

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej technológie



Diplomová práca

ŠTÚDIUM MONOVRSTEVNÝCH LIPIDOVÝCH
MODELOV OCHORENÍ KOŽNEJ BARIÉRY
Study of monolayer lipid models of skin barrier diseases

Vedúci práce: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Andrea Doláková

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové

máj 2017

Andrea Doláková

Pod'akovanie

V prvom rade by som rada poďakovala mojej školiteľke, PharmDr. Barbore Školovej, Ph.D., za zasvätenie do tajov lipidových monovrstiev, za čas a úsilie, ktoré mi venovala a samozrejme za usmernenie pri vypracovaní tejto práce.

Touto cestou rovnako ďakujem doc. PharmDr. Kateřine Vávrovej, Ph.D. a ďalším členom *Skin Barrier Research Group*. Vďaka patrí tiež doc. Ing. Petrovi Slepíčkovi, Ph.D. z VŠCHT v Prahe za meranie na AFM.

Za finančnú podporu ďakujem Karlovej Univerzite (SVV 260401) a Grantovej agentúre Českej republiky (13-23891S).

Za podporu, povzbudenie a trpezlivosť ďakujem svojej rodine a priateľom.

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
1. Úvod a cieľ práce.....	5
2. Zoznam skratiek	6
3. Teoretická časť	7
3.1. Koža	7
3.2. Stratum corneum	9
3.3. Ceramidy a ich prekursorzy.....	11
3.4. Poruchy kožnej bariéry	14
3.5. Ochorenia kože súvisiace s poruchami sfingomyelinázy.....	15
3.6. Lipidové monovrstvy a ich hodnotenie.....	17
3.7. Atómová silová mikroskopia	21
3.8. Brewsterova uhlová mikroskopia.....	22
4. Experimentálna časť	23
4.1. Chemikálie a rozpúšťadlá.....	23
4.2. Prístrojové vybavenie.....	23
4.3. Príprava zmesi voľných mastných kyselín.....	24
4.4. Príprava lipidových zmesí.....	25
4.5. Príprava fosfátového pufru.....	26
4.6. Príprava monovrstevných lipidových modelov na rozhraní vzduch-kvapalina a na pevnom podklade	27
4.6.1. Langmuirove monovrstvy na rozhraní vzduch-kvapalina	27
4.6.2. Príprava monovrstiev pri použití BAM	28

4.6.3. Langmuir-Blodgett technika	29
5. Výsledky a diskusia	30
5.1. Langmuirove izotermy	30
5.2. Modul kompresibility	34
5.3. BAM.....	36
5.4. AFM	39
6. Záver.....	44
7. Literatúra	45

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Autor: Andrea Doláková

Školiteľ: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Štúdium monovrstevných lipidových modelov ochorení kožnej bariéry

Koža chráni ľudské telo od vonkajších vplyvov a udržuje vnútornú integritu organizmu. Kožná bariéra je tvorená korneocytmi a lipidovou hmotou v intercelulárnom priestore *stratum corneum*, najvrchnejšej vrstvy epidermis. Lipidová hmota je zložená z ceramidov, voľných mastných kyselín a cholesterolu. Zloženie a usporiadanie lipidovej matrix určuje bariérové vlastnosti kože. Ceramidy sú syntetizované z glukozilyovaného ceramidu a sfingomyelínu hydrolytickými enzýmami β -glukocerebrozidázou a sfingomyelinázou. Nedostatok alebo nesprávna funkcia týchto enzýmov vedie k nefunkčnej kožnej bariére.

Cieľom tejto práce bola príprava a štúdium monovrstevných lipidových modelov, ktoré simulovali poruchu funkcie sfingomyelinázy u kožných ochorení. Pre hodnotenie sme použili metódy ako Langmuirove monovrstvy, Brewsterova uhlová mikroskopia (na rozhraní vzduch-kvapalina) a technika Langmuir-Blodgettovej s následným hodnotením pomocou atómovej silovej mikroskopie.

S rastúcim povrchovým tlakom sa najochotnejšie usporadúvajú monovrstvy so 100% zastúpením sfingomyelínu a priebeh ich izotermy sa veľmi podobá kontrolnej vzorke s ceramidom. Zároveň sú tieto lipidové zmesi najtesnejšie usporiadané. Súčasná prítomnosť sfingomyelínu a ceramidu v zmesiach sa prejavuje rozvoľnením monovrstiev. S rastúcim zastúpením sfingomyelínu v lipidových zmesiach klesá ich schopnosť tvoriť kompaktné domény.

Poznatky o správaní sfingomyelínu v monovrstevnom lipidovom modeli *stratum corneum* získané touto prácou by v budúcnosti mohli pomôcť k jeho ďalšiemu štúdiu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Andrea Doláková

Supervisor: PharmDr. Barbora Školová, Ph.D.

Title of thesis: Study of lipid monolayer models of skin barrier diseases

Skin protects human body from external factors and maintain internal integrity of organism. Skin barrier is formed by corneocytes and lipid matrix in intercellular space of *stratum corneum*, the uppermost layer of epidermis. Lipid matrix consists of ceramides, free fatty acids and cholesterol. The composition and organisation of lipid matrix are essential for the skin barrier properties. Ceramides are synthesized from glucosylated ceramide and sphingomyelin by hydrolytic enzymes β -glucocerebrosidase and sphingomyelinase. Insufficiency or malfunction of these enzymes lead to functionless skin barrier.

The aim of this work was to prepare and study monolayer lipid models, which simulated the malfunction of sphingomyelinase in skin diseases. For valuation we used several techniques such as Langmuir monolayers, Brewster angle microscopy (at the air-liquid interface), Langmuir-Blodgett technique and atomic force microscopy.

Monolayers with 100% substitution of sphingomyelin layout the most readily with rising surface pressure and the course of their isotherm is very similar to control mixture containing ceramide. Simultaneously these lipid mixtures are arranged most tightly. The presence of both sphingomyelin and ceramide in mixtures show itself by loosening of monolayers. The ability to form compact domains is decreasing with rising substitution of sphingomyelin.

Knowledge about behavior of sphingomyelin in *stratum corneum* monolayer lipid model gained by this work could be helpful for research in future.

1. Úvod a cieľ práce

Stratum corneum (SC) ako najvrchnejšia vrstva epidermis predstavuje kožnú bariéru, ktorá nás chráni nielen pred vplyvmi vonkajšieho prostredia, ale aj pred transepidermálnou stratou vody a elektrolytov. Udržiava tým homeostázu organizmu a umožňuje nám život na zemi.

Štruktúrne je SC zložená z korneocytov, ktoré sú zasadené do lipidovej hmoty. Lipidy SC tvoria ceramidy, voľné mastné kyseliny a cholesterol. Zloženie a usporiadanie medzibunkových lipidov je pre bariérovú funkciu kože zásadné. Ceramidy vznikajú zo svojich polárnejších prekursorov sfingomyelínu a glukozylovaného ceramidu pôsobením enzýmov sfingomyelináza a β -glukocerebrozidáza. Pokiaľ je týchto enzýmov nedostatok, prípadne je ich funkcia znížená, ceramidy nie sú tvorené v dostatočnom množstve, no naopak, dochádza k hromadeniu prekursorov. Tento jav sa potom môže prejaviť mnohými kožnými ochoreniami ako sú psoriáza, atopická dermatitída či ichtyózy, alebo ako komplexné metabolické ochorenie lipidov, akým je napríklad Niemann-Pickova choroba.

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv percentuálneho zastúpenia (0%, 25%, 50%, 75% a 100%) sfingomyelínu na usporiadanie lipidov SC pomocou štúdia lipidových monovrstevných modelov. Príprava Langmuirových izoteriem na rozhraní vzduch-kvapalina a hodnotenie pomocou Brewsterovej uhlovej mikroskopie, či prenášanie monovrstiev na pevný podklad a následné vyhodnotenie vďaka atómovej silovej mikroskopie by malo dopomôcť k riešeniu tejto problematiky.

2. Zoznam skratiek

AFM	atómová silová mikroskopia
BAM	Brewsterova uhlová mikroskopia
Cer	ceramidy
Chol	cholesterol
SC	stratum corneum
SM	sfingomyelín
SMáza	sfingomyelináza
VMK	voľné mastné kyseliny

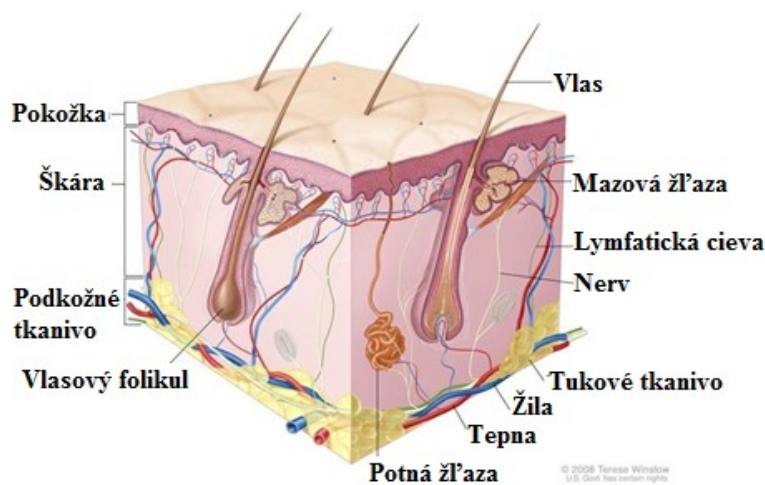
3. Teoretická časť

3.1. Koža

Koža (*cutis, derma*) je najväčším orgánom ľudského tela pokrývajúcim celý jeho povrch (1,5 až 2 m²) oddeľujúc vonkajšie prostredie od vnútorného prostredia organizmu.¹⁻² Hmotnosť kože je približne 4,5 kg, hrúbka má priemerne 1-2 mm, pričom najtenšia je na očných viečkach (0,1 mm), najhrubšia na chodidlách a dlaniach rúk (3,6 mm).¹

Koža má mnoho funkcií, medzi ktoré patrí ochrana pred vonkajšími nežiaducimi vplyvmi prostredia (fyzikálnymi, chemickými i biologickými), čím sa zúčastňuje na zabezpečovaní integrity organizmu.^{1, 3} Zohráva tiež úlohu v imunitných reakciách (tvorba protilátok) a podieľa sa na udržovaní telesnej teploty (termoregulácia).¹⁻² Je orgánom schopným exkrécie (mazové, potné a mliečne žľazy) a plní tiež depotnú funkciu (ukladanie vody a tuku v podkožnom väzive).¹⁻² Koža má schopnosť resorbovať rozličné látky a je tiež percepčným orgánom (pre dotyk, teplo, chlad a bolesť).¹⁻²

Je tvorená pokožkou (*epidermis*), škárou (*dermis, corium*) a podkožným väzivom (*hypodermis, tela subcutanea*) (viď obrázok 1, prevzaté z cancer.gov⁴).^{2, 5}



Obrázok 1. Stavba kože.

Najspodnejšia hypodermis je tvorená prevažne riedkym väzivom a sú tu uložené tukové bunky. Podkožné väzivo spája kožu so svalovým alebo kostrovým tkanivom.^{1-2, 5}

Dermis je hrubá 0,5-2 mm a skladá sa z fibroblastov a extracelulárnej hmoty, obsahuje mnoho kapilár, lymfatických ciev a nervových zakončení.⁵⁻⁶ V najvyššej časti dermis sú bulby vlasových folikulov spojené s mazovými žľazami, ako aj kľbká potných žliaz.¹

Vrchná epidermis vytvára päť vrstiev, ktoré predstavujú rôzne štádiá diferenciácie buniek (keratinizácie).^{1, 7}

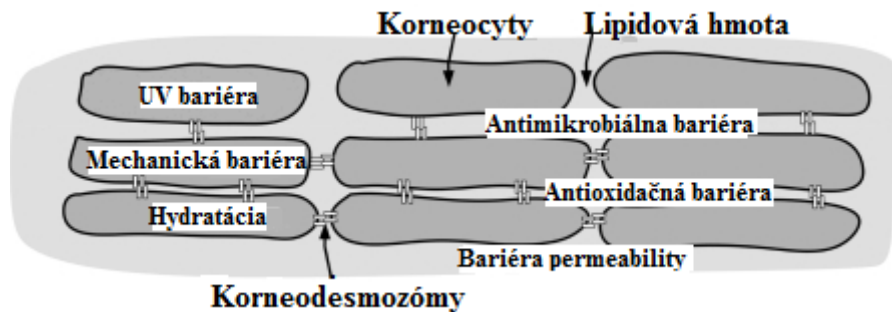
- *Stratum basale (cylindricum)* – vznik keratinocytov
- *Stratum spinosum* – splošťovanie buniek
- *Stratum granulosum* – postupovanie k povrchu a bunková smrť
- *Stratum lucidum* – strata jadra
- *Stratum corneum* – ako najvrchnejšia vrstva kože je konečným produktom diferenciácie epidermálnych buniek (úplne zrohovatené bezjadrové keratinocyty, označované ako rohové bunky – korneocyty) a je zodpovedná za jej bariérovú funkciu.⁵⁻⁶

Pokožka obsahuje okrem keratinocytov melanocyty (pigmentácia kože), Langerhansove bunky (imunitné reakcie) či Merkelove bunky (hmatové bunky).^{2, 5}

3.2. Stratum corneum

Stratum corneum (SC, rohová vrstva) je hrubá 10-20 μm , zvyčajne ju tvorí 10 – 25 vrstiev buniek (korneocytov) a intercelulárna hmota. Skladá sa z 75 – 80 % proteínov, ktoré sú obsiahnuté v korneocytoch a lipidovej hmote, ktorá ich obklopuje a tvorí približne 20 % objemu SC.⁶⁻¹⁰

Korneocyty sú keratínom vyplnené bezjadrové bunky odvodené z terminálne diferencovaných keratinocytov. Úzko interagujú s ostatnými korneocytmi prostredníctvom korneodesmozómov, ktoré sú dôležité pre súdržnosť SC (viď obrázok 2¹¹).^{8, 10}



Obrázok 2. Stavba SC.

Medzibunkový priestor SC tvoria lamely zložené z niekoľkých dvojvrstiev, ktoré sú usporiadané tak, že smerujú svojou hydrofóbnou časťou dovnútra a hydrofilnou von, do vodného prostredia.⁶ Lipidové dvojvrstvy sú zložené hlavne z ceramidov (Cer), voľných mastných kyselín (VMK, najmä nasýtené a s dlhým reťazcom) a cholesterolu (Chol) v takmer ekvimolárnom zastúpení. Hmotnostne predstavujú Cer 50 %, Chol 25 % a VMK 10 %.^{6, 10, 12-14} Ostatné lipidy zahŕňajú organické estery cholesterolu a cholesterol sulfát.^{6, 10}

Súčasťou korneocytov je proteínová vrstva, na ktorú sa kovalentne viaže z vonkajšej strany monovrstva Cer cez ω -hydroxyskupinu kyseliny s 30 – 34 C, ktorej hydroxyl je esterifikovaný kyselinou linolovou. Táto obálka slúži ako základ pre orientáciu ďalších vrstiev lipidov. Extracelulárne lamelárne usporiadanie

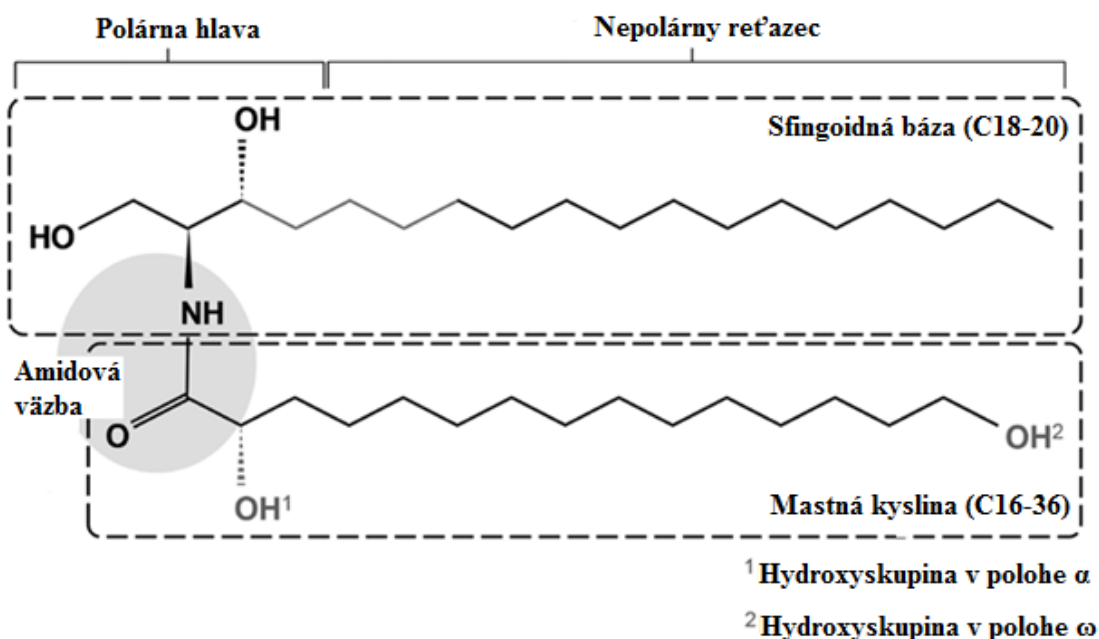
tvoria okrem Cer aj VMK (najčastejšie behenová a lignocerová) a Chol, ktorý slúži ako stabilizátor lipidových štruktúr.^{6-7, 10, 15}

Určitý pomer a rovnako zastúpenie lipidov je dôležité pre správne usporiadanie lamelárnych membránových štruktúr primárne zodpovedných za funkciu kožnej bariéry a epidermálnu homeostázu.^{13, 16}

3.3. Ceramidy a ich prekursorzy¹²

Cer patria medzi sfingolipidy a hrajú dôležitú úlohu nielen vo funkcii kožnej bariéry, ale aj bunkovej adhézii a epidermálnej diferenciácii. Navyše pracujú ako druhí poslovovia v stresom indukovanej apoptóze.¹⁷⁻¹⁸

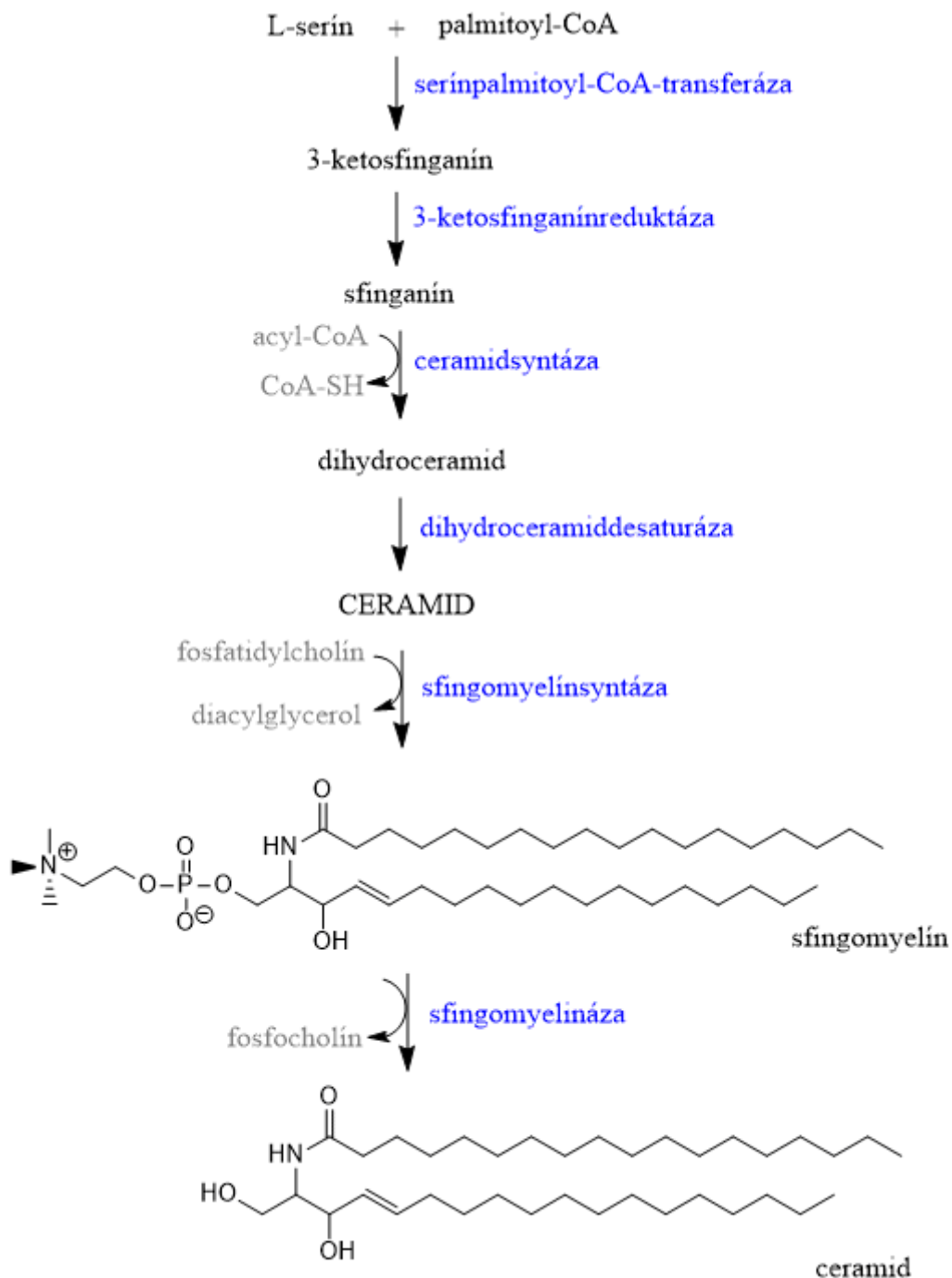
Cer sú zložené zo sfingoidnej bázy (dlhoreťazcový aminoalkohol) spojenej s masťou kyselinou amidovou väzbou medzi karboxylom kyseliny a aminoskupinou bázy (viď obrázok 3¹²).¹⁹ Sfingoidná báza (dihydrosfingozín, sfingozín, fytosfingozín alebo 6-hydroxy sfingozín) obsahuje polárnu hlavu a nepolárny reťazec (18 – 20 uhlíkatý), masťná kyselina s 16 – 36 uhlíkatým reťazcom (nehydroxylovaná, α -hydroxylovaná alebo esterifikovaná na ω -hydroxyle) obsahuje pozíciu pre α - a ω -hydroxyláciu.^{12, 17, 19}



Obrázok 3. Chemická štruktúra ceramidov.

Cer sú syntetizované hlavne v endoplazmatickom retikule v *stratum spinosum*. Sú transferované z buniek z ich prekursorov cez lamelárne telieska (tiež nazývané Odlandove telieska²⁰) vytvorené v *stratum granulosum* a tvoria multilamelárnu bariéru medzi korneocytmi v SC.¹²

De novo syntéza spočíva v reakcii serínu s palmitoyl koenzýmom A a je katalyzovaná serínpalmitoyl-CoA-transferázou a ceramidsyntázou. Degradáciu prekursorov, ktorými sú glukozilyované ceramidy a sfingomyelin (SM), vznikajú ceramidy (viď obrázok 4).^{10, 15, 17-18, 21-22}



Obrázok 4. Syntéza ceramidov.

Tieto polárne prekurzory sú menej lipofilnou transportnou formou a sú skladované v lamelárnych telieskach spolu s katabolickými enzýmami, glykosfingolipidmi, voľnými sterolmi a fosfolipidmi vo forme lipidických diskov. Telieska migrujú k vonkajšej strane bunky, kde sa ich membrána spojí s plazmatickou membránou a ich obsah je secernovaný do intercelulárneho priestoru medzi SC a *stratum granulosum*. Disky splynú a vytvoria súbor lipidových lamiel.^{7, 13-14, 23-24}

Glukozylovaný Cer je prekurzorom všetkých tried ceramidov SC.²⁵ Má v polohe 1 sfingoidnej bázy naviazanú glukózu a je hydrolyzovaný enzýmom β -glukocerebrozidáza.^{13, 19, 26}

Sfingomyelín (SM) má v polohe 1 sfingoidnej bázy naviazaný fosforylcholín a je prekurzorom dvoch tried Cer v SC - CerNS a AS.^{13, 25-26} CerNS je tvorený sfingozinom (S) a nasýtenou mastnou kyselinou (N), zatiaľ čo acyl AS Cer tvorí α -hydroxy kyselina. Toto názvoslovie Cer podľa Motty je jednoduchou klasifikáciou, ktorá zoskupuje Cer nesúce štruktúrne podobnosti.²⁷ Označujú sa kombináciou sfingoidnej bázy a typu mastnej kyseliny, ktoré tvoria Cer.

Dva izoenzýmy môžu meniť SM na Cer. Lyzozomálna kyslá sfingomyelináza (SMáza, pH optimum 5,1-5,6) a nelyzozomálna neutrálna SMáza.^{23, 26, 28} Kyslá SMáza je kľúčovým enzýmom v sfingolipidovom metabolizme, štiepi fosfodiesterovú väzbu v SM na Cer a fosforylcholín.^{18, 21, 28-29} Prírodný SM je zložený zo sfingoidnej bázy a acylu nasýtenej kyseliny s dĺžkou reťazca najčastejšie od 16 do 24 C, báza má vždy konfiguráciu *D-erythro*. Semisyntetické SM majú definovanú dĺžku acylového reťazca, a kvôli epimerizácii na C3 sú to racemické zmesi. Stereochemia a dĺžka reťazcov komerčne dostupných SM (napr. z kuracieho vajecného žltku, z hovädzieho mozgu či kravského mlieka) ovplyvňuje ich biofyzikálne vlastnosti.³⁰

3.4. Poruchy kožnej bariéry

Zmeny v zložení a usporiadaní lipidov v SC spôsobujú zníženie bariérovej funkcie kože. Bariérové vlastnosti kože ovplyvňujú vonkajšie faktory (chemikálie, UV žiarenie a pod.) a vnútorné faktory (vek, strava, psychický stav). Vo výsledku je koža suchá, popraskaná, umožňuje vstup alergénom, toxínom a mikroorganizmom, čím sa zvyšuje riziko infekcie.^{10, 17} Zmenený profil Cer v SC je popísaný tiež u kožných ochorení – atopickej dermatitídy, psoriázy či ichthyózach.^{10, 24, 31} U atopickej dermatitídy je znížený obsah Cer (EOS) až o 50 %, avšak cholesterolu je podstatne viac v porovnaní so zdravou kožou.^{17, 24} Aktivita katabolických enzýmov degradujúcich prekursorov je pozmenená, znížený obsah kyslej SMázy a tiež neutrálnej SMázy vedie k zníženému obsahu Cer, a tým k abnormalitám v bariérovej priepustnosti charakteristickej pre toto ochorenie.³²

Zdedené poruchy v týchto hydrolytických procesoch však spôsobujú i smrteľné ochorenia.²³ Nedostatok alebo nedostatočná funkcia β -glukocerebrozidázy vedie k vážnej Gaucherovej chorobe.^{29, 31} Je to zriedkavé genetické ochorenie, ktoré má za následok hromadenie glukozilylovaného ceramidu a nedostatok Cer. Bariérová funkcia kože je redukovaná, cerebrozidy sa ukladajú v slezine a kostnej dreni.^{2, 17, 24}

Farberova choroba (Farberova lipogranulomatóza) je ojedinelé lyzozómové ochorenie metabolizmu lipidov spôsobené nedostatkom ceramidázy (enzým štiepiaci Cer na sfingozín a mastné kyseliny).^{2, 17} Cer sa akumulujú takmer vo všetkých tkanivách, najviac však v okolí kĺbov. Prognóza nie je priaznivá.²

3.5. Ochorenia kože súvisiace s poruchami sfingomyelinázy

Pred vyše 100 rokmi nemecký pediater Albert Niemann popísal prvého pacienta s extrémne vzácnym, recesívne dedičným lyzozómovým ochorením. O pár rokov neskôr sa zistilo, že sa jedná o akumuláciu SM a koncom 60-tych rokov minulého storočia vedci zistili, že je za to zodpovedný práve nedostatok kyslej SMázy.³²

Niemann-Pickova choroba je vrodené ochorenie s poruchou lipidového metabolizmu.² Mutácia v kyslej SMáze vedie buď buď k vážnej neuroviscerálnej (typ A) alebo miernejšej viscerálnej (typ B) forme ochorenia, v závislosti na stupni zvyškovej enzýmovej aktivity (aj menej než 2 %).^{17, 26, 29}

Nedostatok SMázy je charakterizovaný patologickým hromadením SM v bunkách a tkanivách.¹⁸ Od ranného detstva vedie k ťažkým poruchám vývoja. Typ A (infantilná, neurodegeneratívna forma)³² sa manifestuje okolo 4. mesiaca života hepatosplenomegáliou (viď obrázok 5, prevzaté z nature.com³³).



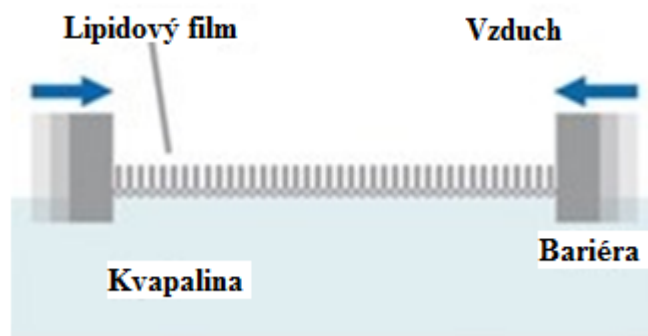
Obrázok 5. Hepatosplenomegália pri Niemann-Pickovej chorobe.

SM a Chol sa akumulujú v pečeni, slezine, kostnej dreni a mozgu. Neurologická symptomatológia sa prejaví neskôr výraznou hypotóniou, slepota a strata sluchu nastáva v preterminálnom štádiu choroby. Najčastejšie sa vyskytuje v židovskej

populácii, deti umierajú do 4. roku života. Typ B je benígnou formou a nie je viazaný na žiadnu etnickú skupinu. SM sa akumuluje v pečeni a v kostnej dreni. Neurologické príznaky sú minimálne alebo žiadne a postihnutí jedinci sa dožívajú normálneho veku, no prejavuje sa napr. hepatosplenomegália, pľúcna nedostatočnosť či kardiovaskulárne choroby.³² Typ C a D nespočíva v deficite sfingomyelinázy, ale v jej zníženej aktivite. Infantilná forma sa manifestuje ikterom a hepatomegáliou už v novorodeneneckom veku, najčastejšie sa však manifestuje až okolo 2. roku života extrapyramidálnou symptomatológiou a hepatosplenomegáliou. Typ D je viazaný na škótsku populáciu.²

3.6. Lipidové monovrstvy a ich hodnotenie³⁴⁻³⁷

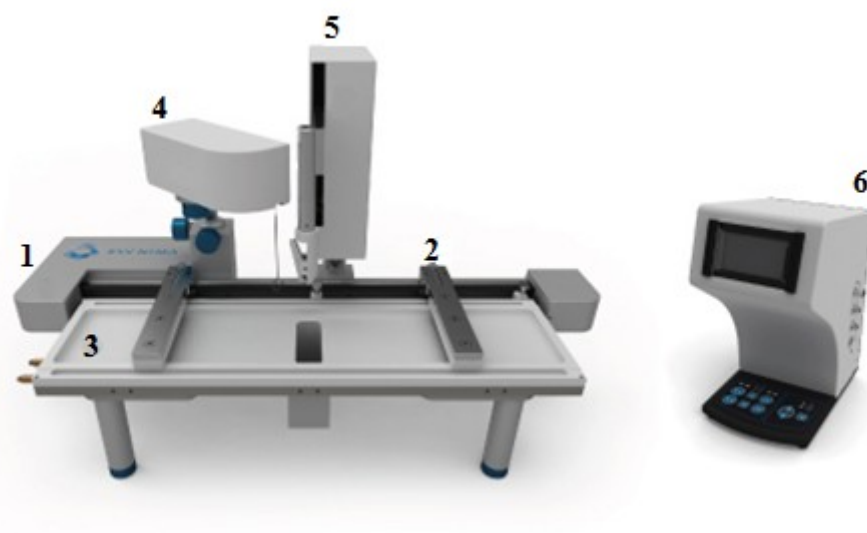
Nápomocným nástrojom pre pochopenie molekulových interakcií v biologických membránach je príprava lipidových, tzv. Langmuirových monovrstiev (vid' obrázok 6, prevzaté z biolinscientific.com³⁶). Lipidové monovrstvy môžu poskytnúť užitočné informácie, napomáhajú nám k pochopeniu mechanických vlastností membránových Cer v lipidových zmesiach a tiež poskytujú príležitosť preskúmať závislosť fázového správania na stlačenie molekúl.^{8, 38} V dnešnej dobe už našťastie nemáme taký problém, s akým sa koncom 19. storočia musela pasovať Nemka Agnes Pockelsová. Hoci pracujúc v kuchyni svojich rodičov prišla na spôsob, akým manipulovať s lipidovými vrstvami na vode, ako žena nebola v pozícii publikovať výsledky svojho pozorovania v odborných periodikách. Preto sa obrátila na lorda Rayleigha, ktorý sa neskôr tejto problematike venoval a to ho viedlo k zisteniu, že tieto vrstvy sú len jednomolekulové. Týmto položil základ pre štúdium nerozpustných monovrstiev, ktoré v nasledujúcich rokoch rozkvitalo vďaka ďalším vedcom, akými boli páni Devaux, Hardy či Langmuir.³⁵



Obrázok 6. Langmuirova monovrstva na rozhraní vzduch-kvapalina.

Látky, ktoré môžu tvoriť monovrstvu na fázovom rozhraní vzduch-kvapalina pozostávajú z molekúl, ktoré sú amfifilné. Hydrofóbna časť musí byť dost' veľká, aby bola molekula nerozpustná vo vode, zatiaľ čo hydrofilná časť musí mať dostatočnú prítťažlivosť k vode, aby sa molekuly pripevnili k vodnej subfázi a zaistilo sa, že sa nebudú hromadiť jedna na druhú.³⁵

Prístroj (vid' obrázok 7, prevzaté z [z biolinscientific.com](http://biolinscientific.com)³⁶) pozostáva z temperovateľnej vaničky z hydrofóbneho materiálu, obvykle polytetrafluóretylénu (PTFE, teflón, vysoko inertný materiál umožňujúci jednoduché čistenie organickými rozpúšťadlami), z hydrofilných bariér (z Delrinu, pre zvýšenú stabilitu monovrstvy) a prístroja na meranie povrchového napätia.³⁹ Vanička je naplnená kvapalinou - voda, pufer (kvapalná subfáza) a bariéry ležiace cez vaničku oddeľujú povrch a sú použité na ohraničenie oblasti, kde sa monovrstva rozprestiera na vodnom povrchu. Nanáša sa lipidová zmes rozpustená v organickom rozpúšťadle, ktoré keď sa odparí, monovrstva môže byť stlačovaná posúvaním bariér po okrajoch vaničky.

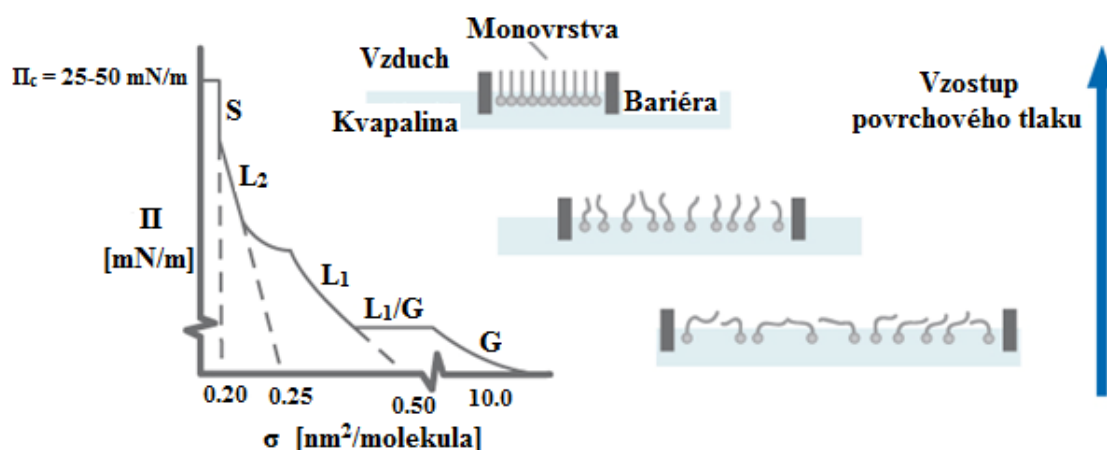


Obrázok 7. Prístroj na meranie izotermy. 1-podstavec, 2-bariéry, 3-vanička, 4-senzor povrchového tlaku, 5-mechanizmus na ponáranie, 6-jednotka rozhrania

Platinový pliešok je sčasti ponorený do subfázy a zaznamenáva zmeny povrchového tlaku. Pomocou softwaru KVS NIMA je hodnotený meraný povrchový tlak Π a ďalšie parametre stlačiteľnosti. Priebeh kompresie zaznamenáva izoterma.

Izoterma je krivka závislosti povrchového tlaku Π [mN/m] na teoretickej ploche jednej molekuly A [\AA^2]. Táto plocha je vypočítaná z molekulovej hmotnosti a koncentrácie, respektíve množstva vzorky. Približovaním bariér sa znižuje plocha

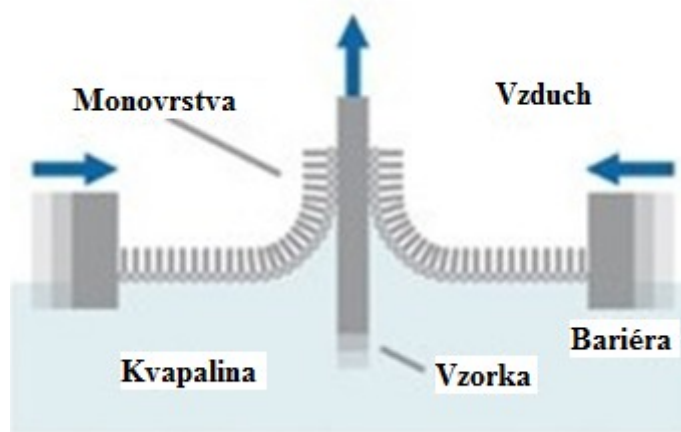
na jednu molekulu, a tým sa zvyšuje povrchový tlak. Izoterma nám dáva informáciu o tom, ako ochotne sa lipidy usporadúvajú (čím je strmšia, tým ochotnejšie). Monovrstvy prechádzajú fázovými zmenami, ktoré sa prejavujú zlomami na krivke, od plynného stavu cez kvapalnú a tuhú, až po kolaps monovrstvy (viď obrázok 8, prevzaté z z biolinscientific.com³⁶).⁴⁰⁻⁴¹



Obrázok 8. Izoterma. Označenie: G (z angl. *gas*) = plynná fáza, L₁ (z angl. *liquid-expanded*) = kvapalno-rozpínavá fáza, L₂ (z angl. *liquid-condensed*) = kvapalno-kondenzovaná fáza, S (z angl. *solid*) = tuhá fáza

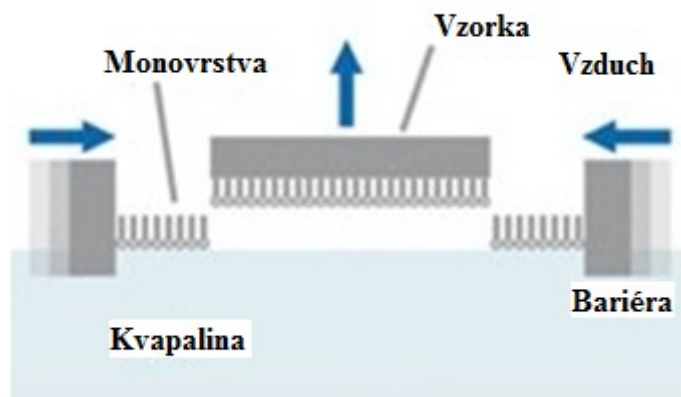
Pri nízkych tlakoch sú molekuly na povrchu subfázy v tzv. plynnej fázi neusporiadané a hustota je nízka, avšak s rastúcou kompresiou sa dostupný priestor redukuje a lipidy prechádzajú do kvapalno-rozpínavej fázy. Molekuly sa začínajú reorganizovať, polárna hlava sa orientuje na vodnú subfázu a hydrofóbny reťazec takmer kolmo na rovinu rozhrania. Ešte vyšší tlak spôsobuje prechod do kompaktnejšej kvapalno-kondenzovanej, a následne tuhej fázy.³⁴

Monovrstvy môžeme prenášať na pevný podklad, napr. na sľudové sklíčko, a potom ich hodnotiť atómovou silovou mikroskopiou či inými metódami. Podklad je najprv ponorený do kvapaliny a po nanosení vzorky prechádza monovrstvou za konštantného povrchového tlaku. O techniku Langmuir-Blodgettovej sa jedná, ak monovrstvou prechádza vertikálne (viď obrázok 9, prevzaté z biolinscientific.com³⁶).



Obrázok 9. Langmuir-Blodgett technika.

Ďalšou možnosťou je priložiť podklad zhora a prenos monovrstvy sa tak uskutoční horizontálne. V tom prípade hovoríme o technike Langmuir-Schaefer (viď obrázok 10, prevzaté z z biolinscientific.com³⁶).^{35, 37}

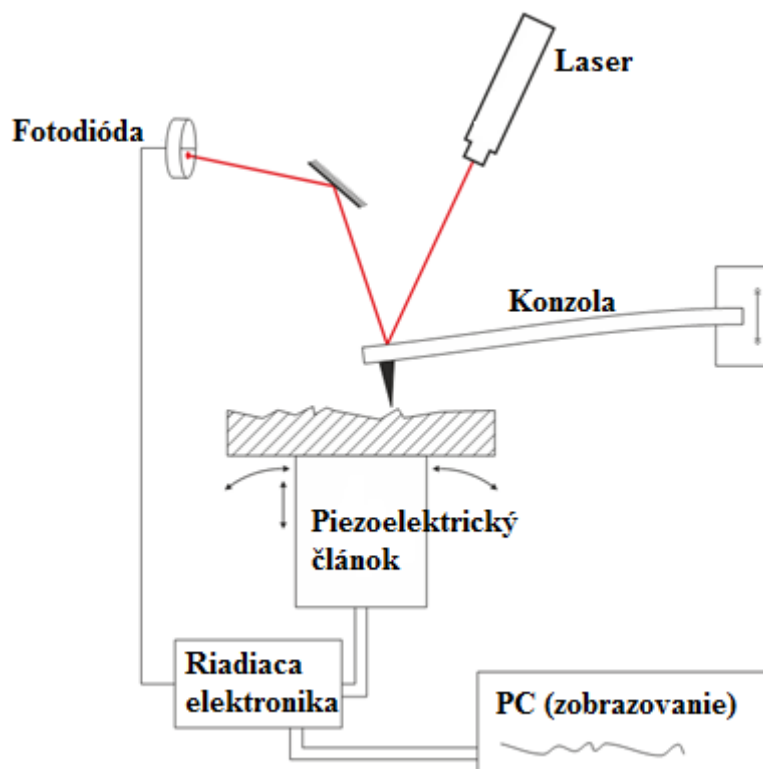


Obrázok 10. Langmuir-Schaeffer technika.

3.7. Atómová silová mikroskopia (AFM)³⁵

Technika mikroskopie atomárnych síl (z angl. *Atomic force microscopy*) nám poskytuje užitočné informácie o povrchu monovrstvy na pevnom podklade. Povrch vzorky je snímaný a zaznamenávaný pohybom sondy (vid' obrázok 11, prevzaté z physics.mff.cuni.cz⁴²).³⁵

Sonda je upevnená na konzole, na ktorú svieti laser. Na piezoelektrickom kmitajúcom článku je umiestnená vzorka a nerovnosti na jej povrchu spôsobujú zmeny ohybu konzoly. Odrazený laserový lúč sníma fotodióda a vyprodukovaný obrázok tak napodobňuje topografiu vzorky zaznamenaním interakčných síl (van der Waalsových) medzi veľmi ostrým hrotom sondy a atómami na povrchu vzorky.⁴³

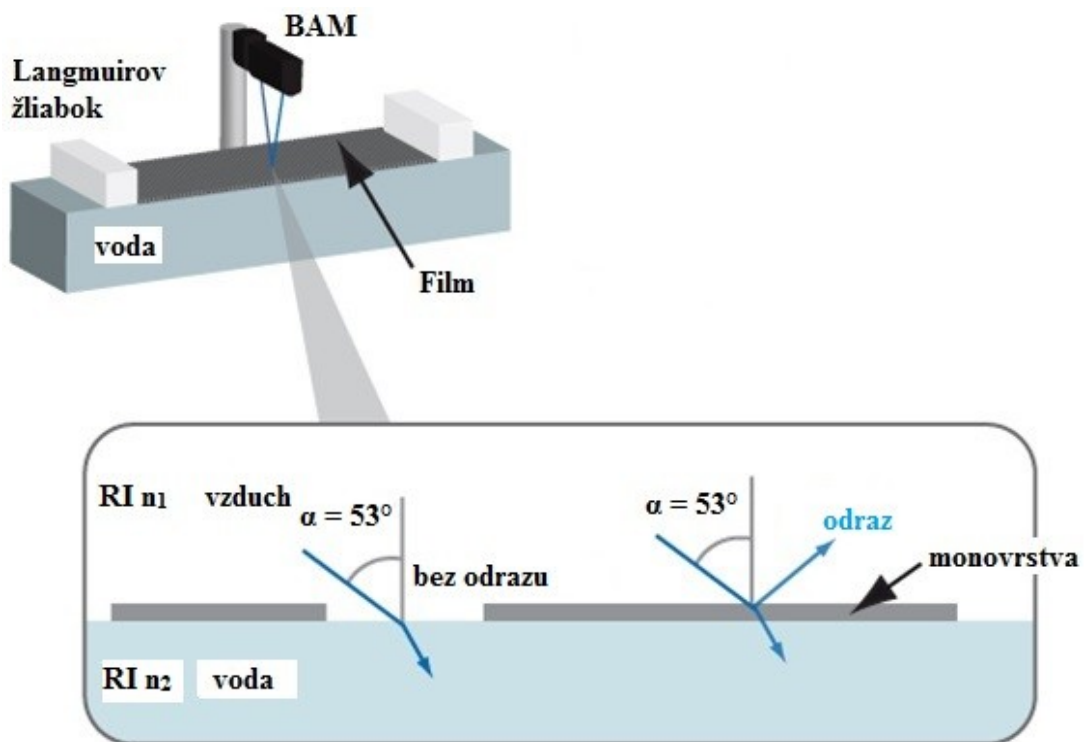


Obrázok 11. Znázornenie princípu AFM.

3.8. Brewsterova uhlová mikroskopia (BAM)^{36, 41, 44}

Brewsterova uhlová mikroskopia (z angl. *Brewster angle microscopy*) je vysoko citlivá zobrazovacia technika založená na princípoch odrazovej spektroskopie. Umožňuje priamo a detailne skúmať mikroskopické povrchové štruktúry a vizualizovať usporiadanie domén v monovrstvách na rozhraní vzduch-kvapalina.^{8, 41}

Lúč polarizovaného svetla dopadajúci na hladinu vody pod Brewsterovým uhlom (ktorý činí približne 53°) sa neodráža, ale prechádza do kvapaliny. Avšak prítomnosť monovrstvy rozloženej na povrchu vedie k zmene indexu lomu (viď obrázok 12, prevzaté z biolinscientific.com⁴⁵). Mikroskop je vybavený špeciálnou snímacou technikou, aby poskytoval ostré obrázky. Je žiadúce mať kontrast medzi oblasťami, kde sú prítomné zhustené monovrstvené domény a miestami, kde je relatívne málo monovrstveného materiálu.^{35, 44}



Obrázok 12. BAM a Brewsterov uhol. RI n_1 – index lomu vzduchu, RI n_2 – index lomu vody

4. Experimentálna časť

4.1. Chemikálie a rozpúšťadlá

Cer (N-lignoceroylsfigozín) a sfingomyelinový prekurzor (SM, z kravského mlieka) sme zakúpili od Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Ostatné chemikálie a rozpúšťadlá v čistote pre HPLC sme si zaobstarali od Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Nemecko). Ultračistá voda bola deionizovaná, destilovaná a filtrovaná systémom Millipore Q.

4.2. Prístrojové vybavenie

Pre prípravu Langmuirových monovrstiev a techniku Langmuir-Blodgett sme použili vaničku KN 2001 (small) KSV NIMA a software KSV NIMA.

Pre pozorovanie monovstiev Brewsterovým uhlovým mikroskopom sme použili vaničku KN 1003 (medium) KSV NIMA, mikroskop KSV NIMA MicroBAM a software KSV NIMA.

Pre atómovú silovú mikroskopiu sme použili zariadenie VEECO CP II, kontaktný mód využívajúci sondu CONT20A-CP Si a software Veeco DI SPMLab NT 6.0.2.

Ku štatistickému spracovaniu dát sme použili test jednofaktorová (*one-way*) ANOVA. Výsledky sú prezentované ako priemery \pm SEM (štandardná chyba priemeru).

4.3. Príprava zmesi voľných mastných kyselín (VMK)

Lipidové vzorky sme pripravovali zo zmesi nasýtených mastných kyselín palmitovej (C16), stearovej (C18), arachidovej (C20), behenovej (C22) a lignocerovej (C24). V molárnom zastúpení uvedenom v tabuľke 1 sa približne vyskytujú v ľudskej SC.⁴⁶

Tabuľka 1. Zloženie zmesi kyselín.

Dĺžka acylového reťazca	Molárny pomer	Relatívna molekulová hmotnosť [g/mol]	Hmotnosť [mg]
C16	1,8	256,42	4,62
C18	4,0	284,48	11,38
C20	7,6	312,54	23,75
C22	47,8	340,58	162,80
C24	38,8	368,63	143,03
suma	100	345,58	345,58

Kyseliny sme navážili, zosypali dohromady, rozpustili v zmesi chloroform/metanol (3:1, v/v) a zamiešali, až vznikla homogénna zmes. Po odparení rozpúšťadla pomocou rotačnej vákuovej odparky, a následne pod prúdom dusíka sme zmes nechali cez noc v exsíkátore nad parafínom a oxidom fosforečným, aby sme docielili kompletne odstránenie použitých rozpúšťadiel.

4.4. Príprava lipidových zmesí

Pre prípravu kontrolnej vzorky, ktorá simulovala správnu funkciu kožnej bariéry, sme použili ekvimolárnu zmes Cer (odvodeného od 18-uhlíkového sfingozínu a lignocerovej kyseliny – $M_r = 650,13 \text{ g/mol}$), zmes VMK ($M_r = 345,58 \text{ g/mol}$) a cholesterol (Chol, $M_r = 386,67 \text{ g/mol}$). Ďalšie zmesi boli lipidovými modelmi SC s čiastočným alebo úplným deficitom Cer, ktorý sme v rôznom percentuálnom zastúpení nahradzovali sfingomyelínom (SM, $M_r = 801,22 \text{ g/mol}$), vid' tabuľka 2.

Tabuľka 2. Zloženie lipidových vzoriek.

Pomer ceramidu a prekursoru vo vzorkách [%]		Hmotnosť jednotlivých lipidov vo vzorkách [mg]			
Cer	SM	Cer	VMK	Chol	SM
100	0	0,650	0,346	0,387	0
75	25	0,488	0,346	0,387	0,200
50	50	0,325	0,346	0,387	0,401
25	75	0,162	0,346	0,387	0,601
0	100	0	0,346	0,387	0,801

Hmotnosti jednotlivých lipidových zložiek sme sčítali, navážili a rozpustili na koncentráciu 1 mg/ml v zmesi chloroform/metanol (3:1, v/v) v prípade Cer, VMK a Chol, zatiaľ čo SM v zmesi chloroform/metanol (1:1, v/v). Po rozpustení sme z týchto roztokov pripravili požadované zmesi lipidov podľa tabuľky 2 a do vialky sme mikrostriekačkou preniesli vždy presne také množstvo lipidov, ktoré odpovedalo ich zastúpeniu. Vzorky sme zhomogenizovali a organické rozpúšťadlo odparili pod prúdom dusíka. V exsikátore, kde bol sušidlom parafín a oxid forforečný, sme vzorky nechali do druhého dňa, aby sa odstránili zvyšky rozpúšťadla. Vzorky sme skladovali v mrazničke a pred každým meraním sme ich rozpustili v zmesi chloroform/metanol (3:1, v/v) na koncentráciu 1 mg/ml.

4.5. Príprava fosfátového pufru

Vodnou subfázou bol 10mM fosfátový pufer s pH 7,4 (pH odpovedajúce rozhraniu *stratum corneum* a *stratum granulosum*⁴⁷) pripravený rozpustením komerčne dostupných tabliet (od Sigma-Aldrich) v ultračistej vode (5 tabliet na liter pufru) a dodaním hexahydrátu chloridu horečnatého. V tabuľke 3 je uvedené zloženie pufru.

Tabuľka 3. Zloženie pufru.

Zloženie	Relatívna molekulová hmotnosť [g/mol]	mmol/l	g/l
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156,01	2,0	0,312
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358,14	8,0	2,865
NaCl	58,44	137,0	8,000
KCl	74,55	2,7	0,201
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,31	2,0	0,407

Pufer sme po rozpustení komponent prefiltrovali a pomocou pH-metru so sklenenou elektródou sme skontrolovali hodnotu pH. Ak to bolo potrebné, upravili sme ju na požadovanú hodnotu kyselinou chlorovodíkovou alebo hydroxidom sodným. Následne sme pufer pred použitím opäť prefiltrovali a medzi jednotlivými meraniami skladovali v chladničke.

4.6. Príprava monovrstevných lipidových modelov na rozhraní vzduch-kvapalina a na pevnom podklade

4.6.1. Langmuirove monovrstvy na rozhraní vzduch-kvapalina

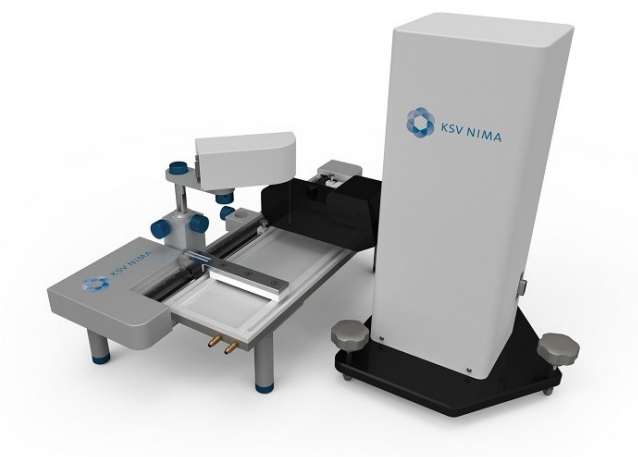
Postup prípravy monovrstiev bol nasledovný:

- 1) Vaničku (KN 2001, small) sme naplnili pufrom a bariéry umiestnili do krajných polôh. Na háčik sme zavesili platinový pliešok, ktorý sa sčasti do pufru ponoril a zaznamenával zmeny povrchového tlaku. Na meranie teploty sme do kade ponorili tiež čidlo termostatu. Aby sme zabránili prúdeniu vzduchu, ktoré by mohlo rozhýbať platinový pliešok, ale tiež aby nedošlo ku kontaminácii systému a znížilo sa vyparovanie subfázy, celé zariadenie bolo umiestnené v uzatvárateľnom boxe.
- 2) Povrch kvapalnej subfázy sme pred každým meraním čistili pomocou pipety opakovaným približovaním bariér ku stredu vaničky a odsatím nečistôt, ktoré mohli priľnúť na hranách bariér.
- 3) Lipidovú vzorku sme rozpustili v zmesi chloroform/metanol (3:1, v/v) na koncentráciu 1 mg/ml. Keď bola kvapalná subfáza vytemperová na 32 °C (teplota kože), pomocou mikrostriekačky sme naniesli 10 µl lipidovej vzorky tak, aby sa nedošlo ku kontaktu ihly s hladinou. V prípade vzorky, v ktorej bol Cer kompletne nahradený SM, sme nanášali 20 µl.
- 4) Približne po 15-tich minútach, keď už bolo rozpúšťadlo odparené, sme vynulovali povrchový tlak, a tiež pozíciu bariér a spustili sme meranie izotermy. Bariéry sa k sebe približovali rýchlosťou 20 mm/min k maximálnej hodnote povrchového tlaku 50 mN/m.
- 5) Po ukončení merania sme obsah vaničky vyprázdnil, vaničku, čidlo a platinový pliešok viackrát premyli zmesou chloroform/metanol (3:1, v/v) a bariéry metanolom a vysušili. Langmuirove izotermy jednej lipidovej zmesi sme získali aspoň z troch meraní.

4.6.2. Príprava monovrstiev pri použití BAM

Monovrstvy pri použití BAM sme pripravovali rovnakým spôsobom, ako už bolo uvedené, avšak s tým rozdielom, že sme použili väčšiu vaničku (KN 1003; medium). Približne do jej stredu sme vsadili doštičku, od ktorej sa laserový lúč mohol odraziť. Nakoľko sme pracovali s väčšou vaničkou, aplikovali sme tiež väčší objem vzorky (30 μ l).

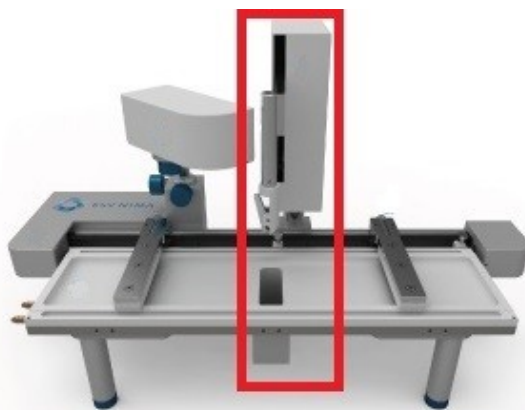
Potom sme nad doštičku nad hladinou situovali zdroj, ktorý emitoval laser (viď obrázok 13, prevzaté z biolinscientific.com⁴⁸). Pri meraní sa bariéry k sebe približovali rýchlosťou 10 mm/min, aby sme mali možnosť pozorovať a tiež zaznamenávať, čo sa deje na povrchu kvapalnej subfázy.



Obrázok 13. Zariadenie BAM.

4.6.3. Langmuir-Blodgett technika

Nanášanie Langmuirovej monovrstvy na pevný podklad prebiehalo opäť vo vaničke KN 2001 (small), ku ktorej sme pridali zariadenie na vertikálne posúvanie pevnej fázy, (viď obrázok 14, prevzaté z [z biolinscientific.com](http://biolinscientific.com)³⁶). Čerstvo odlúpené sľudové sklíčko (rozmery 15x15 mm) sme vpravili do držiaku, a potom sme ho ponorili do subfázy takmer po okraj.



Obrázok 14. Mechanizmus umožňujúci vertikálne posúvanie pevného podkladu je farebne odlišený červeným rámčekom.

Naniesli sme vzorku a po odparení rozpúšťadla (cca 15 minút) sme spustili meranie. Sľudové sklíčko sa vyťahovalo rýchlosťou 2 mm/min pri konštantnom povrchovom tlaku 20 mN/m. Po vynorení sklíčka, s ktorým sme manipulovali pomocou držiaku, sme ho vsadili do sklenenej vialky. Aby sme zabránili znehodnoteniu vzorky, sklíčko bolo uchovávané v inertnej atmosfére argónu v temnote pri pokojovej teplote. Z každej lipidovej zmesi sme pripravili 4 monovrstvy, ktoré boli následne hodnotené pomocou AFM.

5. Výsledky a diskusia

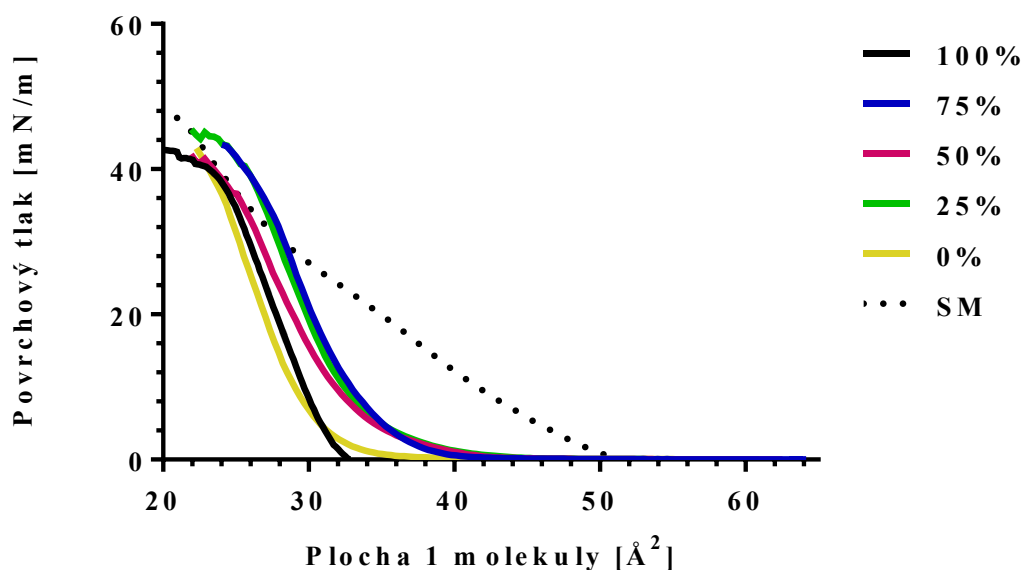
5.1. Langmuirove izotermy

Izotermy vyjadrujú správanie monovrstiev, popisujú termodynamické vlastnosti a fázové zmeny. V tabuľke 4 je uvedené a farebne rozlíšené percentuálne zastúpenie SM a Cer v jednotlivých vzorkách.

Tabuľka 4. Znázornenie percentuálneho pomeru SM/Cer v jednotlivých vzorkách.

SM	0%	25%	50%	75%	100%
Cer	100%	75%	50%	25%	0%

Na obrázku 15 môžeme vidieť, že najstrmšia je izoterma vzorky s úplným nahradením Cer SM prekursorom (100%, čierna). Má však veľmi podobný priebeh, ako izoterma kontrolnej vzorky s Cer (0%, žltá), hoci tá má o čosi skorší nástup.



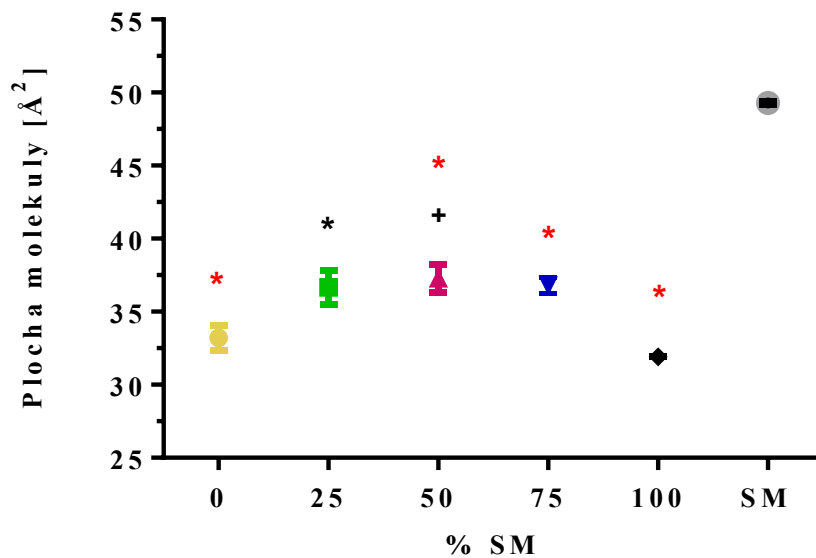
Obrázok 15. Izotermy vzoriek.

Izoterma samotného SM (bodkovaná) má najpozdvoľnejší priebeh, čo značí, že sa lipidy v monovrstve usporadúvajú najmenej ochotne. V porovnaní s inou štúdiou je priebeh SM prekursoru podobný.⁴⁹ Správanie SM závisí od pH subfázy.⁴⁹

Vzorky s čiastočným nahradením Cer SM majú súčasný nástup. Zvlášť vzorky s 25% a 75% SM sú v priebehu takmer identické, zatiaľ čo vzorka s pomerom Cer a SM 1:1 má priebeh o niečo pozvoľnejší. Priebeh izotermy ovplyvňuje teplota, ale tiež zloženie kvapalnej subfázy. Pri našom meraní to vyzerá, že všetky izotermy kolabujú pri tlaku približne 50 mN/m rovno z kvapalno-rozpínavej fázy. Koexistencia kvapalno-rozpínavej a kvapalno-kondenzovanej fázy (plató na krivke) nie je prítomná, čo je typické pre nenasýtené fosfolipidy (napr. vaječný žltok).³⁴ Dôvodom je skutočnosť, že sa jedná o zmesi lipidov, ktorých molekuly medzi sebou rôzne interagujú.

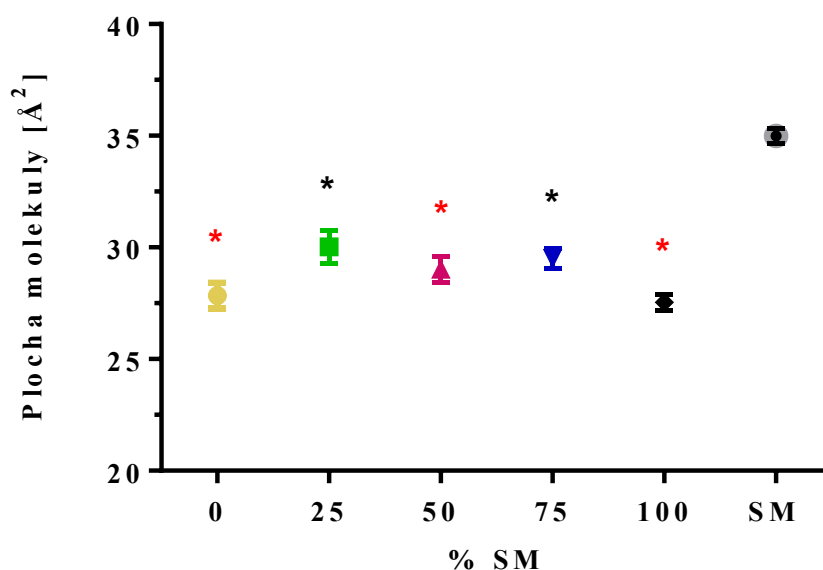
Cer a SM sa líšia v ich afinite k ostatným lipidom, zvlášť k Chol. SM s Chol interagujú a vytvárajú usporiadanú štruktúru, zatiaľ čo Cer má k Chol slabú príťažlivosť.⁵⁰ Môže to byť spôsobené tým, že SM má veľkú polárnu fosfocholínovú hlavu, a práve tá je dôležitá pre interakciu s Chol. Poskytne mu štít, pod ktorý sa Chol môže ukryť, aby sa vyhol vystavovaniu hydrofóbných častí voči vode a to pomáha udržať reťazce v usporiadanom stave.⁵¹⁻⁵² VMK sa zas prednostne miešajú s Cer^{37, 53}, no miesiteľnosť s Chol je obmedzená. Napríklad kyselina lignocerová sa s Chol nemieša, ale kyselina palmitová čiastočne áno.⁵⁴ Pri zmesiach Cer, Chol a VMK sa kyselina palmitová mieša s krátkymi acylovými časťami Cer (a s Chol), zatiaľ čo kyselina lignocerová s tými dlhými. Chol v monovrstvách s Cer tiež zvyšuje fluiditu.⁵⁵ Izotermy samotných lipidov (Cer, Chol, VMK) sú strmé, a hoci aj ich zmesi majú podobný priebeh, plocha molekuly sa prídavkom ďalších zložiek zvyšuje.⁸

Dobrou miesiteľnosťou Cer a VMK a na druhej strane SM a Chol, by sa dalo vysvetliť, prečo práve vzorky so samotným Cer alebo SM majú podobné izotermy a tiež menšie plochy jednej molekuly pri 1,5 mN/m a 20 mN/m. Keď sa však vyskytnú v zmesi súčasne Cer aj SM (zároveň s Chol a VMK), správanie lipidov sa zmení a vzájomné interakcie im bránia v tesnejšom usporiadaní.



Obrázok 16. Zobrazenie hodnôt plochy jednej molekuly pri 1,5 mN/m; * štatisticky významný rozdiel voči hodnote plochy jednej molekuly SM prekursoru, + štatisticky významný rozdiel voči hodnote plochy jednej molekuly vzorky bez prekursoru (0%), $P < 0,05$, ak je znak zvýraznený na červeno, $P < 0,0001$.

Pri povrchovom tlaku 1,5 mN/m (viď obrázok 16) dochádza k nástupu izoteriem a čím sú hodnoty teoretických plôch jednej molekuly pri nízkom povrchovom tlaku nižšie, značí to väčšiu ochotu lipidov sa usporadúvať. Z toho vyplýva, že lipidová zmes, v ktorej bol Cer úplne nahradený SM $A_{1,5}$ (100% SM) = $31,9 \text{ \AA}^2$, ale tiež vzorka bez SM prekursoru $A_{1,5}$ (0% SM) = $33,2 \text{ \AA}^2$, sa usporadúvajú najochotnejšie. Mohlo by to byť spôsobené tým, že SM má veľkú polárnu hlavu a tiež zrejme zaujíma podobnú plochu ako Cer. Keď je však prítomný Cer aj SM, $A_{1,5}$ (25% SM) = $36,7 \text{ \AA}^2$, $A_{1,5}$ (50% SM) = $37,3 \text{ \AA}^2$, $A_{1,5}$ (75% SM) = $36,8 \text{ \AA}^2$, ochota sa o čosi znižuje pravdepodobne kvôli vzájomnému pôsobeniu a interakciám so zvyškom prítomných lipidov.



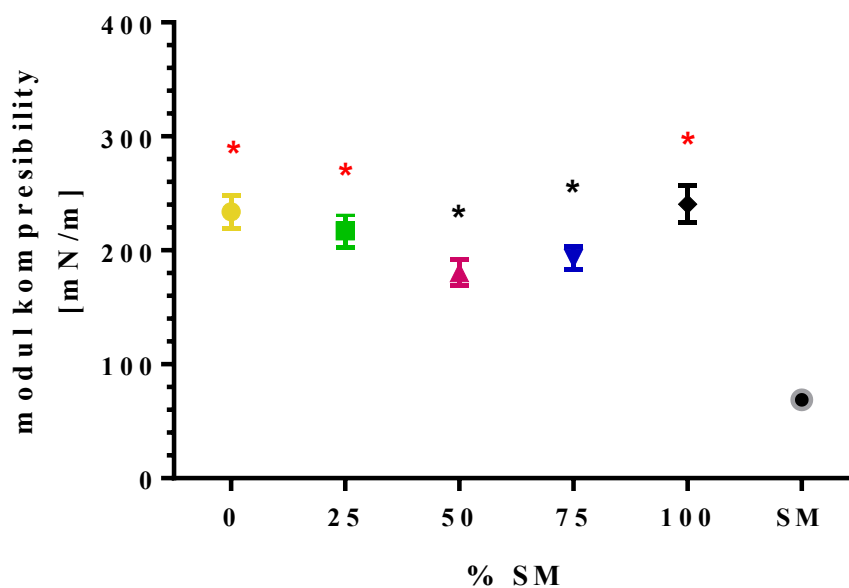
Obrázok 17. Zobrazenie hodnôt plochy jednej molekuly pri 20 mN/m; * štatisticky významný rozdiel voči hodnote plochy jednej molekuly SM prekursoru, $P < 0,05$, ak je znak zvýraznený na červeno, $P < 0,0001$.

SM má najväčšiu plochu $A_{20} = 35,0 \text{ \AA}^2$, z čoho plynie predpoklad, že najmenšiu by sme mali hľadať u vzorky bez prekursoru $A_{20} (0\% \text{ SM}) = 27,85 \text{ \AA}^2$. Pozoruhodné je, že tomu nie je celkom tak a najmenšiu má vzorka, kde je Cer úplne nahradený SM $A_{20} (100\% \text{ SM}) = 27,54 \text{ \AA}^2$. Hodnoty plôch molekúl sa môžu líšiť v závislosti na dĺžke reťazca, konformácii či stupni nasýtenia.⁴⁹ Pri súčasnej prítomnosti Cer aj SM sú medzi hodnotami len malé rozdiely $A_{20} (25\% \text{ SM}) = 30,0 \text{ \AA}^2$, $A_{20} (50\% \text{ SM}) = 29,0 \text{ \AA}^2$, $A_{20} (75\% \text{ SM}) = 29,5 \text{ \AA}^2$.

Trend priebehu hodnôt $A_{1,5}$ a A_{20} je veľmi podobný. V práci, ktorá bola zameraná analogickým smerom, avšak Cer bol postupne nahradzovaný druhým prekursorom, glukozylovaným ceramidom⁵⁶, bol trend tiež podobný, no napriek očakávaniám nebola plocha jednej molekuly $A_{1,5}$ ceramidovej vzorky (totožnej s našou) najnižšia. Rovnako ako v našom prípade to bola vzorka s úplnou náhradou Cer prekursorom.

5.2. Modul kompresibility

Modul kompresibility (β) je prevrátenou hodnotou kompresibility (C_s) a vypočítame ho deriváciou Π -A izotermy podľa rovnice $C_s^{-1} = -A \frac{\delta \Pi}{\delta A}$.^{38, 57} Udáva mieru slačiteľnosti monovrstvy. Čím je hodnota modulu kompresibility vyššia, tým sú lipidy v monovrstve v tesnejšej blízkosti, čo odpovedá vyššej rigidite. Nižšie hodnoty modulu kompresibility vypovedajú o elastickejšej monovrstve.⁵⁸



Obrázok 18. Modul kompresibility pre jednotlivé lipidové vzorky; * štatisticky významný rozdiel voči hodnote modulu kompresibility SM prekursoru, $P < 0,05$, ak je znak zvýraznený na červeno, $P < 0,0001$.

Na obrázku 18 môžeme vidieť, že najvyššiu hodnotu modulu kompresibility má vzorka úplne nahradená prekursorom β (100% SM) = 240,4 mN/m, takže lipidy sú usporiadané najtesnejšie a treba vyvinúť najvyšší tlak pre jej stlačenie. Podobne je na tom ceramidová vzorka β (0% SM) = 233,7 mN/m, zatiaľ čo zmesi Cer/SM sú o čosi elastickejšie β (25% SM) = 217,1 mN/m, β (75% SM) = 193,0 mN/m. Vzorka s Cer a SM v pomere 1:1 má zo všetkých lipidových zmesí najnižšiu hodnotu modulu kompresibility β (50% SM) = 180,4 mN/m, tiež sa líši v priebehu izotermy

a vyzerá to tak, že Cer a SM navzájom súperia a táto rivalita je podstatou najmenej ochoty sa usporiadať. Najelastickejšia je monovrstva samotného SM ($\beta = 68,9 \text{ mN/m}$).

Elasticita monovrstvy závisí na usporiadaní lipidov a nemôžeme tiež zanedbať špecifické interakcie medzi molekulami. Nasýtené lipidy ako SM tvoria väčšmi usporiadané fázy než nenasýtené.⁵⁹ Pri zmesi s Chol sa výrazne zlepšuje usporiadanie lipidových reťazcov.⁵⁹ Ceramidové monovrstvy majú v porovnaní s fosfolipidovými monovrstvami nízku kompresibilitu.³⁸

Za zaujímavú môžeme považovať skutočnosť, že napriek predpokladu, že najvyšší modul bude mať vzorka bez prekursoru a s postupným prídavkom SM bude klesať, opäť sa 100% vzorka v hodnotách približuje tej bez obsahu prekursoru (0%). Rovnako sa správala lipidová zmes pri skúmaní druhého prekursoru – glukozylovaného ceramidu.⁵⁶

Z toho vyplýva, že ak zmes obsahuje buď samotný prekursor alebo Cer, je rigidnejšia, než keď sú v zmesi prítomné obidva. Za zmienku určite stojí aj fakt, že cukornaté prekursory Cer majú v porovnaní so SM s rovnakou dĺžkou reťazca omnoho vyššiu hodnotu modulu kompresibilitiy.⁶⁰

5.3. BAM

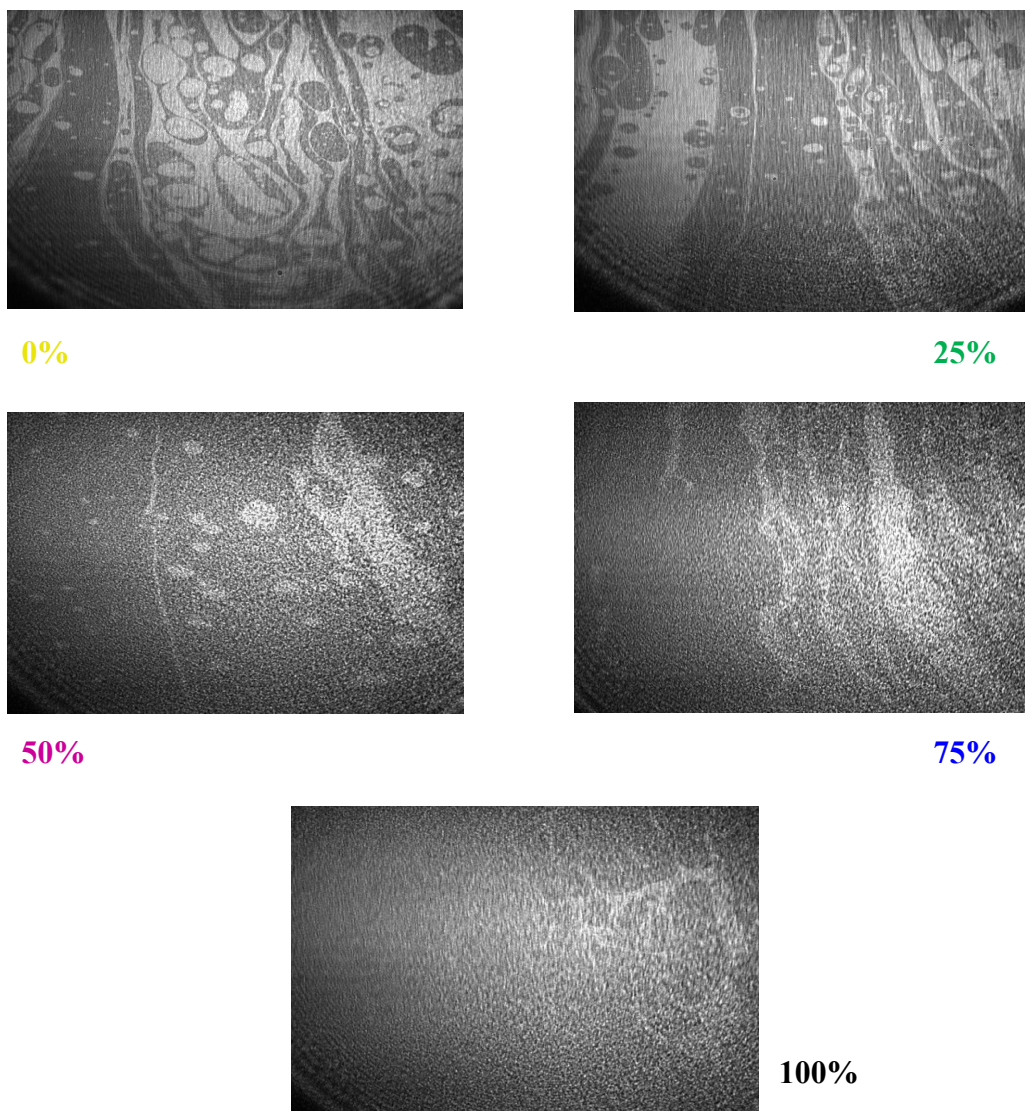
Spojenie tradičnej Langmuirovej metodológie s modernou fyzikálno-chemickou technikou Brewsterovej uhlovej mikroskopie prekvapivo neprinieslo výsledky, aké by sme očakávali. BAM bola pre nás skôr doplnkovou metódou, a hoci je veľmi presná a citlivá, jej nevýhoda spočíva v tom, že nemôžeme zaručiť, že sa senzor bude nachádzať práve na tom mieste, kde je monovrstva dobre viditeľná. Pre túto metodológiu sme použili väčšiu vaničku, väčší objem lipidovej zmesi a tiež nižšiu rýchlosť, ktorou sa bariéry k sebe približovali, aby sme mohli sledovať zmeny prebiehajúce na povrchu kvapalnej subfázy.

Na obrázku 19 môžeme vidieť, že pri nižších povrchových tlakoch (<1 mN/m) vo vzorke bez prekursoru (0%) sú lipidové domény (svetlejšie oblasti) rozptýlené. Tvoria veľké kruhové domény a v tomto zložení sa usporadúvajú celkom ochotne. Pri tlaku 0 mN/m je usporiadanie samovoľné, pretože na monovrstvu nepôsobí zvýšený tlak. Domény sa usporadúvajú nepravidelne v závislosti na podmienkach šírenia.⁴⁴ V zobrazení vzoriek s 25%, 50% a 75% SM môžeme pozorovať ešte pozvoľnejšie rozloženie lipidových domén z dôvodu nedostatočnej kompresie, pri kompletnom nahradení Cer prekursorom takmer nebadateľné. S pribúdajúcim obsahom SM vo vzorkách sa domény zmenšujú, sú horšie viditeľné a rozptýlenejšie. Tento úkaz je zrejme spôsobený nižšou lipofilitou vzoriek obsahujúcich prekursor.

Rozplývanie lipidových domén by sme mohli pre lepšiu predstavu demonštrovať na príklade mäsového vývaru, veď takýmto spôsobom študovala medzipovrchové javy už slečna Pocklesová. Ak je prítomné väčšie množstvo lipidov, domény sú väčšie, no pri nižšom počte sa rozptyľujú a vytvárajú mnoho malých kruhovitých útvarov.

Množstvo a veľkosť domén by sa mala s rastúcou kompresiou zvyšovať. Dochádza k hustejšiemu usporiadaniu lipidov a medzery medzi nimi by sa mali postupne vyplňať. Štruktúra domén sa však môže líšiť, aj pri podobných izotermách môže byť morfológia odlišná⁴⁴, čo som mala možnosť pozorovať aj vo svojich

výsledkoch. Keď sú monovrstvy usporiadané, molekuly na seba navzájom pôsobia repulzívnou silou, a tým si zachovávajú linearitu. Pri usporiadaní však nezáleží len na štruktúre a amfifilite molekuly, ale tiež na povrchovom tlaku a teplote.⁴⁴

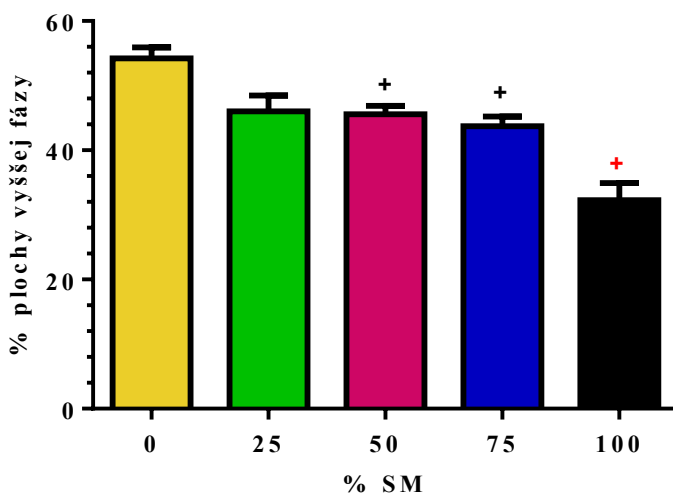


Obrázok 19. Monovrstvy zobrazené Brewsterovým uhlovým mikroskopom pri kompresii <1 mN/m.

S prihliadnutím na výskum druhého prekursoru – glukozylovaného ceramidu, v ktorom dochádzalo pri zvýšenej kompresii k preklopeniu lipidov do dvojvrstvy⁵⁶, tento jav u SM pozorovaný nebol. Bez SM sa lipidy usporadúvajú relatívne ochotne, avšak s rastúcim obsahom SM sa z dôvodu nižšej lipofility filmu domény začínajú zužovať a rozptyľovať do strán. Svoju úlohu tiež môže zohrávať asymetria molekuly a rovnako relatívne veľká variabilita reťazcov prítomných v mliečnom SM (C 16 – 24).

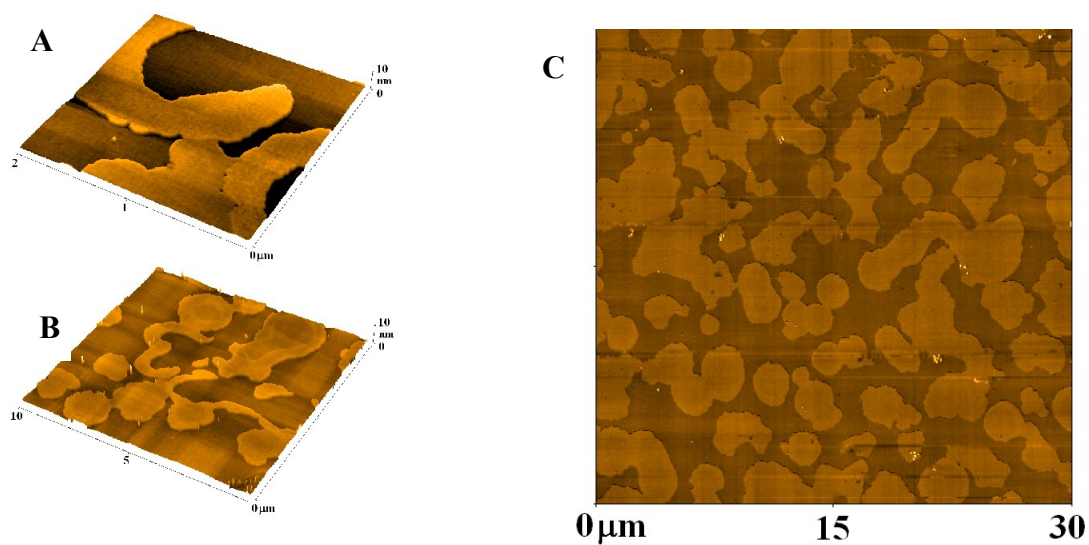
5.4. AFM

Pomocou AFM môžeme sledovať v 2 a 3D vyobrazení, aký vplyv má množstvo SM prekursoru na usporiadanie monovrstevných lipidových domén na pevnom podklade. Za tzv. vyššiu fázu považujeme zmes VMK a Cer, ktorá je usporiadaná veľmi dobre, t.j. kompaktné.⁵³ Najvyššie percento plochy vyššej fázy (54 %) má teda vzorka bez SM prekursoru, najnižšie je pri úplnom nahradení Cer SM (32 %). Ostatné sa pohybujú od 44 % do 46 % (viď obrázok 20). Pokles hodnoty vyššej fázy by sa dal vysvetliť rozdielom v polarite lipidovej zmesi, respektíve v rozdielnych vlastnostiach polárnych hláv Cer a SM. Prenášanie lipidovej monovrstvy prebieha pri povrchovom tlaku 20 mN/m, takže približne v polovičnej hodnote v porovnaní s hodnotením izoterm. Pri tejto strednej hodnote nie je monovrstva na kvapalnej fáze úplne stlačená a jej usporiadanie na hydrofílnom sľudovom sklíčku je okrem interakcií lipidových zložiek ovplyvnené interakciami polárnych hláv s povrchom pevného podkladu. Rozdiely vo veľkosti plôch vyššej fázy u vzoriek s 50%, 75% a 100% SM sú v porovnaní so vzorkou bez prekursoru štatisticky významné.

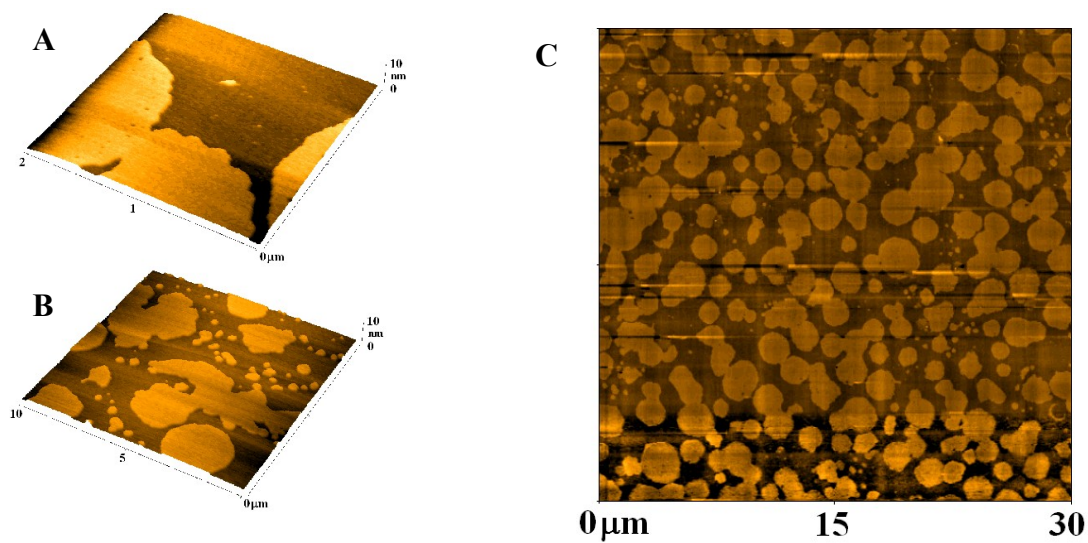


Obrázok 20. Percentá plochy vyššej fázy pre jednotlivé zastúpenie SM; + štatisticky významný rozdiel voči hodnote % plochy vyššej fázy ceramidového vzorku (0%), $P < 0,05$, ak je znak zvýraznený na červeno, $P < 0,0001$.

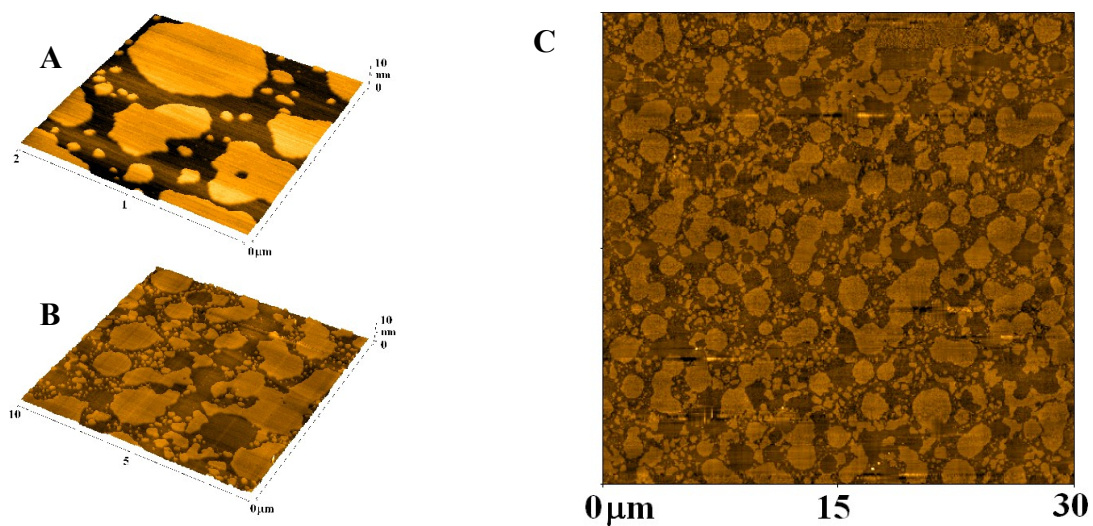
S pridávaním SM do vzoriek dochádza k rozptyľovaniu domén, je ich viac a zaberajú menšiu plochu vyššej fáze (na obrázkoch 21 – 25 svetlejšie oblasti). Na nasledujúcich obrázkoch je pre každé percentuálne zastúpenie SM zobrazené usporiadanie monovrstvy na pevnom podklade v 3D vyobrazení v rozlíšení $2 \times 2 \mu\text{m}$ (panel A) a $10 \times 10 \mu\text{m}$ (panel B). Na paneli C sú v 2D vyobrazené monovrstvy v rozlíšení $30 \times 30 \mu\text{m}$.



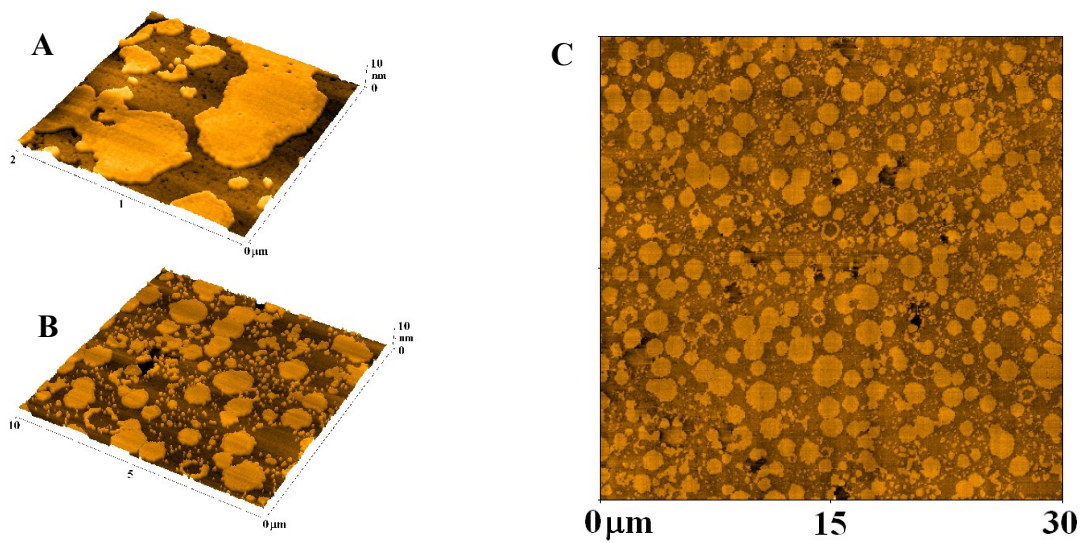
Obrázok 21. Zobrazenie monovrstiev pomocou AFM v rozlíšení $2 \times 2 \mu\text{m}$ (panel A), $10 \times 10 \mu\text{m}$ (panel B) a $30 \times 30 \mu\text{m}$ (panel C) vzorky bez obsahu SM.



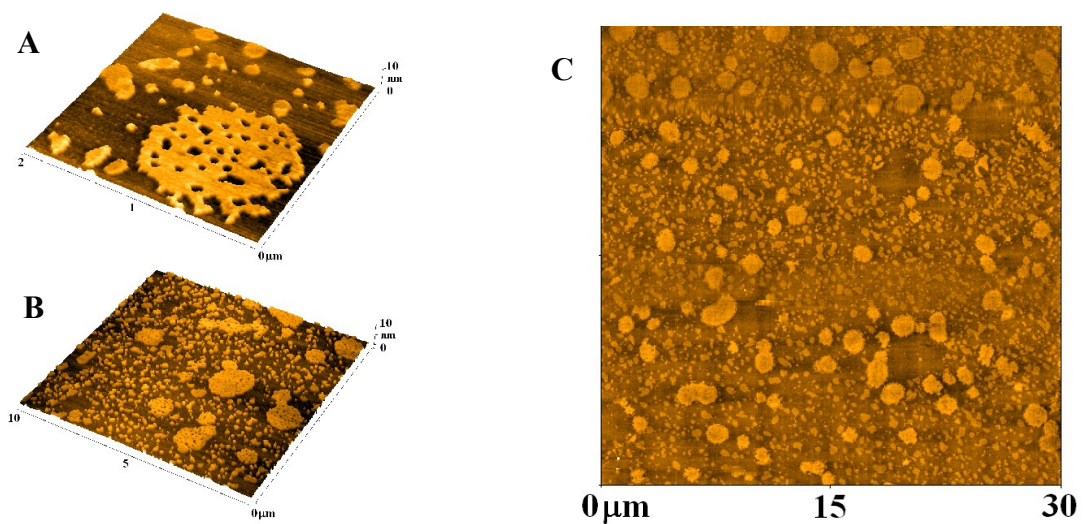
Obrázok 22. Zobrazenie monovrstiev pomocou AFM v rozlíšení 2x2μm (panel A), 10x10μm (panel B) a 30x30μm (panel C) vzorky s 25% zastúpením SM.



Obrázok 23. Zobrazenie monovrstiev pomocou AFM v rozlíšení 2x2μm (panel A), 10x10μm (panel B) a 30x30μm (panel C) vzorky s 50% zastúpením SM.



Obrázok 24. Zobrazenie monovrstiev pomocou AFM v rozlíšení 2x2μm (panel A), 10x10μm (panel B) a 30x30μm (panel C) vzorky s 75% zastúpením SM.



Obrázok 25. Zobrazenie monovrstiev pomocou AFM v rozlíšení 2x2μm (panel A), 10x10μm (panel B) a 30x30μm (panel C) vzorky so 100% zastúpením SM.

Na obrázku 21 môžeme vidieť, že vzorka bez prekursoru je charakterizovaná súvislejšími doménami, ktoré zaujímajú relatívne veľkú plochu. Značí to ich dobrú schopnosť tvoriť kompaktné lipidové domény. Je zreteľné, že postupným pridávaním SM na úkor Cer sa lipidové domény rozptyľujú a tvoria menšie kruhové útvary na úkor tých stabilnejších. Mohlo by to znamenať, že SM monovrstvu rozrušuje, pretože aj keby dochádzalo k interakciám medzi VMK a Chol, ich zastúpenie bolo vo všetkých vzorkách rovnaké, a tým pádom by nemalo mať vplyv na zhlukovanie domén. Na druhej strane, Chol má veľkú afinitu k SM a táto asociácia by mohla byť podstatou zmeny usporiadania v monovrstve.⁵⁷

SM obsahuje skupiny, ktoré sú donormi aj akceptormi vodíkových väzieb, a teda prispievajú k inter- aj intramolekulárnym interakciám. Prítomnosť NH skupiny na C2 SM je esenciálna pre interakciu s Chol. Hydroxyskupina na C3 tvorí hlavne intramolekulárne väzby s fosfátovými kyslíkmi, zatiaľ čo NH-skupina sa môže správať aj ako donor vo vodíkových väzbách medzi molekulami SM. Chol a SM sa tešia veľmi špeciálnemu vzťahu a silné interakcie medzi nimi sú vystupňované vďaka van der Waalsovým silám.⁶¹⁻⁶³

Vo všeobecnosti platí, že vodíkové väzby sú dôležité pre stabilizáciu molekulových interakcií v biologických membránach.⁶² Hoci sú vodíkové väzby takmer vždy slabé, SM ich tvorí v značnej miere. Pri asociácii SM s Cer nemôžeme zabúdať, že hoci majú podobné funkčné skupiny (okrem fosfátových kyslíkov), neznamena to, že aj vodíkové väzby budú rovnaké. Veľká fosfocholínová hlava SM sa správa ako medzerník tak, že zabraňuje možným hydrofóbnym interakciám u Cer. Cer aj Chol majú malé polárne hlavy a sú to veľmi hydrofóbnymi molekulami.⁶²⁻⁶³

6. Záver

Táto práca sa zaoberala prípravou a hodnotením monovrstevných lipidových modelov SC simulujúcich poruchu funkcie SMázy u kožných ochorení na rozhraní vzduch-kvapalina a na pevnom povrchu. Je potrebné si uvedomiť, že sme použili zjednodušený model SC, ktorý neobsahoval všetky komponenty, no napriek tomu môže byť nápomocným nástrojom pre ďalšie skúmanie SM.

Lipidové monovrstvy sa na fázovom rozhraní vzduch-kvapalina usporadúvajú relatívne tesne. Zmesi Cer a SM sú elastickejšie, k ich kompresii stačí vyvinúť menší tlak, zatiaľ čo lipidové zmesi so samotným Cer alebo SM sú rigidnejšie. Keďže je SM oproti Cer vďaka fosfocholínovej hlave polárnejší, vplyva na usporiadanie lipidových domén po prenesení na pevný podklad tým, že ich rozvoľňuje.

Rozvoľňovaním stabilných lipidových domén po náhrade Cer SM by sa mohlo vysvetliť znižovanie bariérovej schopnosti kože a jej väčšiu priepustnosť. Zrejme sa touto náhradou mení lamelárne usporiadanie intercelulárneho priestoru, ktoré potom nemôže dostatočne plniť svoju funkciu. Môžeme predpokladať, že SM netvorí lamely v dostatočnej miere, a tým destabilizuje domény a značne prispieva k ich segregácii. Táto skutočnosť, ako aj všetky ostatné výsledky uvedené v predchádzajúcom texte nám napovedajú, že správanie SM v našich meraniach potvrdzuje dôležitosť konverzie SM na Cer.

Táto práca je súčasťou rozsiahlejšej štúdie prebiehajúcej na Katedre anorganickej a organickej chémie v rámci výskumnej skupiny *Skin Barrier Research Group*. Hoci sa jedná o základný fyzikálno-chemický výskum, získané poznatky by mohli byť využité v nastávajúcom bádání ochorení kožnej bariéry. Jednou z prvých možností rozšírenia by určite stálo za vyskúšanie sledovať správanie lipidových monovrstiev pri percentuálnom zastúpení SM viac odpovedajúcom patologickým stavom pri kožných ochoreniach, t.j. s 1 – 10% zastúpením prekursoru. Rovnako podnetné by v budúcnosti bolo sledovať vplyv pridania enzýmu SMáza a simulovať tak fyziologickú premenu prekursoru na ceramid na monovrstevnom lipidovom modele.

7. Literatúra

1. Javorka, K., *Lekárska fyziológia*. Vydavateľstvo Osveta: Martin, 2001; p 591-596.
2. Vokurka, M.; Hugo, J., *Velký lékařský slovník*. 6. ed.; Maxdorf: Praha, 2006; pp 146, 245, 269, 308, 495, 634, 874.
3. Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponec, M., Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42* (1), 1-36.
4. Skin cancer treatment. Cancer.gov (online). Dostupné z: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/skin-treatment-pdq>. (cit. 3.1.2017).
5. Čihák, R., *Anatomie* 3. 1. ed.; Grada: Praha, 1997; p 559-564.
6. Hrabálek, A.; Vávrová, K., Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství* **2005**, *1*, 8-11.
7. Vávrová, K.; Hrabálek, A., Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství* **2006**, *2*, 55-58.
8. Flach, C. R.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J., Biophysical studies of model stratum corneum lipid monolayers by infrared reflection-absorption spectroscopy and Brewster angle microscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (9), 2159-2165.
9. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 295-313.
10. Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; Dobner, B.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H. H., Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. *Skin Pharmacology and Physiology* **2015**, *28* (1), 42-55.
11. Lee, S. H.; Jeong, S. K.; Ahn, S. K., An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Medical Journal* **2006**, *47* (3), 293-306.

12. Cha, H. J.; He, C. F.; Zhao, H.; Dong, Y. M.; An, I. S.; An, S., Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **2016**, *38* (1), 16-22.
13. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Letters* **2006**, *580* (23), 5456-5466.
14. Feingold, K. R.; Elias, P. M., Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 280-294.
15. Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M., The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology* **2008**, *17* (12), 1063-1072.
16. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 422-434.
17. Choi, M. J.; Maibach, H. I., Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *American Journal of Clinical Dermatology* **2005**, *6* (4), 215-223.
18. Canals, D.; Perry, D. M.; Jenkins, R. W.; Hannun, Y. A., Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *British Journal of Pharmacology* **2011**, *163* (4), 694-712.
19. Uchida, Y., Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 453-462.
20. Wertz, P. W.; van den Bergh, B., The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, *91* (2), 85-96.
21. Hannun, Y. A., The Sphingomyelin Cycle and the Second Messenger Function of Ceramide. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (5), 3125-3128.
22. Uchida, Y.; Hara, M.; Nishio, H.; Sidransky, E.; Inoue, S.; Otsuka, F.; Suzuki, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Hamanaka, S., Epidermal

- sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *Journal of Lipid Research* **2000**, *41* (12), 2071-2082.
23. Breiden, B.; Sandhoff, K., The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 441-452.
 24. Bouwstra, J. A.; Ponc, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 2080-2095.
 25. Itaya, Y.; Tokudome, Y., Upregulation of gene expression levels of ceramide metabolic enzymes after application of sphingomyelin-based liposomes to a three-dimensional cultured human epidermis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2016**, *473* (1), 114-117.
 26. Schmuth, M.; Man, M. Q.; Weber, F.; Gao, W. N.; Feingold, K. R.; Fritsch, P.; Elias, P. M.; Holleran, W. M., Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: Sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology* **2000**, *115* (3), 459-466.
 27. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1993**, *1182* (2), 147-151.
 28. Kornhuber, J.; Rhein, C.; Muller, C. P.; Muhle, C., Secretory sphingomyelinase in health and disease. *Biological Chemistry* **2015**, *396* (6-7), 707-736.
 29. Pullmannova, P.; Stankova, K.; Pospisilova, M.; Skolova, B.; Zbytovska, J.; Vavrova, K., Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2014**, *1838* (8), 2115-2126.
 30. Ramstedt, B.; Leppimaki, P.; Axberg, M.; Slotte, J. P., Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *266* (3), 997-1002.
 31. Mizutani, Y.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Kihara, A.; Igarashi, Y., Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* **2009**, *91* (6), 784-790.

32. Schuchman, E. H., Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: Lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Letters* **2010**, *584* (9), 1895-1900.
33. Niemann-Pick Disease, A Rare Cause of Hepatomegaly and Failure to Thrive in Infancy. Nature.com (online). Dostupné z: http://www.nature.com/ajg/journal/v104/n3s/full/ajg2009492_11a.html. (cit. 21.4.2017).
34. Cruz, A.; Pérez-Gil, J., Langmuir Films to Determine Lateral Surface Pressure on Lipid Segregation. V *Methods in Membrane Lipids*, 1. ed.; Dopico, A. M., Ed. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2010; pp 439-457.
35. Barnes, G.; Gentle, I., Insoluble monolayers and Langmuir-Blodgett films. V *Interfacial Science: An Introduction.*, 2. ed.; Oxford University Press: New York, 2011; pp 107-149.
36. Langmuir, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Technologies. Biolinscientific.com (online). Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvlima/technologies/>. (cit. 31.1.2017).
37. Norlen, L.; Gil, I. P.; Simonsen, A.; Descouts, P., Human stratum corneum lipid organization as observed by atomic force microscopy on Langmuir-Blodgett films. *Journal of Structural Biology* **2007**, *158* (3), 386-400.
38. Catapano, E. R.; Arriaga, L. R.; Espinosa, G.; Monroy, F.; Langevin, D.; Lopez-Montero, I., Solid Character of Membrane Ceramides: A Surface Rheology Study of Their Mixtures with Sphingomyelin. *Biophysical Journal* **2011**, *101* (11), 2721-2730.
39. Langmuir Troughs & Langmuir-Blodgett troughs. Biolinscientific.com (online). Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/product/langmuir-troughs-langmuir-blodgett-troughs/>. (cit. 2.5.2017).
40. Školová, B. Syntéza a studium analogů ceramidů. Disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2015.
41. Meunier, J., Why a Brewster angle microscope? *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *171* (1-3), 33-40.
42. Atomic force microscope. Physics.mff.cuni.cz (online). Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/method/afm>. (cit 2.2.2017).

43. Yalamanchili, M. R.; Veeramasuneni, S.; Azevedo, M. A. D.; Miller, J. D., Use of atomic force microscopy in particle science and technology research. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *133* (1-2), 77-88.
44. Vollhardt, D., Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19* (3), 183-197.
45. Brewster Angle Microscopy. Biolinscientific.com (online). Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/technology/brewster-angle-microscopy/>. (cit. 31.1.2017).
46. Groen, D.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., Model Membranes Prepared with Ceramide EOS, Cholesterol and Free Fatty Acids Form a Unique Lamellar Phase. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4168-4175.
47. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E. R.; Ponec, M., Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *Journal of Lipid Research* **2001**, *42* (11), 1759-1770.
48. KSV NIMA MicroBAM. Biolinscientific.com (online). Dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/products/?card=KP6>. (cit. 12.4.2017).
49. Petelska, A. D.; Naumowicz, M.; Figaszewski, Z. A., Influence of pH on Sphingomyelin Monolayer at Air/Aqueous Solution Interface. *Langmuir* **2012**, *28* (37), 13331-13335.
50. Petelska, A. D.; Figaszewski, Z. A., The Equilibria of Sphingolipid-Cholesterol and Sphingolipid-Sphingolipid in Monolayers at the Air-Water Interface. *Journal of Membrane Biology* **2013**, *246* (1), 13-19.
51. Slotte, J. P., Molecular properties of various structurally defined sphingomyelins - Correlation of structure with function. *Progress in Lipid Research* **2013**, *52* (2), 206-219.
52. Slotte, J. P., Biological functions of sphingomyelins. *Progress in Lipid Research* **2013**, *52* (4), 424-437.

53. Skolova, B.; Janusova, B.; Zbytovska, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepicka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K., Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, *29* (50), 15624-15633.
54. Sparr, E.; Eriksson, L.; Bouwstra, J. A.; Ekelund, K., AFM study of lipid monolayers: III. Phase behavior of ceramides, cholesterol and fatty acids. *Langmuir* **2001**, *17* (1), 164-172.
55. tenGrotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M.; Boer, D. R.; vanMiltenburg, J. C.; Bouwstra, J. A., Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophysical Journal* **1996**, *71* (3), 1389-1399.
56. Nováčková, A. Studium poruch kožní bariéry pomocí lipidových monovrstev. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2016.
57. Wydro, P., Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers - analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2012**, *93*, 174-179.
58. Patterson, M.; Vogel, H. J.; Prenner, E. J., Biophysical characterization of monofilm model systems composed of selected tear film phospholipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2016**, *1858* (2), 403-414.
59. Khattari, Z.; Langer, U.; Aliaskarisohi, S.; Ray, A.; Fischer, T. M., Effects of soluble surfactants on the Langmuir monolayers compressibility: A comparative study using interfacial isotherms and fluorescence microscopy. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2011**, *31* (8), 1711-1715.
60. Li, X. M.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E., Lactosylceramide: Effect of acyl chain structure on phase behavior and molecular packing. *Biophysical Journal* **2002**, *83* (3), 1535-1546.
61. Terova, B.; Heczko, R.; Slotte, J. P., On the importance of the phosphocholine methyl groups for sphingomyelin/cholesterol interactions in membranes: A study with ceramide phosphoethanolamine. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (4), 2661-2669.

62. Slotte, J. P., The importance of hydrogen bonding in sphingomyelin's membrane interactions with co-lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2016**, *1858* (2), 304-310.
63. Garcia-Arribas, A. B.; Alonso, A.; Goni, F. M., Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin. *Chemistry and Physics of Lipids* **2016**, *199*, 26-34.