

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



Simulace molekulárních modelů membrán kůže

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Petr Voňka
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Fyzikální chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Konzultantka:	Mgr. Markéta Paloncýová, Ph.D.
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 5. 5. 2017

Petr Voňka

Touto cestou bych chtěl poděkovat své konzultantce Mgr. Markétě Paloncýové, Ph.D. a svému vedoucímu doc. RNDr. Karlu Berkovi, Ph.D. za vedení a poskytnuté cenné rady při tvorbě diplomové práce. Mé poděkování patří též celému kolektivu z kanceláře 3.004 za vstřícnost při konzultacích a pohodovou atmosféru. Zvláštní poděkování potom náleží mé rodině a kamarádům za trpělivost a podporu ve vypjatých situacích.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Voňka
Název práce	Simulace molekulárních modelů membrán kůže
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Ceramidy jsou lipidy, které jsou zodpovědné za neprůchodnost kůže, potažmo její nejsvrchnější vrstvy - <i>strata cornea</i>, pro cizí látky z našeho okolí. Tato diplomová práce popisuje, jak se jednotlivé typy chovají v monovrstvách, které se nacházejí na rozhraní vody se vzduchem pomocí molekulárně dynamických simulací. Bylo přitom pozorováno, že ceramidy přecházejí ve zkoumaných systémech z vlásenkové („hairpin“) do roztažené („extended“) konformace, ale nikoli opačně, přičemž ale interakce s vodou „hairpin“ konformaci stabilizuje. Povrch vystavený vzduchu tak je z větší části nepolární. U ceramidů jsme dále pozorovali „řetízkování“ jednotlivých molekul, které se nejvíce projevovalo u ceramidu NP. Tato práce může být odrazovým můstkem k bližšímu pochopení odlišných vlastností a funkcí různých ceramidů v naší kůži.</p>
Klíčová slova	Ceramidy, monovrstvy, molekulová dynamika
Počet stran	69
Počet příloh	8
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Petr Voňka
Title	Simulation of the Molecular Models of Skin Membranes
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Karel Berka, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>Ceramides are lipids, which are responsible for impermeability of human skin, mostly of its uppermost part - <i>stratum corneum</i>, for xenobiotics from outer environment. This diploma thesis describes the behaviour of ceramide types on the water/air interface using molecular dynamics simulations. We have observed that ceramides preferentially changed their conformation from hairpin to extended form, whereas the direct interaction with water stabilized the hairpin conformation. As a result, the air surface of ceramide layer is mostly nonpolar. Furthermore, we have observed a formation of ceramide „chains“, which was the most profound at ceramide NP. This thesis can serve as a building block for our detailed understanding of properties and functions of individual ceramide types in our skin.</p>
Keywords	Ceramides, monolayers, molecular dynamics simulations
Number of pages	69
Number of appendices	8
Language	Czech

OBSAH

<u>1. ÚVOD</u>	<u>1</u>
<u>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</u>	<u>2</u>
2.1 BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY	2
2.1.1 STRUKTURA BIOLOGICKÝCH MEMBRÁN	2
2.1.2 SLOŽENÍ BIOLOGICKÝCH MEMBRÁN - LIPIDY	2
2.2 LIPIDY	3
2.2.1 VLIV TVARU MOLEKUL LIPIDŮ NA STRUKTURU MEMBRÁN	4
2.2.2 CERAMIDY	4
2.2.3 CHOLESTEROL	5
2.2.4 VOLNÉ MASTNÉ KYSELINY	7
2.3 LIDSKÁ KŮŽE	8
2.3.1 VLASTNOSTI KŮŽE	8
2.3.2 SUBCUTIS	8
2.3.3 DERMIS	8
2.3.4 EPIDERMIS	8
2.4 STRATUM CORNEUM	10
2.4.1 STRUKTURA STRATA CORNEA	10
2.4.2 LATERÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ VE STRATU CORNEU	11
2.4.3 MODEL Y USPOŘÁDÁNÍ LIPIDŮ V MATRICI STRATA CORNEA	13
<u>3. SIMULAČNÍ METODY</u>	<u>20</u>
3.1 SOFTWARE	20
3.2 MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKA	20
3.3 PARAMETRY MOLEKULÁRNĚ DYNAMICKÝCH SIMULACÍ	20
3.4 SIMULOVANÉ SYSTÉMY	21
3.5 PŘÍPRAVA SIMULAČNÍCH BOXŮ S MONOVRSTVAMI	23
3.6 ANALÝZA PARAMETRŮ MEMBRÁN	25
3.6.1 PLOCHA LIPIDU	25
3.6.2 DISTRIBUCE ÚHLŮ SVÍRANÝCH ŘETĚZCI CERAMIDŮ	25
3.6.3 ANALÝZA VODÍKOVÝCH VAZEB	25
<u>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</u>	<u>27</u>
4.1 VLIV SFINGOSINOVÉHO ŘETĚZCE NA KONFORMACI CERAMIDŮ	27
4.2 VLIV TYPU A KONFORMACE CERAMIDŮ NA PLOCHU LIPIDU	30
4.3 SÍŤ VODÍKOVÝCH VAZEB	32
4.3.1 INTRAMOLEKULÁRNÍ VODÍKOVÉ VAZBY V CERAMIDECH	33
4.3.2 INTERMOLEKULÁRNÍ VODÍKOVÉ VAZBY MEZI CERAMIDY	35
4.3.3 INTERMOLEKULÁRNÍ VODÍKOVÉ VAZBY MEZI CERAMIDY A VODOU	38
4.4 ŘETÍZKOVÁNÍ MOLEKUL CERAMIDŮ	40
4.5 TRENDY CHOVÁNÍ CERAMIDOVÝCH TYPŮ	42

5. ZÁVĚR	44
6. SUMMARY	45
7. LITERATURA	46
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	52
9. PŘÍLOHY	54
9.1 PŘÍLOHA 1 - CERAMID NDS(24:0)	54
9.2 PŘÍLOHA 2 - CERAMID NP(24:0)	55
9.3 PŘÍLOHA 3 - CERAMID NH(24:0)	56
9.4 PŘÍLOHA 4 - CERAMID NT(24:0)	57
9.5 PŘÍLOHA 5 - INTERMOLEKULÁRNÍ VODÍKOVÉ VAZBY	58
9.6 PŘÍLOHA 6 - ŘETÍZKOVÁNÍ II.....	59
9.7 PŘÍLOHA 7 - ŘETÍZKOVÁNÍ III	60
9.8 PŘÍLOHA 8 - ŘETÍZKOVÁNÍ IV.....	61

CÍLE PRÁCE

Cílem práce je studium chování lipidů *strata cornea* v různých prostředích.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku

- biologických membrán
- lidské kůže a specificky *strata cornea*
- modelů uspořádání lipidů v matrici *strata cornea*

V praktické části byly realizovány simulace zaměřené na studium

- simulací monovrstev různých ceramidů

1. ÚVOD

Kůže je největší lidský orgán, který nás nejen ohraničuje, ale i chrání před škodlivými vlivy z okolního prostředí. Za tuto ochranu je zodpovědná především její nejsvrchnější vrstva, která se nazývá *stratum corneum*. Ta je tvořena cholesterolem, volnými mastnými kyselinami a ceramidy v molárním poměru zhruba 1:1:1. Pro průchod látek skrz membrány kůže jsou však nejdůležitější ceramidy. Pochopit, jaký vliv má struktura těchto převážně nepolárních molekul, by mělo nemalý význam, protože by nám to umožnilo lépe pochopit řadu kožních onemocnění, která by se potom možná dala léčit, nebo by léčiva mohla být podávána náplastí skrz kůži, což by pacientům přineslo zvýšení jejich komfortu. Tato diplomová práce se zabývá chováním ceramidů na rozhraní vody a vzduchu či vakua.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Biologické membrány

Biologické membrány umožňují život tak, jak ho známe. Obklopují buňky i jejich jednotlivé orgány, čímž pro buňku definují její vnitřní i vnější prostředí. Jsou polopropustné, čímž kontrolují, jaké látky přes ně z okolí procházejí dovnitř buněk i celých organismů (Watson, 2015).

2.1.1 Struktura biologických membrán

První krok k objasnění struktury biologických membrán udělal americký chemik a fyzik Irving Langmuir. Sestavil přístroj, díky kterému mohl vytvořit molekulární vrstvy lipidů na rozhraní vody a vzduchu (Langmuir, 1917). Na základě tohoto pokusu navrhl, že hlavičky lipidů jsou obráceny směrem k vodě, zatímco jejich hydrofobní řetězce se orientují směrem ke vzduchu.

Holandští vědci Evert Gorter a François Grendel (Gorter a Grendel, 1925) využili Langmuirův přístroj trochu jiným způsobem než jeho autor. Extrahovali lipidy z červených krvinek a posléze z nich vytvořili monovrstvu. Když změřili plochu, kterou tyto lipidy zaujaly, tak zjistili, že je dvakrát větší než povrch červených krvinek, ze kterých byly extrahovány. Toto zjištění je vedlo k závěru, že buněčná membrána je tvořena dvěma tenkými vrstvami lipidů. V této dvojvrstvě jsou pak lipidy obráceny svými polárními hlavami směrem ven, tj. k vodnímu prostředí, a nepolárními řetězci dovnitř dvojvrstvy. Tento model odpovídá základním představám, jaké máme o buněčných membránách dnes.

2.1.2 Složení biologických membrán - lipidy

Složení biologických membrán bylo poprvé zkoumáno britským biologem Charlesem Ernestem Overtonem, který na samém sklonku 19. století vyslovil hypotézu, že vrstvy obklopující buňky se skládají z lipidů a cholesterolu (Heimburg, 2007).

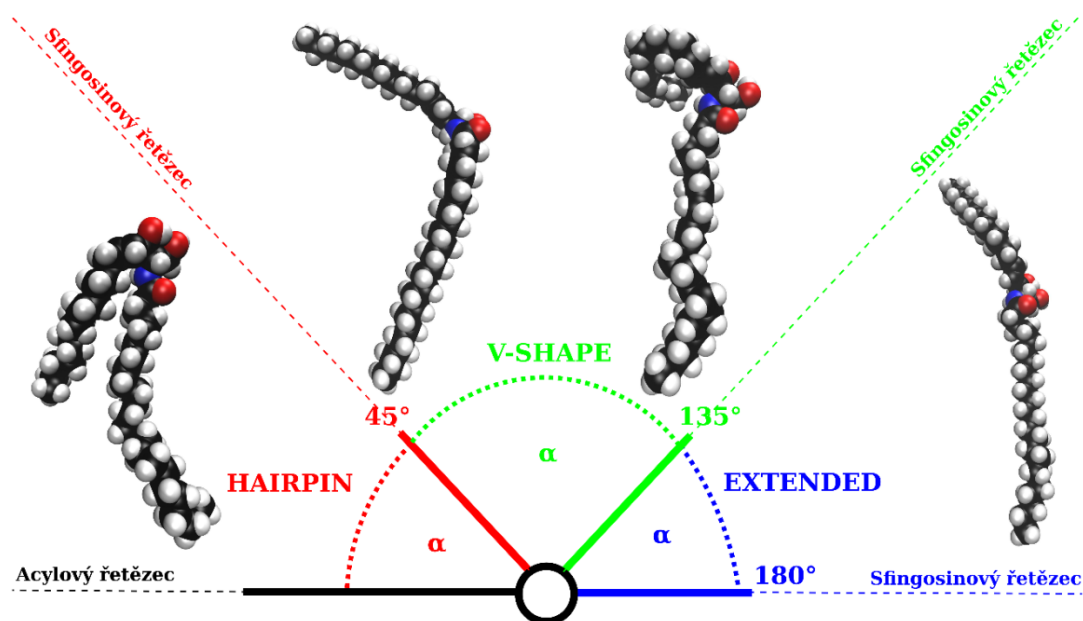
Většina lipidů, ze kterých jsou tvořeny membrány, patří mezi fosfolipidy (Alberts *et al.*, 2008). Jejich základem je trojsytný alkohol glycerol, který má na prvních dvou hydroxy skupinách navázané mastné kyseliny a na poslední fosfát. Na fosfátu je pak vázána ještě další molekula. Nejvýznamnějšími fosfolipidy, které se podílejí na tvorbě membrán, jsou fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylcholin (PC), lysofosfatidylcholin (LPC) a sfingomyelin (SM).

Membrány kůže, kterými se tato práce zabývá, mají ale odlišné složení. Zde jsou dominantní skupinou lipidů ceramidy, volné mastné kyseliny a cholesterol.

2.2 Lipidy

Všechny lipidy, které se podílejí na tvorbě membrán, jsou amfifilní molekuly (Alberts *et al.*, 2008). To znamená, že jedna část molekuly je polární a druhá nepolární. Ve vztahu k vodě jako nejběžnějšímu rozpouštědлу se polární část molekuly označuje také jako hydrofilní a nepolární jako hydrofobní. Polární část lipidů se označuje jako hlava. Nachází se zde silně elektronegativní atomy, které mohou vytvářet vazby vodíkovými můstky. Nepolární část lipidů je většinou tvořena uhlovodíkovými řetězci. Amfifilita je klíčová vlastnost pro tvorbu struktur, ve kterých se lipidy v buňce vyskytují.

Amfifilní lipidy se mohou vyskytovat ve dvou strukturních konformacích (Obr. 1), které se vzájemně liší uspořádáním řetězců (Corkery, 2002). První z nich se označuje anglickým termínem „hairpin“, který se dá do češtiny přeložit jako „vláseňka“. Stejně jako ramena sponky do vlasů (vláseňky) jsou orientována shodným směrem, tak i oba řetězce lipidů v této konformaci ukazují na stejnou stranu. Dlouho se předpokládalo, že je to jediné možné uspořádání. Později se však zjistilo, že chování amfifilních lipidů je mnohem složitější. Druhá konformace, kterou mohou zaujmout, se označuje anglickými termíny „extended“, „anti-parallel“ nebo „splayed“, které se dají přeložit jako „roztažený“. Řetězce takto uspořádaného amfifilního lipidů směřují každý na opačnou stranu. Mezi vláseňkovou a roztaženou konformací pak je ještě přechodová konformace označovaná jako „V-shape“, kdy obě ramena lipidů tvoří písmeno V. Má se za to, že konformace významně ovlivňuje vlastnosti dotyčného lipidového uspořádání.



Obr. 1: **Konformace ceramidů.** Ceramidy se mohou vyskytovat v několika konformacích, které se liší vzájemným uspořádáním řetězců. Pokud oba řetězce ukazují na stejnou stranu, tak se molekula nachází v „hairpin“ konformaci. Pokud každý řetězec směřuje na opačnou stranu, tak se molekula nachází v „extended“ konformaci. Mezi těmito dvěma krajními konformacemi se nachází ještě „V-shape“.

2.2.1 Vliv tvaru molekul lipidů na strukturu membrán

Parametr, který charakterizuje tvar lipidové molekuly, se nazývá kritický sbalovací parametr P_s (Frolov *et al.*, 2011). Je roven následujícímu výrazu:

$$P_s = \frac{V}{A \cdot l} \quad (1)$$

kde „ V “ je skutečný objem nepolární části lipidů, „ A “ je plocha zaujímaná polární hlavičkou a „ l “ je délka nepolární části. Pokud je $P_s \sim 1$, tak molekula lipidů má válcový tvar. Takové lipidy, např. PC, mají za normálních fyziologických podmínek bez vnějšího tlaku tendenci vytvářet dvojvrstvy. Pokud je $P_s > 1$, pak molekula lipidů odpovídá tvaru kužele. Jedná se např. o PE. Pokud je $P_s < 1$, potom bude molekula lipidů mít tvar obráceného kužele. Do této skupiny patří např. LPC nebo ceramidy.

Lipidy, u kterých P_s není zhruba rovno jedné, pak mají tendenci vytvářet různá zakřivení a nerovinné útvary. Jejich příkladem může být *micela* (Kodíček a Karpenko, 2002). Micela je kulovitý útvar, ve kterém jsou lipidy otočeny svými hlavami směrem k polárnímu rozpouštědлу, např. vodě, a svoje nepolární části mají uzavřené uvnitř vzniklého útvaru. Pokud se lipidy nacházejí v nepolárním prostředí, např. v oleji, tak je uspořádání polárních a nepolárních částí opačné. Takovýto útvar se pak nazývá *invertovaná micela*.

2.2.2 Ceramidy

Charakteristika ceramidů

Jako ceramid se označuje derivát sfingosinu, který má na aminoskupině navázaný zbytek mastné kyseliny (Mencarelli a Martinez-Martinez, 2013). Z pohledu organické chemie je tedy ceramid amidem sfingosinu. Sfingosin je nenasycený aminoalkohol, který má v poloze dva aminoskupiny.

Délka jak sfingosinového, tak acylového řetězce je proměnlivá (Mencarelli a Martinez-Martinez, 2013). Sfingosinová část může být dlouhá 16 – 20 atomů uhlíku, zatímco acylový řetězec může být tvořen 14 – 30 atomy uhlíku.

Dále je ještě na sfingosinovém řetězci v poloze jedna umístěna hydroxyskupina, která může být dále modifikována (Mencarelli a Martinez-Martinez, 2013). Mohou se na ni vázat různé polární skupiny, čímž vznikají důležité stavební prvky biologických membrán. Jedná se o některé fosfolipidy, pokud se jako polární skupina váže struktura se zbytkem kyseliny fosforečné, nebo glykosfingolipidy, pokud se na hydroxyskupinu naváže nějaký sacharid. Ceramidy jsou základní molekuly, ze kterých je vystavěna lipidová matrice *strata cornea*.

Názvosloví ceramidů

Ceramidy, které se nacházejí ve *stratu corneu*, je možné pojmenovat podle dvou nomenklatur (Obr. 2A; van Smeden *et al.*, 2014). Podle starší nomenklatury se ceramidy označují triviálně, kde se jako první napíše slovo ceramid a k němu se přidá číslo 1 až 9. Novější nomenklatura je založena na zkratkách, které charakterizují chemickou strukturu daného ceramidu, tj. udává, jaké funkční skupiny se nacházejí v jeho struktuře. Takto sestavené zkratky potom označují dvanáct podtříd ceramidů.

První část zkratky reprezentuje typ acylového řetězce, který je navázaný na sfingoidní bázi (van Smeden *et al.*, 2014). Amidovou vazbou na něj může být navázán zbytek nederivatizované mastné kyseliny (N), nebo zbytek mastné kyseliny s α -hydroxyskupinou (A) a nebo zbytek mastné kyseliny esterifikované na její ω -hydroxyskupině (EO).



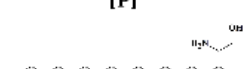
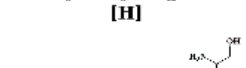
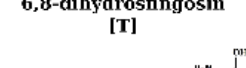
Druhá část zkratky představuje sfingoidní bázi, na kterou je acyl navázán (Mencarelli a Martinez-Martinez, 2013). Byly identifikovány celkem čtyři báze. První z nich je sfingosin (S), který obsahuje trans dvojnou vazbu mezi čtvrtým a pátým uhlíkem. Další je dihydrosfingosin (běžně se pojmenovává jako sfinganin; dS), který má oproti sfingosinu dva vodíky navázané po jednom na uhlících číslo čtyři a pět, čímž zaniká dvojná vazba. Další bázi je fytosfingosin (P), který neobsahuje ve svém řetězci násobnou vazbu a má na čtvrtém uhlíku navázanou hydroxyskupinu. Další bázi je 6-hydroxysfingosin (H). Poslední možností je 6,8-dihydrosfingosin (T), který obsahuje čtyři hydroxylované skupiny.

Acylový řetězec obsahuje variabilní počet atomů uhlíku, a proto jsou jednotlivé ceramidy přesně určeny, až když se definuje počet uhlíků a počet násobných vazeb u zbytku mastné kyseliny. Za tímto účelem se používá klasická nomenklatura mastných kyselin tak, jak je známa z organické chemie. Například jedním z nejčastějších ceramidů v kůži je ceramid NS24, který používám v této práci v simulacích a který obsahuje lignocerovou kyselinu.

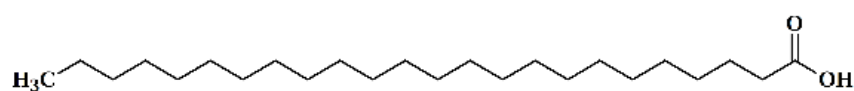
2.2.3 Cholesterol

Cholesterol (Obr. 2C) je nejčastěji se vyskytující zástupce sterolů v lidském *stratu corneu*. Jeho úkolem v této struktuře je nejspíše udržet její kapacitu jakožto kožní bariéry. Tuto domněnku lze podpořit informacemi z několika experimentů. Pokud jsou jeho koncentrace vyšší než 30 mol%, tak podporuje tvorbu lamelárních struktur (Takahashi *et al.*, 1996). Jinými slovy dochází k poklesu rizika vzniku pórů či nelamelárních fází, které jsou spojovány s negativními vlivy na funkci kožní bariéry. Zvyšuje pohyblivost řetězců lipidů v gelové fázi (de Kruffy *et al.*, 1974). Poskytuje totiž gelové fáze méně viskózní, které jsou pak více odolné vůči mechanické zátěži. Rozšiřuje oblasti fázového přechodu (McMullen a McElhaney, 1995). V některých případech dokonce může úplně zrušit přechody mezi jednotlivými gelovými fázemi. Na druhou stranu, pokud je cholesterolu tolik, že přesáhne míru rozpustnosti, tak se vytvářejí domény, které se

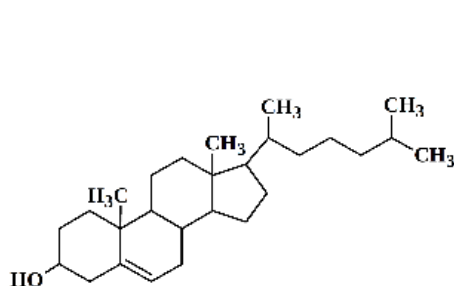
skládají čistě z cholesterolu. Ty pak zase zvyšují nebezpečí vzniku nesouvislých lamelárních struktur. Zdá se tedy, že cholesterol stabilizuje strukturu, ve které se *stratum corneum* nachází.

MASTNÁ KYSELINA SFINGOIDNÍ BÁZE	Mastná kyselina bez hydroxylové skupiny [N]	α -hydroxy mastná kyselina [A]	ω -hydroxy ester mastné kyseliny [EO]
Dihydrosfingosin [dS] 	CER[NdS] (Ceramid 10)	CER[AdS] (Ceramid 11)	CER[EoS]
Sfingosin [S] 	CER[NS] (Ceramid 2)	CER[AS] (Ceramid 5)	CER[EOS] (Ceramid 1)
Fytosfingosin [P] 	CER[NP] (Ceramid 3)	CER[AP] (Ceramid 6)	CER[EOP] (Ceramid 9)
6-hydroxysfingosin [H] 	CER[NH] (Ceramid 8)	CER[AH] (Ceramid 7)	CER[EOH] (Ceramid 4)
6,8-dihydrosfingosin [T] 	CER[NT] (Ceramid 1)	CER[AT] (Ceramid 1)	CER[EOT] (Ceramid 1)

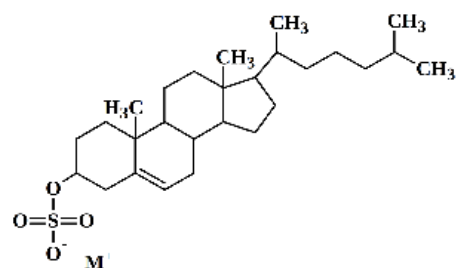
A



B



C



D

Obr. 2: **Lipidy strata cornea.** Matrice *strata cornea* je tvořena ceramidy, jejich nomenklatura je uvedena v tabulce (A), volnými mastnými kyselinami, jejichž nejčastějším zástupcem je kyselina lignocerová (B), cholesterolem (C) a cholesterolem sulfátem (D).

Zřejmě je cholesterol také zapojen v mechanismech, které udržují nenasycené mastné kyseliny vně lamelárních fázových domén (Wertz, 2006). Tyto nenasycené mastné kyseliny vznikají v poslední fázi procesu keratinizace, kde dochází k degradaci fosfolipidů. Taková nenasycená mastná kyselina, např. kyselina oleová, je pak přenesena na cholesterol, kde dojde ke vzniku jeho esteru. Jelikož estery cholesterolu nejsou schopny se dobře přizpůsobit membránám, tak bylo navrženo, že jsou pak separovány jako samostatná fáze do izolovaných dutin v mezibuněčném prostoru *strata cornea*. Estery cholesterolu byly dlouhou dobu považovány za původce procesu keratinizace. Nicméně tyto lipidy, které se vyskytují v kapalné fázi, se pravděpodobně nenachází v mezibuněčných lamelách.

Cholesterol sulfát (Obr. 2D) je dalším menšinovým steroidem *strata cornea*, který se podílí na regulaci procesu deskvamace (Wertz, 2006). Ukazuje se totiž, že cholesterol sulfát inhibuje serinové proteasy, které degradují desmosomální proteiny, jejichž úkolem je oddělování buněk. Aby mohlo dojít k proteolytické degradaci desmosomů, musí na scénu přijít sterolsulfatasa, která katalyzuje hydrolýzu cholesterol sulfátu. Že tato látka má vliv na deskvamaci potvrzují i studie, jenž se zaměřují na genetická onemocnění spojená s poškozením funkčnosti sterolsulfatasy. Je s nimi totiž spojen ne zcela jednoduchý proces deskvamace.

2.2.4 Volné mastné kyseliny

Typické mastné kyseliny (Obr. 2B), které se nacházejí ve *stratu corneu*, mají nasycené řetězce o délce 14 – 28 uhlíků. Nejčastěji se vyskytují mastné kyseliny s dlouhými řetězci, tj. ty, které mají ve svém řetězci více než 20 uhlíků. Z nich nejvíce zastoupeny jsou kyselina behenová, která má 22 uhlíků, a kyselina lignocerová, která má 24 uhlíků (Bouwstra *et al.*, 2006). Čím více se však blížíme k povrchu kůže, tím více se objevují mastné kyseliny s krátkými řetězci, např. kyselina palmitová se 16 uhlíky, kyselina stearová s 18 uhlíky či kyselina arachidonová s 20 uhlíky. Spolu s nimi byly detekovány také nenasycené mastné kyseliny s krátkými řetězci, mezi které se řadí kyselina vacenová (C18:1) s jednou dvojnou vazbou a kyselina linoleová (C18:2) se dvěma dvojnými vazbami. Není zcela jasné, jestli mastné kyseliny, které mají buď krátký řetězec, nebo jsou nenasycené, mají svůj původ ve *stratu corneu*, nebo se do něj dostaly z vrstvičky mazu, který pokrývá pokožku.

Přítomnost mastných kyselin, které mají krátké nebo středně dlouhé řetězce, ať už jsou nasycené, či nikoli, je však ve svrchních vrstvách *strata cornea* velmi proměnlivá (Bouwstra *et al.*, 2006). Pro vysvětlení těchto zjištění bylo navrženo, že zmiňované mastné kyseliny jsou rozpouštěny povrchově aktivními látkami, které jsou obsaženy v mycích prostředcích. Následně jsou pak při koupeli odstraněny. Mastné kyseliny jsou hlavními ionizovatelnými lipidy, které se nachází v lidském *stratu corneu*. Z tohoto důvodu mohou být nezbytné pro tvorbu lamel.

2.3 Lidská kůže

2.3.1 Vlastnosti kůže

Kůže je náš nejsvrchnější a také největší orgán. Má pro nás nedocenitelný význam, ale její nejvýznamnější funkcí bezesporu je, že tvoří bariéru, která nás chrání před mechanickým poškozením a škodlivými vlivy vnějšího prostředí. Chrání nás proti ztrátě vody. Podílí se na regulaci naší tělesné teploty. Díky velkému množství nervových vláken a zakončení je kůže také důležitým smyslovým orgánem (Menon a Kligman, 2009).

Strukturně lze kůži rozdělit do tří vrstev, které se nazývají *subcutis*, *dermis* a *epidermis*. Ty se vzájemně liší jak buněčným složením, tak svojí stavbou a funkcí (Kolarsick *et al.*, 2009).

2.3.2 Subcutis

Subcutis (podkoží) je nejspodnější vrstva kůže (Igarashi *et al.*, 2005). Jejím hlavním úkolem je absorbovat nárazy, které by mohly poškodit krevní řečiště a nervová zakončení. Proto je elastická a je v ní uloženo velké množství tukových buněk. Tloušťka této vrstvy se pohybuje v průměru od 4 do 9 mm. Je nutné ale poznamenat, že její skutečná šířka je odlišná nejen u každé osoby, ale i u jednotlivých partií těla.

2.3.3 Dermis

Nad *subcutis* se nachází *dermis* (škára). Běžně dosahuje šířky od 1 do 4 mm (Igarashi *et al.*, 2005). Je to systém vláken, filament a amorfní pojivové tkáně, který je uzpůsoben vstupu nervů a cév (Kolarsick *et al.*, 2009). Díky této síti vláken a tukové tkáni poskytuje kůži elasticitu a pevnost v tahu (Menon a Kligman, 2009). Vláknina jsou tvořena hlavně proteiny kolagenem a elastinem. Kolagen brání nadměrnému natahování, elastin zase umožňuje obnovení původního stavu po natažení. Tuková vrstva slouží ke zmírnění účinku nárazu tím, že dojde ke změně jejího tvaru.

2.3.4 Epidermis

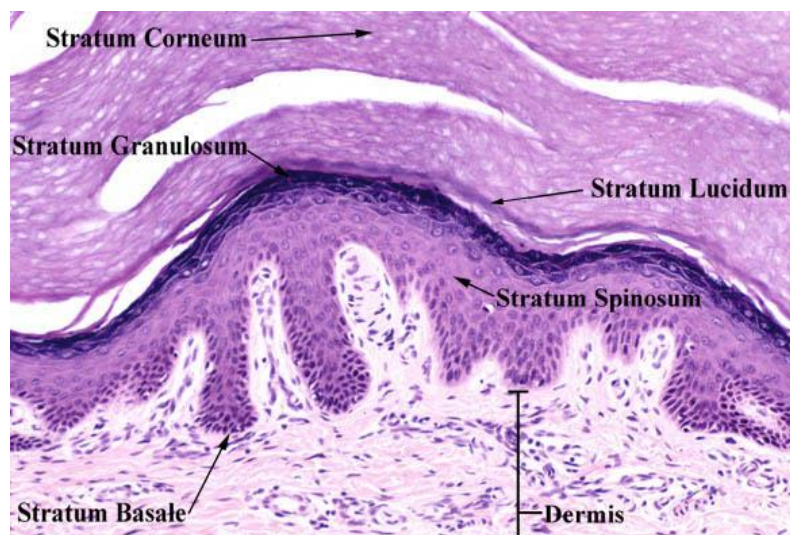
Epidermis (pokožka) je nejsvrchnější vrstva kůže. Její tloušťka se pohybuje od 0,04 mm v oblasti očních víček až k 1,5 mm (Igarashi *et al.*, 2005) v místech, kde je kůže mechanicky nejvíce namáhána, např. na dlaních a chodidlech. V této vrstvě se nevyskytují žádné žíly ani kapiláry.

Nejpočetnějším typem buněk v *epidermis* jsou keratinocyty (Igarashi *et al.*, 2005). V těchto buňkách je produkován keratin, což je skleroprotein s vláknitou strukturou, který se podílí na tuhosti (neohebnosti) nejsvrchnější vrstvy kůže. Keratinocyty se v *epidermu* pohybují směrem od jeho vnitřní strany k jeho vnější straně. V průběhu tohoto procesu

podléhají diferenciaci. Podle své funkce a struktury se jejich jednotlivé typy označují jako bazální buňky (angl. „basal cells“), trnové buňky (angl. „prickle cells“), zrnité buňky (angl. „granular cells“) a zrohovatělé buňky (angl. „horny cells“). Podle stádia, ve kterém se keratinocyty nacházejí, se *epidermis* dále dělí do pěti vrstev, které se nazývají *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (Obr. 3).

Nejspodnější vrstvou *epidermis* je *stratum basale*. Bazální buňky mají tvar válce (Kolarsick *et al.*, 2009), který je orientován kolmo k *dermis*. V této vrstvě dochází primárně k dělení buněk, které se posléze posouvají do vyšších vrstev *epidermis*.

Jak postupují buňky směrem k povrchu kůže, tak se v nich začnou vytvářet lamelární tělíska, což jsou membránou obalené organely (Kolarsick *et al.*, 2009). Ty obsahují jak množství látek, jako jsou glykoproteiny, glykolipidy, fosfolipidy či steroly, tak velké množství hydrolas, jako jsou lipasy, proteasy, kyselé fosfatasy a glykosidasy. Hydrolasy mají za úkol upravit lipidy do výsledné podoby buď ceramidů, nebo volných mastných kyselin (Igarashi *et al.*, 2005).



Obr. 3: **Struktura epidermis.** Epidermis se dělí na dalších pět vrstev, kterými jsou *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. Převzato z <http://www.nku.edu/~dempseyd/SKIN.htm>.

Další vrstva se nazývá *stratum spinosum*. Její tloušťka je 5 – 10 buněk. Tato vrstva se skládá z buněk velmi rozdílných tvarů a struktur. Keratinocyty se zde označují jako trnové buňky.

Následující vrstva se označuje jako *stratum granulosum*. Je to poslední vrstva, ve které se nacházejí živé buňky. Ty jsou zodpovědné za další syntézu a modifikaci proteinů, které jsou následně zapojeny do procesu keratinizace, který zde začíná (Kolarsick *et al.*, 2009). V jeho průběhu dochází k rozpouštění organel uvnitř buňky, jako jsou jádro či mitochondrie (Igarashi *et al.*, 2005). Buňky se začínají vyplňovat vlákny keratinu a dochází i ke zmenšení obsahu vlhkosti uvnitř buněk oproti jejich předešlým vývojovým stádiím. Tvarově se buňky začínají zplošťovat.

Stratum lucidum je tenká vrstva mrtvých buněk (Igarashi *et al.*, 2005), která se nachází mezi *stratum granulosum* a *stratum corneum*. Je široká 3 – 5 buněk. Své jméno dostala díky tomu, že pod mikroskopem je průsvitná. Nachází se pouze v oblasti dlaní a chodidel.

Poslední vrstvou epidermis je *stratum corneum*. Zde je dokončen proces diferenciaci keratinocytů (Kolarsick *et al.*, 2009), na jehož konci jsou mrtvé a zcela ploché buňky, které se označují jako korneocyty. Ty jsou zodpovědné za mechanickou ochranu kůže. Také slouží jako prevence ztráty vody a vstupu cizích látek do kůže. Korneocyty jsou bohaté na proteiny, ale obsahují jen malé množství lipidů. Během závěrečné fáze procesu keratinizace zcela vymizí buněčné orgány a cytoplasma (Denda, 2002). Lamelární tělíčka, která obsahují i lipidy, podléhají exocytose a lipidy se tak dostávají do *strata cornea*, kde zaujímají své místo v mezibuněčné lipidové matrix. Korneocyty jsou pak dále posouvány směrem k povrchu pokožky (Igarashi *et al.*, 2005), ze kterého jsou následně uvolněny například odlupováním nebo třením. Proces uvolňování korneocytů z pokožky se nazývá deskvamace.

2.4 *Stratum corneum*

2.4.1 Struktura *strata cornea*

Stratum corneum představuje kožní bariéru, která zabraňuje samovolnému pronikání látek přes pokožku (Kolarsick *et al.*, 2009). Tato její vlastnost je dána jednak jejím složením a jednak její strukturou. *Stratum corneum* je tvořeno ze 70 % (m/m) proteiny, z 15 % (m/m) lipidy a z 15 % (m/m) vodou (Fore-Pfliger, 2004). Tyto složky jsou uspořádány do struktury (Obr. 4), která je nejčastěji připodobňována k cihlové zdi (Elias a Feingold, 2006). Cihly představují korneocyty (mrtvé buňky), kolem kterých se nachází malta, jež reprezentuje lipidovou mezibuněčnou hmotu. Tato hmota se často označuje jako matrix či matrice. Korneocyty jsou k lipidům vázány kovalentně.

Obecně je přijímán názor, že korneocyty jsou odpovědné za celistvost *strata cornea*, zatímco lipidy regulují ostatní jeho vlastnosti, jako je transport vody, vlastnosti bariéry pro prostup látek a schopnost se přizpůsobit vnějšímu tlaku (Elias a Feingold, 2006).

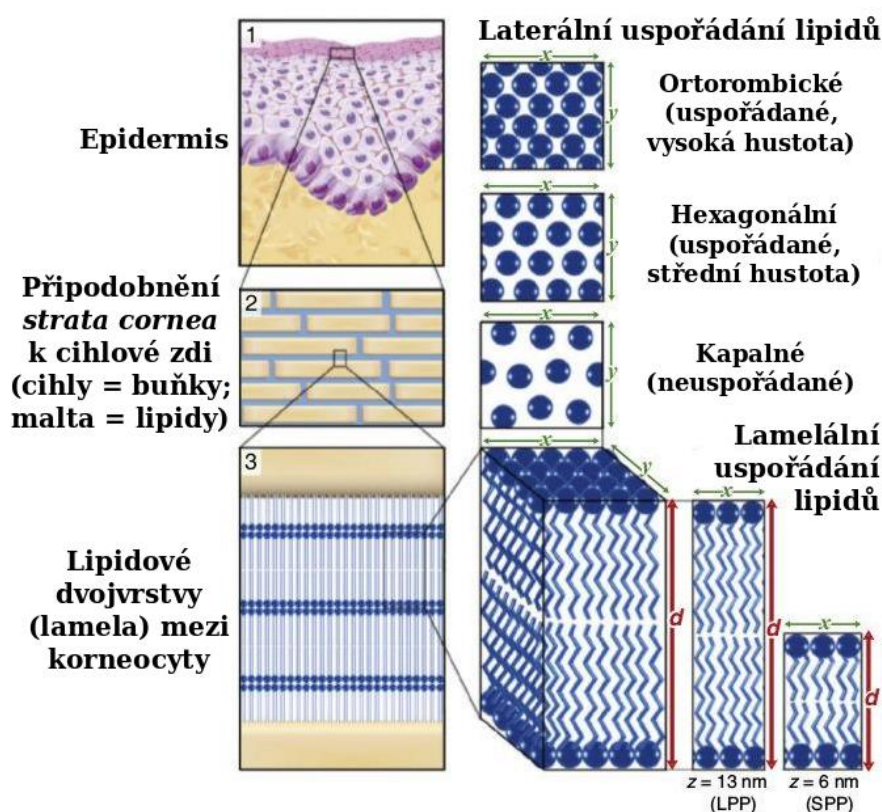
Když bylo zkoumáno myší *stratum corneum* pomocí rentgenové difrakce s malým úhlem (SAXD), tak výsledkem byla série píků, která naznačovala přítomnost lamelární fáze, jenž má 13 nm a periodicky se opakuje (White *et al.*, 1988). Tato fáze byla pojmenována dlouhá opakující se fáze (angl. „Long Periodicity Phase“, LPP). Kromě toho obsahovalo *stratum corneum* ještě druhou fázi, která je taktéž tvořena lipidy a periodicky se opakovala. Byla však široká jen 6 nm, a proto ji pojmenovali krátká opakující se fáze (angl. „Short Periodicity Phase“, SPP).

Předpokládá se, že za vznik těchto dvou fází jsou zcela odpovědné pouze lipidy, které tvoří mezibuněčnou matici *strata cornea*. Napovídá tomu i fakt, že po extrakci lipidů bylo možné pozorovat už jen difrakční obrazce, které odpovídaly proteinům (Bouwstra *et al.*, 1994). Jelikož LPP byla nalezena u všech druhů, jejichž *stratum corneum* bylo

doposud zkoumáno, tak se zdá, že se jedná o velmi charakteristickou molekulární strukturu. Byla proto formulována domněnka, že hraje důležitou roli pro to, aby *stratum corneum* mohlo plnit funkci bariéry pro průchod látek skrz kůži (Bouwstra *et al.*, 2003).

2.4.2 Laterální uspořádání lipidů ve *stratu corneu*

Lipidy nejsou v lamelách umístěny náhodně, ale zauímají vůči sobě jisté uspořádání (Bouwstra a Ponec, 2006). Říká se tomu laterální uspořádání lipidů. U *strata cornea* připadají v úvahu celkem tři možnosti, kterými jsou ortorombické uspořádání, hexagonální uspořádání a kapalná fáze (Obr. 4). Ke zjištění, která z nich se vyskytuje v lipidové matici *strata cornea*, lze použít několik experimentálních technik, z nichž nejpoužívanější jsou infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), elektronová difrakce (ED) a rentgenové difrakce s širokým úhlem (WAXD).



Obr. 4: **Struktura *strata cornea***. Epidermis (1) je vnější vrstva kůže. Její vrchní část se nazývá *stratum corneum* (2), které se připodobňuje ke zdi z cihel. Cihly jsou korneocyty a malta představuje lipidy. Ty jsou organizovány do lamel (3). Lamely tvoří dlouhou opakující se fázi (LPP) a krátkou opakující se fázi (SPP). Lipidy v lamelách jsou organizovány i laterálně (hexagonální uspořádání, ortorombické uspořádání, kapalná fáze). Převzato a upraveno z Janssens *et al.* (2012).

V kapalně fázi (Obr. 4) jsou molekuly lipidů nejdále od sebe. Jelikož tato vzdálenost není zcela jednoznačná, tak byl výsledkem měření pomocí WAXD velmi široký pík se

vzdáleností kolem 0,46 nm (Bouwstra a Ponec, 2006). Pokud jsou lipidy takto uspořádány, tak je membrána propustná pro většinu látek.

Pokud jsou molekuly uspořádány těsněji, tak se jedná o hexagonální uspořádání (Obr. 4). Často se také označuje jako gelová fáze. To je charakterizováno stejnými vzdálenostmi mezi sousedními molekulami ve směru os x a y (Bouwstra a Ponec, 2006). Při měřeních pomocí WAXD je pro něj typický pík kolem 0,41 nm. Jelikož se jedná o hustější strukturu, než byla kapalná fáze, tak toto uspořádání pochopitelně poskytuje i nižší propustnost pro látky. Molekuly lipidů se mohou jak v kapalné fázi, tak v hexagonálním uspořádání otáčet kolem osy z (v této ose jsou orientovány řetězce).

Posledním typem laterální organizace je ortorombické uspořádání (Obr. 4), ve kterém jsou molekuly umístěny velmi těsně vedle sebe. Jedná se tedy o velmi hustou strukturu, z čehož plyne, že bude mít velmi nízkou propustnost pro látky (Bouwstra a Ponec, 2006). Dalším důsledkem vysoké strukturní hustoty je, že molekuly lipidů už nejsou schopné se otáčet kolem osy z, jak to bylo běžné u předchozích uspořádání. Na rozdíl od hexagonálního uspořádání se zde liší vzdálenosti v osách x a y mezi sousedními molekulami. Při měřeních pomocí WAXD jsou pro něj charakteristické tedy dva píky. Jeden se nachází kolem 0,37 nm a druhý kolem 0,41 nm.

Hlavní skupiny lipidů, které se nacházejí ve *stratu corneae*, vytvářejí dvě krystalické lamelární fáze – LPP a SPP zmiňované v předchozí části. Jaká třída lipidů podporuje dané uspořádání, se pokusili zjistit Gooris a Bouwstra (2007). Použili k tomu směsi, které vytvořili z ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin. Pro měření byla zvolena metoda FTIR. Jako první byl proveden pokus pouze se směsí ceramidů. Výsledkem bylo hexagonální uspořádání. Stejného výsledku bylo dosaženo i při pokusech, ve kterých se vyskytovala směs ceramidů a cholesterolu. Naopak pokud byla použita směs ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin, tak lipidy zaujaly ortorombické uspořádání. Už při nízkých koncentracích volných mastných kyselin byla možné současně pozorovat přítomnost jak domén nacházejících se v hexagonálním uspořádání, tak domén s ortorombickým uspořádáním. Autory to vedlo k závěru, že přítomnost volných mastných kyselin indukuje ve *stratu corneae* tvorbu ortorombického uspořádání lipidů. Součástí tohoto pokusu byla také měření, při jakých teplotách dochází k přechodu mezi jednotlivými fázemi. Směs ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin přejde z ortorombického do hexagonálního uspořádání mezi 25 °C a 40 °C a z hexagonálního uspořádání do kapalné fáze mezi 60 °C a 80 °C.

Další poznatky byly získány z měření pomocí elektronové difrakce, které probíhalo na vzorku lidské kůže (Pilgrim *et al.*, 2001). Autoři zde konstatují, že hexagonální uspořádání lipidů se nachází především ve vrchních vrstvách *strata cornea*. Jako možné vysvětlení navrhuje interakce mezi lipidy *strata cornea* a mazem, který se nachází na pokožce. Z něj zmiňují hlavně volné mastné kyseliny s krátkými nenasycenými řetězci nebo jiné nepolární látky. Definitivní závěr ovšem nevyřkli a nechali tak tuto otázku otevřenou.

2.4.3 Modely uspořádání lipidů v matrici *strata cornea*

Stratum corneum zabraňuje nejen pronikání škodlivých látek do našeho těla, ale také brání vstupu léčiv, která by se mohla aplikovat přes kůži. K tomu, abychom mohli navrhnout léky, které budou dobře procházet touto bariérou, je nutná znalost vzájemného uspořádání jednotlivých chemických komponent v rámci *strata cornea*, tj. existence teoretického modelu uspořádání lipidů v matrici *strata cornea*. V současné době existuje minimálně devět takovýchto modelů (Swartzendruber *et al.*, 1989; Forslind, 1994; Bouwstra *et al.*, 2001; Norlén, 2001; Hill a Wertz, 2003; McIntosh, 2003; Kiselev *et al.*, 2005; Kiselev, 2006; Schröter *et al.*, 2009; Iwai *et al.*, 2012). Ty mají samozřejmě své kladné stránky ale také i ty záporné. Jejich hlavní nevýhoda je, že v drtivé většině případů neexistuje příliš experimentů, které by je potvrzovaly (Kessner *et al.*, 2008), a často tyto modely také neuvažují uspořádání všech složek lipidové matrice.

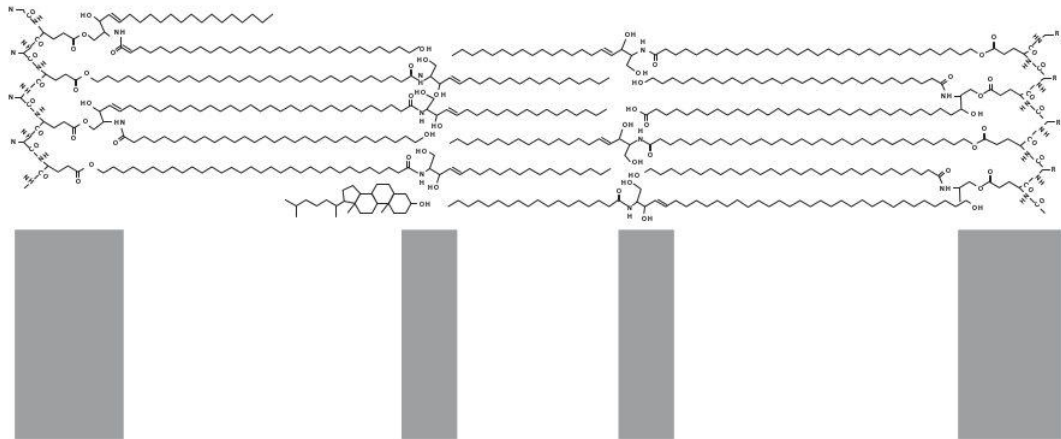
Model složené monovrstvy

První model (Obr. 5), o kterém se zmíním, byl navržen výzkumnou skupinou, kterou vedl Swartzendruber (Swartzendruber *et al.*, 1989). Výsledkem jejich práce byl model složené monovrstvy (angl. „Stacked Monolayer Model“).

Ten byl založen na pozorováních pomocí klasického transmisního mikroskopu. Na obrázcích, které jim byly pořízeny, jsou lipidy mezibuněčné matrice *strata cornea* uspořádány do jednotek, které jsou charakterizovány po sobě následujícími širokým, úzkým a opět širokým světlým pruhem. Jejich šířka je 5 nm, 3 nm a opět 5 nm, což je celkem 13 nm. Seskupení těchto tří pásů tedy představuje LPP. Takovýto obrazec byl získán po obarvení vzorku oxidem ruteničelým RuO₄.

Ceramidy by se podle tohoto modelu v kůži vyskytovaly pouze v konformaci „extended“ a byly by navázány na kolagen. Prostřední, úzký, pás se skládá pouze z uhlovodíkových řetězců ceramidů, které se vzájemně prolínají. Tento pás neobsahuje žádný cholesterol. Krajní, široké, pásy obsahují druhý ceramidový řetězec. Tyto řetězce se už vzájemně neprolínají. Zato ale oba pásy obsahují cholesterol.

Mohlo by se zdát, že tento model je podložen fotografiemi z mikroskopu, takže je zaručeně správný. Opak však je pravdou. Podle jiné studie by strukturní jednotka, která se skládá ze světlých pruhů, mohla být pouze artefakt (Pfeiffer *et al.*, 2000), který na vzorku zanechal oxid ruteničelý používaný při fixaci vzorku.

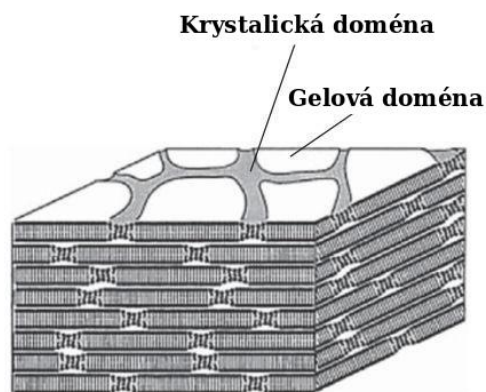


Obr. 5: **Model složené monovrstvy.** V modelu složené monovrstvy se střídají široký, úzký a opět široký světlý pruh. Převzato z Swartzendruber *et al.* (1989).

Model doménové mozaiky

Další model (Obr. 6) byl navržen Forslindem (Forslind, 1994). Ten byl pojmenován jako model doménové mozaiky (ang. „Domain Mosaic Model“). Je založen na laterální segregaci lipidů do domén.

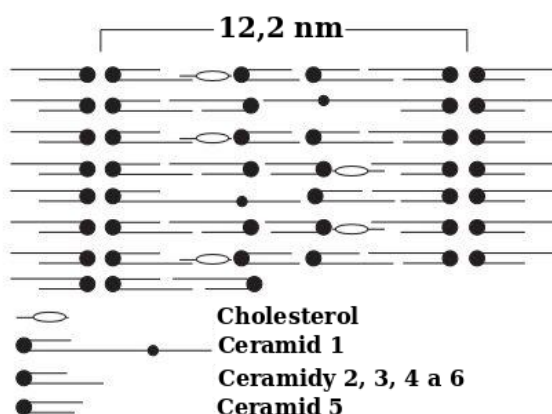
Mezibuněčné lipidy *strata cornea* jsou v něm chápány jako mnoholamelární dvoufázový systém. Ten je tvořen nesouvislou lamelou krystalické domény, jenž je vložena do souvislé domény z tekutých krystalů. Jinými slovy každá lamela *strata cornea* připomíná svým vzhledem třeba gepardí kůži – hnědá část gepardí kůže by v tomto případě představovala souvislou fázi tekutých krystalů, do které jsou jako černé tečky u geparda vloženy domény, ve kterých se lipidy nacházejí v krystalické fázi. Krystalické fáze jsou pak ještě obklopeny okraji (angl. „grain borders“), ve kterých se lipidy nacházejí ve fluidním krystalickém stavu. Tyto okraje také umožňují difúzi jak hydrofóbních, tak hydrofilních látek skrz kůži. Ceramidy se zde oproti předchozímu modelu vyskytují pouze v „hairpin“ konformaci.



Obr. 6: **Model doménové mozaiky.** Tento model se skládá z lamel krystalických domén, ve kterých se nacházejí domény z tekutých krystalů. Převzato a upraveno dle Forslind (1994).

Sendvičový model

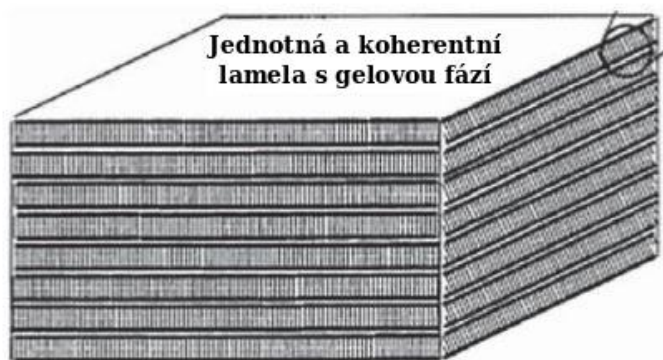
Další možný způsob uspořádání lipidů byl navržen týmem pod vedením prof. Joke Bouwstry (Bouwstra *et al.*, 2001). Tento model (Obr. 7) se označuje jako sendvičový (angl. „Sandwich Model“) a navrhuje především jiné uspořádání krystalické a kapalné fáze, než byly představy autorů modelu doménové mozaiky. U něj se obě fáze vyskytovaly v jedné vrstvě, ale zde, u sendvičového modelu, se kapalná fáze nachází uprostřed a je z obou stran obklopena krystalickými fázemi. Tyto tři fáze opět představují tři světlé pásy, které bylo možné pozorovat pod transmisním mikroskopem. Model lze tedy doopravdy připodobnit k jakémusi lipidovému sendviči. Prostřední, kapalná, fáze je tvořena hlavně ceramidy, které mají esterifikovanou ω -hydroxyskupinu (ceramid EOS, ceramid EOP, ceramid EOH), ceramidy s krátkými řetězci, které jsou v „hairpin“ konformaci, a cholesterolem. Krajní, krystalické, fáze jsou naopak tvořeny méně mobilními ceramidy s dlouhými nasycenými řetězci a cholesterolem.



Obr. 7: **Sendvičový model.** U sendvičového modelu je vrstva z kapalné fáze obklopena vrstvami z krystalické fáze. Převzato a upraveno dle Bouwstra *et al.* (2001).

Model jednotné gelové fáze

Ve stejném roce přišel Lars Norlén (Norlén, 2001) s dalším modelem (Obr. 8), který pojmenoval model jednotné gelové fáze (ang. „Single Gel Phase Model“). Norlén si v něm představuje uspořádání lipidů v matrici *strata cornea* výrazně jinak, než navrhovali jeho dříve jmenovaní kolegové. Přišel s myšlenkou, že lipidová mezibuněčná hmota je tvořena souvislými lamelami, ve kterých se lipidy nachází v gelové fázi. Nedochází zde k žádné fázové separaci ani mezi gelovou fází a fází kapalných krystalů, ani mezi různými krystalickými fázemi s hexagonálním a ortorhombickým uspořádáním, jako je tomu u předchozích modelů.

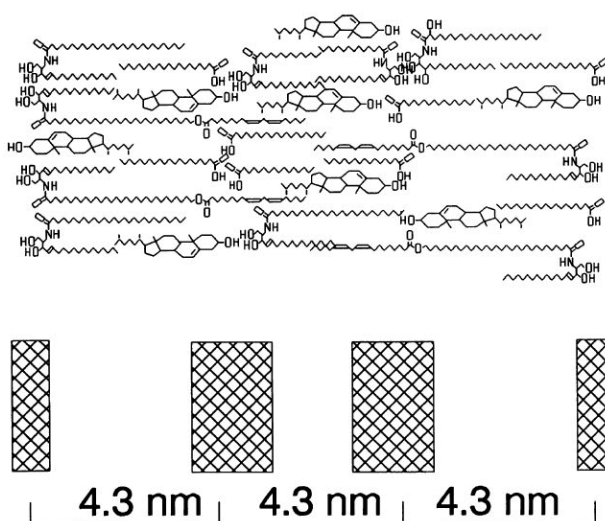


Obr. 8: **Model jednotné gelové fáze.** Tento model se skládá z lamel gelové fáze. Převzato a upraveno dle Norlén (2001).

Takto navržená struktura obsahuje jen velmi málo vody, má nízkou pohyblivost řetězců a vzhledem ke svému fázovému uspořádání i nízkou propustnost pro látky. Na rozdíl od předchozích teorií je uvažováno, že se ceramidy nenachází pouze v „hairpin“ konformaci, ale jsou ve struktuře obsaženy i v konformaci „extended“.

Model Hill a Wertz

V roce 2003 spatřily světlo světa hned dva další modely. První z nich (Obr. 9) byl navržen Hillem a Wertzem (Hill a Wertz, 2003), kteří de facto pouze upravují strukturu sendvičového modelu. Ta úprava spočívá ve změně tloušťky tří světlých pruhů pozorovaných transmisním mikroskopem. Bouwstra se ztotožnila s rozměry, které byly publikovány již dříve (5 nm, 3 nm, 5 nm). Pánové Hill a Wertz je ale upravili a navrhli, že by šířka všech tří pásů měla být stejná a to 4,3 nm.

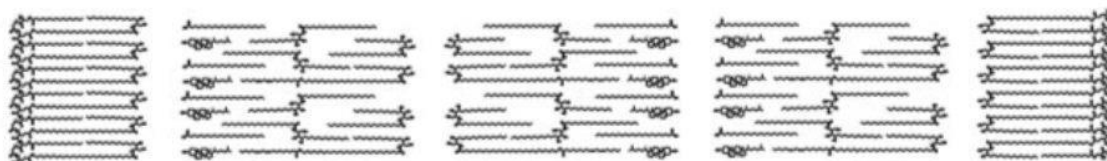


Obr. 9: **Model Hill a Wertz.** Model navržený Hillem a Wertzem počítá se třemi stejně širokými pásy. Převzato z Hill a Wertz (2003).

Model McIntosh

Druhý model (Obr. 10), který byl publikován v roce 2003, pochází z dílny pana McIntoshe (McIntosh, 2003). Ten založil svá tvrzení na měřeních uskutečněných metodou SAXD.

Všechny předchozí modely spojuje, že opakující se jednotka dlouhá 13 nm se skládá ze tří pásů. Pan McIntosh naopak tvrdí, že se stejná jednotka skládá pouze ze dvou stejně širokých pásů a že každý pás představuje jednu dvojvrstvu lipidů. Cholesterol by v tomto případě byl rozložen nerovnoměrně. Už se ale neuvádí, jestli autor počítá jen s ceramidy, které by zaujímaly „hairpin“ konformaci, nebo zda by se ve struktuře vyskytovaly i v konformaci „extended“.



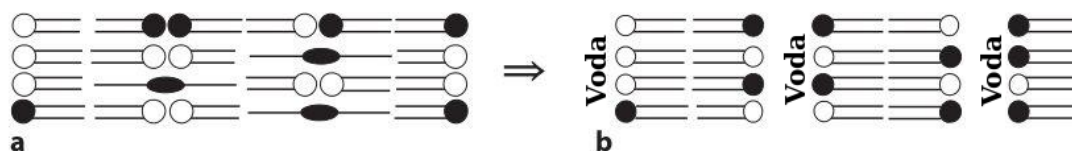
Obr. 10: **Model McIntosh.** Podle modelu, který navrhl McIntosh, je opakující se jednotka složena jen ze dvou pásů. Převzato z McIntosh (2003).

Model zesílení vnitřní výztuže

Všechny modely, které zde byly doposud jmenovány, mají jednu zásadní nevýhodu. Ani jeden z nich nedokáže vysvětlit změnu struktury lipidové matrice *strata cornea* po té, co dojde k její hydrataci nadbytkem vody. Když bylo zkoumáno prasečí *stratum corneum* neutronovou difrakcí, tak došlo oproti nehydratovanému stavu ke zmizení prvního difrakčního obrazce (Charalambopoulou *et al.*, 2002). Pokud zkoumáme lidské *stratum corneum* po té, co bylo izolováno z hydratované kůže, tak oproti nehydratovanému vzorku dojde ke změně LPP na SPP (Bouwstra *et al.*, 1991).

V reakci na to byl navržen Kiselevem (Kiselev *et al.*, 2005; Kiselev, 2006) v roce 2005 (Obr. 11) model zesílení vnitřní výztuže (angl. „Armature Reinforcement Model“). Oproti předchozím modelům je zde představena myšlenka, že ceramid AP může změnit svou konformaci z „hairpin“ na „extended“.

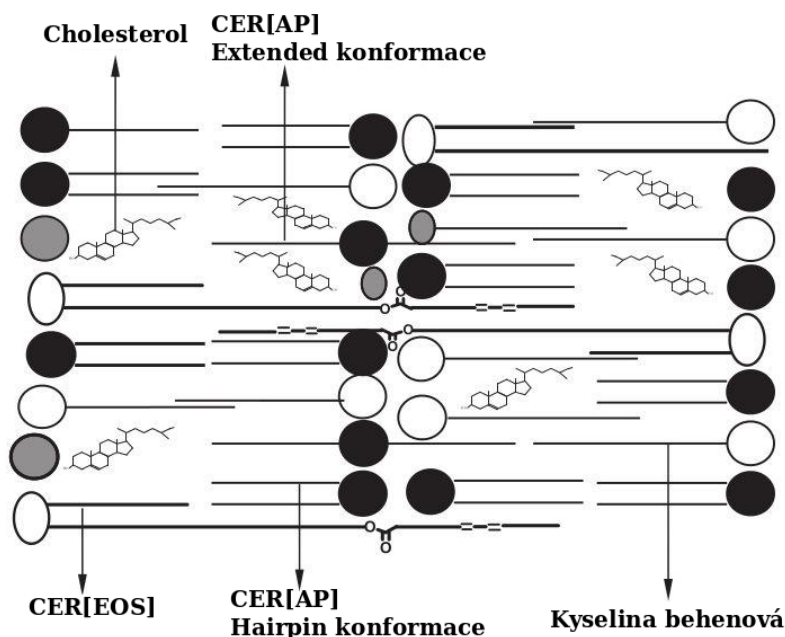
Tento model opět navrhuje, že nehydratované *stratum corneum* se skládá z dvojvrstev, ve kterých jsou ceramidy, které se nacházejí v „hairpin“ konformaci, z obou vrstev k sobě otočeny svými hlavami. Tyto vrstvy jsou vzájemně propojeny ceramidy, které zaujaly „extended“ konformaci, což znamená, že jeden jeho řetězec je zanořený v jedné vrstvě a druhý v té sousední. Pokud je lipidová matrice *strata cornea* hydratována, tak se změní konformace všech ceramidů z „extended“ na „hairpin“. Tím vzniknou jinak uspořádané dvojvrstvy (hlavy ceramidů nejsou jako před tím uvnitř ale vně dvojvrstvy), mezi kterými se objeví mezimebránový prostor, jenž se okamžitě zaplní vodou.



Obr. 11: **Model zesílení vnitřní výztuže.** Tento model navrhuje, že po hydrataci kůže dojde ke změně konformace všech ceramidů z „extended“ na „hairpin“. Převzato a upraveno dle Kiselev *et al.* (2005).

Model Schröter

Další troškou do mlýna přispěl v roce 2009 tým kolem Schrötera (Schröter *et al.*, 2009). Teoretické uspořádání molekul je zde podloženo experimenty, které byly změřeny neutronovou difrakcí. LPP je zde složena z pásů, které mají stejnou šířku (Obr. 12). Tyto lamely se skládají z ceramidů, které se vyskytují jak v „hairpin“, tak v „extended“ konformaci. Cholesterol je v nich distribuován rovnoměrně. Dva sousedící pásy jsou vzájemně propojeny mastnými kyselinami z ceramidu EOS.

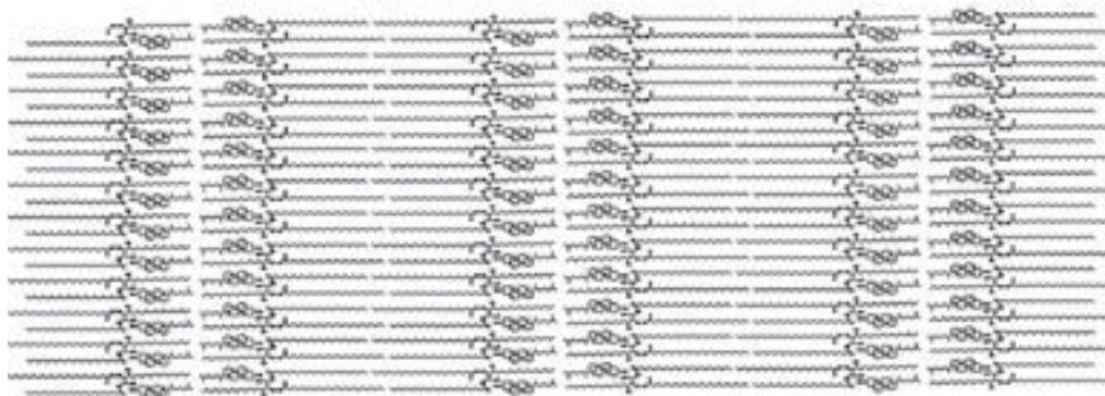


Obr. 12: **Model Schröter.** Podle modelu navrženého Schröterem jsou lipidy uspořádány ve stejně širokých pásch. Převzato z Schröter *et al.* (2009).

Model Iwai

Zatím asi s posledním modelem (Obr. 13) přišla v roce 2012 opět skupina Larse Norléna (Iwai *et al.*, 2012). Ta se opírá o výsledky, které byly získány pomocí elektronové mikroskopie.

Signál elektronové hustoty naznačuje, že pro lidské *stratum corneum* je typická 11 nm dlouhá asymetrická jednotka, která se neustále opakuje. Profil elektronové hustoty ukazuje dva píky. Jejich vzájemná vzdálenost je 4,5 nm. Každá dvojice píků je pak od té další vzdálena 6,5 nm. Píky představují oblasti, v nichž se nachází těžké polární atomy s velkým množstvím elektronů. Tyto oblasti by tedy musely odpovídat hlavám ceramidů, které obsahují kyslíky a dusíky. Oblasti, kde profil elektronové hustoty klesá, zase reprezentují atomy, které jsou poměrně chudé na elektrony. To by tedy odpovídalo uhlíkům a vodíkům, ze kterých se skládají řetězce ceramidů. Autoři navrhují, že *stratum corneum* je organizováno do dvojrstev, které jsou uspořádány jedna vedle druhé. Ceramidy se zde nacházejí pouze v „extended“ konformaci.



Obr. 13: **Model Iwai.** Iwaiův model předpokládá, že lipidová matrice strata cornea je organizovaná ve dvojrstvách, ve kterých se nachází ceramidy pouze v konformaci „extended“. Převzato z Iwai *et al.* (2012).

Uvedené modely se liší jak v uložení jednotlivých lipidů, tak hlavně v otázce uspořádání ceramidů – hlavní otázkou je, zda se ceramidy vyskytují především v „hairpin“ nebo „extended“ konformací. Další otázkou je chování lipidové matrice v přítomnosti vody a také jak se budou lipidy chovat na rozhraní se vzduchem – většina modelů totiž řeší jen uspořádání lipidové matrice mezi korneocyty. Poslední neznámou je variabilita ceramidů, kdy je k dispozici velké množství typů ceramidů. Proto jsme se v následující části zaměřili na studium monovrstev rozdílných typů ceramidů.

3. SIMULAČNÍ METODY

3.1 Software

Pro práci byl použit následující software:

- ACD/ChemSketch 12.01 (ACD/ChemSketch, 2010)
<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- Grace 1:5.1.23-6 (Plasma Laboratory - Weizmann Institute of Science)
<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>
- ImageMagick 8:6.7.7.10-6 (ImageMagick Studio LLC)
<https://www.imagemagick.org/>
- GROMACS, verze 4.5.1, 4.5.5, 4.6.5 a 5.0 (Bekker *et al.*, 1993; Berendsen *et al.*, 1995; Lindahl *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2008; van der Spoel *et al.*, 2005; Pronk *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2015; Páll *et al.*, 2015)
www.gromacs.org/
- The PyMOL Molecular Graphics System 1.7.0.0 (Schrödinger, LLC)
<https://www.pymol.org/>
- VMD 1.9.2 (Humphrey *et al.*, 1996)
www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

3.2 Molekulární dynamika

Molekulárně dynamické simulace jsou jedním ze základních nástrojů teoretického studia biologických molekul. Molekulární dynamika ukazuje časově závislé chování systému (Young, 2001). Tato metoda byla poprvé použita v padesátých letech dvacátého století americkými fyziky Berniem Julianem Alderem a Thomasem Everettem Wainwrightem (Alder a Wainwright, 1957; Alder a Wainwright, 1959). Pro simulaci reálného systému poprvé využili molekulární dynamiku indický fyzik Aneesur Rahman a americký chemik Frank H. Stillinger, a to v roce 1974, kdy s její pomocí studovali vodu v kapalně fázi (Stillinger a Rahman, 1974).

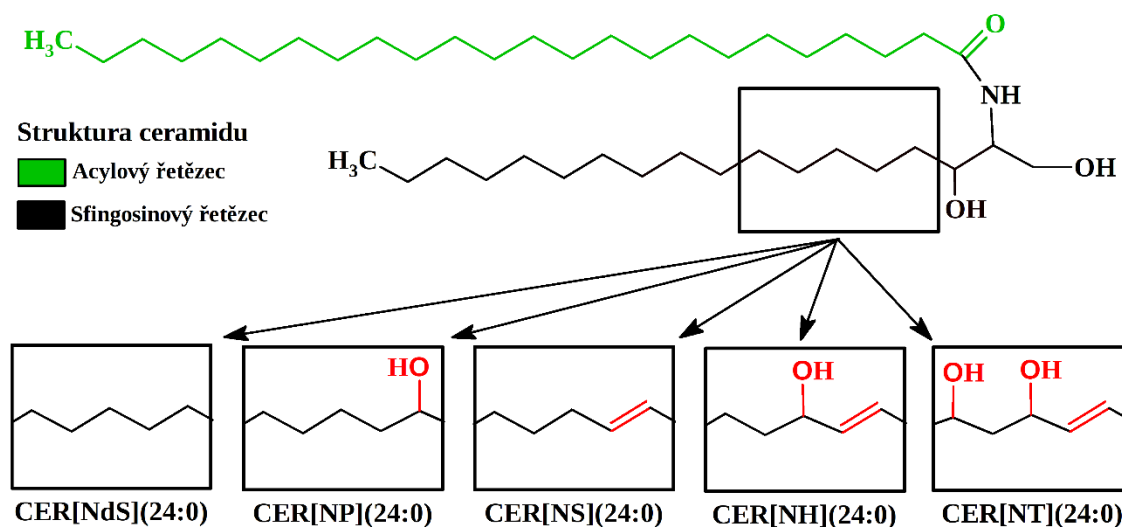
3.3 Parametry molekulárně dynamických simulací

Pro výpočet simulací bylo použito silové pole CHARMM36 určené pro lipidy (Klauda *et al.*, 2010; Pastor a MacKerell, 2011; Venable *et al.*, 2014). Topologie ceramidu NS (Paloncýová *et al.*, 2015) byla odvozena z parametrů sfingomyelinu pro silové pole CHARMM36. Topologie ostatních typů ceramidů vznikly její úpravou při snaze zachovávat atomové typy. Pohybové rovnice byly integrovány algoritmem leap-frog (van

Gunsteren a Berendsen, 1988). Časový krok byl 2 fs. Simulace monovrstev byly spouštěny na 100 ns následující po energetické minimizaci na 5000 kroků pomocí sprzęžených gradientů (conjugated gradients). Dalekodohové elektrostatické interakce delší než 1 nm byly počítány metodou Particle Mesh Ewald (PME; Essmann *et al.*, 1995). Experiment probíhal za izotermicko-izobarických podmínek (NpT). Teplota systému byla udržována tzv. velocity rescaling termostatem (Bussi *et al.*, 2007) na teplotách 296 K, 310 K nebo 370 K. Byl posloužit Berendsenův barostat (Berendsen *et al.*, 1984), který udržoval tlak v systému na 1 baru. Simulace probíhaly za semiisotropických podmínek (tlak v ose z byl 0 Pa), aby se udrželo vakuum uprostřed simulačního boxu. Ve všech simulacích byly zachovány periodické okrajové podmínky.

3.4 Simulované systémy

Bylo použito pět typů ceramidů (Obr. 14) s lignocerovou (C24:0) kyselinou. Jednotlivé ceramidy se vzájemně lišily svými sfingosinovými řetězci. Byli to CER[NdS](24:0) (dále označován jako ND24), CER[NS](24:0) (dále NS24), CER[NP](24:0) (dále NP24), CER[NH](24:0) (dále NH24) a CER[NT](24:0) (dále NT24).



Obr. 14: **Struktura použitých ceramidů.** Ceramidy, které byly simulovány, se vzájemně lišily svými sfingosinovými řetězci. Sfingosinový řetězec ceramidu NdS nemá dvojně vazby ani hydroxylové skupiny. Ceramid NS se od NdS liší jednou dvojnou vazbou a ceramid NP jednou hydroxylovou skupinou. Ceramidy NH a NT se strukturně liší od ceramidu NS jednou, respektive dvěma hydroxylovými skupinami.

Ve *stratu corneu*, kde se mnohem častěji vyskytují multilamelární lipidové membrány, by totiž ceramidy v extended konformaci měly hned několik výhod (Corkery, 2002). Za prvé, lipidy v extended konformaci zvyšují kohezi sousedních lipidových lamel. Za druhé, ceramidy v této konformaci vyrovnávají vzájemný poměr ploch hydrofóbní a hydrofilní části. V neposlední řadě lipidy v extended konformaci tvoří hydrofilní

rozhraní (Corkery, 2002). Podle experimentů na multivrstvách je pravděpodobné, že ve *stratu corneu* se NS24 vyskytuje v extended konformaci (Iwai *et al.*, 2012; Školová *et al.*, 2014). Ve směsi NS24, cholesterolu a volných mastných kyselin NS24 zaujal extended konformaci, cholesterol se uspořádal podél sfingoidního řetězce NS24 a mastná kyselina podél jeho acylového řetězce (Školová *et al.*, 2014). Takto navržené uspořádání se shoduje s modelem krátké opakující se fáze *strata cornea* (Iwai *et al.*, 2012). Školová *et al.* (2014) ještě stejným způsobem zkoušela i kratší NS16, který ale ve směsi zaujímal hairpin konformaci.

Proto kromě systému obsahujícího hairpin otočený hlavou k vodní fázi simulujeme i ostatní teoreticky možná uspořádání ceramidu na rozhraní voda/vzduch, abychom mohli pozorovat i přechody z nerovnovážných uspořádání. Z podobného důvodu byl každý systém simulován při třech teplotách, kterými byly 296 K, 310 K a 370 K, přičemž teplota tání ceramidů je kolem 363 K (pro NS24).

U každého z nich byly simulovány čtyři různé systémy, které se lišily uspořádáním ceramidů v monovrstvách (Obr. 15A). Nejprve jsme simulovali dva systémy v hairpin (H) konformaci:

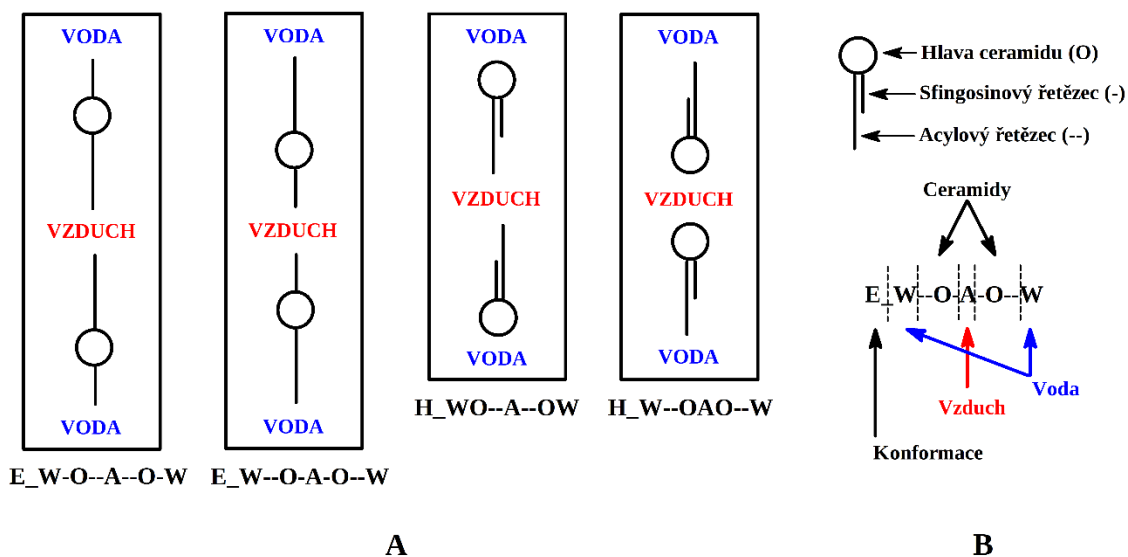
- v systému označovaném H_WO--A--OW byly hlavy ceramidů otočené směrem k vodnímu prostředí, což simulovalo standardní a očekávatelné uspořádání předpokládatelné při běžných monovrstevných experimentech, kdy lze očekávat interakce polárních hlav s polárním vodním prostředím,
- v systému označovaném H_W--OAO--W byly naopak hlavy otočeny směrem do vakua, což mělo simulovat případ, kdy by se při deskvamaci na povrchu odnažila vrstva polárních hlav.

Kromě simulacemi s hairpin konformacemi jsme sledovali i simulace začínající v extended (E) konformaci:

- v systému označovaném E_W--O-A-O--W byly ceramidy natočeny acylovým řetězcem k vodní fázi a
- v systému označovaném E_W-O--A--O-W byly k vodní fázi naopak natočeny sfingosinovým řetězcem.

Dále uvedené hodnoty veličin jsou získány z analýz, které probíhaly v rozmezí 30 - 100 ns.

Jak si lze povšimnout, názvy těchto systémů popisují jejich strukturu (Obr. 15B). První písmeno názvu říká, jestli se ceramidy na začátku simulace nacházely v hairpin (H), nebo extended (E) konformaci. Název systému dále pokračuje podtržítkem, za kterým je popsána struktura simulačního boxu. Její popis vždy začíná a končí písmenem „W“, které označuje vodu (z angl. water). V boxu byly vždy umístěny dvě stejné membrány, které oddělovalo vakuum. To se označuje jako „A“ (z angl. „air“). Hlavy ceramidů jsou reprezentovány písmenem „O“, které odkazuje na kyslíky obsažené v polárních hlavách ceramidů. Pokud byly ceramidy na začátku simulace v hairpin konformaci, tak názvu je symbolicky zaznačen pouze delší, tj. acylový řetězec, dvěma pomlčkami (--). Jestliže ceramidy začínaly v simulaci z extended konformace, tak se v názvu objevuje i jedna pomlčka (-), která představuje kratší, tj. sfingosinový řetězec.

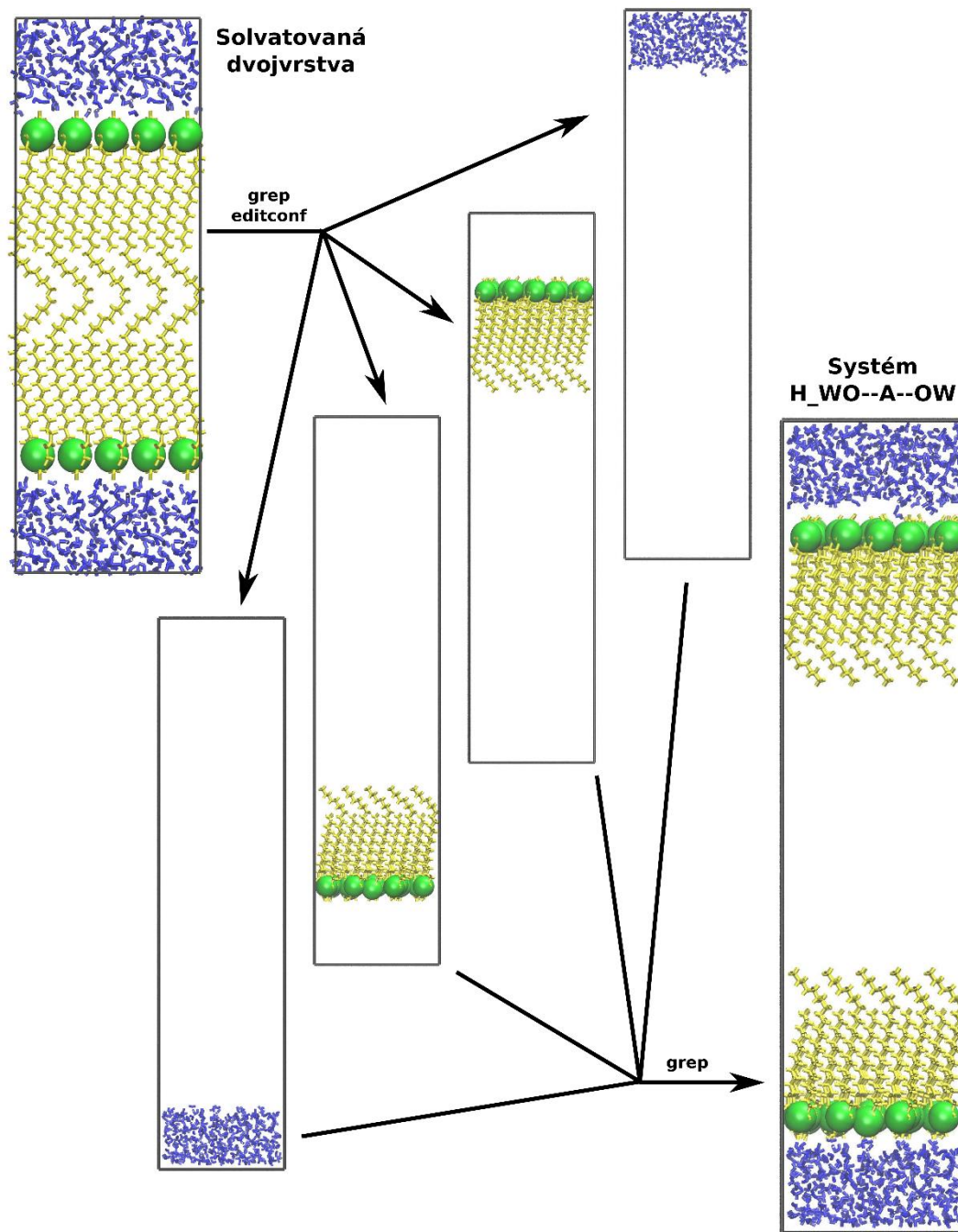


Obr. 15: **Struktury monovrstev.** Simulační box vždy obsahoval dvě monovrstvy ceramidů, které oddělovalo vakuum (A) a z vnějších stran byly obklopené molekulami vody (W). Ceramidy se nacházely na začátku simulace buď v hairpin (H), nebo extended (E) konformaci. Obrázek (A) ukazuje jednotlivé typy simulovaných monovrstev. Obrázek (B) potom schématicky zobrazuje, jakým způsobem vznikly jejich názvy.

3.5 Příprava simulačních boxů s monovrstvami

Pro každý ceramid byly sestaveny simulační boxy, ve kterých byly monovrstvy složené z ceramidů obklopené z jedné strany molekulami vody a z druhé vakuem. Konformace a uspořádání molekul ceramidů v těchto monovrstvách bylo popsáno v předchozí kapitole. Byly v ní popsány i systémy, ve kterých se ceramidy nacházely otočené svými hlavami směrem do vakua. Toto uspořádání představuje sice nerovnovážný stav, ale vzhledem k velké rigiditě ceramidů se jedná o zajímavý způsob, jak ukázat jejich nerovnovážné změny.

Stavba těchto boxů byla vždy stejná (Obr. 16). Nejprve byla z daných ceramidů sestavena dvojvrstva, která byla následně solvatována. Za tímto účelem byl použit SPC/E model molekul vody (Berendsen *et al.*, 1987; Kusalik a Svishchev, 1994). Z takto připravených systémů byly pomocí nástroje grep vypreparovány jednotlivé monovrstvy ceramidů a vrstvy vody do samostatných gro souborů. Pomocí nástroje editconf byly u těchto vrstev nejprve upraveny rozměry simulačního boxu. Poté byly jednotlivé vrstvy posunuty v rámci boxu v ose z do takové výšky, aby po seskupení do jednoho boxu vytvořily monovrstvy, které by byly vzájemně oddělené vakuem o výšce 5 nm a z druhé strany obklopené vodou. Posun po ose z byl proveden pomocí nástroje editconf a složení výsledného boxu umožnilo použití nástroje grep.



Obr. 16: **Příprava simulačních boxů s monovrstvami ceramidů.** Simulační box s monovrstvami ceramidů byl připravován ze solvované dvojrstvy. Ta byla rozdělena nástrojem grep do souborů, které obsahovaly jednotlivé vrstvy. U nich byly následně upraveny rozměry simulačních boxů a pozice vrstev pomocí nástroje editconf. Tyto vrstvy byly nakonec opět nástrojem grep spojeny do jednoho souboru, čímž vznikl simulační box s monovrstvami, které byly vzájemně odděleny vakuem a z druhých stran obklopené molekulami vody.

Byly simulovány nejmenší možné systémy, a proto se liší počty ceramidů, které tvoří jednu vrstvu u jednotlivých konformací. U hairpin konformace ji tvoří 25 ceramidů a u extended konformace 36 ceramidů. U ceramidů v hairpin konformaci každý systém obsahoval 973 molekul vody a u ceramidů v extended konformaci 806 molekul vody.

3.6 Analýza parametrů membrán

Tyto parametry kvantitativně popisují strukturu membrány. Některé z nich mohou být získávány jak ze simulací, tak z experimentů. Takové parametry potom mohou posloužit při určování správnosti výsledků, které byly získány prostřednictvím teoretické chemie.

3.6.1 Plocha lipidu

Plocha lipidu (angl. "Area per Lipid") je veličina, která udává plochu, která v dané chvíli v průměru připadá na jeden lipid. Je to velmi důležitý parametr, který popisuje biologické membrány, protože je velmi citlivý jak k hydrofilním interakcím mezi hlavami lipidů, tak k hydrofóbním interakcím mezi nepolárními uhlovodíkovými řetězci. Interakce hlav ceramidů s okolními molekulami vody také ovlivňují tento parametr (Chaban, 2014).

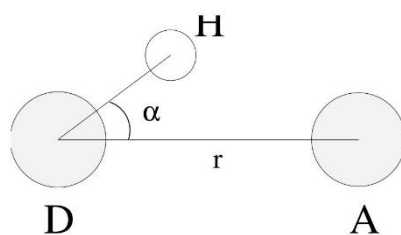
GROMACS nemá program, který by přímo počítal tuto veličinu, ale lze jej určit pomocí programu `g_energy` (van der Spoel *et al.*, 2013), kterým získáme velikosti boxu v čase. Z nich už potom můžeme plochu lipidu dopočítat. Graf pak má na ose *x* čas, po kterou byl tento parametr měřen, a na ose *y* plochu na lipid v jednotkách nm^2 . Tento parametr je velmi dobře měřitelný i experimentálně. Používá se k tomu velké množství metod, např. rentgenová difrakce (McIntosh a Simon, 1986), NMR spektroskopie (Petrache *et al.*, 2000). Tento parametr je ale snadno ovlivnitelný experimentálními podmínkami. Např. pro teplotu platí, že se zvyšující teplotou roste i hodnota plochy lipidu (Pan *et al.*, 2008).

3.6.2 Distribuce úhlů svíraných řetězci ceramidů

Distribuce úhlů je parametr, který může napovědět, jaké je zastoupení jednotlivých konformací ceramidů. Můžeme měřit jak úhel, který se nachází mezi řetězci ceramidů, tak úhel mezi vektorem, který je definován dvěma atomy na lipidových residuech, a osou *z* (angl. "tilt angle"). Pro prvně jmenovaný úhel má GROMACS (van der Spoel *et al.*, 2013) program `g_angle`, pro ten druhý pak `g_sgangle`. Graf bude mít obou případech na ose *x* (úhlové) stupně a na ose *y* bude jejich relativní zastoupení.

3.6.3 Analýza vodíkových vazeb

Vodíková vazba (angl. "Hydrogen Bond") patří mezi základní nekovalentní interakce a hraje velmi důležitou roli při stabilizaci struktur biomolekul. Jejich analýzu v programu GROMACS umožňuje podprogram `g_hbond` (van der Spoel *et al.*, 2013). Jestli je vodíková vazba přítomna, rozhoduje podle dvou parametrů (Obr. 17). Prvním z nich je, že vzdálenost donoru a akceptoru musí být minimálně 0,35 nm, a druhým je, že úhel mezi vodíkem, donorem a akceptorem je minimálně 30°.



Obr. 17: **Geometrické parametry vodíkových vazeb.** Parametry, podle kterých program `g_hbond` rozhoduje o existenci vodíkové vazby, jsou vzdálenost donoru (D) a akceptoru (A) a úhel (α), který svírají vzhledem k atomu vodíku. Převzato z van der Spoel *et al.* (2013).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem simulací bylo popsat, jak rozdíly ve struktuře sfingosinového řetězce ovlivňují chování ceramidů, pokud se z jedné strany dotýkají vody a z druhé jsou vystaveny vakuu.

4.1 Vliv sfingosinového řetězce na konformaci ceramidů

Pokud systém není tepelně stabilní, tak se při zvyšování teploty bude měnit distribuce úhlů, které svírají postranní řetězce ceramidů. Pokud se mění, tak dochází ke změně jejich konformace a tím pádem není struktura, ve které se vyskytovaly na začátku, stabilní.

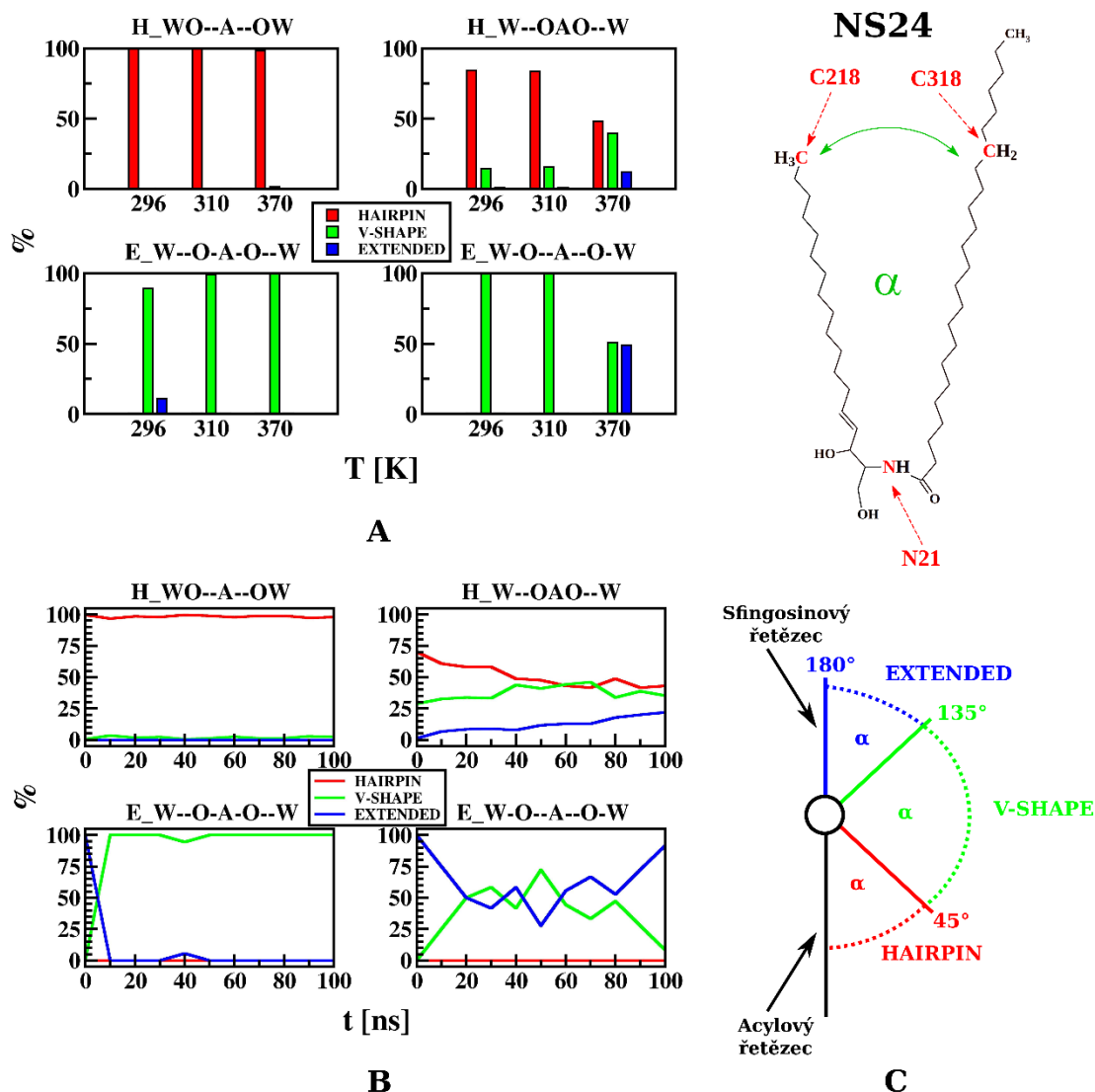
V simulacích je vidět, že u systému **H_WO--A--OW** ceramidu NS24 nedochází při zvyšování teploty k téměř žádné změně distribuce úhlů, které byly nasbírány v rozsahu 30 – 100 ns (Obr. 18A). Ze změny zastoupení jednotlivých konformací v čase při 370 K (Obr. 18B) je vidět, že se u tohoto systému neměnilo zastoupení úhlů ani v čase. Stejně tomu bylo i při nižších teplotách, z čehož plyne, že systém je ekvilibrovaný a pro ceramid NS24 stabilní.

Výsledky, které byly získány ze simulací tohoto systému u ceramidu ND24 (Příloha 1), se shodují s popisem u NS24. U ceramidu NP24 (Příloha 2) simulace při nejvyšší teplotě nedoběhla do konce, ale při nižších teplotách se distribuce úhlů rovněž shodovala. Rozdíly byly však viditelné u ceramidů NH24 (Příloha 3) a NT24 (Příloha 4), u kterých bylo možné pozorovat i přítomnost molekul v konformaci „V-shape“. U ceramidu NH24 tato situace nastala sice až při 370 K, ale u ceramidu NT24 byla konformace „V-shape“ zastoupena již při 296 K.

U systému **H_W--OAO--W** pro ceramid NS24 je v distribuci úhlů, které byly nasbírány v rozsahu 30 – 100 ns, vidět oproti nižším teplotám změna až při 370 K (Obr. 18A), kdy dochází k poklesu zastoupení ceramidů v „hairpin“ konformaci a je možné u tohoto systému pozorovat ceramidy i v konformacích „V-shape“ a „extended“. Převážně jsou zde však stále zastoupeny molekuly v „hairpin“ konformaci. Časový průběh distribuce úhlů při 370 K (Obr. 18B) ukazuje, že dochází k současnému poklesu počtu molekul v „hairpin“ konformaci a ke zvyšování počtu molekul v „extended“ konformaci. Tyto trendy ukazují, že molekuly ceramidů zde přecházejí mezi těmito konformacemi, což zároveň znamená, že se systém ještě nenachází v rovnováze.

Molekuly ostatních ceramidů se v tomto systému nacházely při nižších teplotách pouze v „hairpin“ konformaci. Monovrstvy ceramidy NP24 (Příloha 2) a NT24 (Příloha 4) při teplotě 370 K nedoběhly do konce, takže je nelze popsat, ale ceramidy ND24 (Příloha 1) i NH24 (Příloha 3) rovněž přecházely do „extended“ konformace.

Ze simulací je tedy vidět, že systém **H_WO--A--OW** je tepelně stabilnější než systém **H_W--OAO--W**. Jeho větší stabilita je zřejmě dána výrazněji rozvinutou sítí vodíkových vazeb mezi ceramidy a vodou (viz dále), které ho stabilizují.

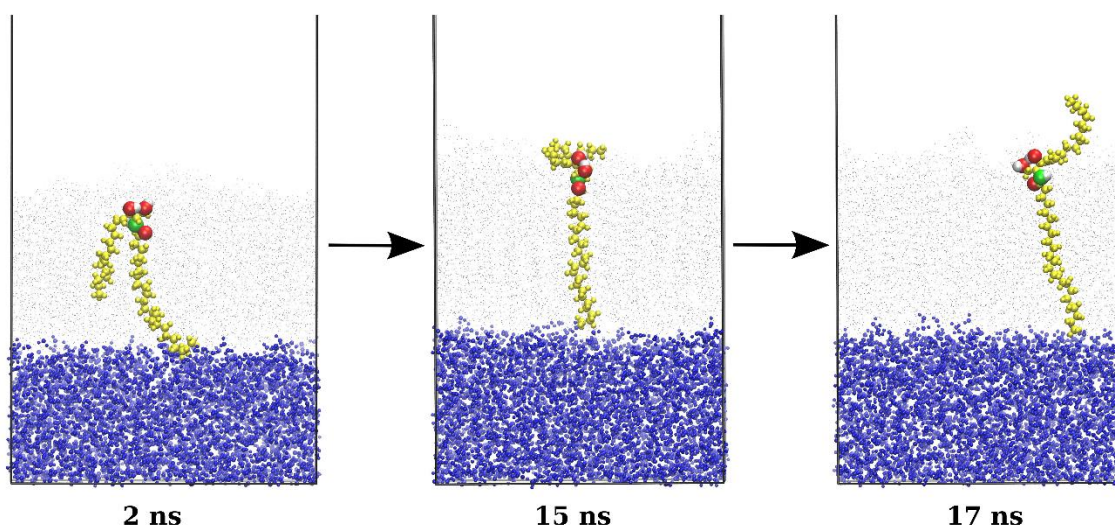


Obr. 18: Úhly svírané postranními řetězci ceramidů. Obrázek dokumentuje měření úhlů, které svírají postranní řetězce ceramidů (dále jen úhly). U obrázků (A) a (B) horní dva grafy vždy popisují systémy s ceramidy v „hairpin“ konformaci a dolní dva grafy zase systémy s ceramidy v „extended“ konformaci. Na obrázku (A) je vidět, jak se změnilo rozložení úhlů nasbíraných v rozsahu 30 – 100 ns u ceramidu NS24 v závislosti na simulačních teplotách. U ceramidů v hairpin konformaci je vidět, že u systému H_W--OAO--W na rozdíl od systému H_WO--A--OW dochází s rostoucí teplotou ke změně distribuce úhlů, a proto je méně teplotně stabilní. U systémů s ceramidy v extended konformaci je vždy vidět velký podíl molekul v konformaci „V-shape“. Při teplotě 370 K dochází k výrazné změně distribuce úhlů u systému E_W-O--A--O-W, takže je zřejmě pro NS24 méně teplotně stabilní než E_W--O-A-O--W. Obrázek (B) ukazuje, jak se v čase měnilo rozložení úhlů u ceramidu NS24 při teplotě 370 K. Je vidět, že u systému H_WO--A--OW na rozdíl od systému H_W--OAO--W nedochází ke změně zastoupení úhlů v čase, a proto je více teplotně stabilní. U systémů, ve kterých ceramidy začínaly v „extended“ konformaci (dolní dva grafy), je vždy vidět velký podíl molekul v konformaci „V-shape“.

Graf systému E_W--O-A-O--W ceramidu NS24 ukazuje (Obr. 18A), že u simulace při 296 K se větší část molekul nachází v konformaci „V-shape“, ale část jich stále setrvává v „extended“ konformaci. Při 310 K se už molekuly ceramidů nacházejí pouze v konformaci „V-shape“, což jim vydrží i při 370 K. Jak je vidět ze zastoupení konformací v čase (Obr. 18B), tak v systému došlo velmi rychle k přechodu mezi konformacemi „extended“ a „V-shape“, která je asi pro ceramid NS24 v tomto systém nejstabilnější.

Až na ceramid NP24 (Příloha 2) je u všech ostatních ceramidů v tomto uspořádání rovněž preferována konformace „V-shape“. U ceramidů NH24 (Příloha 3) a NT24 (Příloha 4) je vidět, že při 370 K se objevuje i konformace „extended“. Je tedy pravděpodobné, že přítomnost hydroxylové skupiny na sfingosinovém řetězci vybízí molekuly ceramidů k zaujetí „extended“ konformace. Z grafů, které ukazují časové změny v zastoupení jednotlivých konformací při 370 K, je vidět, že v jejich monovrstvách dochází k výraznějším změnám konformace než u zbylých ceramidů (Obr. 18B; Příloha 1B - 4B).

U systému E_W-O--A--O-W s ceramidem NS24 se jak při 296 K, tak při 310 K všechny molekuly nacházejí v konformaci „V-shape“ (Obr. 18A). Při 370 K došlo k výrazné změně distribuce úhlů a narostl počet molekul, které zaujaly „extended“ konformaci. Časový průběh zastoupení konformací (Obr. 18B) ukazuje, že dochází k výrazným změnám mezi konformacemi „extended“ a „V-shape“.



Obr. 19: **Změna konformace ceramidu.** Ceramidy umí změnit svou konformaci z „hairpin“ na „extended“. Dělají to postupným otočením svého kratší, tj. sfingosinového, řetězce. Na obrázku je vidět tato změna u jednoho ceramidu NS24 (systém H_W--OAO--W, 370 K), který je zvýrazněný žlutou barvou. Zelená kulička představuje jeho dusík a červené kuličky jeho kyslíky. Šedá je monovrstva ceramidů, do které patří, a modrá je vrstva molekul vody.

U všech simulací tohoto systému s ceramidem ND24 bylo možné vidět pouze konformaci „V-shape“ (Příloha 1). U ceramidů NH24 (Příloha 3) a NT24 (Příloha 4) byla vždy rovněž dominantní konformace „V-shape“, ale při 370 K dochází u obou ceramidů i k přechodu molekul do „extended“ konformace. Molekuly ceramidu NP24 (Příloha 2) se v tomto systému vždy nacházely pouze v „extended“ konformaci.

Jak bylo možné vidět, tak ceramidy s dlouhými acylovými řetězci mění konformaci pouze z „hairpin“ na „V-shape“ či „extended“ (Obr. 19), ale opačným směrem tento děj nebyl zaznamenán. Změna konformace z „hairpin“ na „extended“ byla v simulacích pozorována hlavně u nerovnovážného systému H_W--OAO--W. Ceramidy ji zde prováděly otočením svého kratšího, tj. sfingosinového, řetězce směrem do vakua.

4.2 Vliv typu a konformace ceramidů na plochu lipidů

Jak různé konformace ceramidů, tak jejich struktura se projevují na ploše, kterou v monovrstvě zaujímá jeden lipid (APL). Hodnoty tohoto parametru pro všechny simulované systémy při 310 K jsou umístěny na Obr. 20B.

Při srovnání hodnot APL u obou simulovaných „hairpin“ systémů (Obr. 20B, Obr. 20E) je vidět, že nižší hodnoty tohoto parametru jsou vždy u systému H_W--OAO--W. Je to zřejmě způsobeno tím, že ceramidy zde ve větší míře přecházejí z „hairpin“ do „extended“ konformace, což pochopitelně v důsledku zmenšuje i plochu monovrstvy.

Hodnota APL je u obou systémů s ceramidem NS24 v „hairpin“ konformaci nižší než u odpovídajících simulací s ceramidem ND24 (Obr. 20B). Za tento pokles je zřejmě zodpovědná C4 *trans* dvojná vazba ceramidu NS24, která umožňuje těsnější uspořádání ceramidů v membráně (Brockman *et al.*, 2004).

Srovnání APL ze simulací s ceramidem NS24 v „hairpin“ konformaci a s odpovídajícími simulacemi ceramidu NH24 (Obr. 20B) naznačuje, že hydroxylová skupina, kterou se oba ceramidy liší, zvětšuje hodnotu APL. Přidání další hydroxylové skupiny do sfingosinového řetězce už však tak výrazný vliv nemá, jak je vidět u simulací s ceramidem NT24 (Obr. 20B).

Srovnáním hodnot APL u systémů s ceramidem NS24 v „hairpin“ (Obr. 20C) a „extended“ konformaci (Obr. 20D) je vidět, že nižší hodnoty tohoto parametru charakterizují vždy systémy s ceramidem v konformaci „extended“. Oba systémy s „extended“ molekulami mají u daného ceramidu při stejné teplotě vždy zhruba srovnatelné hodnoty APL (Obr. 20D).

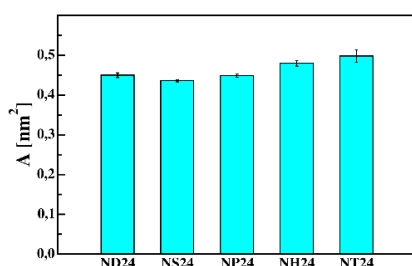
C4 *trans* dvojná vazba nemá na hodnoty APL ceramidů v „extended“ konformaci žádný významný vliv, jak ukazuje srovnání jejich hodnot u ceramidů ND24 a NS24 (Obr. 20B,D). Pokud se ve struktuře ceramidu vyskytuje nějaká hydroxylová skupina, tak dochází ke zvýšení hodnoty APL, což je vidět hlavně u dvojice ceramidů NS24 a NH24 (Obr. 20B,D).

CERAMID	KONFORMACE	A [nm ²]	T [K]	EXPERIMENT/SIMULACE	ZDROJ
NS24	Extended	0,250 - 0,300	325	Experiment	Dahlen a Pascher, 1979
NS24	Hairpin	0,378	323	Experiment	Brockmann <i>et al.</i> , 2004
NS24	Hairpin	0,42	323	Experiment	Löfgren a Pascher, 1977
NS24	Hairpin	0,40	325	Experiment	Dahlen a Pascher, 1979
NS24	Hairpin	0,40 - 0,45	300	Experiment	Scheffer <i>et al.</i> , 2005
NS24	Hairpin	0,404	300	Simulace	Papadimitriou <i>et al.</i> , 2014
NS24	Hairpin	0,374	323	Simulace	Notman <i>et al.</i> , 2007
NS16	Hairpin	0,424	305	Simulace	Guo <i>et al.</i> , 2013
NP16	Hairpin	0,421	305	Simulace	Guo <i>et al.</i> , 2013

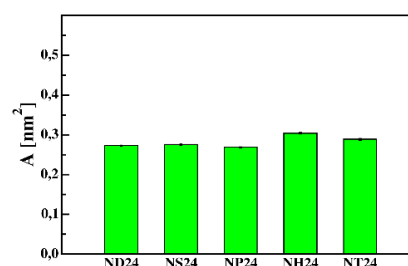
A

CERAMID	H_WO--A--OW	H_W--OAO--W	E_W--O-A-O--W	E_W-O--A--O-W
ND24	0.450 ± 0.006	0.404 ± 0.005	0.273 ± 0.001	0.273 ± 0.001
NS24	0.436 ± 0.003	0.390 ± 0.004	0.276 ± 0.002	0.275 ± 0.002
NP24	0.449 ± 0.004	0.407 ± 0.007	0.269 ± 0.001	0.270 ± 0.001
NH24	0.480 ± 0.007	0.430 ± 0.004	0.304 ± 0.002	0.327 ± 0.002
NT24	0.498 ± 0.016	0.448 ± 0.005	0.289 ± 0.002	0.291 ± 0.002

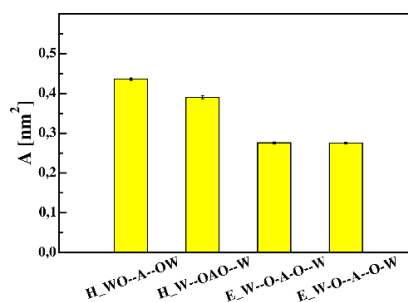
B



C



D



E

Obr. 20: **Plocha lipidu v ceramidové monovrstvě.** Obrázek dokumentuje, jak struktura sfingosinového řetězce a konformace ceramidů ovlivňují hodnoty plochy lipidu (APL). V tabulce (A) jsou uvedeny hodnoty APL dostupné v literatuře. V tabulce (B) jsou shrnuty hodnoty APL pro všechny simulované systémy a ceramidy při 310 K. Experimentálně zjištěným hodnotám odpovídá APL u systému H_WO--A--OW, jejíž hodnoty jsou vyneseny do grafu (C), který zároveň ukazuje vliv struktury sfingosinového řetězce na hodnoty APL u „hairpin“ konformace. Stejný význam má pro „extended“ konformaci graf (D). Jak byly hodnoty APL ovlivňovány uspořádáním simulovaného systému, je potom u ceramidu NS24 vidět na grafu (E).

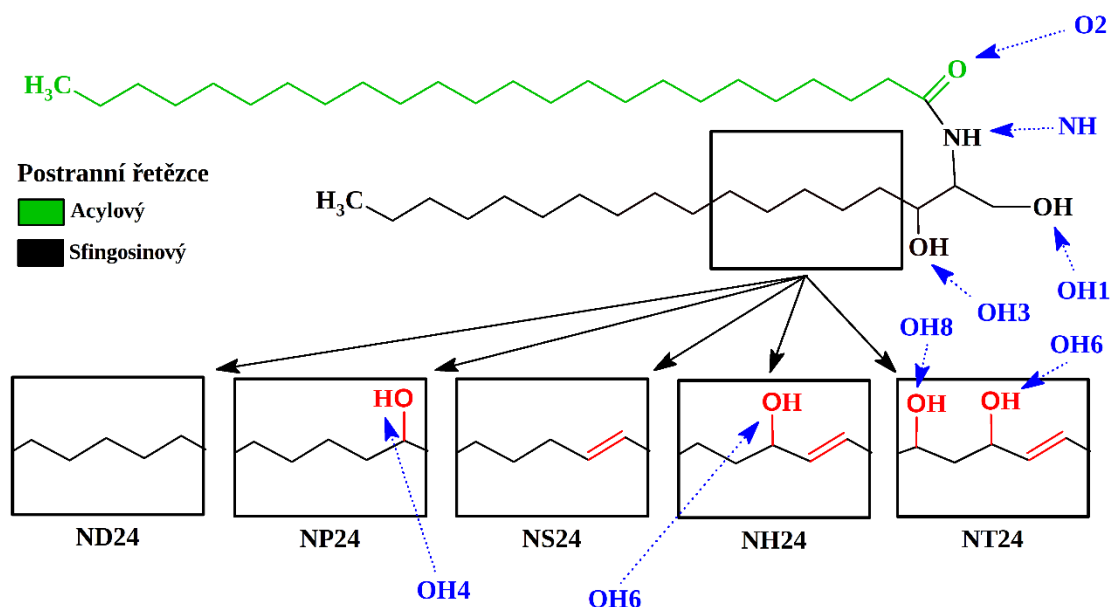
Hodnoty APL u ceramidu NS24 v extended konformaci byly experimentálně stanoveny z krystalu pomocí rentgenové difrakce (Dahlen a Pascher, 1979). Mohou se pohybovat zhruba v rozmezí od 0,250 nm² do 0,300 nm². Horní hranice, tj. 0,300 nm², odpovídá monovrstvě, ve které jsou lipidy vyrovnány jeden vedle druhého a své polární hlavy mají uspořádané v jedné rovině. Polární hlavy jsou objemnější, a proto zabírají v monovrstvě velkou plochu. Řetězcům tak zbývá příliš mnoho volného prostoru, takže se musí naklonit, aby byl ve struktuře zajištěn jejich vzájemný kontakt. Díky tomu mohou při stejné hodnotě APL zaujmout i dvě jiné rovnocenné pozice. Jednou možností je, že řetězce budou v membráně nakloněny od její osy z, ale každý z řetězců bude směřovat na opačnou stranu, a druhou možností je, že nakloněné řetězce budou směřovat stejným směrem, čímž molekula zaujme konformaci „V-shape“. Dolní hranice APL u extended konformace je zhruba 0,250 nm². Ta odpovídá situaci, kdy jsou molekuly ceramidů opět vyrovnány vedle sebe, ale jejich hlavy se nenachází v jedné rovině, nýbrž některé se z ní posunuly nahoru či dolů. Tím pádem se v rovině, ve které se hlavy původně nacházely, objevil jeden z řetězců ceramidu, který ovšem nezaujímá tak velkou plochu, což umožnilo ceramidům se těsněji přimknout k sobě. Hodnoty APL, které byly získány ze simulací (Obr. 20B), jenž jsou zde popisovány, se nacházejí v experimentálně stanoveném rozsahu.

APL se experimentálně zjišťuje měřením tzv. Langmuirovy monovrstvy (Wilke, 2014). Když se amfifilní molekuly, např. ceramidy, které jsou rozpuštěné v organickém rozpouštědle, vystaví vodnímu povrchu, tak jejich roztok rychle zaplní plochu, kterou mají k dispozici. Zatímco organické rozpouštědlo se vypařuje, tak amfifilní molekuly se snaží natočit tak, aby co možná nejvíce zmenšily kontakt mezi vodou a nepolárními řetězci, ale zároveň maximalizovali kontakt mezi vodou a jejich polární částí. Výsledkem je tenký film, který má tloušťku jedné molekuly a nazývá se Langmuirova monovrstva. Z tohoto důvodu zhruba odpovídají experimentálně naměřené hodnoty APL těm ze simulace systému H₂O--A--OW.

V simulaci systému H₂O--A--OW při 310 K, který se skládal z ceramidů NS24, byla určena hodnota jeho APL na 0,436 ± 0,003 nm² (Obr. 20B). Je to trochu více, než je většina experimentálních hodnot (Obr. 20A), např. 0,38 nm² (Brockman *et al.*, 2004), 0,42 nm² (Löfgren a Pascher, 1977), ale spadá do rozsahu hodnot experimentálně zjištěných Schefferem *et al.* (2005).

4.3 Síť vodíkových vazeb

Vodíkové vazby jsou důležité pro udržení struktury celé řady biomakromolekul a rovněž i pro uspořádání molekul ceramidů (Dahlen a Pascher, 1979; Rerek *et al.*, 2001). Jejich popis, který je dále uveden, byl získán analýzou simulací při 310 K, což je fyziologická teplota člověka. Naměřené hodnoty, které budou dále uváděny, jsou průměrné počty vodíkových vazeb mezi danými partnery, jenž jsou vztažené na jednu molekulu ceramidu.



Obr. 21: **Funkční skupiny simulovaných ceramidů.** V rámci této práce bylo použito pět ceramidů, které se lišily strukturou sfingosinového řetězce. Rozdíly ve struktuře jsou na obrázku vyznačeny červeně. Modré popisky potom přiřazují jednotlivým funkčním skupinám označení, pod kterým se o nich mluví dále v textu.

4.3.1 Intramolekulární vodíkové vazby v ceramidech

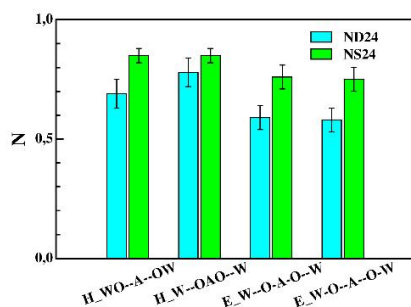
Ceramidy mají především v oblasti hlav několik funkčních skupin (Obr. 21), které mohou vytvářet vodíkové vazby nejen mezi různými molekulami, ale i v rámci jedné molekuly ceramidu. Ve všech simulovaných systémech (Obr. 22A) byla detekována intramolekulární vodíková vazba mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3 (Obr. 22D), což ukazuje, že je zřejmě charakteristická pro všechny simulované ceramidy.

Při srovnání intenzit této vazby u systémů s ceramidy ND24 a NS24 (Obr. 22A,B) je většinou vidět, že u ceramidu ND24 jsou její hodnoty nižší než u ceramidu NS24. Výjimku v tomto směru tvoří systém H_W--OAO--W (Obr. 22B).

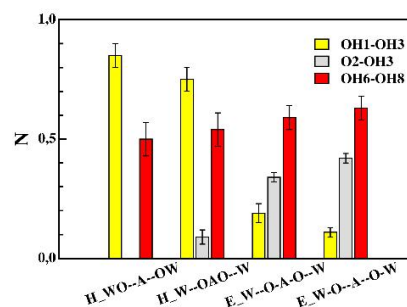
Pokles intenzity intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3 je způsoben ztrátou C4 *trans* dvojně vazby (Li *et al.*, 2002). Její ztráta má vliv i na fázové chování ceramidů (Stahlberg *et al.*, 2015). Ceramid NS24 preferuje orthorombickou fázi, zatímco u ceramidy ND24 byla z 25 % nahrazena fází izotropní, kterou na rozdíl od orthorombické fáze snadněji procházejí látky. Toto pozorování ukazuje na důležitost C4 *trans* dvojně vazby pro funkci *strata cornea* jako kožní bariéry.

CERAMID	VODÍKOVÁ VAZBA	H_WO--A--OW	H_W--OAO--W	E_W--O-A-O--W	E_W-O--A--O-W
ND24	OH1-OH3	0,69 ± 0,06	0,78 ± 0,06	0,59 ± 0,05	0,58 ± 0,05
NS24	OH1-OH3	0,85 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,76 ± 0,05	0,75 ± 0,05
NP24	OH1-OH3	0,76 ± 0,06	0,77 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,59 ± 0,05
NH24	OH1-OH3	0,85 ± 0,05	0,83 ± 0,05	0,76 ± 0,05	0,86 ± 0,04
NT24	OH1-OH3	0,85 ± 0,05	0,75 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,11 ± 0,02
	O2-OH3	< 0,1	< 0,1	0,34 ± 0,02	0,42 ± 0,02
	OH6-OH8	0,50 ± 0,07	0,54 ± 0,07	0,59 ± 0,05	0,63 ± 0,05

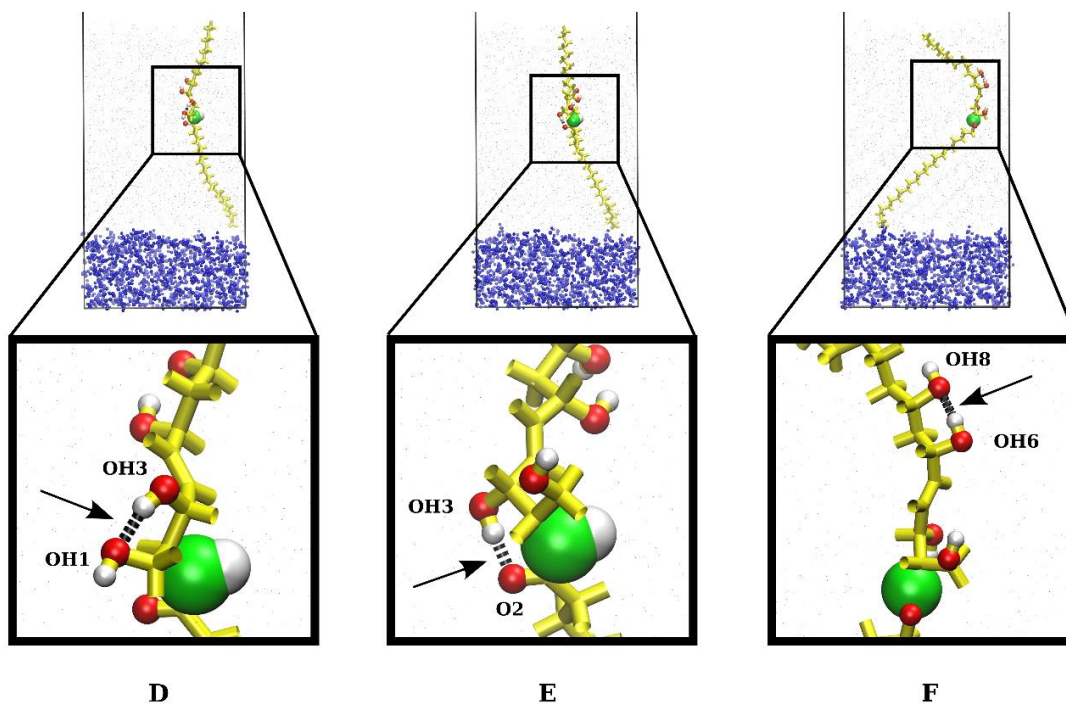
A



B



C



D

E

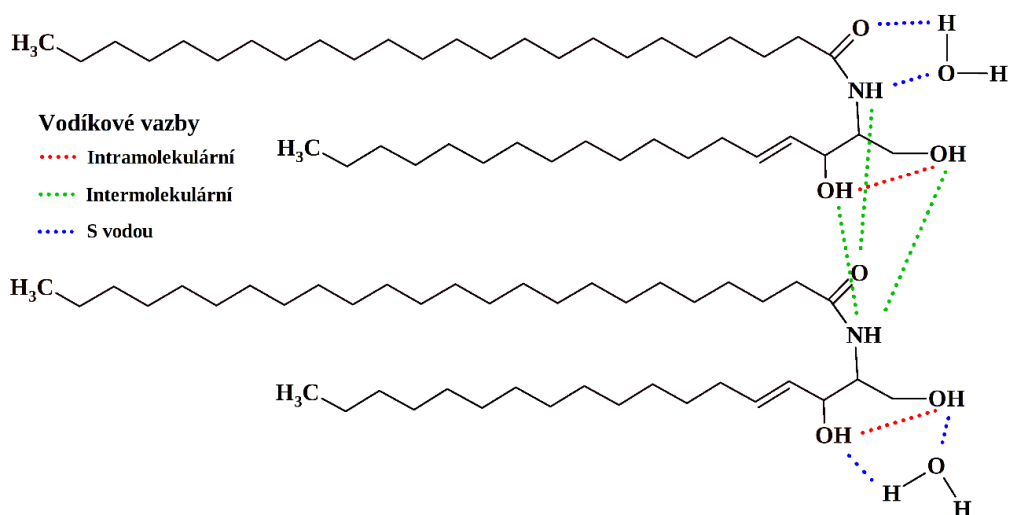
F

Obr. 22: **Intramolekulární vodíkové vazby.** V tabulce (A) jsou uvedeny intramolekulární vodíkové vazby simulovaných ceramidů, jejichž průměrná hodnota vztažená na jednu molekulu ceramidu byla vyšší než 0,1, tj. které se v průměru vyskytují u více jak 10 % molekul. Graf (B) ukazuje, že C4 *trans* dvojná vazba zvyšovala intenzitu intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3 s výjimkou systému H_W--OAO--W. U ceramidu NT24 se kromě vazby mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3 (D) vyskytovaly i vazby mezi ketoskupinou O2 a hydroxylovou skupinou OH3 (E) a hydroxylovými skupinami OH6 a OH8 (F). Graf (C) ukazuje u ceramidu NT24 vztah mezi těmito vazbami a konformací jeho molekul.

Ceramid NT24 má ve své struktuře více hydroxylových skupin než ostatní simulované ceramidy, což mu umožňuje rozvinout rozsáhlejší a pestřejší síť vodíkových vazeb jak intermolekulárních (Příloha 5), tak intramolekulárních. Není tedy divu, že pouze u simulací s ceramidem NT24 se objevily i dvě jiné intramolekulární vodíkové vazby (Obr. 22A). První z nich byla mezi ketoskupinou O2 a hydroxylovou skupinou OH3 (Obr. 22E). Ta je u ceramidu NT24 zřejmě charakteristická pro „extended“ konformaci (Obr. 22C), protože v „hairpin“ konformaci se téměř nevyskytovala. Druhá se potom nacházela mezi hydroxylovými skupinami OH6 a OH8 (Obr. 22F). Ta je pro ceramid NT24 typická, protože byla detekována ve všech jeho konformacích. Bez zajímavosti není, že vazba mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3 je u ceramidu NT24 charakteristická pro „hairpin“ konformaci (Obr. 22C).

4.3.2 Intermolekulární vodíkové vazby mezi ceramidy

U všech simulovaných ceramidů je shodná struktura sfingosinového řetězce od prvního ke třetímu uhlíku (Obr. 21). Tato část, která se nazývá hlava, obsahuje spolu se začátkem acylového řetězce polární skupiny (aminoskupina NH, ketoskupina O2, hydroxylové skupiny OH1 a OH3), jenž mezi sebou vytváří vodíkové vazby charakteristické pro všechny simulované ceramidy. Vyskytují se u všech ceramidů bez ohledu na jeho sfingosinový řetězec či konformaci. Jsou to vodíkové vazby mezi aminoskupinou NH a buď ketoskupinou O2 a nebo hydroxylovými skupinami OH1 či OH3 (Obr. 23, Příloha 5). Tyto vazby byly zastoupeny někdy více, někdy zase méně nebo v minimu případů chyběla vodíková vazba k jedné z hydroxylových skupin, ale tento základní motiv bylo vždy možné pozorovat.



Obr. 23: Diagram vodíkových vazeb charakteristických pro ceramidy. Zdá se, že vodíkové vazby mezi funkčními skupinami z oblasti hlav jsou pro ceramidy charakteristické. Schéma znázorňuje vodíkové interakce ceramidu NS24. Vodíkové vazby intramolekulární jsou na obrázku naznačeny červeně, intermolekulární mezi ceramidy zeleně a intermolekulární s vodou modře.

Základ sítě vodíkových vazeb mezi ceramidy byl popsán i experimentálně pomocí nukleární magnetické rezonance (Li *et al.*, 2002). Autoři studie zjišťovali, jaký vliv má ztráta C4 *trans* dvojnásobné vazby, ke které dochází u CER[NdS], na tvorbu vodíkových vazeb. Tato strukturní změna totiž zřejmě ovlivňuje i biologickou aktivitu molekuly, jelikož CER[NS] na rozdíl od CER[NdS] slouží jako druhý posel (signální molekula), který reguluje růst, diferenciaci a apoptózu buňky. U obou ceramidů navrhuje, že aminoskupina NH je donorem protonu pro hydroxylové skupiny OH1 a OH3 sfingosinového řetězce, což je v souladu s našimi simulacemi. Celá síť je stabilizována flip-flop interakcemi molekul vody. Dospěli také k závěru, že ztráta C4 *trans* dvojnásobné vazby má za následek pokles hodnoty intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3. Tyto interakce polární části ceramidů jsou nezávislé na délce acylového řetězce.

U všech systémů s ceramidy v „hairpin“ konformaci byla významně zastoupena intermolekulární vodíková vazba mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2 (Obr. 24A,B,D). U „extended“ konformace tato interakce naopak slábne a někdy dokonce zcela chybí (Obr. 24A) a místo ní se objevuje interakce mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH1, která je pro tuto konformaci charakteristická (Obr. 24B,E).

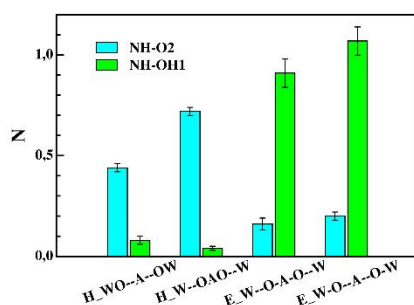
Podle simulací přítomnost hydroxylové skupiny na sfingoidním řetězci (ceramidy NP24, NH24, NT24) nepřinesla žádnou další významně zastoupenou intermolekulární vodíkovou vazbu mezi ceramidy. Naopak bylo detekováno větší množství různých vodíkových vazeb, které měly menší intenzitu (Příloha 5). Např. ceramid NH24 obsahuje ve své struktuře oproti ceramidu NS24 navíc jednu hydroxylovou skupinu OH6 a byly u něj navíc detekovány např. intermolekulární vodíkové vazby mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH3, hydroxylovými skupinami OH1 a OH3, aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH6, ketoskupinou O2 a hydroxylovou skupinou OH6 (Příloha 5).

V řadě ceramidů NS24, NH24 a NT24 roste počet hydroxylových skupin ve sfingosinovém řetězci. Stejným směrem, jakým roste počet hydroxylových skupin, v této řadě také klesá intenzita interakce mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2 u „hairpin“ konformace (Obr. 24C) a interakce mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH1 u „extended“ konformace (Obr. 24C).

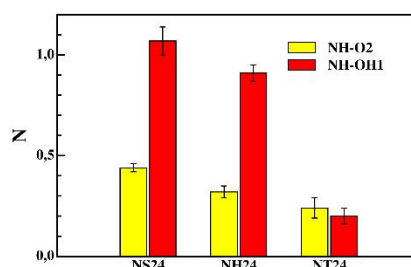
Z ceramidů, které ve svém sfingosinovém řetězci obsahují hydroxylovou skupinu, je nejvíce experimentálně prozkoumán CER[NP]. Byla u něj navržena rozsáhlejší síť vodíkových vazeb, než se nachází u CER[NS] a to jak experimentálně (Rerek *et al.*, 2001; Školová *et al.*, 2017), tak výpočetně (Guo *et al.*, 2013). Biologický význam jeho hydroxylace však doposud není znám. Bylo navrženo, že CER[NP] může snižovat propustnost *strata cornea* tím, že redukuje poškození jeho struktury nebo uspořádává kapalnou doménu, kterými mohou látky pronikat snadněji než jeho zbylými částmi (Rerek *et al.*, 2005).

CERAMID	VODÍKOVÁ VAZBA	H_WO--A--OW	H_W--OAO--W	E_W--O-A-O--W	E_W-O--A--O-W
ND24	NH-O2	0,44 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
	NH-OH1	0,12 ± 0,04	< 0,1	1,23 ± 0,06	1,24 ± 0,06
NS24	NH-O2	0,44 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,20 ± 0,02
	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,91 ± 0,07	1,07 ± 0,07
NP24	NH-O2	0,21 ± 0,05	0,58 ± 0,04	< 0,1	0,12 ± 0,02
	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	1,31 ± 0,10	1,00 ± 0,06
NH24	NH-O2	0,32 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,14 ± 0,03	< 0,1
	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,81 ± 0,05	0,91 ± 0,04
NT24	NH-O2	0,24 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,44 ± 0,03
	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,24 ± 0,03	0,20 ± 0,04

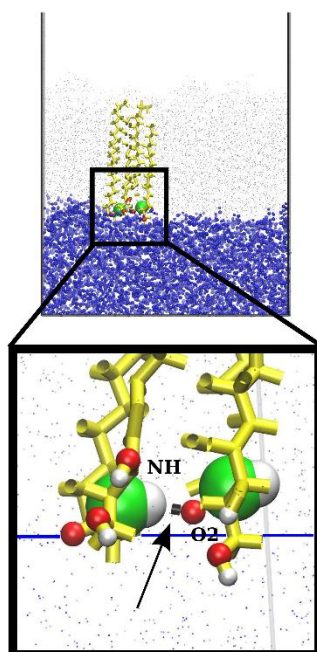
A



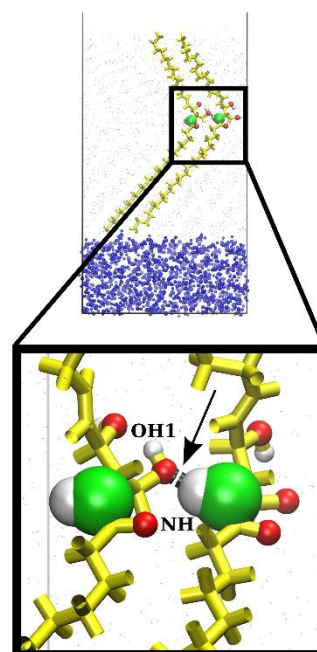
B



C



D



E

Obr. 24: Intermolekulární vodíkové vazby mezi molekulami ceramidů. Nejdůležitější intermolekulárními vodíkovými vazbami jsou interakce mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2 (D) u „hairpin“ konformace a interakce mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH1 (E) u „extended“ konformace, což je vidět u ceramidu NS24 (B). S rostoucím počtem hydroxylových skupin ve sfingosinovém řetězci klesá intenzita těchto dvou vazeb (C).

Na druhou stranu ale při pokusech, které byly dělány na membránách složených z CER[NP], kyseliny lignocerové, cholesterolu a 5% (m/m) cholesterolulfátu, vykazovaly membrány s NP24 menší podíl orthorombické fáze, která je pro látky neprostupná, a menší tepelní stabilitu než membrány s NS24 či ND24 (Školová *et al.*, 2017). NP24 se také na rozdíl od NS24 nemíchal s kyselinou lignocerovou, která se nacházelo v orthorombické fázi, ale zůstával ve fázi hexagonální. Jeho hydroxylová skupina ho tedy před takovýmto mísením nějakým způsobem chrání (Školová *et al.*, 2017).

4.3.3 Intermolekulární vodíkové vazby mezi ceramidy a vodou

Síť vodíkových vazeb mezi molekulami ceramidů a vody bylo možné pozorovat pouze u simulací systému H_WO--A--OW (Obr. 25A). Tyto vodíkové vazby u každého ceramidu svým počtem převyšovaly vodíkové vazby mezi ceramidy samotnými, které byly popisovány v minulé kapitole.

Stejně jako v předchozím případě tak i zde je možné pozorovat jakési základní schéma, kterým ceramidy v simulacích interagovaly. Toto schéma bude popsáno na ceramidu NS24 (Obr. 23).

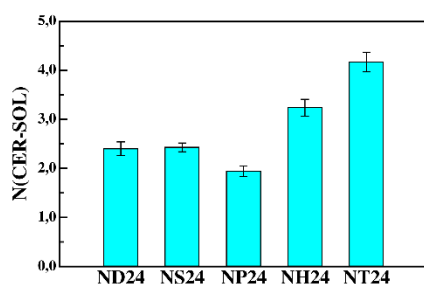
Simulace ukázaly, že hydroxylová skupina OH1 se ze všech funkčních skupin nejvíce podílí na vodíkových vazbách mezi ceramidy a vodou ($1,00 \pm 0,07$). Převážně vystupuje jako donor protonů ($0,61 \pm 0,05$) pro kyslík z molekuly vody, ale zároveň funguje i jako jejich akceptor ($0,38 \pm 0,06$). Experimentálně bylo potom pozorováno, jak se k této hydroxylové skupině molekuly vody otáčejí střídavě svými vodíky a svým kyslíkem (Adhikari *et al.*, 2016), což vysvětluje naměřené hodnoty.

Vodíkové vazby s vodou tvořily v simulacích i zbylé kyslíkaté funkční skupiny, které se vyskytují na ceramidu NS24. Jak ketoskupina O2 (Obr. 25A), tak hydroxylová skupina OH3 (Obr. 25A) jsou pouze akceptory vodíkových protonů molekul vody. Nejméně se na interakcích mezi vodou a ceramidy podílí aminoskupina NH (Obr. 25A), která je výhradně donorem vodíků pro kyslíkové atomy z molekul vody. Chování těchto funkčních skupin odpovídá i výsledkům experimentu (Adhikari *et al.*, 2016).

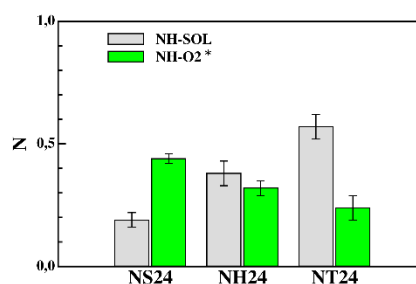
U vodíkových vazeb mezi ceramidem NS24 a vodou byly ze dvou třetin donorem protonů molekuly vody ($1,62 \pm 0,07$) a pouze z jedné třetiny molekuly ceramidů ($0,82 \pm 0,06$). Toto zjištění je v souladu s pozorováními, která experimentálně učinil Adhikari *et al.* (2016). Tvrdí, že se molekuly vody na neionizovaném rozhraní mezi ceramidy a vodou raději orientují svými vodíkovými atomy směrem k lipidům než směrem do vodné fáze. Toto uspořádání je dáno především hydroxylovou skupinou OH3 z ceramidu, jejíž kyslík je akceptorem vodíkových atomů vody, zatímco její vodík vytváří intramolekulární vazbu s kyslíkem z hydroxylové skupiny OH1.

FUNKČNÍ SKUPINA	ND24	NS24	NP24	NH24	NT24	AKCEPTOR/DONOR VODÍKU
CER	2,40 ± 0,14	2,43 ± 0,09	1,94 ± 0,11	3,24 ± 0,17	4,17 ± 0,20	A/D
NH	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,57 ± 0,05	D
OH1	0,98 ± 0,10	0,99 ± 0,07	0,75 ± 0,08	1,04 ± 0,10	1,03 ± 0,11	A/D
O2	0,80 ± 0,07	0,81 ± 0,05	1,06 ± 0,06	0,81 ± 0,07	0,80 ± 0,10	A
OH3	0,43 ± 0,07	0,45 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,63 ± 0,07	0,82 ± 0,08	A
OH4			0,03 ± 0,02			A/D
OH6				0,37 ± 0,06	0,67 ± 0,09	A/D
OH8					0,29 ± 0,07	A/D

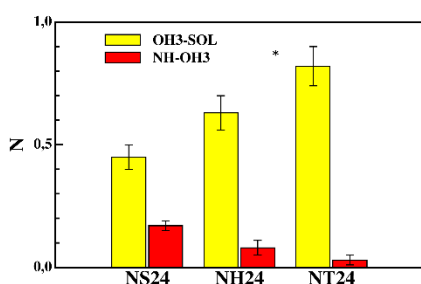
A



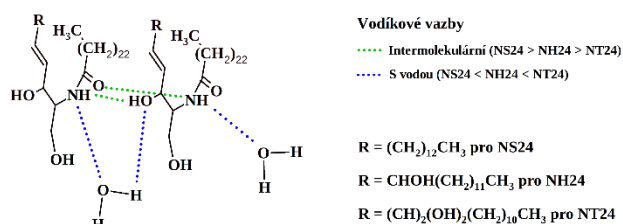
B



C



D



E

* Intermolekulární vodíkové vazby mezi ceramidy u systému H₂O--A--OW

Obr. 25: Intermolekulární vodíkové vazby mezi molekulami ceramidů a vody. V tabulce (A) jsou uvedeny vodíkové vazby mezi všemi funkčními skupinami simulovaných ceramidů a vodou. Tyto vodíkové vazby byly detekovány pouze u systému H₂O--A--OW. Čísla jsou vždy uvedena se směrodatnou odchylkou. Data byla získána ze simulací při teplotě 310 K. Graf (B) znázorňuje celkový počet interakcí s vodou, který v přepočtu připadá na jednu molekulu daného ceramidu. Grafy (C) a (D) ukazují, jak s rostoucím počtem hydroxylových skupin ve sfingosinovém řetězci klesá počet daných intermolekulárních vodíkových vazeb mezi ceramidy samotnými a narůstá počet interakcí mezi ceramidy a vodou. Tyto změny jsou potom schématicky vyjádřeny na obrázku (E).

Síť vodíkových vazeb u simulací s ceramidem NS24 se shodovala s tou u ceramidu ND24 (Obr. 25A), takže se zdá, že C4 *trans* dvojná vazba nemá zásadní vliv na síť vodíkových vazeb mezi ceramidy a vodou.

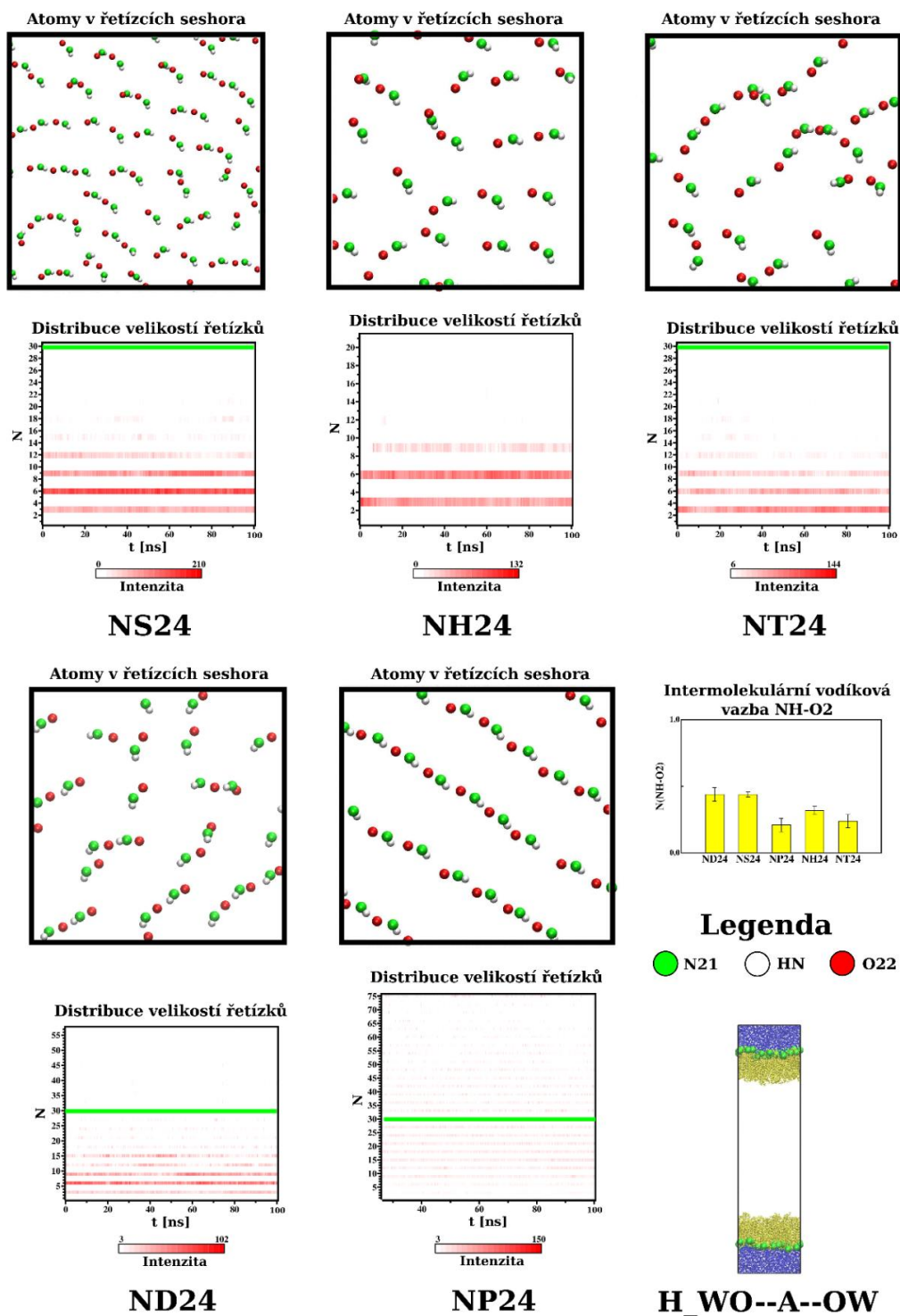
Také se zdá, že na rozdíl od C4 *trans* dvojně vazby vnesení hydroxylové skupiny do struktury sfingosinové báze má zásadní vliv na interakce mezi ceramidy a vodou. Vypadá to, že vložená hydroxylová skupina je ceramidem využita k posílení interakcí mezi ním a vodou. Toto tvrzení lze ilustrovat hned na několika příkladech.

Za prvé při srovnání celkového počtu vodíkových vazeb mezi ceramidem a vodou (Obr. 25B) je vidět, že v řadě ceramidů NS24, NH24 a NT24, kde roste počet hydroxylových skupin ve sfingosinovém řetězci, také zároveň roste i počet interakcí mezi ceramidem a vodou. Za druhé ve stejné řadě ceramidů dochází se vzrůstajícím počtem hydroxylových skupin zároveň jak k poklesu intenzity intermolekulární vodíkové vazby mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2, tak k nárůstu intenzity interakcí mezi aminoskupinou NH a molekulami vody (Obr. 25C). A za třetí dochází opět v této řadě ceramidů k poklesu intenzity intermolekulární vodíkové vazby mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH3 a k nárůstu interakcí mezi hydroxylovou skupinou OH3 a molekulami vody (Obr. 25D). Všechny tyto změny interakcí vedou k oslabení sítě vodíkových vazeb mezi ceramidy samotnými a k posílení interakcí jednotlivých molekul ceramidů s molekulami vody (Obr. 25E). Hydroxylové skupiny, které byly diskutovány v tomto odstavci, mohou vůči molekulám vody vystupovat buď jako akceptory, nebo i jako donory vodíkového protonu (Obr. 25A).

4.4 Řetízování molekul ceramidů

Z analýzy simulací vyplývá, že intermolekulární vodíková vazba mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2 je zřejmě spojena se zajímavým jevem, kterým je řetízování molekul ceramidů (Obr. 26; Přílohy 6 - 8). Při pohledu shora na simulační box bylo vidět, jak se jednotlivé molekuly staví jakoby „do vláček“. Toto chování bylo pozorováno u všech systémů, které se na začátku nacházely v „hairpin“ konformaci (Obr. 26; Příloha 6), přičemž výraznější byl tento jev u systému H_W--OAO--W (Příloha 6), ve kterém nebyl ovlivněn interakcemi s molekulami vody.

Simulace rovněž ukazují, že vzniklé útvary sice drží pohromadě interakcemi mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2, ale jejich struktura je významně ovlivněna strukturou ceramidů. Mezi ceramidem NS24 (Obr. 26; Příloha 6), který má C4 *trans* dvojnou vazbu, a ceramidem ND24 (Obr. 26; Příloha 6) není, co se týče řetízování, žádný větší rozdíl. Oproti tomu ceramid NP24 (Obr. 26; Příloha 6), který má místo dvojně vazby navázanou hydroxylovou skupinu, tvoří dlouhé řetízky, ve kterých bývá zapojeno podstatně více molekul než u ceramidu ND24. Jak je vidět z grafu, který popisuje časový vývoj velikosti řetízků, tak s rostoucím časem má ceramid NP24 tendenci tvořit delší a delší řetízky hlavně o celkové délce sedmi až osmi molekul. Oproti ceramidu ND24 vykazuje nižší zastoupení u jednotlivých distribucí řetízků.



Obr. 26: **Řetízování ceramidů.** Řetízování ceramidů je zřejmě spojeno s vodíkovou vazbou mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2. Ukázka řetízků v čase 100 ns je vždy vidět v horní části obrázku. Barevně jsou tam vyznačeny atomy výše jmenovaných funkčních skupin. Dole je potom celý jev kvantifikován. Na ose y je vidět počet atomů v řetízku (program `g_clustsize` přidal do jednoho řetízku atomy N21, HN a O22, jejichž vzdálenost byla menší než 0,35 nm, tj. délka vodíkové vazby; počet molekul ceramidů v jednom řetízku je tedy hodnota na ose y vydělená třemi). Vzhledem k rozdílným rozsahům na osách y je každý z grafů opatřen zelenou linkou u klastrů s právě 10 ceramidy (hodnota 30), která umožňuje jejich vzájemné porovnání. Obrázky simulace systému H_WO--A--OW při 310 K.

Ceramidy NH24 a NT24 (Obr. 26; Příloha 6) mají tendenci tvořit kratší řetízky než ceramid NS24. Kombinace dvojné vazby a jedné hydroxylové skupiny tedy zřejmě snižuje schopnost ceramidů vytvářet tyto struktury. Přidání další hydroxylové skupiny u ceramidu NT24 sice tvorbu řetízků podporuje, ale i přesto jednotlivé distribuce nedosahují intenzit jako u ceramidu NS24. Je pravděpodobné, že u ceramidů NH24 a NT24 brání z protorových důvodů tvorbě řetízků přítomnost jedné, respektive dvou hydroxylových skupin.

U systémů, v nichž ceramidy začínaly z „extended“ konformace, bylo možné řetízkování pozorovat v podobné intenzitě jako u „hairpin“ konformací jen u ceramidu NT24 (Příloha 7 a 8). Důvodem je zřejmě změna orientace vodíkových vazeb. Vodíková vazba mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2 byla totiž detekována v „extended“ konformaci pouze u ceramidu NT24, u všech ostatních ceramidů se místo ní vytvořila interakce mezi aminoskupinou NH a hydroxylovou skupinou OH1. I přesto však byly pokaždé detekovány jisté řetízky, mezi kterými však největší intenzitu měla distribuce tvořená jednou molekulou. Ukázkovým příkladem, že ceramidy v „extended“ konformaci netvoří řetízky, je ceramid NH24 v systému E_W-O--A--O-W (Příloha 8).

4.5 Trendy chování ceramidových typů

Srovnání předešlých analýz u ceramidů ND24 a NS24 nám ukazuje, jak ovlivňuje monovrstvy na rozhraní vody a vzduchu přítomnost C4 *trans* dvojné vazby. Tento strukturální prvek u ceramidů v „hairpin“ konformaci snižuje hodnoty jejich APL (Obr. 20B,C). Co se týče vodíkových vazeb, tak nejvíce ovlivňuje intramolekulární vodíkovou interakci mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3, kde přítomnost dvojné vazby zvyšuje její intenzitu (Obr. 22B). K podobným závěrům došel experimentálně i Li *et al.* (2002). V ostatních charakteristikách mezi NS24 a ND24 nebyly pozorovány žádné významné rozdíly.

Porovnání ceramidů ND24 a NP24 nám zase řekne, co s monovrstvami na rozhraní vody a vzduchu udělá přítomnost hydroxylové skupiny u NP24. Překvapující je fakt, že u ceramidu NP24 nedošlo ke zvýšení hodnot APL (Obr. 20A,B,C). Přítomnost hydroxylové skupiny se však projevila u distribuce úhlů, které svírají řetězce ceramidů v „extended“ konformaci. Zde došlo oproti ostatním simulovaným ceramidům k jednoznačné preferenci konformace „extended“ před „V-shape“ (Příloha 1,2). U hydroxylové skupiny lze předpokládat zapojení do sítě vodíkových vazeb, které bylo vidět především u intermolekulárních vazeb mezi ceramidy. Sice nevznikla žádná nová velmi významná interakce, ale byla pozorována spleť slabších vodíkových vazeb (Příloha 5). Co se týče řetízkování, tak hydroxylová skupina rozhodně podporuje tvorbu dlouhých řetízků, kdy NP24 vytváří vůbec nejdelší pozorované řetízky (Obr. 26; Příloha 6).

Nicméně záleží i na umístění a počtu hydroxylových skupin v ceramidu, jak ukazuje srovnání mezi ceramidy NS24, NH24 a NT24. Zde se hydroxylové skupiny vyskytují až za dvojnou vazbou dále od hlavičky a hodnoty APL zde poté rostou, především u „hairpin“ konformací (Obr. 20). Zvyšující se počet hydroxylových skupin rovněž podporuje u molekul ceramidů roztaženější konformace (Obr. 18; Přílohy 3,4). U systému H₂O--A--O s ceramidem NS24 nebylo možné při 370 K pozorovat žádnou molekulu v konformaci „V-shape“, což už bylo vidět u ceramidu NH24 a výrazněji i u ceramidu NT24 (Obr. 18; Přílohy 3,4). Rostoucí počet hydroxylových skupin ovlivňuje samozřejmě i síť vodíkových vazeb. Ceramid NT24 vytváří oproti ostatním ceramidům dvě pro něj zřejmě specifické intramolekulární interakce (Obr. 22). Všechny tři ceramidy vytvářejí stejně jako ceramid NP24 hustou síť méně intenzivních vodíkových vazeb mezi svými molekulami (Příloha 5). Pokud jsou jejich hlavové skupiny v kontaktu s vodou, tak dochází k rozvinutí sítě vodíkových vazeb mezi molekulami ceramidů a vody na úkor interakcí mezi ceramidy samotnými (Obr. 24, 25). Kombinace C4 *trans* dvojných vazeb a hydroxylové skupiny příliš nepřispívá k tvorbě dlouhých řetězků ceramidů (Obr. 26; Příloha 6).

5. ZÁVĚR

Znalost strukturních vlastností ceramidů je důležitá pro pochopení, jakým způsobem ovlivňují architekturu membrán *strata cornea*. U simulací, které jsou popisovány v této diplomové práci, bylo pozorováno, že molekuly ceramidů spíše mění konformaci z „hairpin“ na „V-shape“ a následně „extended“, ale nikoli opačně. Přítomnost hydroxylových skupin ve struktuře ceramidů podporuje roztaženější konformace. Naopak, proti změně konformace z „hairpin“ na „extended“ působí přítomnost molekul vody u polární části ceramidů. Mezi molekulami vody a ceramidů pak dojde k vytvoření sítě vodíkových vazeb, která stabilizuje molekuly ceramidů v „hairpin“ konformaci. Pokud odstraníme kontakt hlav ceramidů s vodou, tak molekuly začnou přecházet až do „extended“ konformace. Učiní tak otočením sfingosinového řetězce.

Základem sítě vodíkových vazeb mezi molekulami ceramidů jsou vazby mezi aminoskupinou NH a buď ketoskupinou O2 nebo hydroxylovými skupinami OH1 a OH3. C4 *trans* dvojná vazba u ceramidu NS24 ovlivňuje síť vodíkových vazeb mezi ceramidy, což je vidět například na poklesu intenzity intramolekulární vazby mezi hydroxylovými skupinami OH1 a OH3, ale zřejmě nemá významný vliv na interakce mezi ceramidy a vodou. Hydroxylové skupiny podporují pestrost sítě vodíkových vazeb mezi ceramidy. Pokud je hlavová část ceramidů v kontaktu s vodou, tak ceramidy NH24 a NT24 využijí přítomnost hydroxylových skupin k rozšíření sítě vodíkových interakcí mezi molekulami ceramidů a vody na úkor vodíkových vazeb mezi samotnými molekulami ceramidů, což je spojeno i s výrazným nárůstem APL pro tyto ceramidy.

V této práci byly popsány významné rozdíly v chování molekul ceramidů, které se vyskytují v lidském těle a liší se polohou a množstvím hydroxylových skupin či dvojných vazeb. V simulacích jsme v atomárním rozlišení viděli rozdílné konformační chování molekul, které se ve *stratu corneum* může projevit např. při uspořádávání vícevrstev, které jsou nejspíše propojené molekulami v „extended“ konformaci. Odlišné konformační uspořádání se může projevit také rozdílnými interakcemi ceramidů s vodou či přímo mezi samotnými ceramidy a hypoteticky i jejich signálními schopnostmi nebo stabilitou a propustností lipidových dvojvrstev a vícevrstev. Také jsme pozorovali, že povrch ceramidové vrstvy se vystavuje vzduchu nepolární částí a to i tehdy, kdy simulace začínala polární stranou ceramidu orientovanou ke vzduchu.

Věříme, že tento detailní pohled na struktury monovrstev ceramidů může napomoci k bližšímu pochopení odlišných vlastností a funkcí spojených s jednotlivými typy ceramidů.

6. SUMMARY

Ceramide structure properties are important for the architecture of *stratum corneum* membranes. In our simulations, we have observed that ceramide molecules rather changed their starting conformations from hairpin to V-shape and then to extended one, but not *vice versa*. The presence of hydroxyl groups in ceramides further supported more extended conformations. By contrast, the immersion of ceramide head groups towards the water phase reversed this tendency and ceramides sustained in the hairpin conformation. Ceramide head groups further formed a net of hydrogen bonds with water molecules. When the contact between ceramides head groups and water was removed, ceramide molecules started transition from hairpin conformation to the extended one generally by the extension movement of the sphingosine chain.

Main hydrogen bonds are formed between amine group NH and either keto group O2 or hydroxyl groups OH1 and OH3. C4 trans double bond present at ceramide NS24 decrease the intensity of intramolecular bond between hydroxyl groups OH1 and OH3, but it evidently doesn't influence the interactions between ceramides and water. Additional hydroxyl groups support variety of hydrogen bonds net between ceramides. If ceramide head groups are in the contact with water, ceramides NH24 and NT24 show further expansion of hydrogen bonds between ceramide molecules and water at the expense of hydrogen bonds between ceramide molecules themselves. This expansion of contact with water phase is also connected with further increase of area per lipid of these ceramides.

In this diploma thesis, we have described important differences of behavior of individual ceramide types present in human skin. These ceramides differ in number and position of hydroxyl groups or in the presence double bond. In simulations, we have observed conformation behavior of ceramide molecules, which can be manifested in *stratum corneum* in the multilayer arrangement, which are most likely linked up by molecules in extended conformation. Different behavior of individual ceramide types can also play role in the interactions with water or directly between ceramides and hypothetically in ceramide signaling or even more importantly in the stability and permeability of lipid bilayers and multilayers. Furthermore, we observed that ceramide layer air surface exhibits its nonpolar part to air even when the simulations were started with polar part exposed to the air.

We believe that this detailed insight to ceramide monolayer structures will help for closer understanding of different properties and functions connected with individual ceramides types.

7. LITERATURA

- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. (2015): GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*, **1-2**, 19-25.
- ACD/ChemSketch, verze 12.01 (2010). www.acdlabs.com, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada.
- Adhikari A., Re S., Nishima W., Ahmed M., Nihonyanagi S., Klauda J.B., Sugita Y., Tahara T. (2016): Water Orientation at Ceramide/Water Interfaces Studied by Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation. *The Journal of Physical Chemistry* **120**, 23692-23697.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, Spojené státy americké, 1392 stran. ISBN: 978-0-8153-4106-2.
- Alder B.J., Wainwright T.E. (1957): Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, **27**, 1208-1209.
- Alder B.J., Wainwright T.E. (1959): Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *The Journal of Chemical Physics*, **31**, 459-466.
- Bekker H., Berendsen H.J.C., Dijkstra E.J., Achterop S., van Drunen R., van der Spoel D., Sijbers A., Keegstra H., Reitsma B., Renardus M.K.R. (1993): Gromacs: A Parallel Computer for Molecular Dynamics Simulations. In: *Physics Computing '92: Proceedings of the 4th International Conference*. 1st ed., (de Groot R.A., Nadrchal J.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur, Singapur, 252-256. ISBN: 978-981-4553-62-9.
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. (1984): Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 3684-3690.
- Berendsen H.J.C., Grigera J.R., Straatsma T.P. (1987): The Missing Term in Effective Pair Potentials. *The Journal of Physical Chemistry*, **91**, 6269-6271.
- Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. (1995): GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Computer Physics Communications*, **91**, 43-56.
- Bouwstra J.A., Gooris G.S., van der Spek J.A., Bras W. (1991): Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-Angle X-Ray Scattering. *Journal of Investigative Dermatology* **97**, 1005-1012.
- Bouwstra J.A., Gooris G.S., van der Spek J.A., Lavrijsen S., Bras W. (1994): The Lipid and Protein Structure of Mouse *stratum corneum*: A Wide and Small Angle Diffraction Study. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipids Metabolism* **1212**, 183-192.
- Bouwstra J.A., Gooris G.S., Dubbelaar F.E.R., Ponc M. (2001): Phase Behavior of Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: Coexistence of Crystalline and Liquid Phases. *Journal of Lipid Research* **42**, 1759-1770.
- Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S., Ponc M. (2003): Structure of the Skin

- Barrier and Its Modulation by Vesicular Formulations. *Progress in Lipid Research* **42**, 1-36.
- Bouwstra J.A., Ponc M. (2006): The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, 2080-2095.
- Bouwstra J.A., Pilgram G.S.K., Ponc M. (2006): Structure of the Skin Barrier. In: *Skin Barrier*. 2nd ed., (Elias P.M., Feingold K.R.), Taylor & Francis Group, LLC, New York, Spojené státy americké, 1-3. ISBN: 978-0-8247-5815-8.
- Brockman H.L., Momsen M.M., Brown R.E., He L., Chun J., Byun H.-S., Bittman R. (2004): The 4,5-Double Bond of Ceramide Regulates Its Dipole Potential, Elastic Properties, and Packing Behavior. *Biophysical Journal* **87**, 1722-1731.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. (2007): Canonical Sampling through Velocity Rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, **126**, 1-8.
- Corkery R.W. (2002): The Anti-Parallel, Extended or Splayed-Chain Conformation of Amphiphilic Lipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**, 3-20.
- Dahlen B., Pascher I. (1979): Molecular Arrangements in Sphingolipids. Thermotropic Phase Behaviour of Tetracosanoylphyto sphingosine. *Chemistry and Physics of Lipids* **24**, 119-133.
- de Kruff B., van Dijk P.W.M., Demel R.A., Schuijff A., Brants F., van Deenen L.L.M. (1974): Non-Random Distribution of Cholesterol in Phosphatidyl-Choline Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* **356**, 1-7.
- Denda M. (2002): Role of Lipids in Skin Barrier Function. In: *Cosmetic Lipids and the Skin Barrier*. 1st ed., (Förster T.), Marcel Dekker, Inc., New York, Spojené státy americké, 97-120. ISBN: 0-8247-0664-1.
- Elias P.M., Feingold K.R. (2006): Stratum Corneum Barrier Function: Definitions and Broad Concepts. In: *Skin Barrier*. 2nd ed., (Elias P.M., Feingold K.R.), Taylor & Francis Group, LLC, New York, Spojené státy americké, 1-3. ISBN: 978-0-8247-5815-8.
- Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L. (1995): A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *The Journal of Chemical Physics*, **103**, 8577-8593.
- Fore-Pfliger J. (2004): The Epidermal Skin Barrier: Implications for the Wound Care Practitioner, Part I. *Advances in Skin & Wound Care* **17**, 417-425.
- Forslind B. (1994): A Domain Mosaic Model of the Skin Barrier. *Acta Dermato-Venereologica* **74**, 1-6.
- Frolov V.A., Shnyrova A.V., Zimmerberg J. (2011): Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**:a004747. <http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/11/a004747.short>.
- Gooris G.S., Bouwstra J.A. (2007): Infrared Spectroscopic Study of *Stratum Corneum* Model Membranes Prepared from Human Ceramides, Cholesterol, and Fatty Acids. *Biophysical Journal* **92**, 2785-2795.
- Gorter E., Grendel F. (1925): On Biomolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of Experimental Medicine* **41**, 439-443.
- Guo S., Moore T.C., Iacovella Ch.R., Strickland L.A., McCabe C (2013): Simulation Study of the

- Structure and Phase Behavior of Ceramide Bilayers and the Role of Lipid Head Group Chemistry. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**, 5116-5126.
- Heimburg T. (2007): *Thermal Biophysics of Membranes*. 1st ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & KgaA, Weinheim, Spolková republika Německo, 378 stran. ISBN: 978-3-527-40471-1.
- Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. (2008): GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficiency, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4**, 435-447.
- Hill J.R., Wertz P.W. (2003): Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae From Epidermal *Stratum Corneum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1616**, 121-126.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996): VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 33-38.
- Chaban V. (2014): Computationally Efficient Prediction of Area per Lipid. *Chemical Physics Letters*, **616-617**, 25-29.
- Charalambopoulou G.Ch., Steriotis T.A., Hauss T., Stefanopoulos K.L., Stubos A.K. (2002): A Neutron-Diffraction Study of the Effect of Hydration on *Stratum Corneum* Structure. *Applied Physics A* **74**, 1245-1247.
- Igarashi T., Nishono K., Nayar S.K. (2005): The Appearance of Human Skin. *Foundations and Trends in Computer Graphics and Vision* **3**, 1-95.
- ImageMagick Studio LLC: <http://www.imagemagick.org/script/index.php> (19. 11. 2016).
- Iwai I., Han H., den Hollander L., Svensson S., Öfverstedt L.-G., Anwar J., Brewer J., Bloksgaard M., Laloef A., Nosek D., Masich S., Bagatolli L.A., Skoglund U., Norlén L. (2012): The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *Journal of Investigative Dermatology* **43**, 1-11.
- Janssens M., van Smeden J., Gooris G.S., Bras W., Portale G., Caspers P.J., Vreeken R.J., Hankemeier T., Kezic S., Wolterbeek R., Lavrijsen A.P., Bouwstra J.A. (2012): Increase in Short-Chain Ceramides Correlates with an Altered Lipid Organization and Decreased Barrier Function in Atopic Eczema Patients. *Journal of Lipid Research* **53**, 2755-2766.
- Kessner D., Ruettinger A., Kiselev M.A., Wartewig S., Neubert R.H.H. (2008): Properties of Ceramides and Their Impact on the *Stratum Corneum* Structure: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology* **21**, 58-74.
- Kiselev M.A., Ryabova N.Y., Balagurov A.M., Dante S., Hauss T., Zbytovska J., Wartewig S., Neubert R.H.H. (2005): New Insights into the Structure and Hydration of a *Stratum Corneum* Lipid Model Membrane by Neutron Diffraction. *European Biophysics Journal* **34**, 1030-1040.
- Kiselev M.A. (2006): Conformation of Ceramide 6 Molecules and Chain-Flip Transitions in the Lipid Matrix of the Outermost Layer of Mammalian Skin, the *Stratum Corneum*. *Crystallography Reports* **52**, 525-528.
- Klauda J.B., Venable R.M., Freites J.A., O'Connor J.W., Tobias D.J., Mondragon-Ramirez C., Vorobyov I., MacKerell Jr. A.D., Pastor R.W. (2010): Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical*

- Chemistry B*, **114**, 7830-7843.
- Kodíček M., Karpenko V. (2013): *Biofyzikální chemie*. Academia, Praha, Česká republika, 423 stran. ISBN: 978-80-200-2241-7.
- Kolarsick P.A.J., Kolarsick M.A., Goodwin C. (2009): Anatomy and Physiology of the Skin. In: *Site-Specific Cancer Series: Skin Cancer*. 1st ed., (Muelhbauer P., McGowan C.), Oncology Nursing Society, Pittsburgh, Spojené státy americké, 1-11. ISBN: 978-1-890504-78-6.
- Kusalik P.G., Svishev I.M. (1994): The Spatial Structure in Liquid Water. *Science* **265**, 1219-1221.
- Langmuir I. (1917): The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **39**, 1848-1906.
- Li L., Tang X., Taylor K.G., DuPré D.B., Yappert M.C. (2002): Conformational Characterization of Ceramides by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biophysical Journal* **82**, 2067-2080.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. (2001): GROMACS 3.0: A Package for Molecular Simulation and Trajectory Analysis. *Journal of Molecular Modeling*, **7**, 306-317.
- Löfgren H., Pascher I. (1977): Molecular Arrangements of Sphingolipids. The Monolayer Behaviour of Ceramides. *Chemistry and Physics of Lipids* **20**, 273-284.
- McIntosh T.J., Simon S.A. (1986): Area per Molecule and Distribution of Water in Fully Hydrated Dilauroylphosphatidylethanolamine Bilayers. *Biochemistry*, **25**, 4948-4952.
- McIntosh T.J. (2003): Organization of Skin *Stratum Corneum* Extracellular Lamellae: Diffraction Evidence for Asymmetric Distribution of Cholesterol. *Biophysical Journal* **85**, 1675-1681.
- McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (1995): New Aspects of the Interaction of Cholesterol with Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers as Revealed by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1234**, 90-98.
- Mencarelli Ch., Martinez-Martinez P. (2013): Ceramide Function in the Brain: When a Slight Tilt is Enough. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 181-203.
- Menon G.K., Kligman A.M. (2009): Barrier Functions of Human Skin: A Holistic View. *Skin Pharmacology and Physiology* **22**, 178-189.
- Norlén L. (2001): Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model. *Journal of Investigative Dermatology* **117**, 830-836.
- Notman R., den Otter W.K., Noro M.G., Briels W.J., Anwar J. (2007): The Permeability Enhancing Mechanism of DMSO in Ceramide Bilayers Simulated by Molecular Dynamics. *Biophysical Journal* **93**, 2056-2068.
- Páll S., Abraham M.J., Kutzner C., Hess B., Lindahl E. (2015): Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In: *Solving Software Challenges for Exascale*. 1st ed., (Markidis S., Laure E.), Springer International Publishing Switzerland, Londýn, Velká Británie, 3-27. ISBN: 978-3-319-15975-1.
- Paloncýová M., Vávrová K., Sovová Ž., DeVane R., Otyepka M., Berka K. (2015): Structural Changes in Ceramide Bilayers Rationalize Increased Permeation through *Stratum Corneum*

- Models with Shorter Acyl Tails. *The Journal of Physical Chemistry B*, **119**, 9811-9819.
- Pan J., Tristram-Nagle S., Kučerka N., Nagle J.F. (2008): Temperature Dependence of Structure, Bending Rigidity, and Bilayer Interactions of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal*, **94**, 117-124.
- Papadimitriou N.I., Kainourgiakis M.E., Karozis S.N., Charalambopoulou G.Ch. (2014): Studying the Structure of Single-Component Ceramide Bilayers with Molecular Dynamics Simulations using Different Force Fields. *Molecular Simulation* **41**, 1122-1136.
- Pastor R.W., MacKerell Jr. A.D. (2011): Development of CHARMM Force Field for Lipids. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, **2**, 1526-1532.
- Petrache H.I., Dodd S.W., Brown M.F. (2000): Area per Lipid and Acyl Length Distributions in Fluid Phosphatidylcholines Determined by ^2H NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal*, **79**, 3172-3192.
- Pfeiffer S., Vielhaber G., Vietzke J.-P., Wittern K.-P., Hintze U., Wepf R. (2000): High-Pressure Freezing Provides New Information on Human *Epidermis*: Simultaneous Protein Antigen and Lamellar Lipid Structure Preservation. Study on Human *Epidermis* by Cryoimmobilization. *Journal of Investigative Dermatology* **114**, 1030-1038.
- Pilgrim G.S.K., Meulen J. van der, Gooris G.S., Koerten H.K., Bouwstra J.A. (2001): The Influence of Two Azones and Sebaceous Lipids on the Lateral Organization of Lipids from Human *Stratum Corneum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1511**, 244-254.
- Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., et al (2013): GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics*, **29**, 845-854.
- Rerek M.E., Chen H.-Ch., Markovic B., Van Wyck D., Garidel P., Mendelsohn R., Moore D.J. (2001): Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange. *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 9355-9362.
- Rerek M.E., Van Wyck D., Mendelsohn R., Moore D.J. (2005): FTIR Spectroscopic Studies of Lipid Dynamics in Phytosphingosine Ceramide Models of the *Stratum Corneum* Lipid Matrix. *Chemistry and Physics of Lipids* **134**, 51-58.
- Scheffer L., Solomonov I., Weygand M.J., Kjaer K., Leiserowitz L., Addadi L. (2005): Structure Cholesterol/Ceramide Monolayer Mixtures: Implications to the Molecular Organization of Lipid Rafts. *Biophysical Journal* **88**, 3381-3391.
- Schrödinger, LLC: <https://www.pymol.org/> (19. 11. 2016).
- Schröter A., Kessner D., Kiselev M.A., Hauss T., Dante S., Neubert R.H.H. (2009): Basic Nanostructure of *Stratum Corneum* Lipid Matrices Based on Ceramides [EOS] and [AP]: A Neutron Diffraction Study. *Biophysical Journal* **97**, 1104-1114.
- Stahlberg S., Školová B., Madhu P.K., Vogel A., Vávrová K., Huster D. (2015): Probing the Role of the Ceramide Acyl Chain Length and Sphingosine Unsaturation in Model Skin Barrier Lipid Mixtures by ^2H Solid-State NMR Spectroscopy. *Langmuir* **31**, 4906-4915.
- Stillinger F.H., Rahman A. (1974): Improved Simulation of Liquid Water by Molecular

- Dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, **60**, 1545-1557.
- Swartzendruber D.C., Wertz P.W., Kitko D.J., Madison K.C., Downing D.T. (1989): Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian *Stratum Corneum*. *Journal of Investigative Dermatology* **92**, 251-257.
- Školová B., Hudská K., Pullmannová P., Kováčik A., Palát K., Roh J., Fleddermann J., Estrela-Lopis I., Vávrová K. (2014): Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *The Journal of Physical Chemistry B* **118**, 10460-10470.
- Školová B., Kováčik A., Tesař O., Opálka L., Vávrová K. (2017): Phytosphingosine, Sphingosine and Dihydrosphingosine Ceramides in Model Skin Lipid Membranes: Permeability and Biophysics. *BBA - Biomembranes* **1859**, 824-834.
- Takahashi H., Sinoda K., Hatta I. (1996): Effects of Cholesterol on the Lamellar and the Inverted Hexagonal Phases of Dielaidoylphosphatidylethanolamine. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* **1289**, 209-216.
- van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. (2005): GROMACS: Fast, Flexible and Free. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1701-1718.
- van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., vývojový tým GROMACSu (2013): GROMACS User Manual version 4.6.5. www.gromacs.org.
- van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. (1988): A Leap-Frog Algorithm for Stochastic Dynamics. *Molecular Simulation*, **1**, 173-185.
- van Smeden J., Janssens M., Gooris G.S., Bouwstra J.A. (2014): The Important Role of *Stratum Corneum* Lipids for Cutaneous. *Biochimica et Biophysica Acta* **1841**, 295-313.
- Venable R.M., Sodt A.J., Rogaski B., Rui H., Hatcher E., MacKerell Jr. A.D., Pastor R.W., Klauda J.B. (2014): CHARMM All-Atom Additive Force Field fo Sphingomyelin: Elucidation of Hydrogen Bonding and of Positive Curvature. *Biophysical. J.*, **107**, 134-145.
- Watson H. (2015): Biological membranes. *Essays in Biochemistry* **59**, 43-69.
- Wertz P.W. (2006): *Epidermal Lipids and Formation of the Barrier of the Skin*. In: *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function*. 2nd ed., (Lodén M., Maibach H.I.), Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, Spojené státy americké, 23-30. ISBN: 978-0-8493-2134-4.
- White S.H., Mirejovsky D., King G.I. (1988): Structure of Lamellar Lipid Domains and Corneocyte Envelopes of Murine *Stratum Corneum*. An X-Ray Diffraction Study. *Biochemistry* **27**, 3725-3732.
- Wilke N. (2014): Lipid Monolayers at the Air-Water Interface: A Tool for Understanding Electrostatic Interactions and Rheology in Biomembranes. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. 1st ed., (Iglič A., Kulkarni Ch.V., Tien H.T., Ottova-Leitmannova A.), Elsevier Inc., Amsterdam, Nizemské království, 51-82. ISBN: 978-0-12-418698-9.
- Young D.C. (2001): *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, Spojené státy americké, 370 stran. ISBN: 0-471-33368-9.

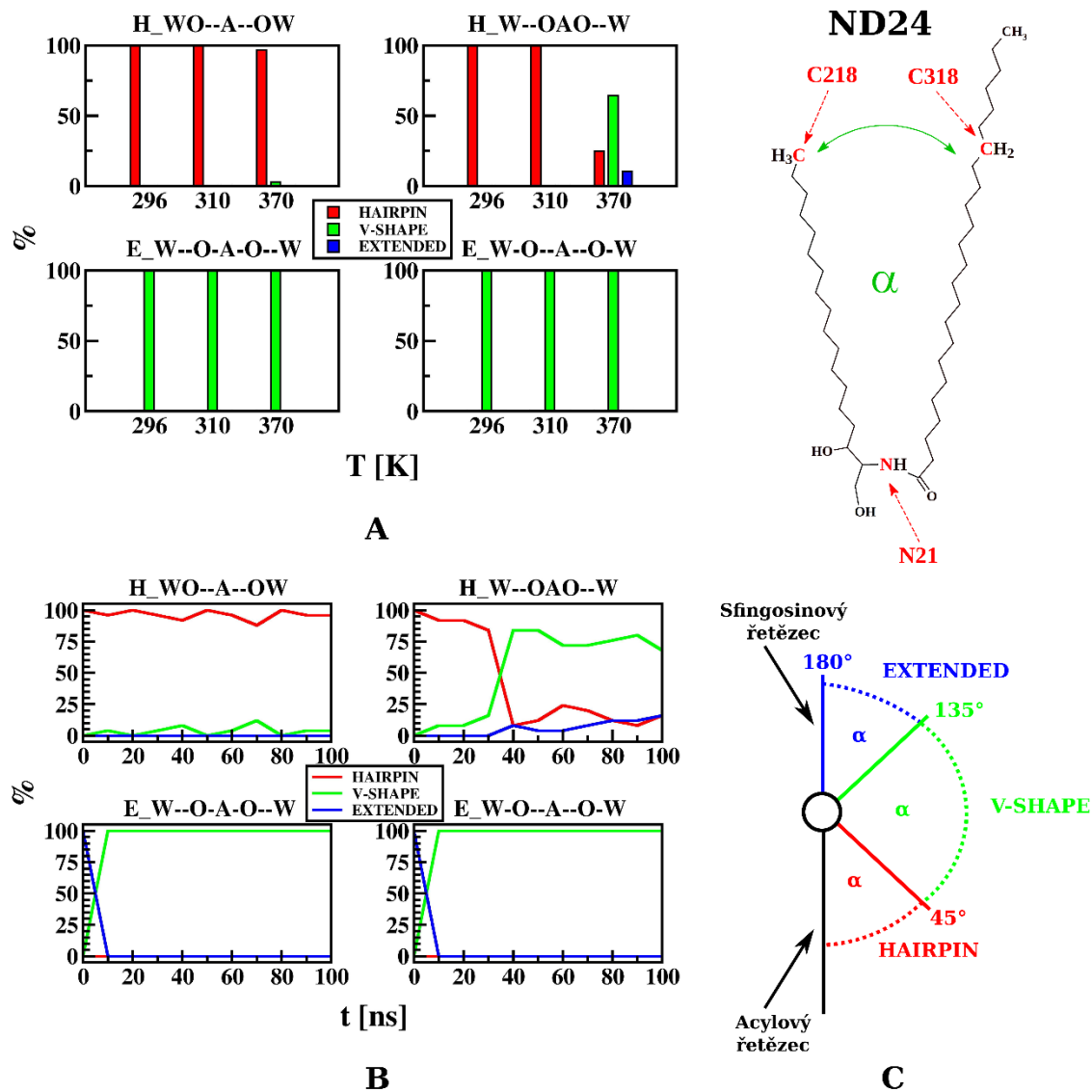
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Mastná kyselina s α -hydroxyskupinou
APL	Plocha, kterou v membráně zaujímá jeden lipid (angl. Area per Lipid)
CER	Ceramid
dS	Dihydrosfingosin
E_W--O-A-O--W	Simulovaný systém s ceramidy v „extended“ konformaci, které byly otočené svými acylovými řetězci směrem k molekulám vody
E_W-O--A--O-W	Simulovaný systém s ceramidy v „extended“ konformaci, které byly otočené svými acylovými řetězci směrem do vakua
ED	Elektronová difrakce (angl. Electron Diffraction)
EO	Mastná skupina esterifikovaná na ω -hydroxyskupině
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (angl. Fourier Transform Infrared (Spectroscopy))
GROMACS	GRONingen Machine for Chemical Simulations
H	6-hydroxysfingosin
H_W--OAO--W	Simulovaný systém s ceramidy v „hairpin“ konformaci, které byly otočené svými hlavami směrem do vakua
H_WO--A--OW	Simulovaný systém s ceramidy v „hairpin“ konformaci, které byly otočené svými hlavami směrem k molekulám vody
LPC	Lysofosfatidylcholin
LPP	Dlouhá opakující se fáze (angl. Long Periodicity Phase)
m/m	Hmotnostní zlomek
mol%	Molární procenta
N	Mastná kyselina bez hydroxyskupiny
ND24	CER[NdS](24:0)
NH	Aminoskupina ceramidu
NH24	CER[NH](24:0)
NP24	CER[NP](24:0)
NpT	Izotermicko-izobarické podmínky
NS24	CER[NS](24:0)
NT24	CER[NT](24:0)
O2	Ketoskupina ceramidu
OH1	Hydroxylová skupina na uhlíku 1 molekuly ceramidu

OH3	Hydroxylová skupina na uhlíku 3 molekuly ceramidu
OH4	Hydroxylová skupina na uhlíku 4 molekuly ceramidu
OH6	Hydroxylová skupina na uhlíku 6 molekuly ceramidu
OH8	Hydroxylová skupina na uhlíku 8 molekuly ceramidu
P	Fytosfingosin
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidylethanolamin
PME	Metoda pro výpočet dalekodosahových interakcí (angl. Particle Mesh Ewald)
P_s	Kritický sbalovací parametr
PS	Fosfatidylserin
PyMOL	Software pro zobrazení a analýzu molekulárních dat
S	Sfingosin
SAXD	Rentgenová difrakce s malým úhlem (angl. Small-Angle X-Ray Diffraction)
SM	Sfingomyelin
SPC/E	Explicitní model molekuly vody (angl. The Extended Simple Point Charge)
SPP	Krátká opakující se fáze (angl. Short Periodicity Phase)
T	6,8-dihydroxysfingosin
VMD	Visual Molecular Dynamics (software pro vizualizaci molekulárně dynamických simulací)
WAXD	Rentgenová difrakce s širokým úhlem (angl. Wide-Angle X-Ray Diffraction)

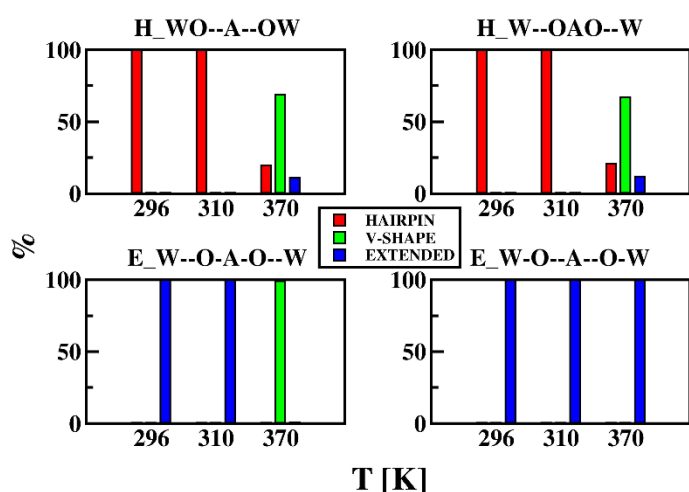
9. PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 - Ceramid NdS(24:0)

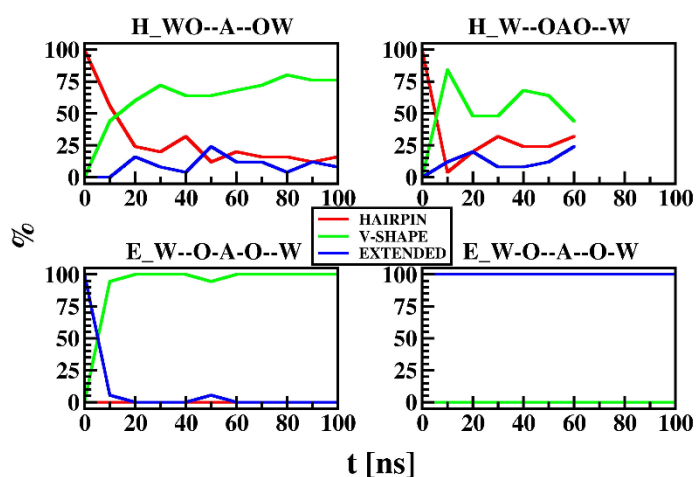


Příloha 1: Úhly svírané postranními řetězci ceramidů ND24. (A) Rozložení úhlů mezi postranními řetězci ceramidů ukazuje, jaké konformace jejich molekuly při daných teplotách preferují. (B) Přejídy molekul mezi jednotlivými konformacemi dokumentují data ze simulací při 370 K. (C) Tyto úhly byly měřeny mezi atomy C218 na sfingosinovém řetězci, C318 na acylovém řetězci a atomem N21, který se nachází v oblasti hlavy ceramidu.

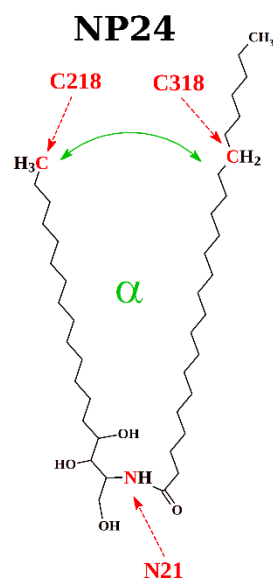
9.2 Příloha 2 - Ceramid NP(24:0)



A



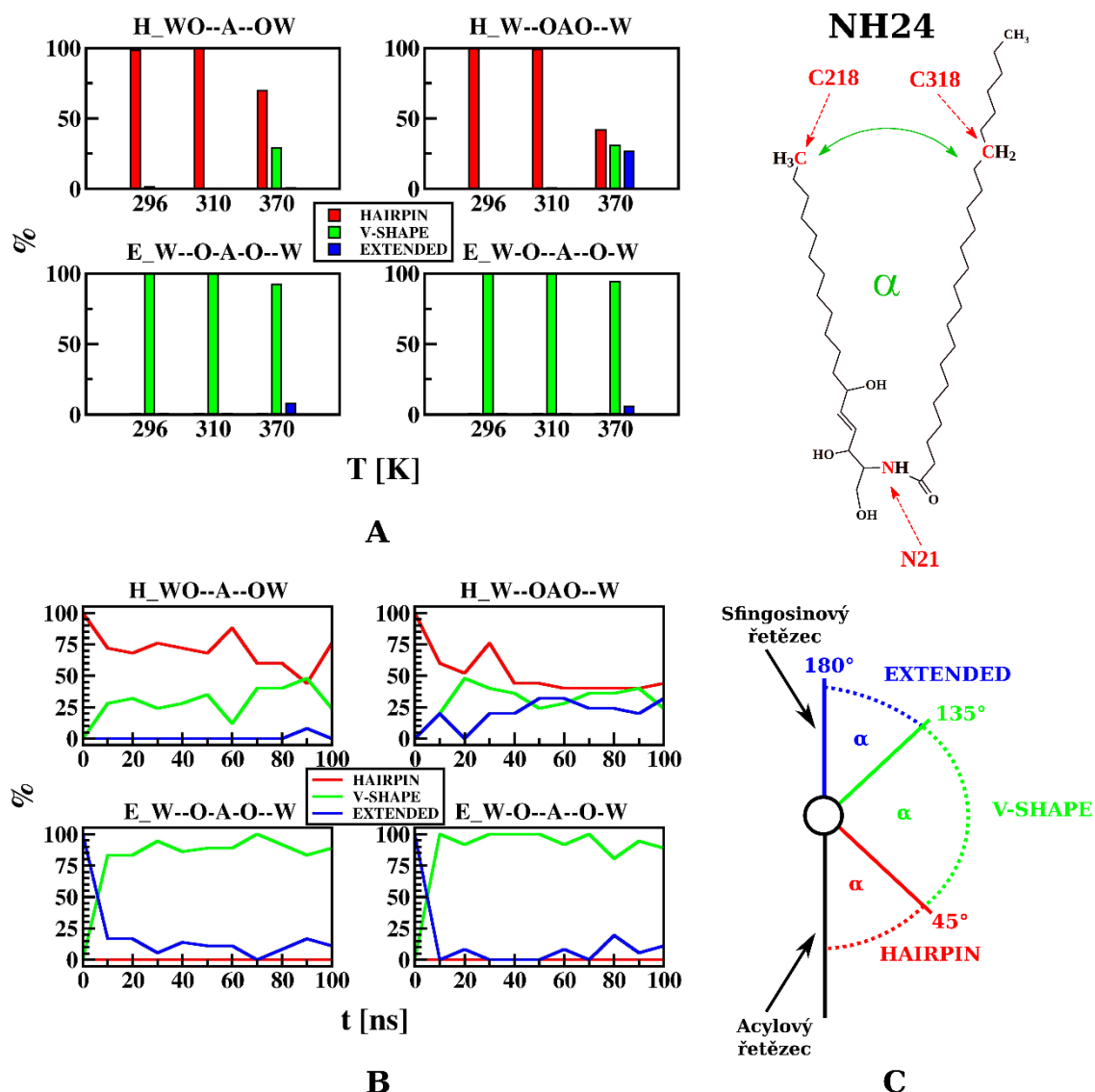
B



C

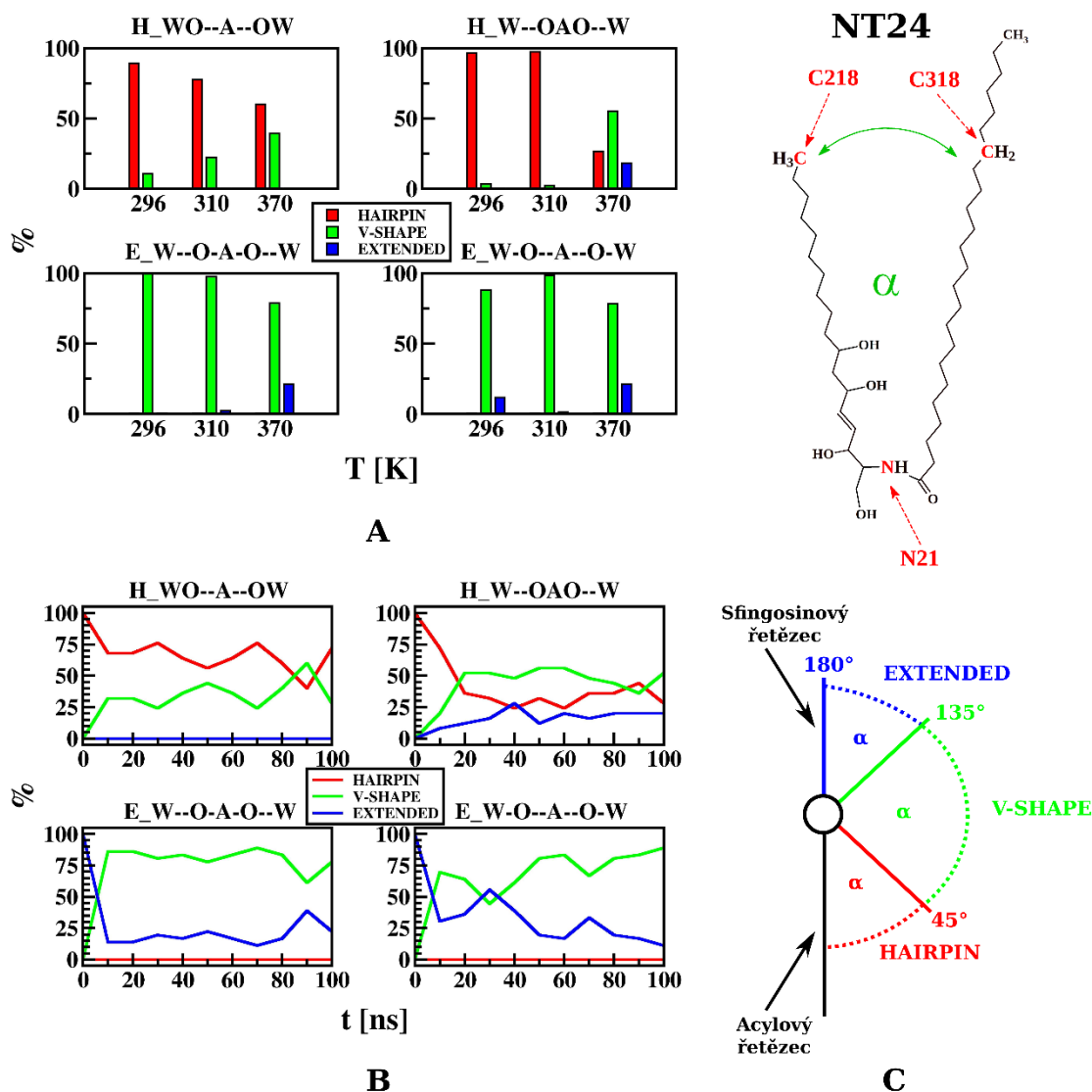
Příloha 2: Úhly svírané postranními řetězci ceramidů NP24. (A) Rozložení úhlů mezi postranními řetězci ceramidů ukazuje, jaké konformace jejich molekuly při daných teplotách preferují. (B) Přechny molekul mezi jednotlivými konformacemi dokumentují data ze simulací při 370 K. (C) Tyto úhly byly měřeny mezi atomy C218 na sfingosinovém řetězci, C318 na acylovém řetězci a atomem N21, který se nachází v oblasti hlavy ceramidu.

9.3 Příloha 3 - Ceramid NH(24:0)



Příloha 3: Úhly svírané postranními řetězci ceramidů NH24. (A) Rozložení úhlů mezi postranními řetězci ceramidů ukazuje, jaké konformace jejich molekuly při daných teplotách preferují. (B) Přechny molekul mezi jednotlivými konformacemi dokumentují data ze simulací při 370 K. (C) Tyto úhly byly měřeny mezi atomy C218 na sfingosinovém řetězci, C318 na acylovém řetězci a atomem N21, který se nachází v oblasti hlavy ceramidu.

9.4 Příloha 4 - Ceramid NT(24:0)



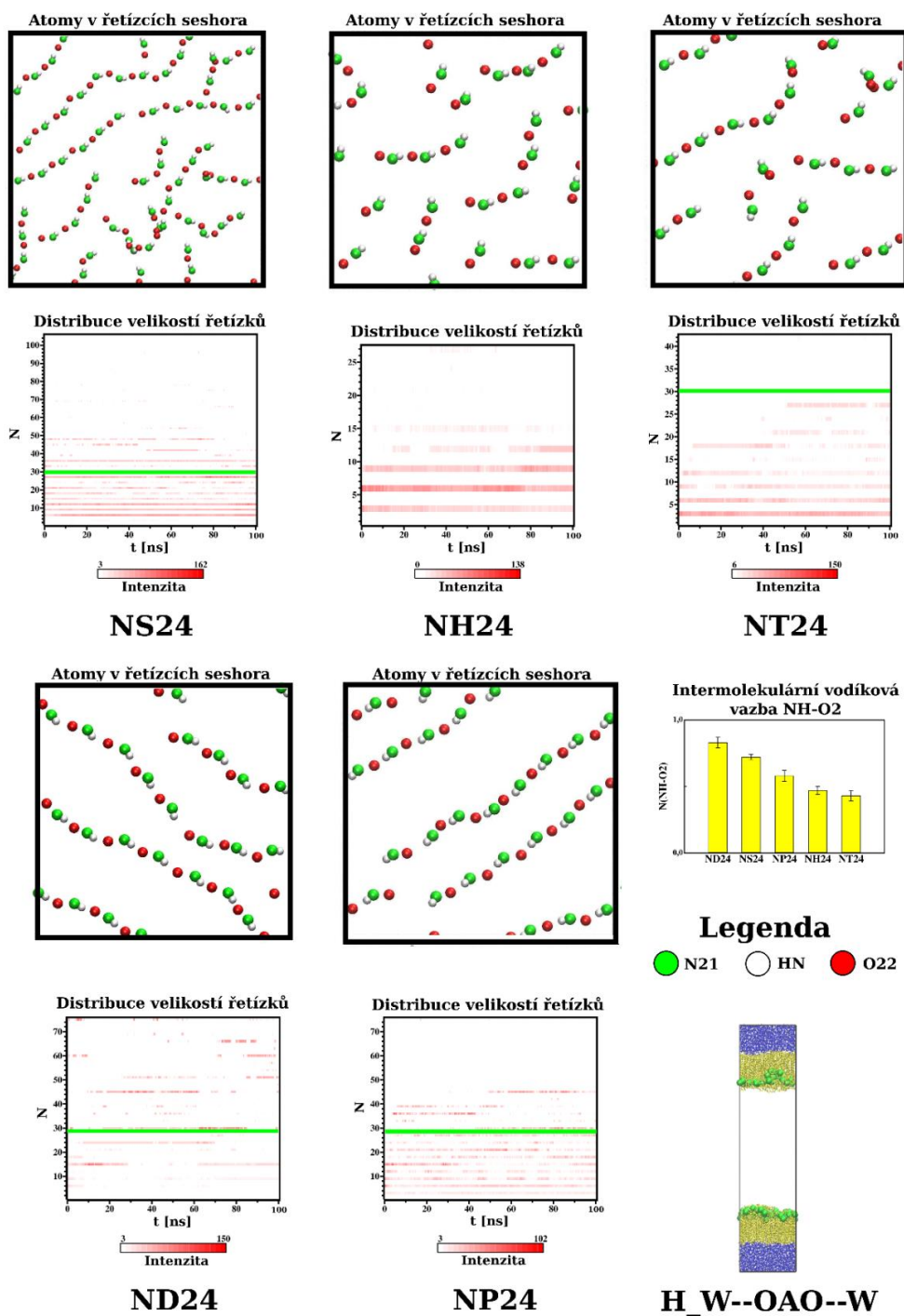
Příloha 4: Úhly svírané postranními řetězci ceramidů NT24. (A) Rozložení úhlů mezi postranními řetězci ceramidů ukazuje, jaké konformace jejich molekuly při daných teplotách preferují. (B) Přejídy molekul mezi jednotlivými konformacemi dokumentují data ze simulací při 370 K. (C) Tyto úhly byly měřeny mezi atomy C218 na sfingosinovém řetězci, C318 na acylovém řetězci a atomem N21, který se nachází v oblasti hlavy ceramidů.

9.5 Příloha 5 - Intermolekulární vodíkové vazby

Příloha 5: **Intermolekulární vodíkové vazby mezi molekulami ceramidů.** V tabulce jsou uvedeny intermolekulární vodíkové vazby simulovaných ceramidů, jejichž průměrná hodnota vztažená na jednu molekulu ceramidu byla vyšší než 0,1, tj. které se v průměru vyskytují u více jak 10 % molekul. Čísla jsou vždy uvedena se směrodatnou odchylkou. Data byla získána ze simulací při teplotě 310 K. Červeně je zvýrazněna vazba NH-O2, která je charakteristická pro molekuly v „hairpi“ konformaci, a zeleně vazba NH-OH1, která je charakteristická pro molekuly v „extended“ konformaci.

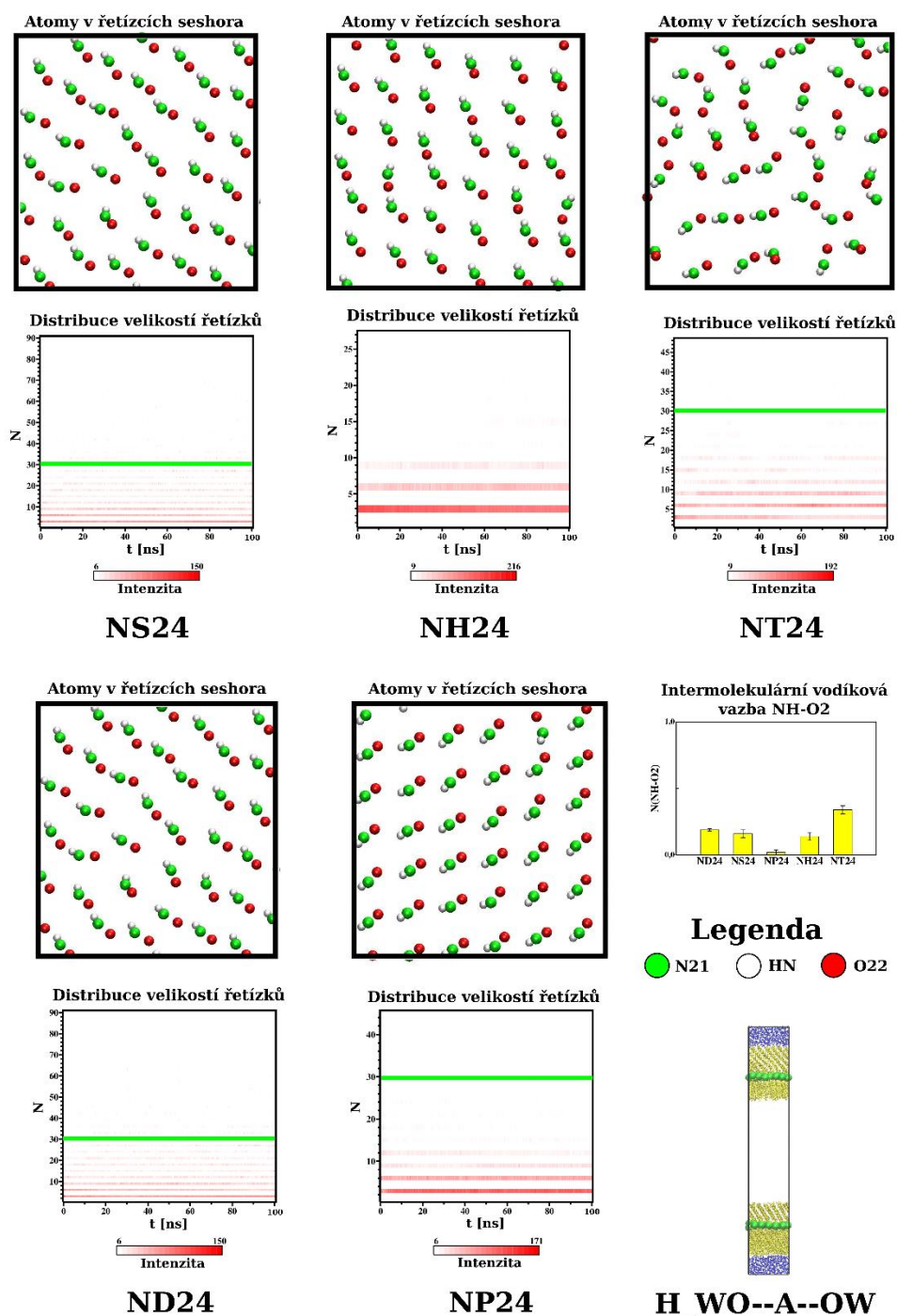
Ceramid	Vodíková vazba	H_WO--A--OW	H_W--OAO--W	E_W--O-A-O--W	E_W-O--A--O--W
ND24	NH-OH1	0,12 ± 0,04	< 0,1	1,23 ± 0,06	1,24 ± 0,06
	NH-O2	0,44 ± 0,05	0,83 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
	NH-OH3	0,13 ± 0,03	< 0,1	< 0,1	< 0,1
	OH1-O2	< 0,1	< 0,1	0,29 ± 0,05	0,27 ± 0,05
NS24	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,91 ± 0,07	1,07 ± 0,07
	NH-O2	0,44 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,20 ± 0,02
	NH-OH3	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,02	< 0,1	< 0,1
	OH1-O2	< 0,1	< 0,1	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,05
NP24	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	1,31 ± 0,10	1,00 ± 0,06
	NH-O2	0,21 ± 0,05	0,58 ± 0,04	< 0,1	0,12 ± 0,02
	O2-OH4	< 0,1	0,11 ± 0,04	< 0,1	< 0,1
	OH4-OH4	< 0,1	0,14 ± 0,06	< 0,1	0,13 ± 0,04
	OH1-O2	< 0,1	< 0,1	0,26 ± 0,06	0,19 ± 0,04
	OH1-OH4	< 0,1	< 0,1	0,21 ± 0,05	0,25 ± 0,05
	OH3-OH4	< 0,1	< 0,1	0,73 ± 0,08	0,63 ± 0,06
	OH1-OH3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,10 ± 0,03
NH24	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,81 ± 0,05	0,91 ± 0,04
	NH-O2	0,32 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,14 ± 0,03	< 0,1
	NH-OH3	< 0,1	0,27 ± 0,04	< 0,1	< 0,1
	NH-OH6	< 0,1	0,11 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	O2-OH6	< 0,1	0,10 ± 0,03	0,00 ± 0,00	< 0,1
	OH1-O2	< 0,1	< 0,1	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,04
	OH3-OH6	< 0,1	< 0,1	0,33 ± 0,05	0,24 ± 0,05
NT24	NH-OH1	< 0,1	< 0,1	0,24 ± 0,03	0,20 ± 0,04
	NH-O2	0,24 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,44 ± 0,03
	NH-OH3	< 0,1	0,18 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,03
	OH1-O2	< 0,1	< 0,1	0,15 ± 0,03	0,10 ± 0,03
	OH1-OH3	< 0,1	< 0,1	0,32 ± 0,05	0,42 ± 0,04
	O2-OH3	< 0,1	< 0,1	0,10 ± 0,03	< 0,1
	OH6-OH6	< 0,1	< 0,1	0,14 ± 0,05	0,11 ± 0,04
	OH1-OH6	< 0,1	< 0,1	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,03
	OH6-OH8	< 0,1	< 0,1	0,12 ± 0,03	< 0,1
	OH8-OH8	< 0,1	< 0,1	0,19 ± 0,06	< 0,1

9.6 Příloha 6 - Řetízování II



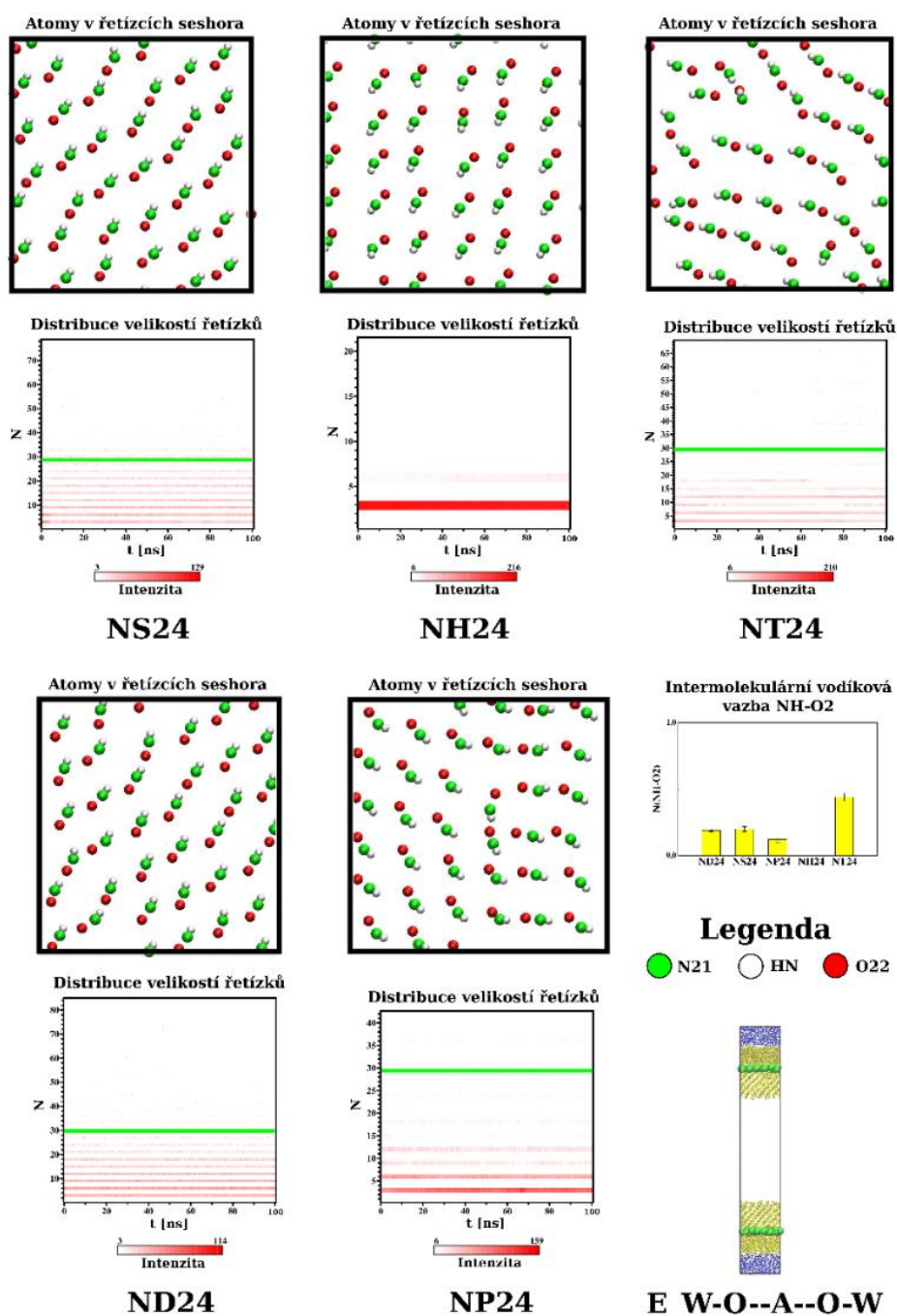
Příloha 6: **Řetízování ceramidů.** Řetízování ceramidů je zřejmě spojeno s vodíkovou vazbou mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2. Ukázka řetízků v čase 100 ns je vždy vidět v horní části obrázku. Barevně jsou tam vyznačeny atomy výše jmenovaných funkčních skupin. Dole je potom celý jev kvantifikován. Na ose y je vidět počet atomů v řetízku (program `g_clustsize` přidal do jednoho řetízku atomy N21, HN a O22, jejichž vzdálenost byla menší než 0,35 nm, tj. délka vodíkové vazby; počet molekul ceramidů v jednom řetízku je tedy hodnota na ose y vydělená třemi). Vzhledem k rozdílným rozsahům na osách y je každý z grafů opatřen zelenou linkou, která umožňuje jejich vzájemné porovnání. Obrázky dokumentují simulace systému H_W--OAO--W při 310 K.

9.7 Příloha 7 - Řetízování III



Příloha 7: **Řetízování ceramidů.** Řetízování ceramidů je zřejmě spojeno s vodíkovou vazbou mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2. Ukázka řetízků v čase 100 ns je vždy vidět v horní části obrázku. Barevně jsou tam vyznačeny atomy výše jmenovaných funkčních skupin. Dole je potom celý jev kvantifikován. Na ose y je vidět počet atomů v řetízku (program `g_clustsize` přidal do jednoho řetízku atomy N21, HN a O22, jejichž vzdálenost byla menší než 0,35 nm, tj. délka vodíkové vazby; počet molekul ceramidů v jednom řetízku je tedy hodnota na ose y vydělená třemi). Vzhledem k rozdílným rozsahům na osách y je každý z grafů opatřen zelenou linkou, která umožňuje jejich vzájemné porovnání. Obrázky dokumentují simulace systému H_W--O-A-O--W při 310 K.

9.8 Příloha 8 - Řetízování IV



Příloha 8: **Řetízování ceramidů.** Řetízování ceramidů je zřejmě spojeno s vodíkovou vazbou mezi aminoskupinou NH a ketoskupinou O2. Ukázka řetízků v čase 100 ns je vždy vidět v horní části obrázku. Barevně jsou tam vyznačeny atomy výše jmenovaných funkčních skupin. Dole je potom celý jev kvantifikován. Na ose y je vidět počet atomů v řetízku (program g_clustsize přidal do jednoho řetízku atomy N21, HN a O22, jejichž vzdálenost byla menší než 0,35 nm, tj. délka vodíkové vazby; počet molekul ceramidů v jednom řetízku je tedy hodnota na ose y vydělená třemi). Vzhledem k rozdílným rozsahům na osách y je každý z grafů opatřen zelenou linkou, která umožňuje jejich vzájemné porovnání. Obrázky dokumentují simulace systému H_W-O--A--O-W při 310 K.