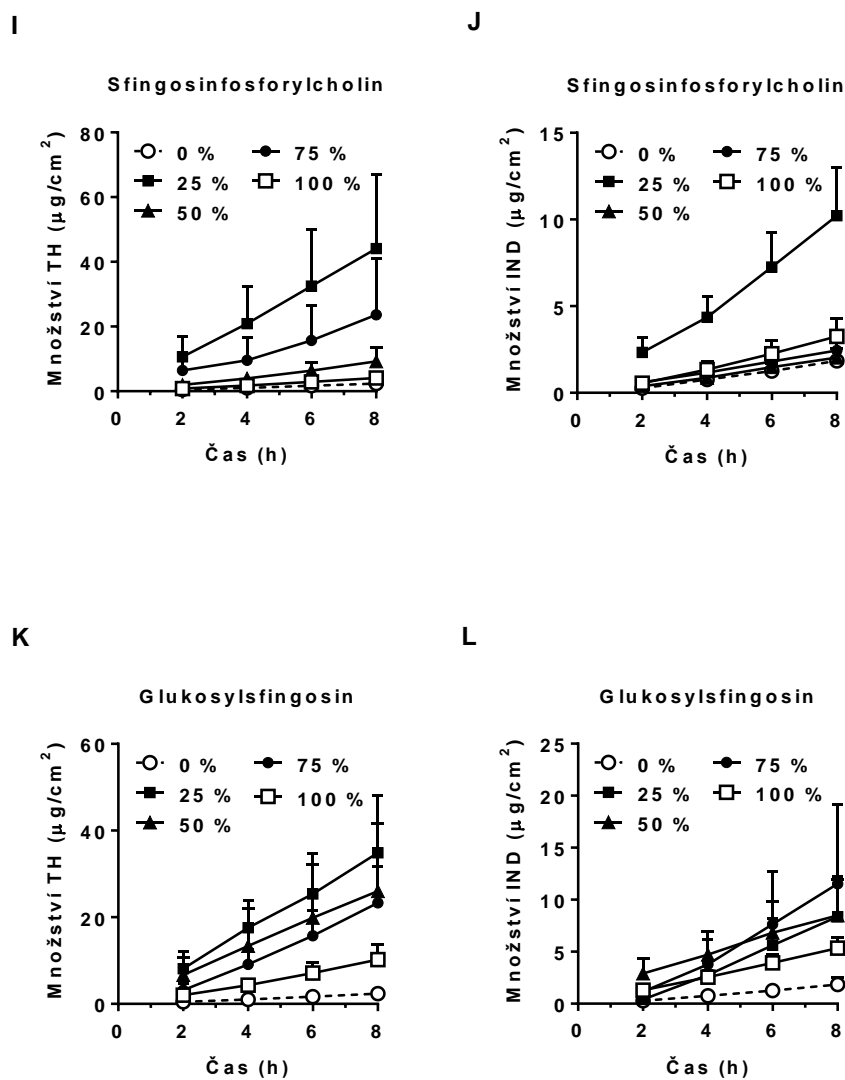
Flux TH je na membránách s GS zvýšen u všech připravených membrán v porovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 8: G). Flux TH je u kontrolního vzorku $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, flux TH u membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno GS, je $3,69 \pm 1,69 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $3,24 \pm 1,93 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $3,36 \pm 1,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a $1,37 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. U membrány, kde bylo 25 % ceramidů nahrazeno GS, je flux TH zvýšen téměř 12krát ve srovnání s kontrolou, tento rozdíl je statisticky významný.

Stejně tak flux IND je na membránách s GS zvýšen u všech připravených membrán v porovnání s kontrolním vzorkem (Obr. 8: H). Flux IND je u kontrolního vzorku $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, flux IND u membrán, kde bylo 25 %, 50 %, 75 % a 100 % ceramidu nahrazeno GS, je $1,33 \pm 0,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $0,94 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, $0,58 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a $0,67 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. Na membráně, kde bylo 25 % ceramidu nahrazeno GS, je flux IND statisticky významně vyšší než u kontrolního vzorku (7krát vyšší flux než u kontrolního vzorku).



Obr. 8. Flux TH a IND při různém složení membrán. Černé sloupce představují kontrolní vzorek, bílé sloupce pak membrány se vzrůstajícím množstvím SPC (graf E, F) a GS (graf G, H). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, $n = 7$. * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$).

Z permeačních profilů (Obr. 9), ze kterých byly výše uvedené hodnoty fluxu počítány, je zřejmé, že obě modelové látky dosáhly během pokusu ustáleného stavu (tedy lineární závislosti kumulativního množství léčiva prošlého přes membrány v závislosti na čase).



Obr. 9. Permeační profily TH a IND na membránách se SCP a s GS. Grafy jsou vyjádřeny jako závislost množství léčiva, které prošlo membránou, na čase.

Co se týče koncentrací lysolipidů u pacientů, byly prokázány významně zvýšené hladiny GS v ekzematickém i neekzematickém SC pacientů s AD v porovnání se zdravými jedinci stejného věku. Obsah GS v ng/mg SC byl u pacientů s AD významně zvýšen oproti zdravým pacientům ($n = 90 - 100$, $p < 0,001$). Obsah GS v ekzematickém SC pacientů s AD činil $15,9 \text{ ng}/\text{mg}$ SC, obsah GS v neekzematickém SC činil $13,2 \text{ ng}/\text{mg}$ SC a u zdravých jedinců byl obsah GS $7,7 \text{ ng}/\text{mg}$ SC. V rámci této studie

bylo uvedeno, že v horních vrstvách SC pacientů s AD se kromě kumulace GS objevuje i kumulace SPC⁽³²⁾.

Přestože studované koncentrace lysolipidů v této práci byly vyšší než koncentrace nalezené u pacientů, naše výsledky potvrzují přímý vliv hydrolýzy prekurzorů ceramidů na lysolipidy a mastné kyseliny na patologicky zvýšenou propustnost kůže u pacientů s AD.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo studium lipidových membrán s obsahem lysolipidů, jakožto modelů AD. Výsledky ukázaly, že přítomnost SPC v membránách má za následek zvýšení ztráty vody membránami (až 3krát), a dále zvýšenou propustnost membrán pro modelové látky TH (až 18krát) a IND (až 7krát) ve srovnání s kontrolou. Ztráta vody i propustnost byly největší u membrán, kde bylo nahrazeno 25 % ceramidu. Zvýšená propustnost se prokázala i u membrán s obsahem GS. I zde největší propustnost vykazovaly membrány, kde bylo nahrazeno 25 % ceramidu (12krát vyšší flux TH a 7krát vyšší flux IND oproti kontrole). Zajímavé je, že GS neměl vliv na ztrátu vody membránou. Vzhledem k tomu, že negativní vliv lysolipidů na propustnost studovaných lipidových membrán byl prokázán v nejnižší použité koncentraci (25 %), bylo by do budoucna zajímavé vyzkoušet vliv ještě nižších koncentrací lysolipidů.

Závěrem lze říci, že tyto výsledky potvrdily hypotézu, že přítomnost SPC a GS v SC pacientů s AD je přímo zodpovědná za zvýšenou propustnost SC pro cizorodé látky a za zvýšenou ztrátu vody z epidermis.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	atopická dermatitida
GCer	glukosylceramid
GS	glukosylsfingosin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Chol	cholesterol
CholS	cholesterol-sulfát
IND	indomethacin
MK	mastná kyselina
SB	stratum basale
SC	stratum corneum
SEM	standardní chyba průměru
SG	stratum granulosum
SM	sfingomyelin
SPC	sfingosinfosforylcholin
SS	stratum spinosum
TEWL	transepidermální ztráta vody
TH	theofylin

8. LITERATURA

1. **De Benedetto, A., Agnihotri, R., McGirt, L. Y., Bankova, L. G. a Beck, L. A.** Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *J Invest Dermatol.* 2009, Sv. 129, 14-30.
2. **Murata, Y., Ogata, J., Higaki, Y., Kawashima, M., Yada, Y., Higuchi, K., Tsuchiya, T., Kawainami, S. a Imokawa, G.** Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *J Invest Dermatol.* 1996, Sv. 106, 1242-9.
3. **Higuchi, K., Hara, J., Okamoto, R., Kawashima, M. a Imokawa, G.** The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Biochem J.* 2000, Sv. 350, 747-756.
4. **Breiden, B. a Sandhoff, K.** The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta.* 2014, Sv. 1841, 441-52.
5. **Holleran, W. M., Man, M. Q., Gao, W. N., Menon, G. K., Elias, P. M. a Feingold, K. R.** Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest.* 1991, Sv. 88, 1338-45.
6. **Pilgram, G. S., Vissers, D. C., van der Meulen, H., Pavel, S., Lavrijsen, S. P., Bouwstra, J. A. a Koerten, H. K.** Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol.* 2001, Sv. 117, 710-7.
7. **Downing, D. T.** Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res.* 1992, Sv. 33, 301-13.
8. **Elias, P. M. a Menon, G. K.** Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res.* 1991, Sv. 24, 1-26.
9. **Bikle, D. D.** Vitamin D and skin cancer. *J Nutr.* 2004, Sv. 134, 3472-8.
10. **Menon, G. K.** New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002, Sv. 54, 3-17.
11. **Forslind, B.** A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol.* 1994, Sv. 74, 1-6.
12. **Wertz, P. W. a van den Bergh, B.** The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids.* 1998, Sv. 91, 85-96.

13. **Frei, J. V. a Sheldon, H.** A small granular component of the cytoplasm of keratinizing epithelia. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961, Sv. 11, 719-24.
14. **Matoltsy, A. G. a Parakkal, P. F.** Membrane-coating granules of keratinizing epithelia. *J Cell Biol.* 1965, Sv. 24, 297-307.
15. **Wertz, P. W., Downing, D. T., Freinkel, R. K. a Traczyk, T. N.** Sphingolipids of the stratum corneum and lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol.* 1984, Sv. 83, 193-5.
16. **Grayson, S., Johnson-Winegar, A. G., Wintroub, B. U., Isseroff, R. R., Epstein Jr, E. H. a Elias, P. M.** Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol.* 1985, Sv. 85, 289-94.
17. **Rassner, U., Feingold, K. R., Crumrine, D. A. a Elias, P. M.** Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies. *Tissue Cell.* 1999, Sv. 31, 489-98.
18. **Schürer, N. Y., Plewig, G. a Elias, P. M.** Stratum corneum lipid function. *Dermatologica.* 1991, Sv. 183, 77-94.
19. **Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Abraham, W., Madison, K. C. a Downing, D. T.** Essential fatty acids and epidermal integrity. *Arch Dermatol.* 1987, Sv. 123, 1381-4.
20. **Holleran, W. M., Takagi, Y., Menon, G. K., Legler, G., Feingold, K. R. a Elias, P. M.** Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest.* 1993, Sv. 91, 1656-64.
21. **Holleran, W. M., Ginns, E. I., Menon, G. K., Grundmann, J. U., Fartasch, M., McKinney, C. E., Elias, P. M. a Sidransky, E.** Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994, Sv. 93, 1756-64.
22. **Bowser, P. A. a Gray, G. M.** Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1978, Sv. 70, 331-5.
23. **Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E. a Elias, P. M.** Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res.* 1983, Sv. 24, 120-30.
24. **Grubauer, G., Elias, P. M. a Feingold, K. R.** Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J Lipid Res.* 1989, Sv. 30, 323-33.
25. **Holleran, W. M., Feingold, K. R., Man, M. Q., Gao, W. N., Lee, J. M. a Elias, P. M.** Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *J Lipid Res.* 1991, Sv. 32, 1151-8.

26. **Jin, K., Higaki, Y., Takagi, Y., Higuchi, K., Yada, Y., Kawashima, M. a Imokawa, G.** Analysis of beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin. *Acta Derm Venereol.* 1994, Sv. 74, 337-40.
27. **Schmuth, M., Man, M. Q., Weber, F., Gao, W., Feingold, K. R., Fritsch, P., Elias, P. M. a Holleran, W. M.** Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2000, Sv. 115, 459-66.
28. **Imokawa, G. a Hattori, M.** A possible function of structural lipids in the water-holding properties of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1985, Sv. 84, 282-4.
29. **Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. a Hidano, A.** Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol.* 1991, Sv. 96, 523-6.
30. **Hamanaka, S., Asagami, C., Suzuki, M., Inagaki, F. a Suzuki, A.** Structure determination of glucosyl beta 1-N-(omega-O-linoleoyl)-acylsphingosines of human epidermis. *J Biochem.* 1989, Sv. 105, 684-90.
31. **Bouwstra, J. A., Dubbelaar, F. E., Gooris, G. S., Weerheim, A. M. a Ponc, M.** The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochim Biophys Acta.* 1999, Sv. 1419, 127-36.
32. **Ishibashi, M., Arikawa, J., Okamoto, R., Kawashima, M., Takagi, Y., Ohguchi, K. a Imokawa, G.** Abnormal expression of the novel epidermal enzyme, glucosylceramide deacylase, and the accumulation of its enzymatic reaction product, glucosylsphingosine, in the skin of patients with atopic dermatitis. *Lab Invest.* 2003, Sv. 83, 397-408.
33. **Kim, B. S.** Atopic dermatitis - Medscape [online]. Poslední revize 2014-04-21 [cit. 2014-05-04]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/1049085-overview>
34. **Saito, H.** Much atopy about the skin: genome-wide molecular analysis of atopic eczema. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005, Sv. 137, 319-25.
35. **Wahlgren, C. F.** Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol.* 1999, Sv. 26, 770-9.
36. **Baron, S. E., Cohen, S. N. a Archer, C. B.** Guidance on the diagnosis and clinical management of atopic eczema. *Clin Exp Dermatol.* 2012, Sv. 37, 7-12.
37. **Schmitt, J., Langan, S., Deckert, S., Svensson, A., von Kobyletzki, L., Thomas, K. a Spuls, P.** Assessment of clinical signs of atopic dermatitis: a systematic review and recommendation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013, Sv. 132, 1337-47.

38. **Tupker, R. A., Pinnagoda, J., Coenraads, P.-J. a Nater, J. P.** Transepidermal water loss measurement by means of an evaporimeter. In: **Frosch, P. J. a Kligman, A. M.** Noninvasive methods for the quantification of skin functions. Springer Berlin Heidelberg, 1993, 56-70.
39. **Ogawa, H. a Yoshiike, T.** A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *J Dermatol Sci.* 1993, Sv. 5, 197-204.
40. **Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M. a Sato, Y.** Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 1991, Sv. 283, 219-23.
41. **Macheleidt, O., Kaiser, H. W. a Sandhoff, K.** Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2002, Sv. 119, 166-73.
42. **Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A. a Seidenari, S.** Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1998, Sv. 78, 27-30.
43. **Hara, J., Higuchi, K., Okamoto, R., Kawashima, M. a Imokawa, G.** High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2000, Sv. 115, 406-13.
44. **Ohnishi, Y., Okino, N., Ito, M. a Imayama, S.** Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999, Sv. 6, 101-4.
45. **Jensen, J. M., Fölster-Holst, R., Baranowsky, A., Schunck, M., Winoto-Morbach, S., Neumann, C., Schütze, S. a Proksch, E.** Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2004, Sv. 122, 1423-31.
46. **Goodyear, H. M., Watson, P. J., Egan, S. A., Price, E. H., Kenny, P. A. a Harper, J. I.** Skin microflora of atopic eczema in first time hospital attenders. *Clin Exp Dermatol.* 1993, Sv. 18, 300-4.
47. **Ito, M., Kurita, T. a Kita, K.** A novel enzyme that cleaves the N-acyl linkage of ceramides in various glycosphingolipids as well as sphingomyelin to produce their lyso forms. *J Biol Chem.* 1995, Sv. 270, 24370-4.
48. **Imokawa, G.** A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J Dermatol Sci.* 2009, Sv. 55, 1-9.
49. **Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, P. M., Holleran, W. M. a Hamanaka, S.** Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res.* 2000, Sv. 41, 2071-82.

50. **Janůšová, B., Zbytovská, J., Lorenc, P., Vavrysová, H., Palát, K., Hrabálek, A. a Vávrová, K.** Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2011, Sv. 1811, 129-37.
51. **Resl, V., Leba, M. a Rampl, I.** Měření transepidermální ztráty vody (TEWL). *Čes-slov Derm.* 2008, Sv. 83, 319-24 [elektronická verze].
52. **De Paepe, K., Houben, E., Adam, R., Wiesemann, F. a Rogiers, V.** Validation of the VapoMeter, a closed unventilated chamber system to assess transepidermal water loss vs. the open chamber Tewameter. *Skin Res Technol.* 2005, Sv. 11, 61-9.
53. **Fasano, W. J. a Hinderliter, P. M.** The Tinsley LCR Databridge Model 6401 and electrical impedance measurements to evaluate skin integrity in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2004, Sv. 18, 725-9.
54. **Novotný, J., Janůšová, B., Novotný, M., Hrabálek, A. a Vávrová, K.** Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009, Sv. 22, 22-30.
55. **Školová, B., Janůšová, B., Zbytovská, J., Gooris, G., Bouwstra, J., Slepíčka, P., Berka, P., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, A. a Vávrová, K.** Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir.* 2013, Sv. 29, 15624-33.