

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

**STUDIUM VLIVU KONCENTRACE CHOLESTEROLU
NA MONOVrstevné modely**

Study of the effect of cholesterol concentration on monolayer models

Eliška Šrámová

Hradec Králové 2020

Vedoucí práce: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

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

V Hradci Králové

Eliška Šrámová

Květen 2020

Poděkování

Největší poděkování patří především konzultantce diplomové práce Mgr. Anně Nováčkové, která mi pomohla s prací po odborné stránce a poskytla mi cenné rady. Ráda bych také poděkovala vedoucímu práce Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D. za jeho rady, vstřícnost a ochotu.

Poděkování patří i prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a dalším členům Skin Barrier Research Group. Děkuji i doc. Ing. Petru Slepíčkovi, Ph.D. z VŠCHT v Praze za měření na AFM. Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (SVV 260 547) a Grantové agentuře České republiky (GAČR 1909600-S). V neposlední řadě děkuji za jazykovou korekturu Mgr. Stanislavě Rygálové. Děkuji také své rodině.

Obsah

1.	Seznam zkratk.....	8
2.	Úvod a cíle práce.....	9
3.	Teoretická část.....	10
3.1	Stavba lidské kůže a její funkce	10
3.2	Rohová vrstva – <i>Stratum corneum</i>	12
3.2.1	Lipidová matrix SC-význam, metabolismus a uspořádání lipidů.....	13
3.3	Onemocnění kožní bariéry s abnormalitami v koncentraci cholesterolu.....	20
3.3.1	Ichtyózy	20
3.3.2	CHILD Syndrom.....	21
3.3.3	Conradi-Hünemannův-Happlův syndrom	21
3.3.4	Atopická dermatitida.....	22
3.4	Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina	23
3.4.1	Langmuirovy izotermy	24
3.4.2	Brewsterův úhlový mikroskop.....	26
3.5	Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladu.....	27
3.5.1	Mikroskopie atomárních sil	28
4.	Experimentální část	29
4.1	Chemikálie a rozpouštědla	29
4.2	Přístrojové vybavení	29
4.3	Příprava acetátového pufru	29
4.4	Příprava směsi volných mastných kyselin	30
4.5	Příprava lipidových vzorků	31
4.6	Příprava monovrstevných modelů na rozhraní vzduch-kapalina a na pevném podkladu	33
4.6.1	Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina.....	33
4.6.2	Příprava monovrstev za použití BAM.....	34

4.6.3	Langmuir-Blodgett technika	35
5.	Výsledky a diskuse	36
5.1	Izotermy	36
5.2	Modul kompresibility	40
5.3	AFM.....	43
5.4	Hodnocení lipidových monovrstev pomocí BAM	47
6.	Závěr	51
7.	Bibliografie	52

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autor: Eliška Šrámová

Školitel: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Anna Nováčková

Název diplomové práce: Studium vlivu koncentrace cholesterolu na monovrstevné modely

Kůže je tvořena třemi hlavními vrstvami: hypodermis, dermis a epidermis. Pro bariérovou funkci je nejdůležitější epidermis, konkrétně její nejsvrchnější část *stratum corneum* (SC). Struktura SC připomíná dobře postavenou zeď, kde funkci „cihel“ plní korneocyty a lipidová matrix funguje jako „malta“. Ceramidy, volné mastné kyseliny a cholesterol (Chol) jsou hlavními lipidy tvořící tuto matrix. Ve zdravém SC je poměr těchto lipidů ekvimolární a je klíčový pro správnou bariérovou funkci kůže a organizaci lipidů. Chol je významný pro správné uspořádání jednotlivých lipidů do lamel (lamelární) a zároveň pro jejich organizaci v lamelách (laterální) ve SC. Abnormality v poměru lipidů spojené s defekty v metabolismu Chol mohou vést k poškození kožní bariéry, což se projevuje jako kožní či systémová onemocnění (např. recesivně X-vázaná ichthyóza, Conradi-Hünemannův-Happlův syndrom a CHILD syndrom).

V této práci byl studován vliv deficiencie Chol na uspořádávání lipidů za využití monovrstevných modelů simulujících lipidovou matrix SC. Jako charakterizační metody byly použity Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina, Brewsterova úhlová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil (AFM). Pro naměřené izotermy všech lipidových vzorků je charakteristický pozvolný průběh (pomalý nárůst povrchového tlaku při snižování plochy jedné molekuly). Největší strmost vykazuje izoterma vzorku, kde bylo 80 % Chol své fyziologické koncentrace. Složení vzorků a rozdílná koncentrace Chol ve směsi ovlivnila organizaci lipidů. Konkrétně plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku 1,5 mN/m ($A_{1,5}$) se u jednotlivých vzorků významně lišila. Zároveň se potvrdilo, že s klesajícím množstvím Chol ve směsi se do jisté míry zvyšuje elasticita monovrstvy (až do směsi, kdy Chol dosáhne 40 % své fyziologické koncentrace). Pro nižší koncentrace byl pozorován opačný efekt. Podobný trend jako u elasticity monovrstev byl pozorován také pro velikost domén pomocí AFM, kdy nejmenší velikost lipidových domén byla pozorována u vzorku Chol 40 %.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Eliška Šrámová

Supervisor: Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph. D

Consultant: Mgr. Anna Nováčková

Title of Thesis: Study of the effect of cholesterol concentration on monolayer models

Skin is composed of 3 major layers: hypodermis, dermis, and epidermis. The uppermost layer, which is called *stratum corneum* (SC), has a unique structure resembling a well-built wall. Corneocytes represent bricks and the lipid matrix works like a mortar. Ceramides, free fatty acids, and cholesterol (Chol) are the main lipids creating the human SC matrix. In a healthy SC, the ratio of these lipids is equimolar. This ratio is crucial, not only to maintain the barrier function of the skin, but also for the organization of lipids in SC. Chol appears to be required for the correct lamellar organization, and the ordering of lipids inside of the lamellar formation (lateral organization) in SC. Abnormalities in the ratio of the lipids and depleted amount of Chol can lead to a disruption of the skin barrier function resulting in skin disease or multisystemic diseases (e.g. X-linked ichthyosis, Conradi-Hünemann-Happle syndrome, and CHILD syndrome.)

The present work deals with a Chol deficiency study on lipid organization on monolayer models simulating the lipid matrix. Langmuir monolayers at the gas-liquid interface, Brewster angle microscopy, and atomic force microscopy (AFM) were used as characterization techniques. The main characteristic of all recorded isotherms is their gradual shape (slow increase of surface pressure when mean molecular area is decreased). The steepest isotherm was observed for the sample where Chol was 80 % of its physiological concentration. The lipid organization was always depended on the composition of the samples. More specifically, the mean molecular area of single samples when surface pressure is 1.5 mN/m ($A_{1,5}$) was significantly different between each other. On the other hand, the A_{20} values showed only negligible variation. The elasticity of monolayers is increasing when the concentration of Chol is getting lower (until Chol is 40 % of its physiological concentration). For lower concentrations, an opposite dependence was noticed. A similar trend like elasticity was observed for the size of lipid domains by AFM where the smallest size was noticed at the 40 % Chol sample.

1. Seznam zkratek

A _{1,5}	plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku 1,5 mN/m
A ₂₀	plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku 20 mN/m
AD	atopická dermatitida
AFM	atomová silová mikroskopie
BAM	Brewsterův úhlový mikroskop
Cer	ceramidy
C _{max}	modul kompresibility
Chol	cholesterol
CholS	cholesteryl sulfát
LA	kyselina lignocerová
LPP	dlouhá lamelární fáze
Mma	plocha jedné molekuly
PA	kyselina palmitová
SC	<i>stratum corneum</i>
SP	povrchový tlak
SPP	krátká lamelární fáze
VMK	volné mastné kyseliny

2. Úvod a cíle práce

Kůže je nejrozsáhlejší orgán lidského těla. Mezi její nejpodstatnější funkce patří: termoregulace, bariérová funkce a sekrece endogenních látek. Bariérová funkce kůže je definována ve *stratum corneum* (SC), což je nejsvrchnější a nejtenčí vrstva kůže.

Struktura SC připomíná zeď, kde korneocyty plní funkci „cihel“ a funkce lipidové matrix se přirovnává k „maltě“. Pro správnou bariérovou funkci kůže je klíčové složení a uspořádání kožních lipidů v lipidové matrix. Mezi hlavní lipidy matrix SC se řadí: ceramidy, cholesterol (Chol) a volné mastné kyseliny. Ve fyziologickém SC jsou tyto lipidy zastoupeny v ekvimolárním poměru, který je klíčový pro správnou bariérovou funkci kůže. Dále je zde přítomno malé množství cholesteryl sulfátu (CholS), který je kromě organizace lipidů zapojen i do metabolických procesů (prekurzor Chol). Chol se ve SC nachází volný anebo vázaný. Volný Chol je důležitý pro správné uspořádání jednotlivých lipidů do lamel (lamelární uspořádání) a zároveň pro jejich organizaci v těchto lamelách (laterální uspořádání).

Narušení ekvimolárního poměru lipidů v matrix SC vede k porušení bariérových vlastností kůže, např. u recesivně X-vázané ichthyózy bylo zjištěno snížené množství Chol a zvýšené množství CholS ve SC. Tyto abnormality vedou k defektnímu uspořádání lipidů do lamel v matrix SC, což má za následek poškození bariérových funkcí kůže a manifestaci onemocnění.

Cílem práce bylo zjistit vliv deficiencie Chol na uspořádávání lipidů za využití monovrstevných modelů simulujících lipidovou matrix SC. Lipidové monovrstvy byly studovány pomocí Langmuirových izoterm a Brewsterovy úhlové mikroskopie na rozhraní vzduch-kapalina a na pevném podkladě pomocí mikroskopie atomárních sil.

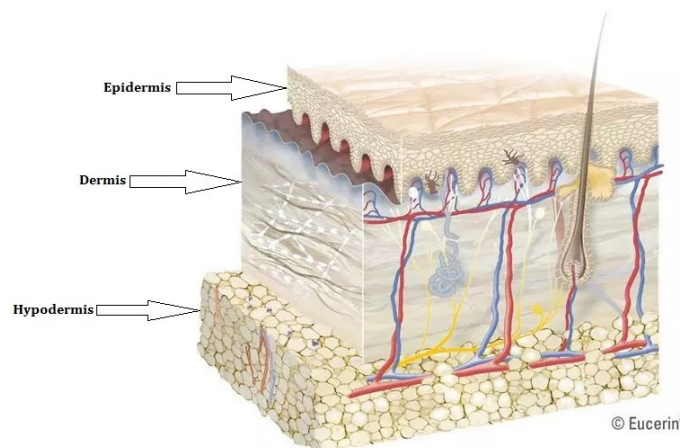
3. Teoretická část

3.1 Stavba lidské kůže a její funkce

Kůže (*cutis, derma*) je nejrozsáhlejší orgán lidského těla (1,6 – 1,8 m²). Hmotnost kůže je přibližně 3 kg a její průměrná tloušťka se pohybuje mezi 0,5 – 4 mm, nejtenčí kůže je na očních víčkách a nejtlustší je naopak na zádech. (1)

Kůže poskytuje ochrannou bariéru organismu vůči vnějším vlivům; fyzikálním, chemickým a mikrobiálním. Kůže má dále funkce termoregulační, tzn. řídí tělesnou teplotu odpařováním vody skrze potní žlázy z vnitřního do vnějšího prostředí. Kůže také plní funkci imunologickou; dochází zde ke tvorbě protilátek a vlivem slunečního světla je v kůži tvořen vitamin D z prekurzorů (ergosterol) uložených v kůži. Kůže je orgánem zajišťujícím exkreci díky přítomnosti potních, mazových a mléčných žláz (u žen) a plní také funkci depotní (ukládání tuku v podkožním vazivu). V kůži je přítomno mnoho nervových zakončení a cév a funguje jako percepční orgán pro dotyk, chlad, bolest a teplo. (1) (2) (3)

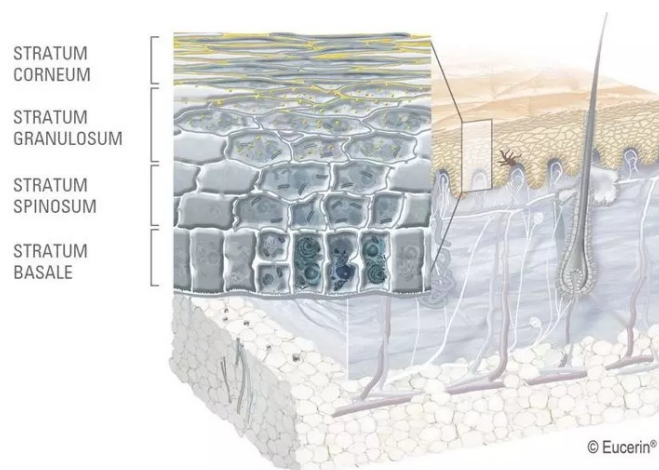
V kůži rozeznáváme 3 hlavní vrstvy (viz obrázek č. 1, převzato z *Eucerin.cz* (4)). Nejspodnější vrstva je bohatá zejména na vazivo (*tela subcutanea, hypodermis*), prostřední vrstva se nazývá škůra (*corium, dermis*) a na povrchu se nachází pokožka (*epidermis*). (2) (3) (4)



Obrázek č. 1 Schematické znázornění lidské kůže. Nejspodnější část, podkožní vazivo (*hypodermis*), je v kontaktu s vnitřními orgány. Nad vazivem se nachází škůra (*dermis*), která přechází v pokožku (*epidermis*).

Hypodermis je nejspodnější vrstva kůže, která je tvořena tukovými buňkami a podkožním vazivem. Podkožní tuk je důležitý pro tepelnou izolaci a slouží zároveň jako zásoba energie. Podkožní vazivo spojuje kůži se svalovou anebo kosterní tkání. (1) (2) (3) *Dermis* je 0,5-3 mm široká vazivová tkáň skládající se zejména z kolagenních a elastických vláken. V této části kůže lze nalézt receptory nervového zakončení, krevní a lymfatické cévy a jsou zde zakotveny potní a mazové žlázy a vlasové folikuly. (1) (2) (3) *Epidermis* je nejsvrchnější a zároveň nejtenčí vrstva kůže (0,06-0,8 mm). Pro tuto vrstvu jsou typické kožní buňky (keratinocyty), dále se zde vyskytují Langerhansovy buňky (imunitní funkce) a melanocyty (pigmentující kůži). *Epidermis* je tvořena vícevrstevným dlaždicovým epitelem, který na povrchu rohovatí. (1) (2) (3)

Epidermis se z histologického hlediska dělí na čtyři vrstvy (viz obrázek č. 2, převzato z *Eucerin.cz* (4)). Každá z vrstev je charakteristická určitým stadiem diferenciací keratinocytů (keratinizace). Vrstvy jsou seřazeny shora sestupně: *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, *stratum basale*. Ve *stratum basale* dochází k mitotickému dělení a vznikají zde keratinocyty, které se ve vyšších vrstvách diferencují (*stratum spinosum*), a získávají charakteristický zploštělý tvar. Keratinocyty se postupně přes *stratum granulosum*, dostávají do nejsvrchnější vrstvy (*stratum corneum*). V této vrstvě se vyskytují bezjaderné (odumřelé) keratinocyty, tzv. korneocyty. Na povrchu *epidermis* dochází k jejich deskvamaci neboli odlupování. Životní cyklus keratinocytů trvá 2-4 týdny. (3) (4)

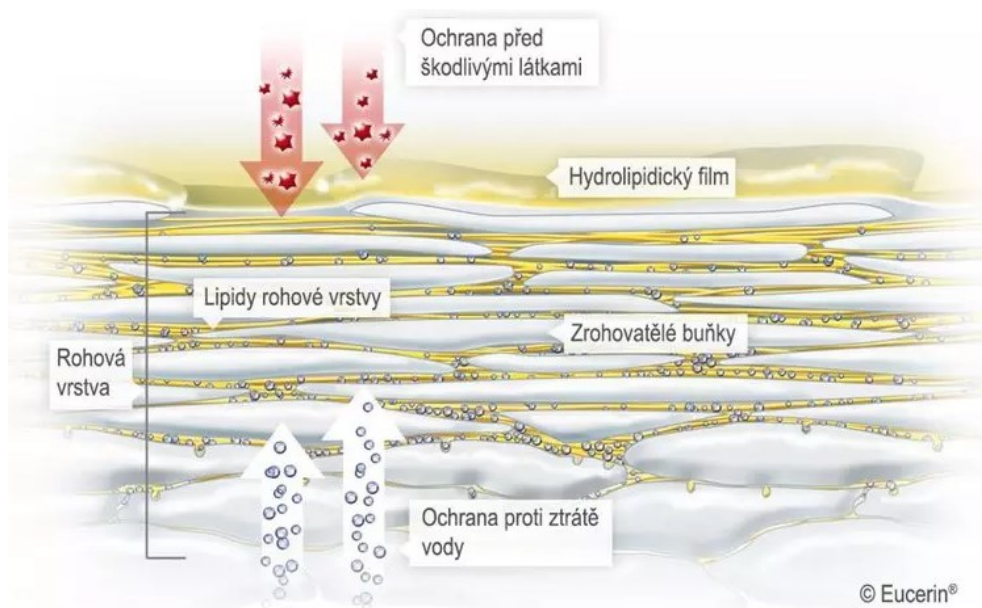


Obrázek č. 2 Zobrazení jednotlivých vrstev epidermis.

3.2 Rohová vrstva – *Stratum corneum*

Rohová vrstva neboli *stratum corneum* (SC) je nejsvrchnější vrstva kůže a je zodpovědná za její bariérovou funkci. Bariérová schopnost spočívá v zamezení nadměrných ztrát vody z kůže a eliminaci rizika průniku cizorodých částic do organismu (mikroorganismů, alergenů, chemických látek, mechanických částic atd.) (5) (6)

SC je velmi tenká část epidermis měřící 10-20 μm . Tato vrstva je tvořena 18-21 vrstvami buněk a intracelulární hmotou. Uspořádání vrstvených buněk a intracelulární hmoty ve SC připomíná „cihly a maltu“, kde korneocyty plní funkci cihel a lipidová matrix malty (viz obrázek č. 3, převzato z *Eucerin.cz* (4)). Lipidová matrix je tvořena směsí cholesterolu (Chol), volných mastných kyselin (VMK) a ceramidů (Cer). Zastoupení jednotlivých lipidů ve SC je ekvimolární a je velmi důležité pro správnou bariérovou funkci kůže; změna v zastoupení lipidů vede k dysfunkci bariérových vlastností kůže. (7) (8) (9)



Obrázek č. 3 Schematické znázornění *stratum corneum*, nejsvrchnější vrstvy lidské kůže. Funkce a uspořádání korneocytů a lipidové matrix ve SC je znázorňováno jako model „cihly a malty“.

3.2.1 Lipidová matrix SC-význam, metabolismus a uspořádání lipidů

V lipidové matrix SC se kromě ekvimolární směsi lipidů nachází různé typy sterolů, estery Chol (CholS), organické kyseliny, glukosylceramidy a malé množství vody. Na rozdíl od buněčných membrán nejsou ve SC přítomny fosfolipidy. (8) Lipidy se do SC dostávají pomocí sekrečních organel tzv. lamelárních tělísek. Během diferenciacie keratinocytů ve spodních vrstvách *epidermis (stratum spinosum)* dochází k formaci lamelárních tělísek, které obsahují látky lipidové povahy a prekurzory kožních lipidů (nejvyšší zastoupení má Chol, fosfolipidy a prekurzory Cer). Mimo to jsou zde uloženy enzymy, které zajišťují hydrolytický rozklad prekurzorů. Pomocí exocytózy dochází k uvolnění obsahu lamelárních tělísek do extracelulárního prostoru SC. K uvolnění obsahu lamelárních tělísek dochází na rozhraní *stratum granulosum* a SC. (7) (10) Výjimku tvoří CholS, jehož transport do SC není přesně znám. Pravděpodobně však (díky jeho vysoce amfifilnímu charakteru) dochází k jeho přestupu přes buněčné membrány pomocí jednoduché difúze anebo jsou využívány specifické transportéry. (11)

3.2.1.1 Cholesterol

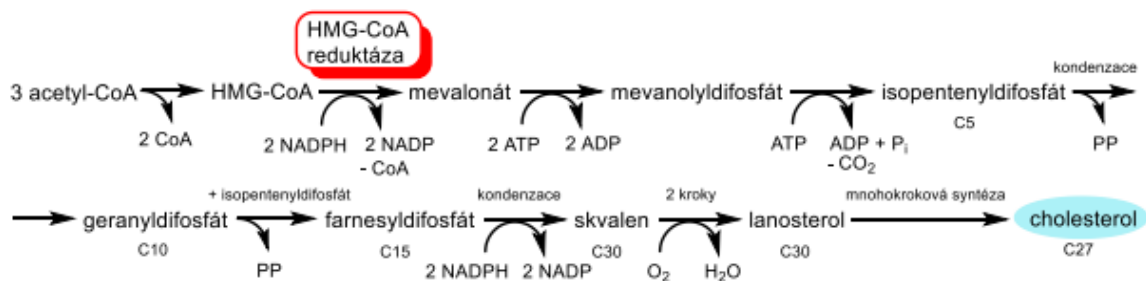
Chol je nejčastěji zastoupený sterol v lipidové matrix SC. Chol se ve SC nachází volný anebo vázaný ve formě organických anebo anorganických esterů. Volný Chol je velmi důležitý pro správné uspořádání jednotlivých lipidů do lamel (lamelární uspořádání) a zároveň pro jejich organizaci v těchto lamelách (laterální uspořádání). Díky Chol mohou být lipidy v lamelách v kapalně fázi a je tak zajištěna fluidita lipidových lamel a pružnost vrchních vrstev pokožky. Bylo zjištěno, že pouze polovina z fyziologického množství Chol ve SC může být inkorporována do lipidových lamel. Zbylé množství Chol vytváří samostatné domény. Příčina tvorby separovaných domén Chol nebyla doposud objasněna a stále je otázkou, zda je jejich přítomnost důležitá pro správnou bariérovou funkci kůže. (5) (12) (13)

Nejčastěji vyskytujícím se derivátem Chol ve SC je CholS, jehož funkce není doposud zcela objasněna, ale jeho přítomnost pravděpodobně poskytuje určitou míru soudržnosti korneocytů. Ve fyziologickém SC dosahuje množství CholS 5 % (w/w) z celkového obsahu kožních lipidů. Množství CholS se ve SC snižuje směrem k povrchu pokožky, dochází k rozvolňování sítě korneocytů a nastává deskvamace. CholS je také zapojen do diferenciací keratinocytů. (5) (11)

3.2.1.2 Syntéza cholesterolu

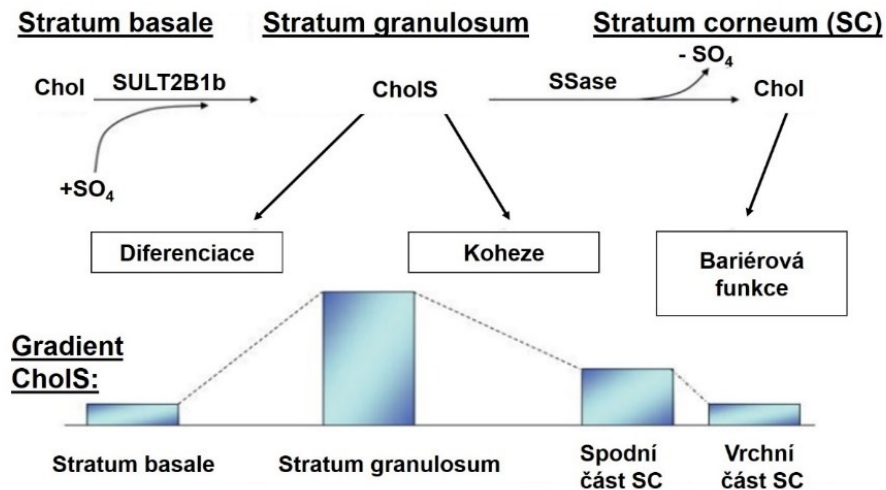
Chol je v *epidermis* syntetizován *de novo* v keratinocytech, kdy platí, že s diferenciací keratinocytů stoupá i množství Chol uvnitř buněk. Buňky ve *stratum basale* mohou zajistit i přijetí Chol ze systémové cirkulace pomocí LDL receptorů. Hladiny sérového Chol mají však zanedbatelný vliv na jeho množství v *epidermis*. (14)

Syntéza cholesterolu zahrnuje mnoho kroků (viz obrázek č. 4, převzato z: Sochorová M., *Disertační práce* (15)), tím klíčovým krokem je přeměna 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA) na mevalonát enzymem HMG-CoA reduktáza. Jeho zvýšená aktivita, a tím pádem vyšší syntéza Chol, byla pozorována u akutního a chronického poškození kožní bariéry. (14) (15) (16)



Obrázek č. 4 Syntéza cholesterolu. Klíčovým enzymem při syntéze Chol je HMG-CoA reduktáza, který řídí i rychlost celé syntézy.

V nižších vrstvách *epidermis* je určité množství Chol přeměňováno na CholS pomocí cholesterol sulfotransferázy (SULT2B1b). Ve vyšších vrstvách *epidermis* je pak CholS převeden zpět na Chol pomocí enzymu steroid sulfatázy (SSase). Aktivita tohoto enzymu se zvyšuje směrem ke svrchním vrstvám *epidermis*. Při dysfunkci tohoto koloběhu (viz obrázek č. 5, převzato a upraveno dle Elias et al. (11)) dochází k narušení deskvamace a narušení permeability kožní bariéry. (11) (17)



Obrázek č. 5 Schematické znázornění koloběhu Chol a CholS. v jednotlivých vrstvách epidermis. CholS má obecně vyšší zastoupení v nižších vrstvách a Chol ve vyšších vrstvách epidermis. Nejvyšší zastoupení má CholS ve stratum granulosum. Zkratka SULT2B1b označuje enzym cholesterol sulfotransferáza a zkratka SSase ve schématu zastupuje enzym steroid sulfatázu.

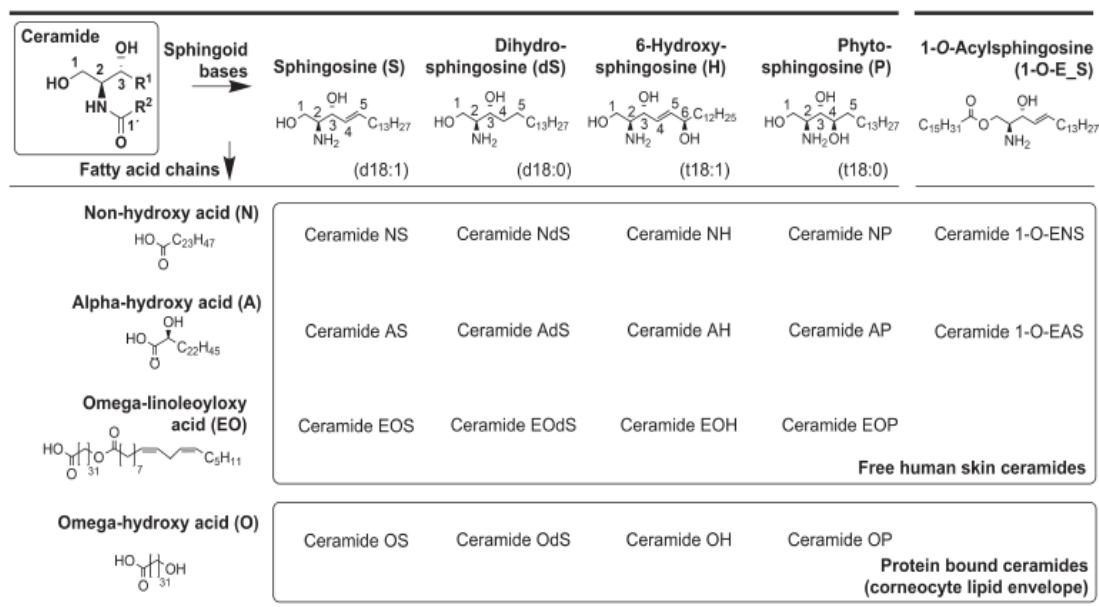
3.2.1.3 Ceramidy

Cer tvoří 50 % celkové hmotnosti lipidů ve SC a jsou klíčové pro správnou funkci kožní bariéry. Mimo to fungují jako signální molekuly buněčných membrán a podílejí se na řízení buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciací a apoptóza. Aby kvůli těmto funkcím nedošlo k poškození živých vrstev *epidermis*, jsou Cer skladovány ve SC ve formě polárních prekurzorů, které jsou přeměněny na Cer až ve vyšších vrstvách (na rozhraní *stratum granulosum* a SC). Cer pak vytváří s ostatními lipidy extracelulární lamely (viz dále kapitola Uspořádání lipidové matrix). (5) (18) (19)

Cer řadíme do skupiny sfingolipidů; základ jejich struktury je tvořen sfingoidní bází, a acylem mastné kyseliny navázaným přes amidovou vazbu. Ve struktuře Cer je obsažena malá polární hlava a dva lipofilní řetězce. Jeden hydrofobní řetězec je nerozvětvený 2-aminoalkohol, jehož délka řetězce je nejčastěji 18 uhlíků, a druhý je acyl mastné kyseliny (nejvíce zastoupeny jsou řetězce s 24-28 uhlíky). (5) (7)

V lidském SC bylo popsáno 15 typů Cer. Cer zastoupené ve SC se značně liší svojí strukturou a jejich heterogenita je definována zejména v polární části molekuly (různým stupněm hydroxylace, počtem dvojných vazeb a jejich umístěním). Kožní Cer mohou mít jako sfingoidní bázi nejčastěji: sfingosin (S), dyhydrodfingosin (dS), fytosfingosin (P) anebo 6-hydroxysfingosin (H). Ve SC jsou nejčastější Cer odvozené od sfingosinu (S). Acylová část Cer je většinou tvořena nerozvětvenou nasycenou mastnou kyselinou (nejčastěji je zastoupená kyselina lignocerová (24 C)), která může být nesubstituovaná (N) anebo je substituována hydroxylem v poloze α - (A) nebo ω - (O). Přes ω -hydroxylovou skupinu může být dále navázána esterovou vazbou kyselina linolová (EO) anebo může být přes tento hydroxyl navázán Cer na bílkoviny (involukrin) na povrchu korneocytů (viz dále, kapitola Uspořádání lipidové matrix). (5) (6) (19) (20)

V současné době se pro pojmenování Cer používá názvosloví dle S. Motty. (5) (20) Název Cer je tvořen kombinací písmen, kde první písmeno definuje acyl MK (N, A, EO) a druhé označuje sfingoidní bázi (S, dS, P, H a 1-O-E_S) (viz obrázek č. 6, převzato z Vávrová et al. (5)). (6) (20)



Obrázek č. 6 Názvosloví Cer a struktury sfingoidníchází a acylových částí.

3.2.1.4 Volné mastné kyseliny

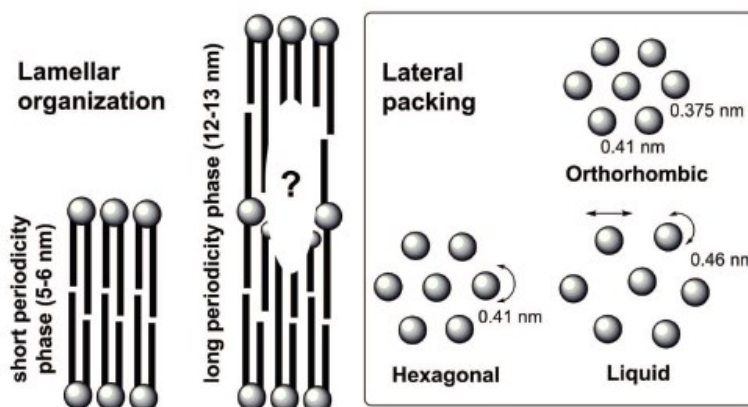
Ve SC jsou nejvíce zastoupeny nasycené VMK s nerozvětveným skeletem. Délka jejich řetězce se pohybuje od 14 do 34 uhlíků. Nejhojněji se ve zdravém SC vyskytují kyselina behenová (C22:0) a lignocerová (C24:0), jejichž obsah tvoří 50 % hmotnosti všech VMK ve SC. VMK se ve SC podílejí na tvorbě kyselého pH, které je důležité pro správnou funkci kožní bariéry. Jejich přítomnost ve SC je také důležitá pro tvorbu lamel, tedy správné uspořádání lipidů. (5) (21)

3.2.1.5 Uspořádání lipidové matrix

V případě organizace lipidů ve SC lze hovořit o lamelárním a laterálním uspořádání (viz obrázek č. 7, převzato z Vávrová et al. (5)). Lipidy jsou ve SC uspořádány do dvojrstev; polární část lipidů je orientována ven a nepolární část dovnitř. Tyto dvojrstvy jsou tvořeny multivrstevnými lamelami, které jsou kovalentně navázány přes ω -hydroxyskupiny Cer na proteinovou obálku korneocytů. (6) (7) (8)

Lipidy SC se uspořádávají do lamel o různých délkách. Rozlišujeme dlouhou lamelární fázi (angl. *long periodicity phase*; LPP, lamelární vzdálenost $\sim 13,1$ nm), krátkou lamelární fázi (angl. *short periodicity phase*; SPP; $\sim 6,4$ nm) a fázi separovaného Chol ($\sim 3,4$ nm). LPP je nezbytná pro bariérovou funkci SC. (5) (6) Pro správné uspořádání lipidů do lamel je důležitá přítomnost Chol. Bylo zjištěno, že LPP se formuje i v případě absence Chol, naopak SPP se tvoří pouze u lipidových směsí obsahujících alespoň 40 % Chol (z fyziologického množství Chol). Je také známo, že se snižujícím se množstvím Chol klesá délka SPP. (13)

Uspořádání lipidů v rámci jedné lamely se nazývá laterální uspořádání, které může být trojího typu: orthorombické, hexagonální a kapalně-krytalické uspořádání. Lipidy nejčastěji tvoří orthorombickou fázi. Toto velmi těsné uspořádání do obdélníkové mřížky je umožněno díky tzv. *all-trans* konformaci lipidových řetězců. Přítomnost Chol podporuje tvorbu orthorombické fáze, tedy těsnější uspořádání lipidů. Menší zastoupení má hexagonální fáze, pro kterou je typické uspořádání řetězců do šestiúhelníkové mřížky a jejich částečná rotace. Kapalně-krytalická fáze se vyskytuje vzácně a uspořádání lipidů je zde nepravidelné. (5) (20)



Obrázek č. 7 Lamelární a laterální organizace lipidů.

3.3 Onemocnění kožní bariéry s abnormalitami v koncentraci cholesterolu

U kožních onemocnění, kde dochází k poruše bariérové funkce kůže, byly pozorovány změny ve složení lipidové matrix a v metabolismu lipidů. Na podkladě těchto aspektů se poté lipidy ve SC defektně uspořádávají. (7) V této kapitole budou popsána onemocnění s abnormalitami v koncentraci cholesterolu.

3.3.1 Ichtyózy

Jedná se o hyperkeratózy, u kterých dochází k narušení kožní bariéry kvůli abnormálnímu uspořádání lipidů do lamel v extracelulárním prostoru ve SC. Tato dysfunkce může být způsobena přímo defektem v metabolismu kožních lipidů anebo problémy v korneocytech, které buď brání sekreci lipidů anebo mají modifikovanou funkci pro tvorbu templátu k uspořádání lipidů do lamel. (17) (22)

Ichtyózy (řecky: *ichthys* – ryba) se manifestují ztlustělou, suchou a šupinatí se pokožkou, která se často viditelně odlupuje. K tomu dochází v důsledku nerovnováhy mezi novotvorbou a odlupováním rohové vrstvy. Zesílení rohové vrstvy je u tohoto onemocnění způsobeno dvěma mechanismy: v první řadě dochází k hyperprodukcí rohových buněk (proliferací hyperkeratóza), v druhém případě se na povrchu kůže odlupuje jen malé množství buněk SC (tj. retenční hyperkeratóza). (17) (23) Závažnost onemocnění se může výrazně lišit u jednotlivých forem ichtyóz. Projevy onemocnění se také mění s věkem pacienta a ročním obdobím. Ichtyózy mohou být genetického anebo získaného původu. Ichtyóza se může také manifestovat jako symptom u systémových genetických onemocnění, respektive syndromů jako je např.: CHILD syndrom, Chanarin-Dorfman syndrom a Conradi-Hünemannův syndrom (viz dále). (17) (22)

Mezi nejčastější a zároveň nejmírnější formy onemocnění patří *Ichtyosis vulgaris*, která může být získaná i dědičná. Dědičná forma se řadí mezi autozomálně dominantní onemocnění, tj. že při postižení obou rodičů je klinický stav závažnější než při postižení jednoho z rodičů. Onemocnění vzniká na podkladě mutace genu pro filagrin a u 40 % pacientů je tato forma ichtyózy asociována s atopickou dermatitidou. Nejzávažnější forma vrozené ichtyózy se nazývá Harlekýnská ichtyóza, která je velmi často neslučitelná

se životem. Kvůli mutaci genu pro ABCA12 transportér nedochází ke vzniku Cer z prekurzorů, což má za následek defekt ve vzniku lamel lipidové matrix. (17) (22) (24)

Vzácnou formou onemocnění je lamelární ichtyóza, jejíž příčina spočívá zejména v defektu transglutaminázy 1. Tento enzym je důležitý pro tvorbu bílkovinné obálky na povrchu korneocytů. Výsledkem je dysfunkce kožní bariéry, změna složení lipidové složky (snížení VMK, Cer) a snížená schopnost lipidů se uspořádat. (7) (17) (19) (22)

Mutace genu pro mikrozomální enzym steroidsulfatázu způsobuje recesivně X-vázanou ichtyózu. Steroidsulfatáza je enzym, který je zodpovědný za přeměnu CholS na Chol; v důsledku defektu enzymu dochází k hromadění CholS a snížení produkce Chol ve SC (zvýšené množství CholS způsobuje inhibici HMG-CoA reductázy). Všechny tyto aspekty vedou k narušení bariérové funkce SC. (11) (17) (22)

3.3.2 CHILD Syndrom

CHILD syndrom (*Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects*) je dominantní X-vázané genetické onemocnění, respektive soubor příznaků, které vznikají na podkladě mutace genu kódující NSDHL (sterol-4 α -karboxylát-3-dehydrogenáza). NSDHL je enzym, který je součástí syntézy Chol v lidském těle. Při dysfunkci tohoto enzymu dochází k depleci Chol v membránách a kumulaci metabolitů. Tyto aspekty jsou pravděpodobně zodpovědné za manifestaci onemocnění. CHILD syndrom se projevuje následujícími symptomy: ichtyózou, difuzním zánětem kůže, nedostatečným vývojem jedné strany těla (častěji pravá strana), absencí jednoho nebo více prstů na nohou nebo na ruce a zkrácením končetin. (17)

3.3.3 Conradi-Hünemannův-Happlův syndrom

Jedná se o vzácné, dominantní X-vázané genetické onemocnění, které vzniká na podkladě mutace genu kódující enzym řídící syntézu Chol (3 β -hydroxy-steroid Δ 8- Δ 7-isomeráza). Defekt tohoto enzymu se projevuje kumulací prekurzorů a nedostatkem Chol. Onemocnění je letální pro mužské pohlaví a dochází k úmrtí plodu během těhotenství. U ženského pohlaví se syndrom projevuje mnohočetnými malformacemi, kataraktou, alopecií a ichtyózou. (17) (25)

3.3.4 Atopická dermatitida

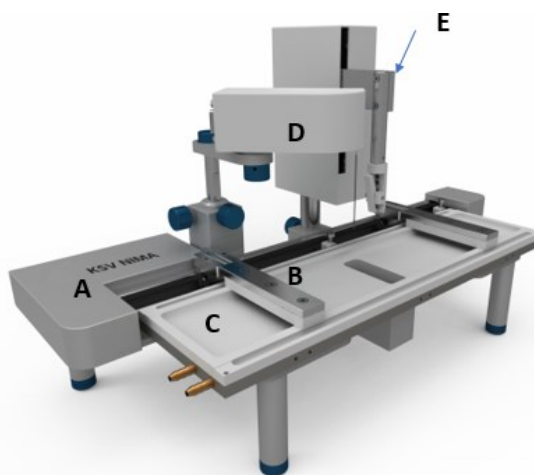
AD je chronické, recidivující zánětlivé kožní onemocnění, které vzniká na podkladě kombinace několika faktorů (genetika, imunita, porušená kožní bariéra a vnější vlivy). Onemocnění není život ohrožující, ale má výrazný vliv na kvalitu života pacientů. Porušení lipidové kožní bariéry způsobuje zvýšené ztráty vody a pokožka pacientů s AD je proto značně suchá a náchylnější pro uchycení patogenů a prostup alergenů, které mohou průběh onemocnění zhoršit, nikoliv však vyvolat. Běžnými symptomy onemocnění jsou: chronický kožní zánět, suchost a výrazná svědivost, která může vést k rozškrábání ložisek AD. (7) (15) (26) (27)

Co se týče složení kožních lipidů, bylo prokázáno, že ve SC pacientů s AD je snížené množství Cer, VMK s dlouhými řetězci a zvýšené množství Chol v porovnání se zdravým SC. Všechny tyto aspekty vedou ke zhoršení bariérových funkcí kůže. (7) (19) (28)

3.4 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina

Tato laboratorní technika umožňuje vytvoření Langmuirovy monovrstvy neboli jednovrstvého lipidového filmu, který se nachází na rozhraní dvou fází: vzduchu a kapaliny. Horní plynná fáze je tvořena vzduchem a dolní fáze tzv. subfáze je zastoupena polární kapalinou. Látky, které tvoří tyto monovrstvy, mají amfifilní charakter. Hydrofobní část molekuly je orientovaná směrem do vzduchu. Hydrofilní část molekuly musí mít dostatečnou afinitu k vodě a je orientována do subfáze. (29) (30)

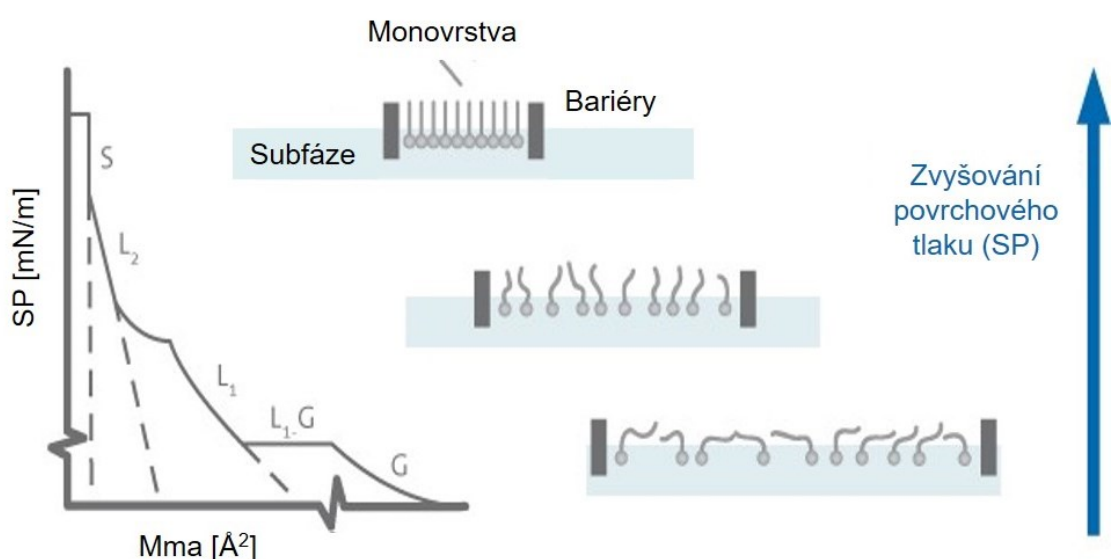
Přístroj (viz obrázek č. 8, převzato z *Biolinscientific.com* (31)) se skládá z vaničky z hydrofobního materiálu obvykle polytetrafluóretylénu (vysoce inertní materiál, který lze čistit organickými rozpouštědly). Při měření Langmuirových monovrstev je vanička (C) naplněná polární kapalinou, která je temperována na předepsanou teplotu pomocí připojeného termostatu. Teplota je měřena pomocí teplotního čidla, které je ponořeno do kapaliny. Důležitou součástí přístroje jsou také bariéry (B) z hydrofilního materiálu (Delrinu, polyoxymethylen), které jsou pohyblivé a jsou umístěny na obou stranách vaničky. Bariéry jsou během experimentu ovládány pomocí softwaru KSV NIMA. Při jejich přibližování danou rychlostí nastává komprese monovrstvy. Stlačováním monovrstvy dochází ke změnám povrchového tlaku. Tyto změny jsou snímány pomocí senzoru. Jako senzor slouží platinový plíšek, částečně ponořený do subfáze. (D) (31)



Obrázek č. 8 Přístroj na měření izotermy. A – podstavec, B – bariéry, C – vanička, D – držák a senzor povrchového tlaku a E – ponořovací mechanismus

3.4.1 Langmuirovy izotermy

Kompresi monovrstvy popisuje graf závislosti povrchového tlaku (SP), Π [mN/m] na ploše jedné molekuly (M_{ma}), A [\AA^2], neboli izoterma. M_{ma} lze vypočítat z molekulové hmotnosti a koncentrace vzorku, respektive množství použitého lipidového vzorku pro experiment. Před jednotlivým měřením je potřeba tyto parametry zadat pro každý vzorek individuálně. Přibližováním bariér ke středu vaničky klesá hodnota veličiny M_{ma} , a naopak SP vzrůstá. Izoterma poskytuje informace o tom, jak jsou lipidy ochotné se uspořádat. Obecně platí, že strmější izoterma vypovídá o vyšší ochotě molekul lipidů se uspořádat. (29) (31)



Obrázek č. 9 Izoterma. Graf závislosti povrchového napětí (Surface pressure [mN/m]) na ploše jedné molekuly (Molecular area [\AA^2]). Se zvyšujícím povrchovým napětím je uspořádanost molekul větší. Na obrázku jsou znázorněny fázové přechody.

Při stlačování monovrstvy dochází k fázovým neboli strukturálním přechodům, které se projevují zakřivením izotermy. Jedná se o 4 fáze: gas (G) - plynná fáze, liquid-expanded (L_1) - kapalně-rozptýlená fáze, liquid-condensed (L_2) - kapalně-kondenzovaná fáze a solid (S) - pevná fáze (viz obrázek č. 9, převzato a upraveno dle *Biolinscientific.com* (31)). Pro plynnou fázi je typický nízký SP a neuspořádanost systému. Se zvyšujícím se SP se zmenšují prostory mezi jednotlivými molekulami a nastává kapalně-rozptýlená fáze. Molekuly vzorku se začínají orientovat dle polarity, tzn. polární část směrem ke kapalně hydrofilní subfázi a hydrofobní část směrem

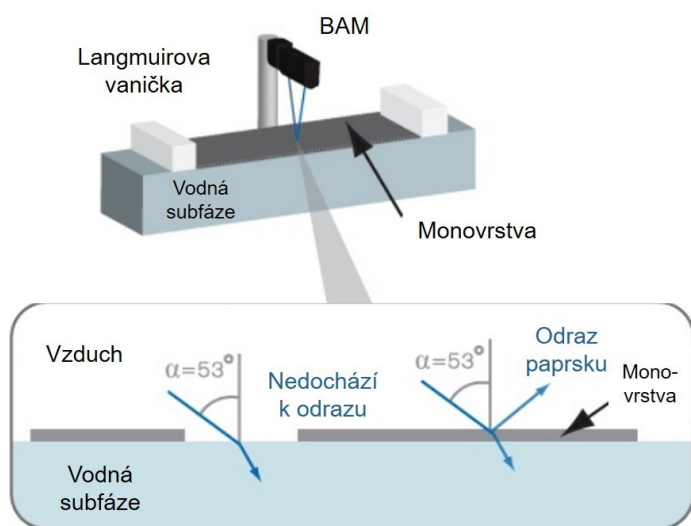
do vzduchu. Zvyšující se SP zprostředkovává přechod molekul lipidů do kapalně-kondenzované fáze, a nakonec do tuhé fáze. (29) (30) (31)

Další důležitou charakteristikou monovrstev je modul kompresibility (Compression modulus, C_{\max} [mN/m]). Tato veličina je převrácenou hodnotou kompresibility a je ukazatelem elasticity monovrstvy. C_{\max} získáme derivací izotermy. Teplota a složení subfáze mají výrazný vliv na tuto veličinu. (20) (29)

3.4.2 Brewsterův úhlový mikroskop

Brewsterova úhlová mikroskopie (*Brewster angle microscopy*, BAM) je neinvazivní zobrazovací metoda, která nám umožňuje prostudovat povrchové struktury monovrstev a zobrazit uspořádání jejich domén na rozhraní fází vzduch-kapalina v reálném čase, díky čemuž jsme schopni zaznamenat děje probíhající v monovrstvě během komprese pomocí snímků a následně je vyhodnotit.

Princip BAM spočívá v lomu světla na rozhraní dvou opticky rozdílných prostředí. Pokud polarizované světlo dopadá na povrch pod Brewsterovým úhlem, který činí pro rozhraní vzduch-kapalina 53° , paprsek se neodráží, ale prochází kapalinou. Ke změnám indexu lomu a odrazu světla dochází, pokud je na povrchu kapaliny nanášena monovrstva. Odraz světla je následně detekován a zobrazen jako 2D mikrograf. (viz obrázek č. 10, převzato a upraveno dle *BiolinScientific.com* (31)). (31) (29) (32)

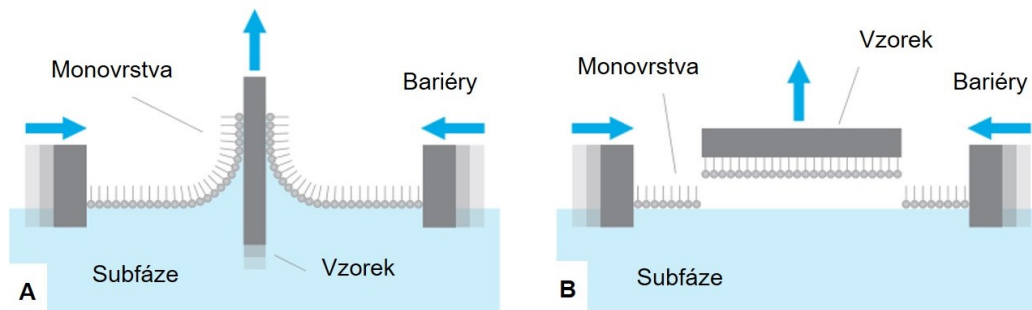


Obrázek č. 10 Brewsterův mikroskop a Brewsterův úhel. Nanesená monovrstva na povrch kapaliny způsobí odraz paprsku, který dopadá pod Brewsterovým úhlem.

3.5 Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladu

Langmuirovy monovrstvy lze přenést na pevný podklad a následně prostudovat jejich vlastnosti pomocí technik jako je např. atomová silová mikroskopie (AFM), infračervená spektroskopie nebo rentgenová difrakce. (29) Přenos monovrstvy je možné uskutečnit pomocí dvou metod: Langmuir-Blodgett a Langmuir-Schaefer. Při metodě Langmuir-Blodgett dochází k fixaci monovrstvy na pevný podklad (např. slídové sklíčko), při vertikálním průchodu podkladu subfází (viz obrázek č. 11A, převzato a upraveno dle Bioscientific.com (31)). Metoda Langmuir-Schaefer (viz obrázek č. 11B, převzato a upraveno dle Bioscientific.com (31)) je vhodná pro rigidnější monovrstvy. Přenos je zajištěn přiložením hydrofobního materiálu (např. pyrolytický grafit anebo silanizovaný oxid křemičitý) shora k monovrstvě, tedy horizontálně. (29) (31) (33)

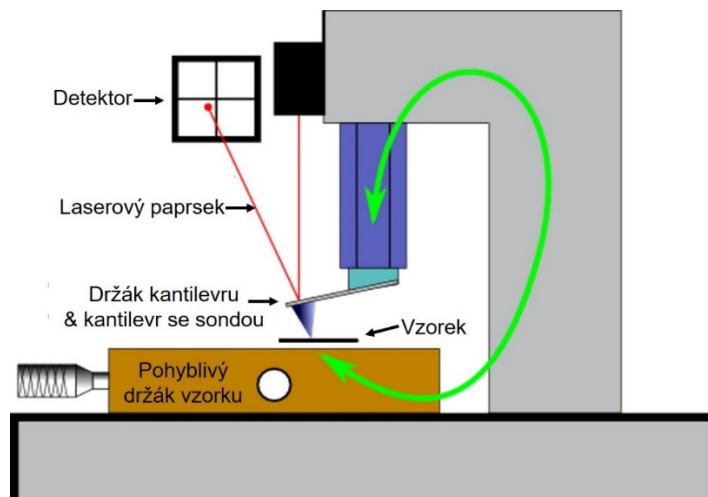
Pro správný přenos monovrstvy na pevný podklad je důležité dodržet podmínky konstantní komprese, tj. povrchový tlak v rozmezí od 20 do 40 mN/m. Tyto podmínky jsou důležité kvůli zachování soudržnosti monovrstvy při jejím přenosu na pevný povrch. (20) (29) (31)



Obrázek č. 11 A: Langmuir-Blodgett metoda. Znárodnění vertikálního průchodu pevného podkladu subfází. **B: Langmuir-Schaefer metoda.** Znárodnění horizontálního průchodu pevného podkladu subfází.

3.5.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (*Atomic force microscopy, AFM*) slouží k zobrazení povrchu monovrstvy nanesené na hladký pevný podklad (např. čerstvě odloupené slídové sklíčko). Povrch monovrstvy je snímán sondou pohybující se v těsné blízkosti povrchu. Přístroj se skládá z kmitajícího článku, na který je umístěn zkoumaný vzorek. Povrch vzorku je snímán pomocí sondy přichycené na kantilevr, na který svítí laser. Struktury na povrchu vzorku způsobují různý ohyb kantilevru, na kterém dojde k odrazu paprsku laseru, který je zaznamenán pomocí detektoru. Z detekovaného signálu je následně vytvořen obrázek povrchu vzorku (viz obrázek č. 12, převzato a upraveno dle http://www.nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php (34)). (29) (34) (35).



Obrázek č. 12 Princip mikroskopie atomárních sil.

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie a rozpouštědla

Cer byly izolovány z lidského SC. VMK, Chol a CholS byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Pro experiment byla použita ultračistá voda, jejíž čistota byla zajištěna deionizací, destilací a filtračním systémem Milipore Q. Ostatní chemikálie a rozpouštědla, jejichž čistota odpovídala použití pro HPLC, byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo).

4.2 Přístrojové vybavení

Na přípravu Langmuirových monovrstev a k metodě Langmuir-Blodgett byla použita vana typu KN 2001(small) a software KSV NIMA.

Pro zobrazení Langmuirových monovrstev Brewsterovým úhlovým mikroskopem byla použita vana KN NIMA 1003 (medium), mikroskop typu KSV NIMA MicroBAM a software KSV NIMA.

Pro mikroskopii atomárních sil bylo využito zařízení VEECO CP II, kontaktní mód, sonda CONT20A-CP Si, software Veeco DI SPMLab NT 6.0.2.

Vyhodnocení a statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 8.

4.3 Příprava acetátového pufru

Jako subfáze Langmuirových monovrstev byl použit izotonický acetátový pufr (10mM, pH 5,5). Pufr byl připraven rozpuštěním 8,5 g chloridu sodného, 0,6 g kyseliny octové (99 %) v 1 l ultračisté vody. Hodnota pH byla změřena pomocí pH metru se skleněnou elektrodou. Pro následnou úpravu pH na požadovanou hodnotu byla použita kyselina octová nebo hydroxid sodný. Acetátový pufr byl poté zfiltrován přes filtr, jehož velikost pórů byla 0,45 μm . Mezi jednotlivými měřeními byl pufr skladován v lednici.

4.4 Příprava směsi volných mastných kyselin

Pro přípravu vzorků lipidů byla využita směs VMK (viz tabulka č. 1). Poměr molárního množství jednotlivých kyselin v této směsi odpovídá jejich fyziologickému zastoupení ve SC. (36) Předepsané množství jednotlivých VMK bylo naváženo a rozpuštěno ve směsi rozpouštědel chloroform:metanol (3:1, v/v). Výsledná koncentrace pak činila 1 mg/ml v. Po smísení bylo rozpouštědlo ze směsi odpařeno pomocí proudu dusíku a zbytková vlhkost byla odstraněna ve vakuu v exsikátoru (jako sušidlo byl použit parafín a oxid fosforečný).

Délka acylového řetězce	Molární poměr [%]	Relativní molekulová hmotnost [g/mol]	Hmotnost [mg]
C16	1,79	256,43	1,33
C18	4,00	284,48	3,30
C20	7,62	312,54	6,89
C22	47,80	340,59	47,11
C24	38,79	368,65	41,38

Tabulka č. 1 Složení směsi VMK

4.5 Příprava lipidových vzorků

Lipidové vzorky obsahovaly lidské Cer, směs VMK, Chol a CholS. V kontrolním vzorku bylo množství Cer, VMK a Chol ekvimolární. K této směsi bylo přidáno 5 % (w/w) CholS. Ostatní vzorky obsahovaly snížené množství Chol, ale množství Cer a VMK bylo vždy ekvimolární. Každý vzorek obsahoval 5 % (w/w) CholS a celková hmotnost každého vzorku byla 1 mg. Vzorky byly označeny jako *Chol X %*, kde X je procento Chol v poměru k Cer a VMK (např.: Chol 80 % znamená, že vzorek obsahuje Cer: VMK: Chol v poměru 1:1:0,8). Pro výpočty byly použity molekulové hmotnosti Chol ($M_r=386,65$ g/mol) a CholS ($M_r=488,70$ g/mol). Dále byly použity průměrné hodnoty molekulové hmotnosti pro lidské Cer ($\bar{M}_r=691,29$ g/mol) a VMK ($\bar{M}_r=345,58$ g/mol). Rozpis konkrétních vzorků je uveden v *tabulce č. 2*.

Zastoupení Chol [%]	Množství jednotlivých lipidů ve vzorcích [μg]				Suma lipidů ve vzorku [μg]
	Lidské Cer	VMK	Chol	CholS	
100 (kontrola)	461,34	230,63	258,04	50,00	1000
80	487,84	243,87	218,29	50,00	1000
60	517,57	258,74	173,69	50,00	1000
40	551,16	275,53	123,31	50,00	1000
20	589,42	294,65	65,93	50,00	1000
0	633,38	316,63	0	50,00	1000

Tabulka č. 2. Složení lipidových vzorků.

Na přípravu roztoků jednotlivých lipidů byly hmotnosti jednotlivých typů lipidů sečteny, naváženy a následně bylo přidáno takové množství směsi rozpouštědel chloroform:metanol (3:1, v/v), respektive (2:1, v/v) pro CholS, aby vznikl roztok o koncentraci 1 mg/ml. Každá koncentrace byla zastoupena dvěma vzorky. Mikrostríkačkou bylo odebráno předepsané množství jednotlivých roztoků lipidů, (podle hmotností uvedených v *tabulce č. 2*) a přeneseno do předem připravených vialek. Vzorky byly následně homogenizovány a rozpouštědlo bylo odpařeno v digestoři pod proudem dusíku. Přebytečná vlhkost byla odstraněna vakuovým sušením v exsikátoru, který obsahoval sušidla, parafín a oxid fosforečný. Vzorky byly uchovávány v mrazáku při -20 °C. Před daným měřením byly lipidové vzorky rozpuštěny ve směsi rozpouštědel chloroform: metanol (3:1, v/v). Cílová koncentrace vzorků pak byla 1 mg/ml.

4.6 Příprava monovrstevných modelů na rozhraní vzduch-kapalina a na pevném podkladu

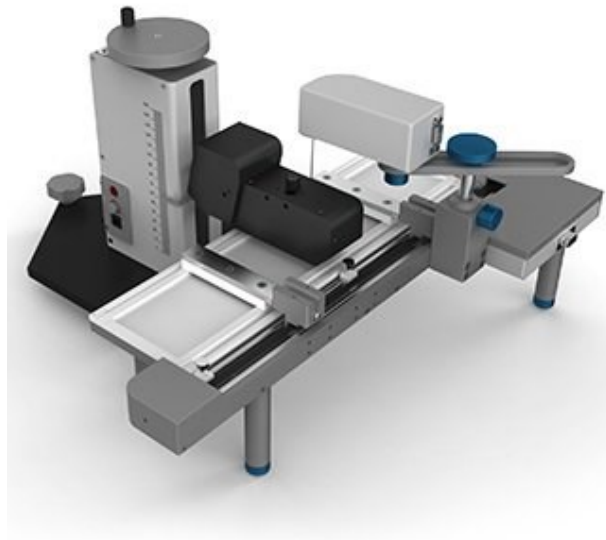
4.6.1 Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina

Monovrstvy byly připraveny následujícím postupem:

1. Vanička (KN 2001, small) byla umístěna na podstavec přístroje a naplněna acetátovým pufrem. Bariéry byly umístěny do krajních poloh vaničky. Do acetátového pufru byl ponořen platinový plíšek (k měření změn povrchového napětí), který byl zavěšen na háček senzorového aparátu. Dále bylo do lázně ponořeno čidlo termostatu pro měření teploty lázně. Celý přístroj byl umístěný v uzavřeném boxu, čímž se snížilo působení vnějších vlivů, např. proudění vzduchu, prachových částic atd. Uzavřený systém dále zabráňoval vypařování subfáze a rozpouštědel ze vzorků do okolí.
2. Před každým měřením byl povrch vyčištěn odsátím nečistot z hran bariér pomocí pipety, čemuž předcházelo přiblížení bariér do středu vaničky.
3. Lázeň acetátového pufru byla vytemperována na teplotu 32 °C. Připravené lipidové vzorky jsme rozpustili ve směsi chloroform:metanol (3:1, v/v) na koncentraci 1 mg/ml. Následně jsme pomocí mikrostříkačky nanесли 10 µl vzorku. Vzorek byl rozmístěn rovnoměrně v několika kapkách po celé ploše subfáze tak, aby nedošlo ke kontaktu mikrostříkačky s hladinou subfáze.
4. Po 15 minutách došlo k odpaření rozpouštědla, byla vynulována hodnota povrchového tlaku a bylo spuštěno měření. Bariéry se pohybovaly rychlostí 20 mm/min a maximální hodnotu povrchového tlaku jsme předem nastavili na 50 mN/m.
5. Po skončení měření jsme několikrát omyli vaničku, plíšek a teplotní čidlo směsí rozpouštědel chloroform:metanol (3:1, v/v). Bariéry byly opláchnuty metanolem. Následně byly všechny části přístroje důkladně vysušeny. Pro vytvoření izotermy byly použity výsledky alespoň ze 4 měření.

4.6.2 Příprava monovrstev za použití BAM

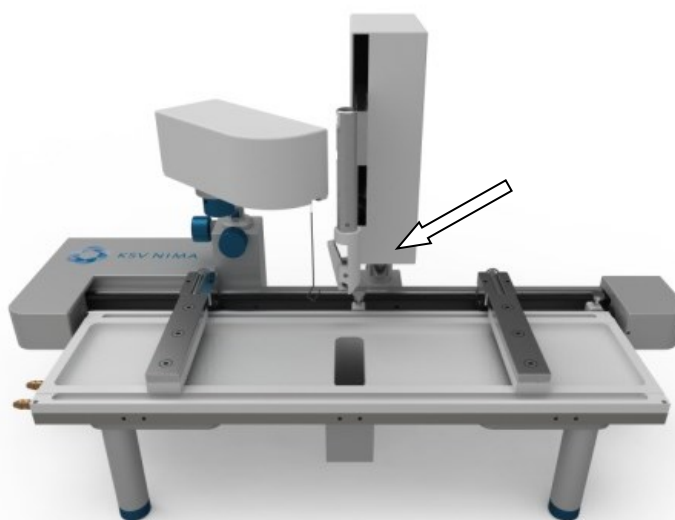
Příprava monovrstev se příliš nelišila od postupu uvedeného u Langmuirových monovrstev. Rozdíl však spočíval v použití větší vaničky (KN 1003; medium) a ve větším množství použitého acetátového pufru. Dále byla doprostřed vaničky umístěna destička, od které se odráží laser (viz obrázek č. 13, převzato z *biolinscientific.com* (32)). Zdroj laseru byl umístěn nad výše zmíněnou destičku. Pro měření bylo použito 30 μ l vzorku, který byl rovnoměrně rozmístěn po celé ploše vaničky pomocí mikrostříkačky. Měření bylo provedeno u lipidových vzorků o koncentraci Chol 100 %, 40 % a 0 %. Rychlost přibližování bariér byla nastavena na 20 mm/min.



Obrázek č. 13 BAM a instrumentální vybavení.

4.6.3 Langmuir-Blodgett technika

Přenesení Langmuirovy monovrstvy na pevný podklad bylo uskutečněno pomocí techniky Langmuir-Blodgett. Jako pevný podklad bylo použito hydrofilní slídové sklíčko, přičemž měření probíhalo v menší vaničce (KN 2001; small). Těsně před měřením bylo odloupeno čerstvé slídové sklíčko o velikosti 15×15 mm a upevněno do držáku (viz obrázek č. 14, převzato z *Biolinscientific.com* (31)), který byl následně ponořen do subfáze až po okraj. Poté byl nanesen lipidový vzorek obdobně jako u předchozích metod a rozpouštědlo bylo odpařováno po dobu 15 minut. Monovrstva byla stlačena na 20 mN/m a po 15min. ekvilibraci bylo sklíčko vytaženo ze subfáze rychlostí 2 mm/min. Slídové sklíčko bylo uloženo do vialek. Pro zvýšení stability byly vzorky uchovávány v inertní atmosféře dusíku při pokojové teplotě do doby měření. Přenos monovrstvy na pevný podklad byl proveden vždy dvakrát pro konkrétní vzorek. Hodnocení lipidových monovrstev pomocí AFM bylo provedeno u lipidových vzorků s koncentrací Chol: 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % a 100 %

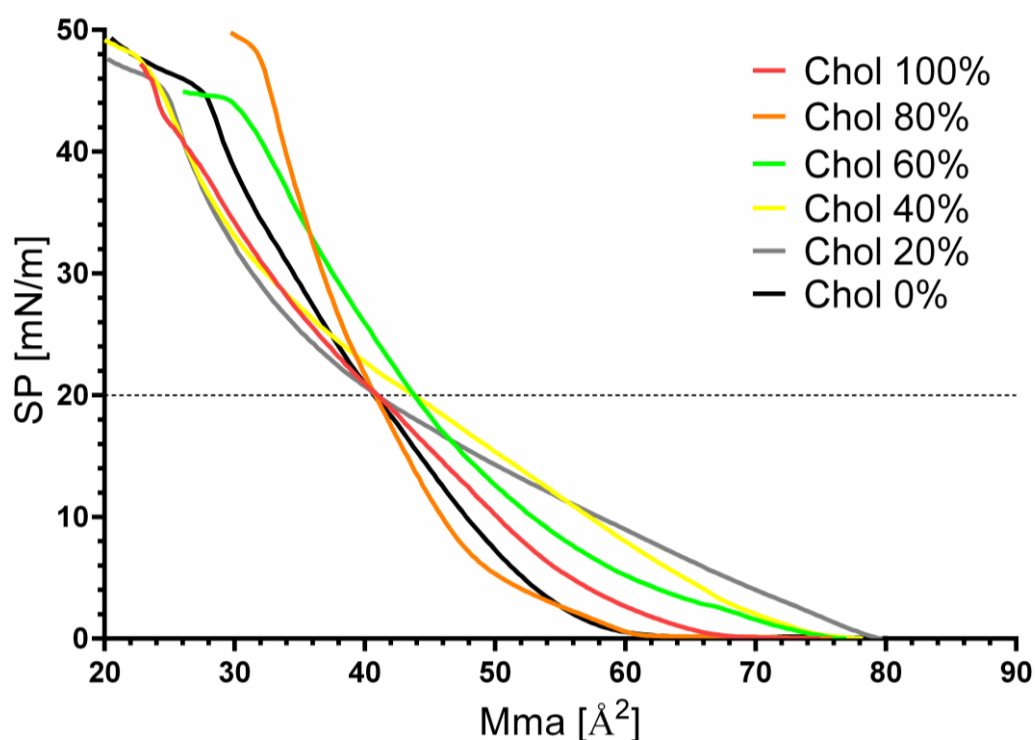


Obrázek č. 14 Zařízení pro Langmuir Blodgett techniku. Šipka směřuje k posuvnému zařízení, na kterém je upevněn držák pro uchopení slídového sklíčka.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Izotermy

Obrázek č. 15 zobrazuje barevně odlišené izotermy jednotlivých vzorků. V připravených vzorcích bylo zvýšeno množství Cer a VMK na úkor Chol. Tím bylo napodobeno snížení Chol při patologických stavech. Poměr Cer a VMK byl po celou dobu konstantní (1:1 mol).



Obrázek č. 15 Izotermy. *Izotermy jednotlivých vzorků jsou zobrazeny různými barvami.*

Naměřené izotermy mají obecně pozvolnější průběh, což se shoduje s výsledky z předchozí práce, kde byly použity izolované lipidy ze SC. (37) Pozvolný charakter může být zapříčiněn komplexností směsi a přítomností lidských Cer. To naznačuje, že i když směs není kompletně izolovaná ze SC, má podobné chování jako kdyby byla. Jediným rozdílem od izoterm směsi lipidů izolovaných z lidského SC (37) bylo, že

izotermy v této práci nevykazují výraznější fázové přechody (zakřivení izotermy) během jejich průběhu.

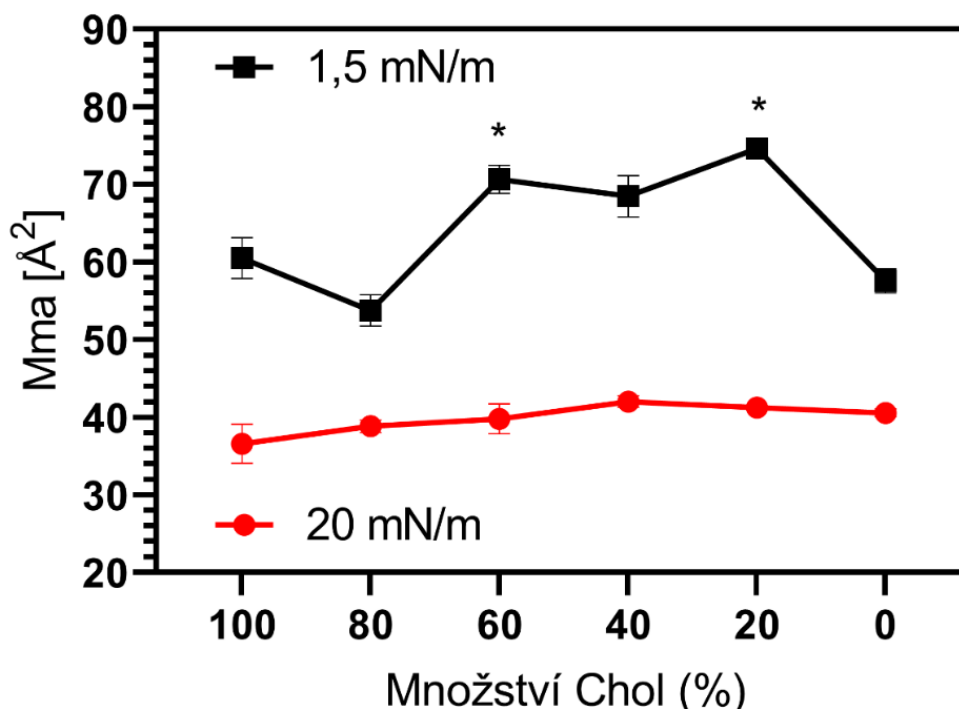
Je očekáváno, že izoterma čisté látky bude strmější díky podobným interakcím mezi jednotlivými molekulami. Podobné chování by bylo logické i pro směsi látek, které mají mezi sebou podobnou strukturu. V literatuře byla nalezena izoterma čistého Chol, která je velmi strmá a začíná nastupovat kolem 45 \AA^2 . (38) Naměřené izotermy naznačují, že ekvimolární směs Cer a VMK (Chol 0 %) má velmi strmý průběh, což je v souladu s obecnými pravidly, protože tyto dvě kategorie látek mají obdobnou strukturu (polární hlava a délka řetězců). Méně strmý průběh izoterm je pozorovaný pro směsi, které obsahují látky, které nemají tolik podobnou strukturu (Cer, VMK, Chol). Překvapivě nejvíce strmá izoterma byla naměřena pro vzorek Chol 80 %.

V literatuře byly vyhledány izotermy čistých látek (nebo směsí strukturně podobných látek), aby bylo možné předpokládat teoretické vlastnosti izoterm. Kromě již zmíněného Chol, byly nalezeny i izotermy Cer (izolované prasečí i lidské a syntetické), kyseliny palmitové (PA) a lignocerové (LA) a směsi kyselin (VMK). Izoterma samotného Chol je tedy velmi strmá (strmost vypovídá o vyšší ochotě uspořádávání lipidů). Naopak izotermy Cer mají pozvolnější průběh. Izoterma směsi prasečích Cer nastupuje kolem 65 \AA^2 . (38) Průběh izotermy syntetických Cer závisí na délce jejich řetězce a na teplotě během experimentu. (39) Cer s délkou řetězce 16-24 uhlíků, které jsou v lidském SC nejhojnější, mají nástup izotermy kolem $60-70 \text{ \AA}^2$. (20) (38) (40) Izoterma volných lipidů extrahovaných z lidského SC se začíná zvedat kolem 70 \AA^2 . (37) Izotermy jednotlivých kyselin mají nástup $\sim 27 \text{ \AA}^2$, izotermy směsí $\sim 35 \text{ \AA}^2$. (37) (40) V našem případě bychom tedy očekávali, že s klesajícím množstvím Chol bude klesat strmost izotermy a průběh bude spíše pozvolnější, což se do jisté míry potvrdilo. Nutno však zohlednit, že naše směs obsahovala lidské Cer a směs VMK, a musíme tedy očekávat komplexnější chování vzorků.

Obrázek č.16 zachycuje grafické znázornění závislosti plochy jedné molekuly na množství Chol v lipidových vzorcích při SP 1,5 mN/m a SP 20 mN/m. K určení těchto hodnot byly použity nejméně 4 reprezentativní vzorky od každé koncentrace Chol, ze kterých byl následně vypočítán průměr a stanovena směrodatná odchylka. Jednotlivé směsi se mezi sebou liší zejména hodnotou plochy jedné molekuly při SP 1,5 mN/m ($A_{1,5}$)

a na grafu jsou reprezentovány černými čtverci. Při tomto SP dochází k nástupu izotermie a molekuly lipidů se uspořádávají spíše samovolně bez většího působení SP. Nízké hodnoty $A_{1,5}$ charakterizují ochotu lipidů se uspořádávat těsněji a projevují se vyšší strmostí izotermie. (40)

Plocha jedné molekuly



Obrázek č. 16 Plocha jedné molekuly. Grafické znázornění závislosti plochy jedné molekuly na množství Chol v lipidových vzorcích při povrchovém tlaku (SP) 1,5 a 20 mN/m. Data jsou prezentována jako průměrná hodnota \pm SEM, $n \geq 4$, * značí statisticky významný rozdíl vůči kontrolnímu vzorku (100 %), $p < 0,05$.

Podle obsahu jednotlivých vzorků použitých v této práci by se dalo předpokládat, že ekvimolární směs VMK a Cer (Chol 0 %) bude mít nejnižší hodnotu $A_{1,5}$, což může být zapříčiněno posílením interakcí mezi Cer a VMK a úplnou absencí Chol ve směsi. Teoreticky by následovala ekvimolární směs Cer/CMK/Chol (Chol 100 %) a potom ostatní směsi s deplecí Chol. V experimentu bylo dokázáno, že tato hypotéza byla správná a že pro vzorek Chol 0 % byla naměřena nižší hodnota ($A_{1,5} = 57,58 \pm 1,5 \text{ \AA}^2$) než pro Chol 100 % ($A_{1,5} = 60,5 \pm 2,6 \text{ \AA}^2$). Také bylo prokázáno, že s deplecí Chol průměrná hodnota $A_{1,5}$ stoupá [Chol 60 % ($A_{1,5} = 70,7 \pm 1,8 \text{ \AA}^2$), Chol 40 % ($A_{1,5} = 68,5 \pm 2,7 \text{ \AA}^2$)

a Chol 20 % ($A_{1,5} = 74,6 \pm 1,1 \text{ \AA}^2$]. Výjimka této hypotézy byl vzorek Chol 80 %, který měl nejnižší hodnotu ($A_{1,5} = 53,8 \pm 2,0 \text{ \AA}^2$). To znamená, že lipidy v této směsi se nejochootněji uspořádávají.

Směs s ekvimolárním obsahem CerNS 24/VMK/Chol a 5% přídavkem (w/w) CholS, byla zkoumána již v předchozí práci. (41) Podmínky měření byly totožné (tj. teplota a typ subfáze). Hodnoty $A_{1,5}$ dosahovaly $38,2 \text{ \AA}^2$, což je v porovnání s výsledky této práce podstatně nižší (Chol 100 % ($A_{1,5} = 59,70 \text{ \AA}^2$)). Avšak podle výše zmíněné hypotézy, že méně komplexní model (konkrétně model obsahující pouze CerNS 24 místo směsi Cer), je to očekávané. To se potvrdilo již v předchozím výzkumu (37), kde naměřené izotermy lipidů SC vykazovaly podstatně méně strmý průběh (tedy nižší ochotu uspořádávání lipidů) než izotermy vzorků připravených ze syntetických lipidů.

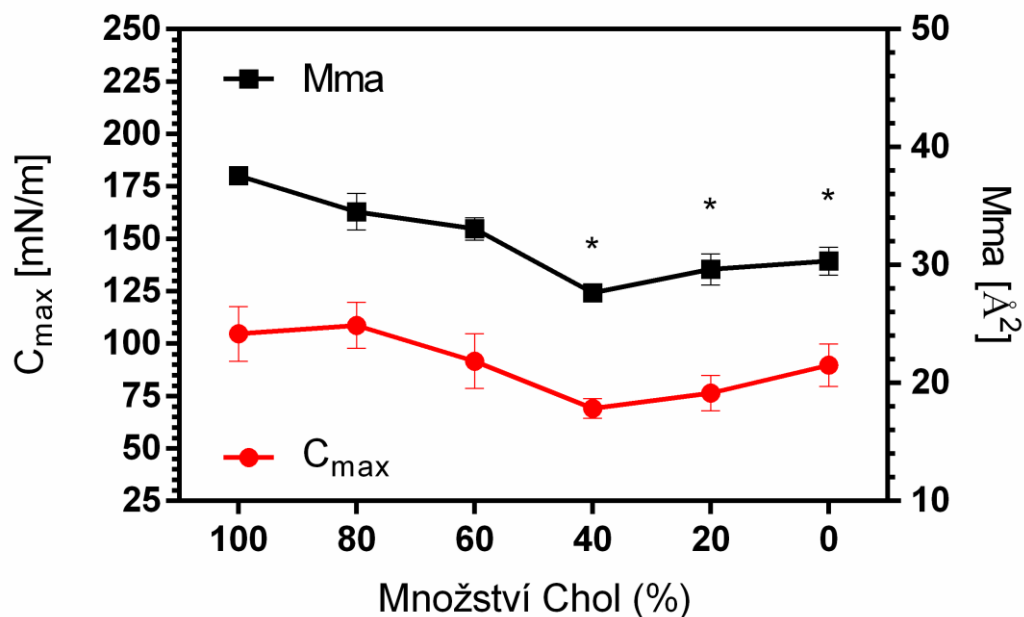
Hodnoty M_{ma} jednotlivých vzorků při SP 20 mN/m (A_{20}) se na rozdíl od $A_{1,5}$ příliš neliší (viz obrázek č. 17, červená kolečka). Při vyšším SP dochází k organizaci lipidů zejména na základě komprese, nikoli samovolně. V literatuře byla nalezena hodnota A_{20} čistého Chol při 32 °C, avšak jiném pH ($A_{20} \sim 38 \text{ \AA}^2$). (39) Ve stejné práci byla A_{20} lipidové směsi (CerNS 24/LA/Chol/CholS) zjištěna $\sim 38 \text{ \AA}^2$. Izoterma volných lipidů izolovaných z lidského SC za stejné teploty a pH jako v našem experimentu dosáhla $\sim 47 \text{ \AA}^2$. (37) U kontrolního vzorku Chol 100 % byla naměřena hodnota nižší ($A_{20} = 36,6 \pm 2,5 \text{ \AA}^2$). Tato hodnota odpovídá spíše směsi s obsahem syntetického Cer. Z toho vyplývá, že A_{20} zřejmě nezávisí na podobnosti ve směsi obsažených molekul, a tedy na interakcích mezi nimi, ale je ovlivněna jinými faktory.

5.2 Modul kompresibility

Modul kompresibility (C_{\max}) je převrácená hodnota kompresibility (C_s), kterou získáme derivací izotermu podle rovnice $C_s = (-1/A)/(dA/d\pi)$. A vyjadřuje teoretickou plochu jedné molekuly a π je povrchový tlak. C_{\max} udává míru stlačitelnosti monovrstvy neboli její elasticitu. Čím je hodnota C_{\max} vyšší, tím je těsnější uspořádání lipidů v monovrstvě, což odpovídá vyšší rigiditě. Volnější uspořádání lipidů v monovrstvě je charakterizováno nižšími hodnotami C_{\max} , což vypovídá o elastičtějším charakteru monovrstvy. (42)

Na *obrázku č. 17* jsou znázorněny hodnoty C_{\max} (červená kolečka). Hodnoty M_{\max} reprezentované černými čtverečky vyjadřují plochu jedné molekuly, při které dosáhla monovrstva nejvyšší hodnoty C_{\max} . Tato veličina definuje místo, kde je největší strmota izotermu. K určení těchto hodnot byly použity nejméně 4 reprezentativní vzorky od každé koncentrace Chol, ze kterých byl následně vypočítán průměr a stanovena směrodatná odchylka.

Modul kompresibility (C_{\max})



Obrázek č. 17 Grafické znázornění závislosti modulu kompresibility (C_{\max}) na množství Chol v lipidových vzorcích. Mma neboli plocha jedné molekuly zde vyjadřuje hodnotu, při které monovrstva dosáhla nejvyšších hodnot C_{\max} . Data jsou prezentována jako průměrná hodnota \pm SEM, $n \geq 4$, * značí statisticky významný rozdíl vůči kontrolnímu vzorku (100 %), $p < 0,0001$.

Kontrolní vzorek (Chol 100 %) má hodnotu Mma 38,5 \AA^2 . S klesající koncentrací Chol Mma také klesá až ke vzorku Chol 40 %. Poté dochází k zvýšení Mma až do Chol 0 %, kde je hodnota Mma 30 \AA^2 (tedy nižší než Chol 100 %). Z výsledků vyplynulo, že mezi výslednými hodnotami Mma u směsí Chol 40 %, 20 % a 0 % je statisticky významný rozdíl vůči kontrolnímu vzorku (Chol 100 %).

Křivka závislosti C_{\max} na koncentraci Chol má podobný průběh jako bylo popsáno pro křivku závislosti Mma na koncentraci Chol. Jediným rozdílem je hodnota C_{\max} pro Chol 80 %, kde je průměr mírně vyšší než kontrolní vzorek, ale bez statistické významnosti. Hodnoty C_{\max} byly následující: Chol 100 % ($C_{\max} = 104,7 \pm 10,2$ mN/m), Chol 80 % ($C_{\max} = 108,8 \pm 11,0$ mN/m), Chol 60 % ($C_{\max} = 91,7 \pm 13,1$ mN/m), Chol 40 % ($C_{\max} = 69,2 \pm 4,8$ mN/m), Chol 20 % ($C_{\max} = 76,5 \pm 8,5$ mN/m) a

Chol 0 % ($C_{\max} = 89,7 \pm 10,2$ mN/m). Z naměřených výsledků vyplývá, že hodnoty C_{\max} směsi s vyšším podílem Chol se téměř neliší.

Výsledky C_{\max} kontrolní směsi (Chol 100 %) lze porovnat s předchozí prací (41), kde byla použita ekvimolární směs syntetického CerNS 24/VMK/Chol s 5% přídavkem CholS (ostatní podmínky tj. teplota a typ subfáze byly stejné). Hodnoty C_{\max} u této studie (41) byly 3,7× vyšší ($C_{\max} = 382$ mN/m). Lze říct, že uspořádání lipidů u vzorku obsahující lidské Cer (Chol 100 %) je volnější a charakter monovrstvy je elastičtější než té, která obsahuje syntetický CerNS 24.

V předchozím výzkumu zaměřeném na propustnost komplexnějších multivrstevných lipidových modelových membrán SC (složení membrán bylo stejné jako připravené lipidové vzorky v této práci, lišila se metoda přípravy membrán) (13) byl pozorován podobný trend průběhu jako má získaná křivka závislosti C_{\max} na koncentraci Chol. Konkrétně permeabilita připravených membrán SC pro modelové léčivo theofylin klesala od vzorku Chol 100 % až ke vzorku Chol 40 %. Následně pak permeabilita opět stoupala s klesajícím množstvím Chol. Na první pohled tyto výsledky kompletně odporují našim závěrům, ale musíme vzít v potaz, že lipidy takto připravených multivrstevných membrán se nacházejí v pevné fázi. V literatuře bylo nalezeno, že přítomnost Chol zvyšuje rigiditu směsi lipidů nacházející se v kapalně fázi, naopak u lipidových směsí nacházející se v pevné fázi Chol zabraňuje rigidnímu uspořádání. (43) V našem případě se lipidy nacházely v kapalně fázi a předpokládali bychom tedy, že s úbytkem Chol ve směsi bude klesat i její rigidita neboli bude se snižovat modul kompresibility, což odpovídá zjištěným výsledkům.

5.3 AFM

Metoda AFM byla použita k zobrazení lipidových monovrstev na pevném podkladě. Díky této technice je možné identifikovat různé struktury a domény lipidových vzorků. Získané informace by mohly pomoci při objasnění vlivu koncentrace Chol na laterální uspořádání lipidů ve SC. (33) Snímky vzorků byly pořízeny při třech zvětšeních: $3 \times 3 \mu\text{m}$ a $10 \times 10 \mu\text{m}$ a $30 \times 30 \mu\text{m}$. Nejmenší zvětšení ($30 \times 30 \mu\text{m}$) zde není uvedeno, jelikož vzorky s nižší koncentrací Chol při něm nebyly zcela homogenní.

Zastoupení Chol [%]	Rozdíl mezi jednotlivými fázemi [nm]	Zastoupení vyšší fáze [%]
100 (kontrola)	$1,7 \pm 0,1$	27,8
80	$1,8 \pm 0,1$	30,1
60	$1,1 \pm 0,1$	36,3
40	$1,3 \pm 0,1$	42,5
20	$1,7 \pm 0,2$	44,5
0	$1,5 \pm 0,1$	23,1

Tabulka č. 3 Výška monovrstvy a % zastoupení vyšší fáze v jednotlivých vzorcích.

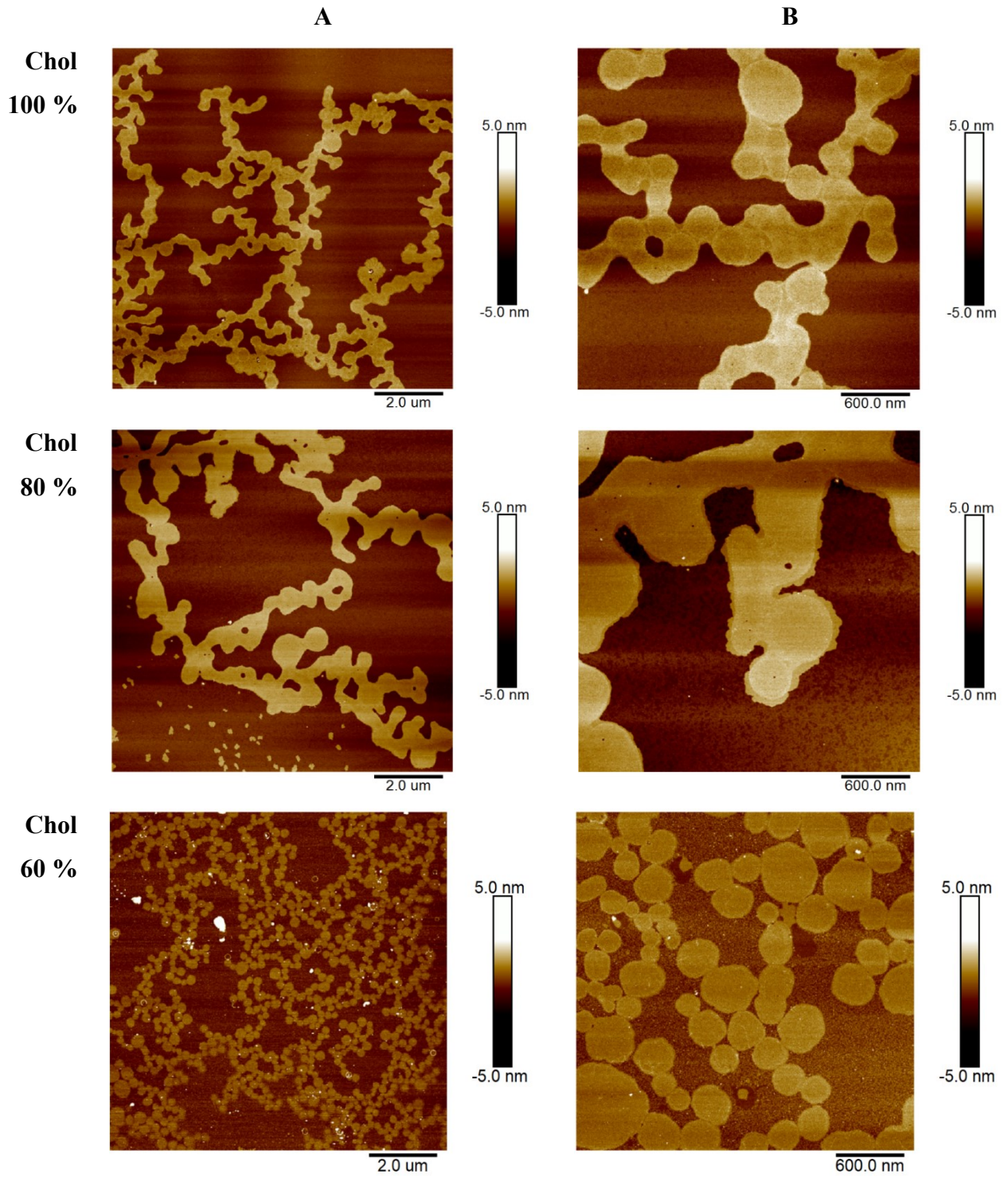
Na *obrázku č. 18* jsou v levém sloupci AFM mikrografy při zvětšení $10 \times 10 \mu\text{m}$ seřazené podle klesajícího zastoupení Chol ve směsi. V pravém sloupci je pak $3 \times 3 \mu\text{m}$ zvětšení. Na mikrografech jsou patrné světlejší domény, které vystupují na povrch a mají vyšší zastoupení dlouhých Cer a VMK. (39). Těchto domén na obrázcích přibývá s narůstajícím množstvím Cer a VMK a poklesem Chol. Tmavší domény, které se více vyskytují u vzorků s vyšším množstvím Chol, charakterizují nižší polohu a jsou bohaté na Chol, CholS a krátké Cer. (39) Z *tabulky č. 3* vyplývá, že rozdíl výšky mezi fázemi (nižšími a vyššími doménami) se v jednotlivých směsích příliš neliší ($\sim 1,1-1,8 \text{ nm}$) a odpovídá literatuře (38) ($\sim 1,3-1,6 \text{ nm}$).

U vzorku Chol 100 % a Chol 80 % jsou viditelné dvě dobře oddělené fáze, což může být zapříčiněno sníženou mísitelností vyššího množství Chol s některými složkami směsi VMK a Cer. VMK obsažené ve SC vykazují různou mísitelnost s Chol, např. PA (C16) je částečně mísitelná s Chol (v poměru 1:1 dochází k tvorbě dvou separovaných fází) a LA (C24) se s Chol vůbec nemísí (tvoří se dvě fáze). (40) Cer jsou v malém

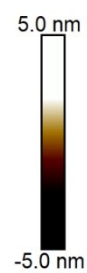
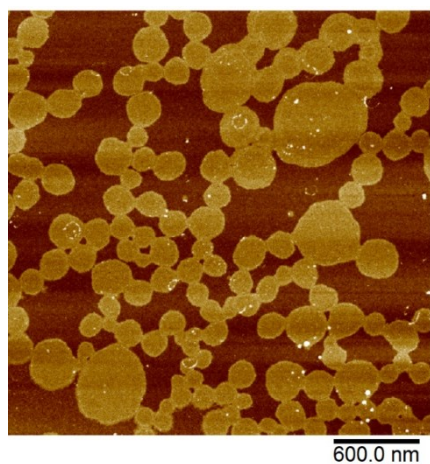
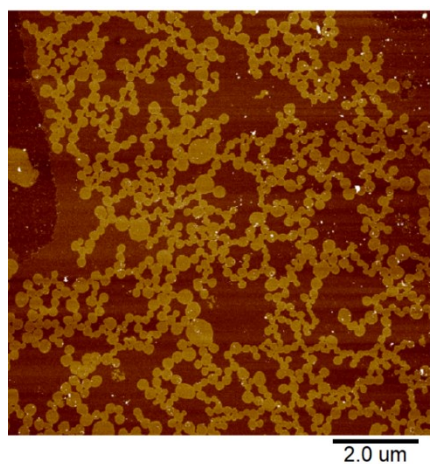
množství mísitelné s fází vysoce bohatou na Chol, naopak při nízkém množství až středním množstvím Chol dochází k tvorbě dvou fází. Mísitelnost dále závisí na délce řetězce Cer (kratší Cer jsou mísitelné lépe). (40)

Domény vzorků Chol 100 % a Chol 80 % mají řetízkovitý a větvený charakter, což se shoduje s výsledky předchozího výzkumu (33), kde byla použita směs podobného složení jako vzorek Chol 100 %. Obdobný tvar domén byl také pozorován u předchozí studie (40), kde byla použita ekvimolární směs prasečího Cer, Chol a LA. Je patrné, že s ubývajícím množstvím Chol se mění charakter světlých vyšších domén. U vzorků Chol 60 % a Chol 40 % lze pozorovat hustou síť kulatých, drobných domén, které jsou navzájem propojeny, avšak nemají již řetízkovitý charakter jako kontrolní směs. Dále přibývají drobné, světlé, granulovité domény, přičemž nejvíce jich lze spatřit u vzorku Chol 0 %. Tento jev může být způsobený přibývajícím množstvím Cer (což může být způsobeno kvůli nárůstu Cer a VMK ve zkoumaných vzorcích). (33) Bylo také popsáno, že Chol a CholS zvyšují rozptýlení domén Cer. Avšak přidání VMK do směsi způsobí přednostní mísení Cer s VMK a vznik vyšších domén, které se ochotněji uspořádávají, a tím je potlačen dispergující efekt Chol. (33) Bylo by tedy očekáváno, že vyšší množství VMK a Cer způsobí nárůst ploch vyšších domén a zvýší se celková rigidita a kompaktnost systému, což se částečně potvrdilo. Byl totiž pozorován mírný nárůst plochy vyšší fáze (*Tabulka č. 3*) s přibýváním Cer a VMK (a tedy úbytkem Chol). Pro kontrolní směs byla stanovena plocha vyšší fáze 27,8 %. Tato hodnota se poté postupně zvyšuje (zastoupení vyšší fáze pro Chol 80 % = 30,1 %; Chol 60 % = 36,3 %; 40 % = 42,5 %; 20 % = 44,5 %) a k výraznému poklesu následně dojde u vzorku bez obsahu Chol (zastoupení vyšší fáze pro Chol 0 % = 23,1 %).

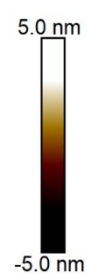
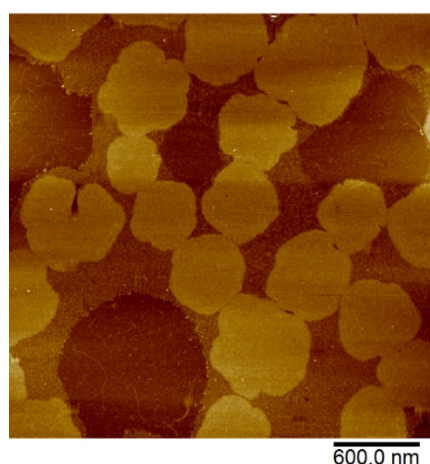
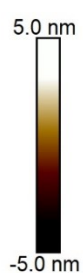
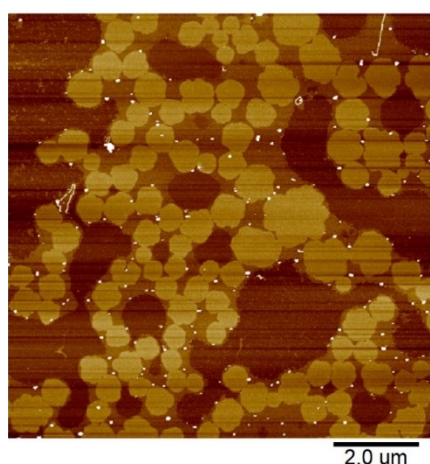
Jak již bylo řečeno, s klesajícím množstvím Chol ve vzorcích byla pozorována ztráta řetízkového charakteru vyšších domén, naopak se začínají vytvářet kulovité domény, které se postupně zmenšují. Zajímavé je, že nejmenší velikost světlých domén byla pozorována u směsi Chol 40 %. Podobný trend, tedy změna chování směsi ve 40 % Chol, byl pozorován u výsledků modulu kompresibility (*viz kapitola č. 5.2*), kde nejnižší hodnota C_{max} byla naměřena také u vzorku Chol 40 %. Opětný nárůst domén lze pozorovat od vzorku Chol. 20 %. Následný růst domén by mohl být zapříčiněný interakcemi s přibývajícím množstvím VMK ve směsi. (38)



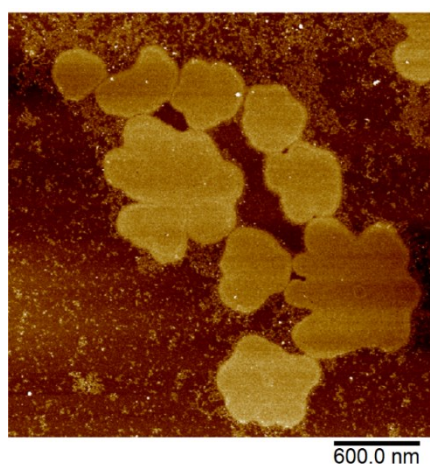
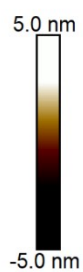
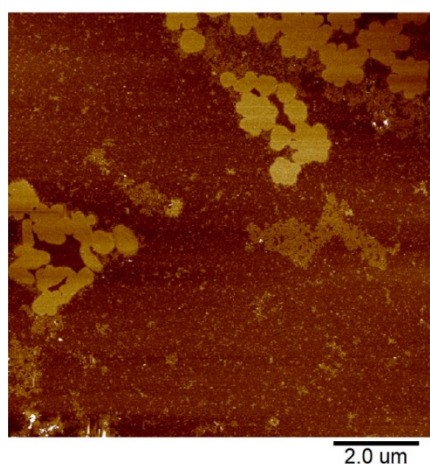
Chol
40 %



Chol
20 %



Chol
0 %



Obrázek č. 18 Zobrazení monovrstev pomocí techniky AFM. *Ve sloupci A jsou monovrstvy zobrazeny při zvětšení $10 \times 10 \mu\text{m}$ a ve sloupci B při zvětšení $3 \times 3 \mu\text{m}$.*

5.4 Hodnocení lipidových monovrstev pomocí BAM

Metoda BAM byla použita jako komplementární metoda pro studium lipidových monovrstev. Ačkoliv je BAM vysoce citlivá metoda, která dovoluje studovat struktury v řádu μm , její nevýhoda spočívá v tom, že nelze zaručit přítomnost senzoru v okolí důležitých částí monovrstvy. Při této metodě byla použita větší vanička a větší množství vzorku.

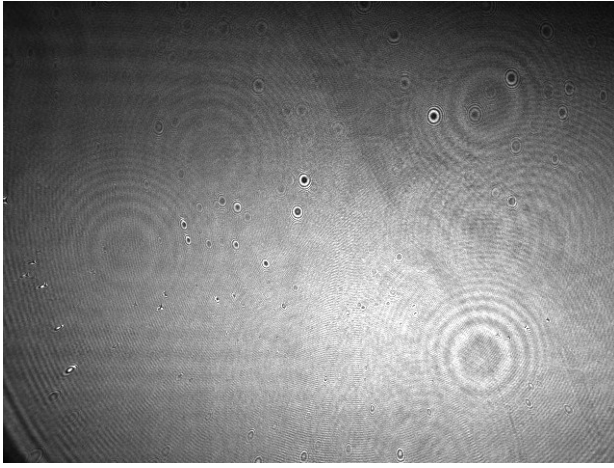
BAM dokáže zachytit především změny probíhající na mezifázi. Pokud je monovrstva kompaktní nebo není přítomna v blízkosti senzoru (tj. je zobrazena pouze subfáze), na mikrografech je viditelná pouze černá barva. Naopak jestliže je senzorem zachycena koexistence více fází, světle jsou zobrazeny části monovrstvy s těsněji uspořádanými molekulami (většinou se jedná o kapalně-rozptýlenou (L1) a kondenzovanou (L2) fázi). (44) Tvar domén může být ovlivněn nejen chemickou strukturou lipidů, ale také povrchovým tlakem, teplotou a pH subfáze. (45) V našem případě se měnilo složení jednotlivých vzorků a povrchový tlak.

Lipidové směsi jsou zachyceny na obrázcích při SP 1,5 mN/m, SP 20 mN/m a pro zajímavost je uveden i obrázek lipidové směsi, kde SP dosahuje 40 mN/m, což je tlak blízký kolapsu monovrstvy. Při přibližování bariér do středu vaničky (se zvyšujícím se SP) dochází ke snižování plochy jedné molekuly a k těsnějšímu uspořádání lipidů ve vzorcích. Hodnoty M_{ma} lipidových vzorků jsou uvedeny pod obrázky (viz obrázek č. 19), avšak nelze porovnat jejich závislost na hodnotách SP s hodnotami v kapitole 5.1, jelikož zde byla použita větší vana a větší množství pufru a vzorku a nižší rychlost bariér.

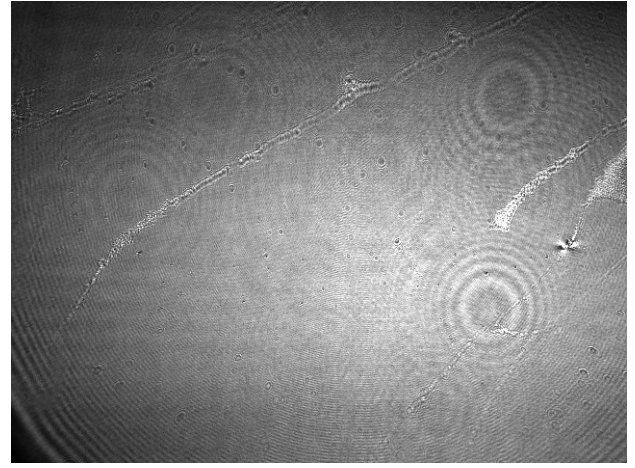
Na obrázcích je možné pozorovat zejména pruhovité domény různé šíře. Při SP 1,5 mN/m jsou viditelné širší pruhovité domény lipidů, které vystupují na povrch. Naopak při SP 20 mN/m jsou domény tenčí, ale mají stále pruhovitý charakter. Šíře domén je také ovlivněna zastoupením Chol ve vzorcích; nejtenčí domény jsou viditelné u vzorku Chol 100 % a nejširší u vzorku Chol 0 %. Tyto výsledky se shodují s literaturou (46), kde bylo nalezeno, že po přidání Chol k monovrstvě fosfolipidů, dochází k tvorbě tenkých pruhovitých útvarů. Zároveň se zvyšujícím množstvím Chol anebo se zvyšující se kompresí dochází k prodlužování a ztenčování pruhů. (46). Vznik pruhovitých domén může být také ovlivněn přítomností dipólových interakcí, které

působí mezi jednotlivými lipidy ve vzorcích. Tyto interakce ovlivňují spíše délku pruhovitých domén. Pokud na sebe dipóly působí repulzně, pak dochází ke vzniku dlouhých pruhovitých lipidových domén, anebo se mohou opačně nabitě dipóly přitahovat, což se projeví kratšími pruhovitými doménami. (45) (46) (47)

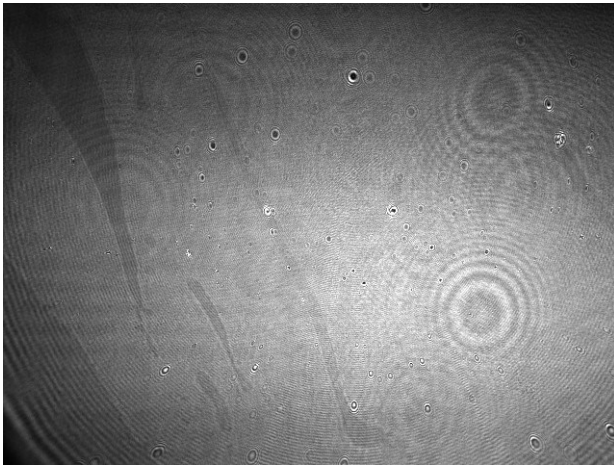
Zajímavé jsou jasně bílé bodovité domény, které se ve zvýšené míře zobrazují u směsi s částečnou deplecí Chol (Chol 40 %), ale nejsou tolik viditelné u kontrolní směsi a překvapivě ani u směsi bez obsahu Chol. V literatuře bylo nalezeno, že podobné domény jsou blíže k mikroskopu, tedy vystupují nad povrch monovrstvy. (48) Mohlo by se jednat o úseky monovrstvy, kde se kvůli vysokému SP, lipidy překloupily do vícevrstevných domén.



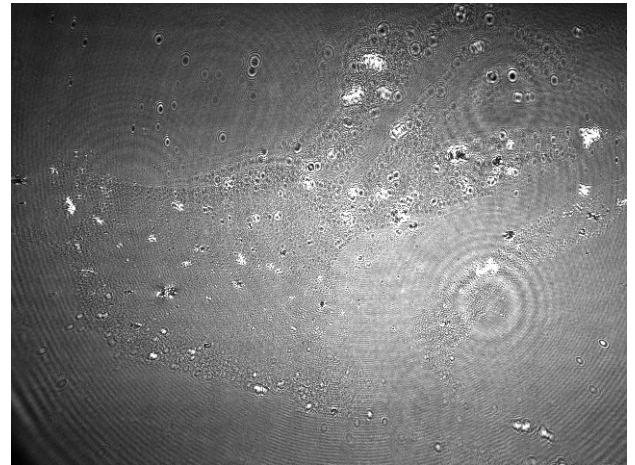
Chol 100 %
SP = 1,5 mN/m
Mma = 51,71 Å²



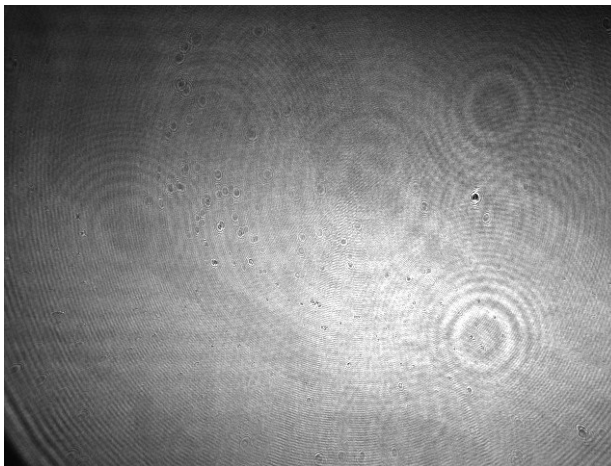
Chol 100 %
SP = 20 mN/m
Mma = 44,28 Å²



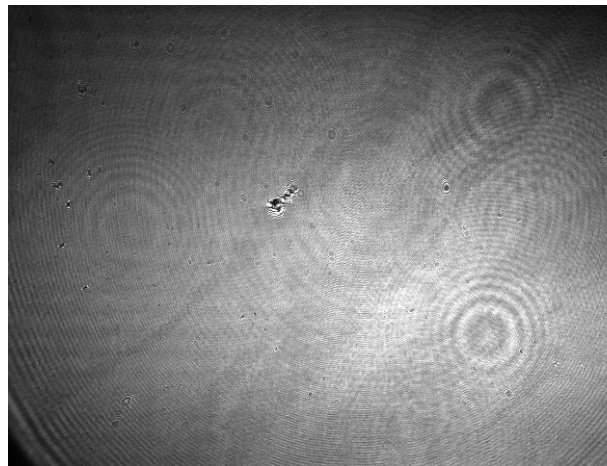
Chol 40 %
SP = 1,5 mN/m
Mma = 37,86 Å²



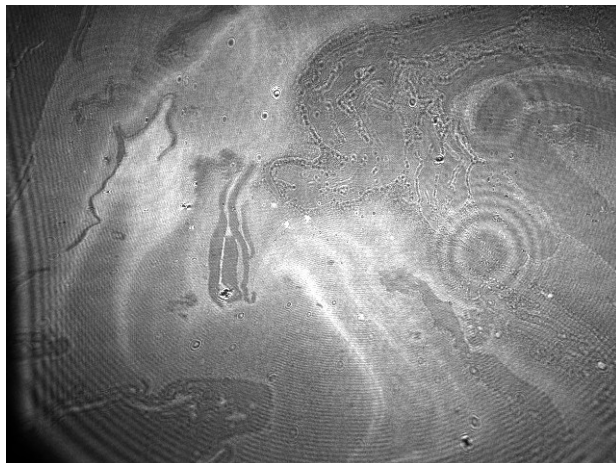
Chol 40 %
SP = 20 mN/m
Mma = 27,54 Å²



Chol 0 %
SP = 1,5 Å
Mma = 62,52 Å²



Chol 0 %
SP = 20 Å
Mma = 46,76 Å²



Chol 100 %
SP = 40 mN/m
Mma = 27,99 Å²

Obrázek č. 19 Lipidové monovrstvy zobrazené pomocí BAM. Snímky zachycují monovrstvy při kompresi 1,5 mN/m a 20 mN/m. Poslední obrázek znázorňuje monovrstvu Chol 100 % při SP = 40 mN/m.

6. Závěr

Správné uspořádání kožních lipidů v lipidové matrix SC je klíčové pro zachování bariérových vlastností kůže. V této práci byl studován vliv koncentrace Chol na uspořádávání lipidů za využití monovrstevných modelů. Jako hlavní charakterizační techniky byly použity metody Langmuirovy monovrstvy na rozhraní vzduch-kapalina, BAM a AFM.

Komplexnost měřených lipidových směsí a přítomnost lidských Cer způsobila pozvolný průběh izoterm, přičemž největší strmost vykazovala izoterma vzorku Chol 80 %. Bylo zjištěno, že různé množství Chol ve směsi má vliv zejména na samovolné uspořádávání lipidů, tj. hodnoty $A_{1,5}$ jednotlivých směsí se mezi sebou významně liší, naopak hodnoty A_{20} vykazují jen nepatrné rozdíly. Zároveň se potvrdilo, že s klesajícím množstvím Chol ve směsi se do jisté míry zvyšuje elasticita monovrstvy. Překvapivě bylo zjištěno, že tyto směsi mají daleko nižší C_{max} než podobné směsi s obsahem syntetických Cer ($3,7 \times$ nižší než směsi s obsahem CerNS 24). Protože směsi v této práci byly komplexnější a bližší fyziologickému složení lipidů ve SC než zmíněné modely se syntetickými Cer, nabízí se tedy hypotéza, že nižší C_{max} a tedy vyšší elasticita membrán může být důležitá pro fyziologickou funkci kožní bariéry. Nejnižší hodnoty C_{max} a tudíž největší elasticita, byla zjištěna u vzorku Chol 40 %. Pomocí AFM byla také u tohoto vzorku zaznamenána nejmenší velikost světlých lipidových domén. AFM mikrografy také potvrdily zvýšené „řetízování“ domén s vyšším obsahem Chol. Zdá se tedy, že Chol hraje důležitou roli v propojení lipidických domén. Velice pozoruhodné je, že podobný trend průběhu jako má graf závislosti C_{max} na koncentraci Chol a růst velikosti vyšších domén u AFM mikrografů, byl již dříve pozorován a bylo zjištěno, že vyšší množství Chol v multivrstevných membránách není nezbytně nutné pro permeabilitu, a tedy bariérovou funkci. To by mohlo souviset se zvýšenou elasticitou Chol deficitních monovrstev.

Do budoucna by mohlo být zajímavé zkoumat chování lipidové směsi s ekvimolárním množstvím Cer/VMK/Chol a s 5% přídavkem (w/w) CholS, kde by postupně klesalo množství Chol a na jeho úkor by narůstalo zastoupení CholS. Takto nastavené podmínky by mohly pomoci při objasnění patologických pochodů u recesivně X-vázané ichthyózy.

7. Bibliografie

1. ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 1. Praha : Grada, 1997. stránky 559-564.
2. KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada, 2011. stránky 473-476.
3. PETROVICKÝ, P. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi: III. svazek*. Martin : Osveta, 2002. 507-514.
4. **Struktura a funkce kůže**. *Eucerin.cz*. [Online] [Citace: 17. 9 2019.] dostupné z: <http://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze..>
5. VÁVROVÁ, K., KOVÁČIK, A., OPÁLKA, L. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, 64(2), stránky 28-35.
6. KOVÁČIK, A. *Studium vlivu hydroxylace ceramidů na permeabilitu a mikrostrukturu modelových lipidových membrán*. Univerzita Karlova. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta, 2017. Disertační práce.
7. VAN SMEDEN, J., JANSSENS, M., GOORIS, G. S., BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, 1841(3), stránky 295-313.
8. HRABÁLEK, A., VÁVROVÁ, K. Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*. 2005, 1(1), stránky 8-11.
9. ELIAS, P. M., FEINGOLD, K. R. Skin Barrier. *New York: Taylor & Francis Group*. 2006, stránky 234-240.
10. FEINGOLD, K. R., ELIAS, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, 1841(3), stránky 280-294.
11. ELIAS, P.M., WILLIAMS, M.L., CHOI, E.H., FEINGOLD, K.R. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. *BBA - Mol Cell Biol L*. 2014, 1841(3), stránky 353-61.

12. **MOJUMDAR, E.H., GOORIS, G.S., BOUWSTRA, J.A.** Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft Matter*. 2015, 11(21), stránky 4326-36.
13. **SOCHOROVÁ, M., AUDRLICKÁ, P. ČERVENÁ, M., KOVÁČIK, A., KOPEČNÁ, M., OPÁLKA, PULLMANNOVÁ, P., VÁVROVÁ, K.** Permeability and microstructure of cholesterol-depleted skin lipid. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019, 535, stránky 227–238.
14. **PROKSCH, E., ELIAS, P.M., FEINGOLD, K.R.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in murine epidermis. Modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements. *Journal Clin Invest*. 1990, 85(3), stránky 874–882.
15. **SOCHOROVÁ, M.** *Studium bariérových lipidů v kůži a kožních modelech*. Univerzita Karlova. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta, 2019.
16. **PROKSCH, E., ELIAS, P.M., FEINGOLD, K.R.** Localization and regulation of epidermal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by barrier requirements. *BBA - Lipid Lipid Met*. 1991, stránky 71-9.
17. **ELIAS, P.M., WILLIAMS, M.L., HOLLERAN, W.M., JIANG, Y.J., SCHMUTH, M. J.** Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2008, 49(4), stránky 697-714.
18. **HOLLERAN, W. M., TAKAGI, Y. a UCHIDA, Y.** Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett*. 2006, 580(23), stránky 5456-66.
19. **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), stránky 215-223.
20. **ŠKOLOVÁ, B.** *Syntéza a studium analogů ceramidů*. Univerzita Karlova. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta, 2015. Disertační práce.

21. **FLUHR, J.W., KAO, J., AHN, S.K., FEINGOLD, K.R., ELIAS, P.M., JAIN, M.** Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *Journal Invest Dermatol.* 2001, 117(1), stránky 44-51.
22. **Spolek ichtyóza.** Ichtyóza odborně. *Nemoc jako Dialog.* [Online] [Citace: 7. 10 2019.] dostupné z: <http://ichtyoza.cz/ichtyoza-odborne/>.
23. **ČAPKOVÁ, Š.** Genodermatózy kojeneckého věku. *Dermatológia pre prax.* 2010, 4(2), stránky 49-53.
24. **OKULICZ, J.F., SCHWARTZ, R.A.** Hereditary and acquired ichthyosis vulgaris. *Int J Dermatol.* 2003, 42(2), stránky 95-8.
25. **KOLB-MÄURER, A., HEINZ GRZE, K., HAAS, D.** Conradi-Hünemann-Happle Syndrome (X-linked Dominant Chondrodysplasia Punctata) Confirmed by Plasma Sterol and Mutation Analysis. *Acta Derm Venereol.* 2008, 88(1), stránky 47-51.
26. **HAŠEK, J.** Péče o pacienta s atopickou dermatitidou . *Praktické lékařství.* 2014, 10(2), stránky 53-60.
27. **ELIAS, P.M., HATONO, Y., WILLIAMS, M.L.** Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2008, 121(6), stránky 1337–1343.
28. **DI NARDO, A., WERTZ, P., GIANNETTI, A., SEIDENARI, S.** Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 1998, 78(1), stránky 27-30.
29. **BARNES, G. T., GENTLE, I. R.** *Interfacial Science: An Introuction.* New York : Oxford University Press, 2011. ISBN 978-0-19-957118-5.
30. **DOPICO, A., M.** *Methods in Membrane Lipids.* Totowa N.J : Humana Press Inc, 2010. stránky 439-457.
31. **Langmuir, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Technologies.** *Biolinscientific.com.* [Online] [Citace: 11. 9 2019.] dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/technologies/>.

32. **Brewster Angle Microscopy.** Biolinscientific.com. [Online] [Citace: 15. 9 2019.] dostupné z: <http://www.biolinscientific.com/technology/brewster-angle-microscopy/>.
33. **NORLÉN, 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), stránky 386-400.
34. **Mikroskopie atomárních sil.** *Nanometrologie.cz.* [Online] CMI, 2012. [Citace: 8. 9 2019.] dostupné z: http://www.nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php.
35. **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), stránky 77-88.
36. **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), stránky 4168-75.
37. **RŮŽIČKOVÁ K.** *Hodnocení přípravy monovrstevných lipidových modelů kožní bariéry.* Univerzita Karlova. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta, 2019. Diplomová práce.
38. **TEN GROTHENHUIS, E., DEMEL, R. A., PONEC, M., BOER, D. R., VAN MILTENBURG, J. C., BOUWSTRA, J. A.** Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophysical Journal.* 1996, 71(3), stránky 1389-1399.
39. **ŠKOLOVÁ, B., JANŮŠOVÁ, B., ZBYTOVSKÁ, J, GOORIS, G., BOUWSTRA, J., SLEPIČKA, P., BERKA, P., ROH J., PALÁT, K., HRABÁLEK, A., VÁVROVÁ, K.** Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir.* 2013, 29(50), stránky 15624-33.
40. **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), stránky 164-172.

41. **MIHALOVÁ, V.** *Studium kožních onemocnění pomocí monovrstevných lipidových modelů.* Univerzita Karlova. Hradec Králové : Farmaceutická fakulta, 2017. Diplomová práce.
42. **MCINTOSH, T. J.** *Lipid Rafts. 1.* Totowa, New Jersey : Humana Press Inc, 2007. ISBN 978-1-58829-729-7.
43. **VIST, M. R., DAVIS, J. H.** Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry.* 1990, 29 (2), stránky 451-564.
44. **FLACH, C. R., MENDELSON, 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.* 104(9), 2000, stránky 2159-2165.
45. **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), stránky 183-197.
46. **KELLER, D. J., MCCONNELL, H. M., MOY, V. T.** Theory of superstructures in lipid monolayer phase transitions. *J. Phys. Chem.* 1986, 90(11), stránky 2311–2315.
47. **SEUL, M., ANDELMAN, D.** Domain Shapes and Patterns: The Phenomenology of Modulated Phases. *Science.* 1995, 267(5197), stránky 476-483.
48. **PATTERSON, M., VOGEL, H. J., PRENNER, E. J.** Biophysical characterization of monofilm model systems composed of selected tear film phospholipids. *BBA-Biomembranes.* 1858 (2), 2016, stránky 403-414.