

# Funkcionalne lipidne sirovine

---

**Nađ, Paula**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:375834>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Paula Nađ**

# **Funkcionalne lipidne sirovine**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na predmetu Kozmetologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Pepića.

*Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Ivanu Pepiću, na savjetima i strpljenju kroz zadnjih godinu dana.*

*Zahvaljujem svom dečku što neizmjereno vjeruje u mene i moje snove, što mi daje snagu i što mi je podrška svakodnevno, kroz svaki uspon i pad.*

*Konačno, zahvaljujem roditeljima, sestri, sestrični i prijateljicama na zajedničkom prolaženju kroz probleme, za savjete, pomoć, smijeh u teškim situacijama i slavlja u onim dobrim.*

## SADRŽAJ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                            | <b>1</b>  |
| 1.1. GRAĐA EPIDERMISA.....                     | 1         |
| 1.2. KOŽNA BARIJERA I NJEZINA ULOGA.....       | 2         |
| 1.3. NASTANAK FUNKCIONALNE KOŽNE BARIJERE..... | 3         |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>              | <b>13</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>            | <b>14</b> |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>           | <b>15</b> |
| 4.1. CERAMIDI.....                             | 15        |
| 4.2. MASNE KISELINE.....                       | 20        |
| 4.3. KOLESTEROL.....                           | 25        |
| 4.3.1. Uloga kolesterol sulfata.....           | 28        |
| 4.4. ULOGA I SASTAV SEBUMA.....                | 29        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>                      | <b>36</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                     | <b>37</b> |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>                | <b>43</b> |

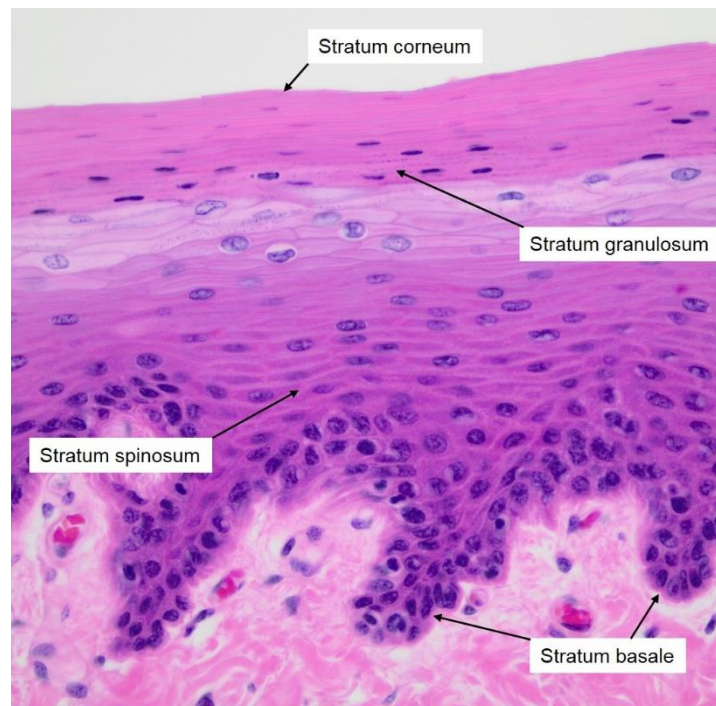
**Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card**

## 1. UVOD

### 1.1. GRAĐA EPIDERMISA

Epiderma je građena od 5 različitih slojeva stanica, a to su redom: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* i *stratum corneum*; pri čemu je *stratum lucidum* prisutan isključivo na djelovima tijela gdje je koža izrazito zadebljana (dlanovi i stopala). Žive stanice kože svih slojeva su keratinociti, dok su stanice koje grade *stratum corneum* korneociti.

Svaki sloj ima određenu karakteristiku, te je *stratum basale* (monosloj stanica) jedini u potpunosti nediferencirani sloj matičnih stanica čija je glavna funkcija održavanje kože u dinamičnoj ravnoteži između stvaranja novih stanica i gubitka mrtvih stanica deskvamacijom s površine. Nadalje, kroz *stratum spinosum* (varijabilno od 1, 2 do više od 20 slojeva) i *stratum granulosum* (3 sloja) vidljive su sve faze diferencijacije keratinocita kako se oni kreću suprabazalno do konačne formacije mrtvog orožnjelog sloja *stratum corneum* (debljina 10-20 slojeva stanica) (Freeman i Sonthalia, 2019; Jennings i sur., 2017).

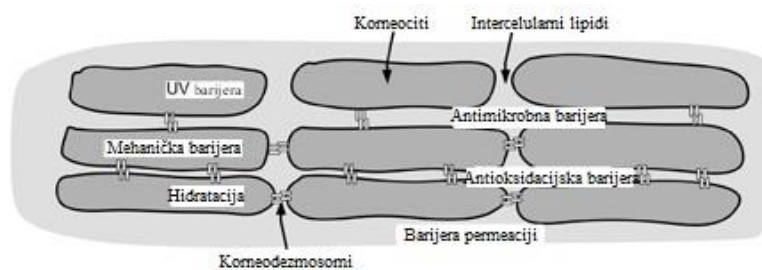


Slika 1. Prikaz epidermalnih slojeva kože konja (preuzeto iz Jennings i sur., 2017.)

## 1.2. KOŽNA BARIJERA I NJEZINA ULOGA

Glavna funkcija kože očituje se kroz njezinu ulogu barijere sa svrhom zaštite organizma ponajprije od pretjeranog gubitka vode i elektrolita, a zatim i štetnog UV zračenja, prodora mikroorganizama te ograničavanja penetracije različitih tvari poput lijekova, alergena, polutanata iz okoliša itd. Uz sve navedeno, koža je i senzorni organ te najutjecajniji čimbenik u regulaciji tjelesne temperature (Mojumdar i sur., 2013; Lee i sur., 2006).

Fizičku barijeru čine slojevi orožnjelih mrtvih stanica (korneocita) *stratum corneuma* uklopljeni u kompleksno organiziran izvanstanični lipidni matriks čije glavne komponente čine ceramidi, kolesterol i slobodne masne kiseline. Sami korneociti svoja svojstva, poput mehaničke čvrstoće, dobivaju zahvaljujući vrlo uređenom procesu diferencijacije kroz koji epidermalne stanice (keratinociti) prolaze prilikom sazrijevanja i programiranog umiranja. Iz razloga što su korneociti vrlo slabe propusnosti, većina tvari će prilikom transdermalnog kretanja imati tendenciju prolaženja intercelularnim putem stoga je upravo ustroj međustaničnog prostora ključan čimbenik u ograničavanju permeabilnosti kože (Bouwstra i sur., 2003).



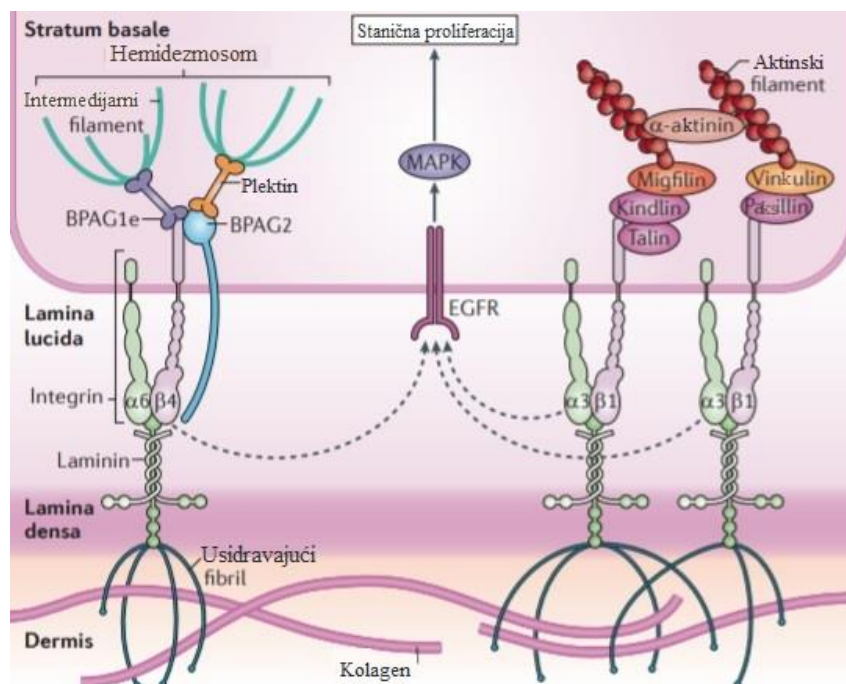
Slika 2. Shematski prikaz fizičke barijere kože koji uključuje stanice i međustanični prostor *stratum corneuma* (preuzeto i prilagođeno prema Bouwstra i sur., 2003).

Za druge navedene zaštitne uloge kože zaslužni su različiti medijatori upale poput prostaglandina, histamina, leukotriena itd. koji reguliraju imunodne odgovore u koži (imunodna barijera); zatim melanin, metaboliti vitamina D i C te *trans*-urokanska kiselina sa svojstvima apsorpcije UV zračenja te proteini toplinskog šoka, antimikrobni peptidi i regulatori pH (kemijska barijera) (Lee i sur., 2006; Proksch i sur., 2006).

### 1.3. NASTANAK FUNKCIONALNE KOŽNE BARIJERE

Na razvojnem putu od bazalnih matičnih stanica kože do funkcionalnih korneocita keratinociti prolaze vrlo složenu i strogo kontroliranu diferencijaciju. Sam proces započinje signalizacijom preko integrinskih receptora na suprabazalnoj stanici nastaloj vertikalnom (asimetričnom) diobom bazalne stanice (Eckhart i sur., 2013; Simpson i sur., 2011). Naime, bazalne stanice integrinima su usidrene na bazalnu membranu što je svojstvo koje diobom nastale stanice kćeri gube.

Integrini predstavljaju važnu skupinu transmembranskih heterodimernih molekula koje omogućavaju komunikaciju stanica s njihovim mikrokolišem, sudjelujući u provođenju signala iz okoline u stanicu te iz unutrašnjosti stanice prema izvastaničnom prostoru. Opisano je 11 integrinskih dimera u epidermalnim keratinocitima (kombinacije različitih tipova  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica) od kojih većina s citoplazmatske strane ostvaruje interakcije s aktinskim filamentima preko proteina adaptora, a neki su, poput integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , povezani s hemidezmosomima (Howe i Addison, 2012; Simpson i sur., 2011; Sastry i Horwitz, 1993). Nakon odvajanja keratinocita od bazalne membrane i aktivacije signalnih puteva koji dovode do diferencijacije stanice (pod utjecajem p63 i drugih transformacijskih faktora) dolazi do promjena u genskoj ekspresiji (Eckhart i sur., 2013).

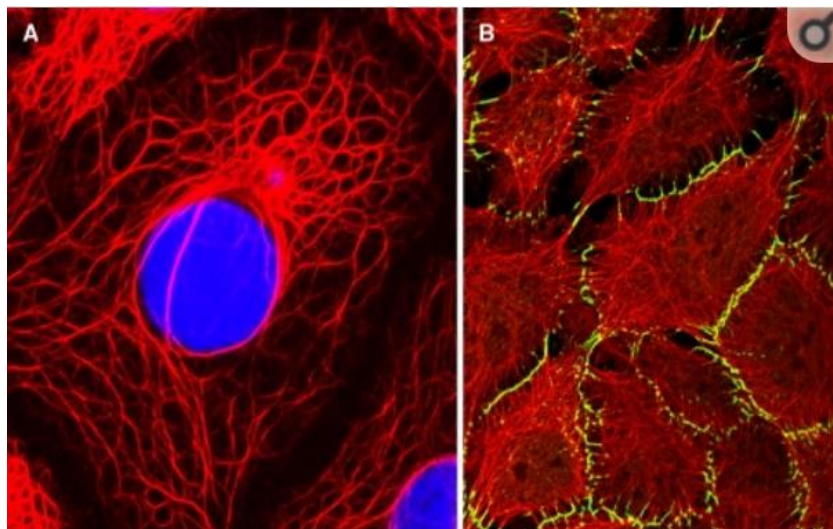


Slika 3. Prikaz interakcija bazalne stanice i bazalne membrane ostvarenih preko integrinskih receptora (preuzeto i prilagođeno prema Simpson i sur., 2011).

### **Keratin i dezmosomi**

Jedna od najvažnijih unutarstaničnih struktura keratinocita svakako su proteini keratini koji se udružuju primarno u heterodimerne molekule građene od po jednog keratina tipa I i tipa II, a sekundarno u tetramere i keratinske filamente čija mreža omeđuje jezgru i širi se duž cijele citoplazme prema periferiji stanice usidrujući se u konačnici na dezmosomima (Slika 4).

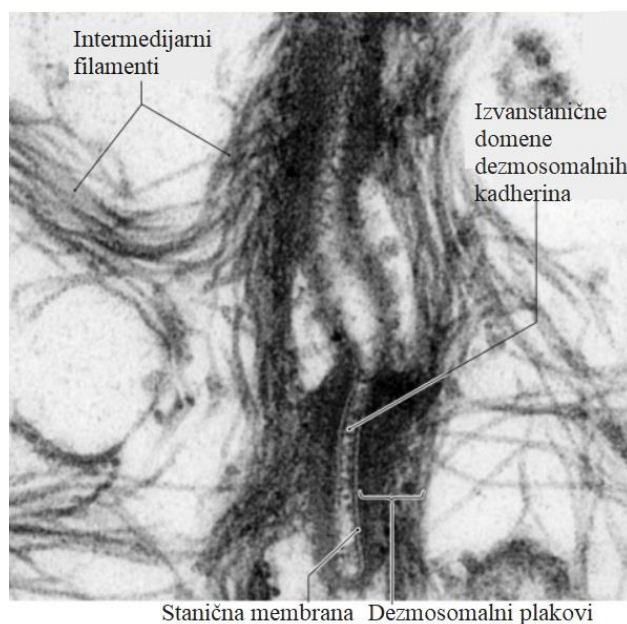
Stvaranjem keratinske mreže postiže se mehanički integritet stanice, a preko dezmosoma koji povezuju susjedne stanice i mehanička stabilnost cijelog tkiva (epidermisa) ključna za funkcionalnost konačne kožne barijere (Moll i sur., 2008; Downing, 1992; Lu i Lane, 1990). Upravo zbog značaja dobre povezanosti stanica brojnost dezmosoma u epidermalnom tkivu je vrlo visoka.



Slika 4. Prikaz organizacije keratinskih filamenata i njihova povezanost s dezmosomima u stanici keratinocita. (A) Vizualizacija keratina K18 (crveno) i stanične jezgre (plavo) dobiveno imunofluorescentnim bojenjem; (B) Keratinski filamenti (crveno) i komponenta dezmosoma dezmozoplakin (zeleno) u kulturi keratinocita linije HaCaT (preuzeto iz Moll i sur., 2008).



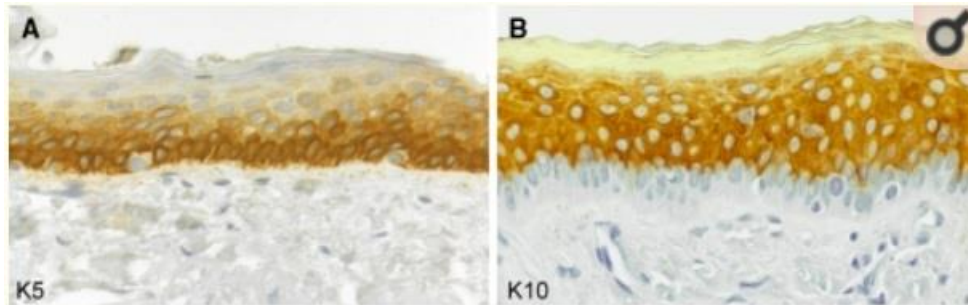
Strukturno, dezmosomi su građeni od nekoliko tipova proteina: dvije vrste kadherina: dezmgoleina i dezmkolina, čiji ekstracelularni dijelovi grade poveznicu s dezmosomom susjedne stanice, a unutarstanični dijelovi vežu proteine plakoglobin i plakofilin na koje se dalje nastavljaju dezmoaplakini, a u konačnici je cijela struktura povezana s keratinskim filamentima što ukupno stvara dezmosomalni plak s unutrašnje strane stanične membrane (Simpson i sur., 2011; Waschke, 2008).



Slika 5. Prikaz dezmosoma dobiven elektronskom mikroskopijom; vidljivi su dezmosomski plakovi unutar stanice te izvanstanične domene kadherina koji grade poveznice između dva dezmosoma (preuzeto i prilagođeno prema Waschke, 2008).

Udio keratinskih filamenata u ukupnom staničnom sadržaju značajno se povećava kako korneocit prolazi razvojnim stadijima kroz *stratum spinosum* i *stratum granulosum*, a prijelazom iz bazalnog sloja u *stratum spinosum* ujedno se mijenja i sam sastav keratinskih dimera. Naime, tip keratinskih dimera utječe na sposobnost njihovog umrežavanja te time u konačnici i na stupanj mehaničke čvrstoće tkiva. Iz tog razloga epitelne stanice tkiva koja ne prolaze kroz značajan mehanički stres, poput parenhimatoznih organa (jetra, žučni mjehur, slezena, gušterača itd.), stvaraju rahle i malobrojne keratinske filamente, dok epitelne stanice suprabazalnih slojeva kože zahtjevaju najizraženiju mehaničku otpornost, a time i najveći stupanj umrežavanja keratina. Sukladno tome,

keratinski dimeri tipa K5/K14, prisutni u bazalnim stanicama, se u višim slojevima epidermisa zamjenjuju tipom K1/K10 koji ima značajno veću sposobnost umrežavanja (Moll i sur., 2008).



Slika 6. Prikaz rožnatog epitela u kojem je provedena vizualizacija keratina K5 (A) i K10 (B); (A) Stanice bazalnog sloja vidljivo su bogate keratinom K5 dok se u suprabazalnim slojevima njegova količina smanjuje; (B) Suprabazalni slojevi bogati su keratinom K10 dok je vidljivo potpuna odsutnost tog tipa keratina u stanicama bazalnog sloja (preuzeto i prilagođeno prema Moll i sur., 2008).

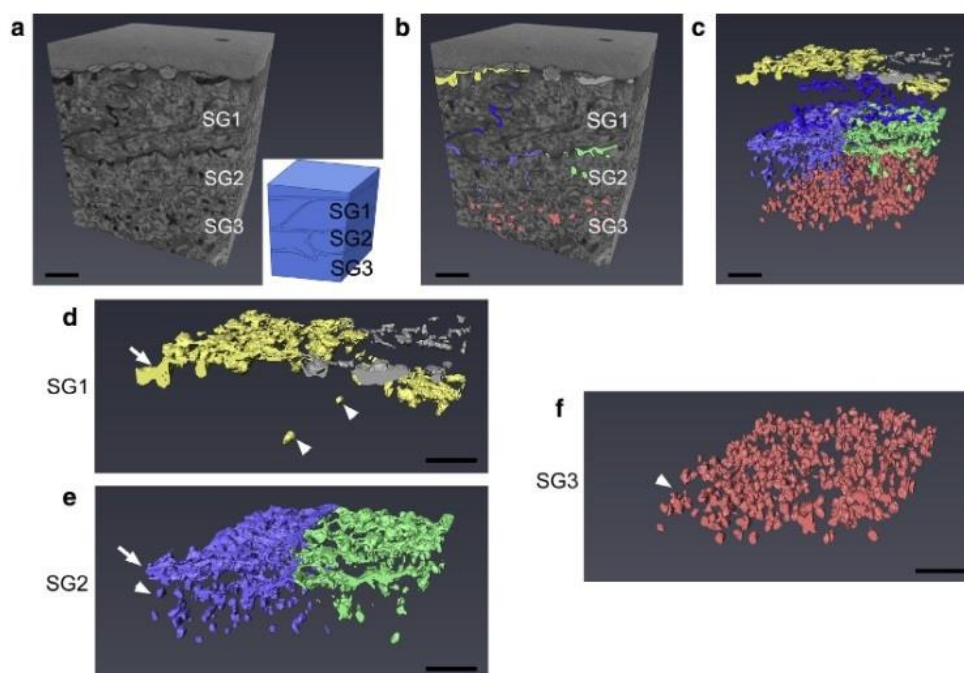
### **Keratohijalinske granule**

Kako bi keratinska mreža bila još čvršća, sazrijevanjem keratinocita započinje sinteza i nakupljanje profilagrinskih molekula u obliku kompleksa zvanih keratohijalinske granule. Svaka molekula profilagrina (>400 kDa) u tom kompleksu polimer je filagrina s 10-12 ponavljanja. Keratohijalinske granule u najvećem broju vidljive su u *stratum granulosum* koji je prema njima dobio i ime. Potaknuto signalizacijom u stanici, započinje defosforilacija profilagrina nakon čega slijedi proteoliza molekule do filagrinskih monomera uz proteaze CAP1/Prss8 i SASPase/ASPRV1. Važnost filagrina je u njegovom svojstvu da se veže na keratinske filamente i potiče njihovu još veću agregaciju, stvarajući time stabilan potporanj i temelj za izgradnju orožene ovojnice stanice, a kondenzacijom citoskeleta omogućavajući i spljošteni oblik stanice do razine vidljive u *stratum corneum* (Freeman i Sonthalia, 2019; Egawa i Kabashima, 2017; Eckhart i sur., 2013).

### **Lamelarna tjelešca**

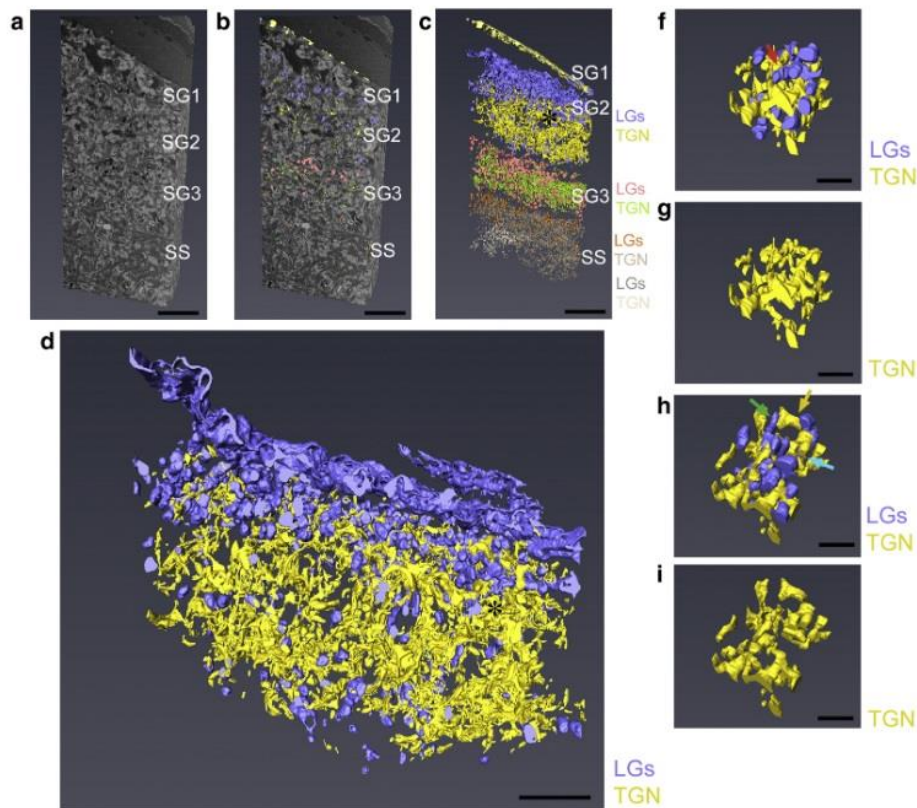
Napredovanjem keratinocita kroz slojeve dolazi do još jedne značajne promjene u stanici, a to je pojava lamelarnih tjelešaca (granula) – posebnih organela, svojstvenih keratinocitima, čija funkcija je doprema raznih molekula poput lipida (uglavnom u obliku prekursora) važnih za stvaranje lipidnog izvanstaničnog matriksa (detaljno opisano u poglavlju 4.), enzima potrebnih za razgradnju lipidnih prekursora, proteaza ključne za transformaciju dezmosoma i regulaciju procesa deskvamacije te njihovih inhibitora itd. iz stanice u izvanstanični prostor na granici *stratum granulosum* i *stratum corneum* (Elias i Wakefield, 2014).

Ključna za kasnije faze sazrijevanja keratinocita, lamelarna tjelešca vidljiva su elektronskim mikroskopom tek od viših slojeva *stratum spinosum* gdje su još malobrojna, a kroz daljnje slojeve značajno mijenjaju i svoju brojnost, ali i morfologiju. Naime, prethodna teorija prema kojoj su lamelarna tjelešca isključivo vezikule koje fuzijom sa staničnom membranom dopremaju svoj sadržaj u međustanični prostor kako bi se omogućilo stvaranje lipidnih lamela (Landmann, 1986), zamijenjeno je suvremenom teorijom. Zahvaljujući novim tehnikama poput FIB-SEM (eng. Focused Ion Beam – Scanning Electron Microscopy) omogućeno je trodimenzionalno proučavanje staničnih organela te je kroz seriju slika zabilježen cjelokupan razvoj trans-golgijske mreže i lamelarnih tjelešaca od gornjih slojeva *stratum spinosum* pa sve do najvišeg sloja *stratum granulosum* (Hollander i sur., 2015). Dobivene slike povezane su u 3D prikaze i time je detaljno razjašnjeno pitanje morfologije takvih organela.



Slika 7. (A-C) Vizualizacija razlika u morfologiji lamelarnih tjelešaca kroz tri sloja *stratum granulosum*; (D) Dominantno retikularna morfologija uz nekoliko vidljivih vezikularnih oblika u SG1 (glave strelica); (E) Retikularni oblik uz staničnu membranu (strelica) te vezikularni u unutrašnjosti (glava strelice) uočeni u SG2; (F) Dominantno vezikularna morfologija uočena u SG3 (glava strelice) (preuzeto iz Yamanishi i sur., 2019).

Prema tim saznanjima, lamelarne granule, koje svoje porijeklo nalaze u trans-golgiju, u najvišim slojevima *stratum spinosum* su isključivo jajolikog oblika (u skladu sa prethodnim teorijama), no već u 2. sloju *stratum granulosum* dolazi do značajne promjene iz vezikularnog u retikularno-tubularni oblik. Naime, pomoću metode bojanja teškim metalima, FIB-SEM tehnikom je uočena lokalizacija golgijevog aparata neposredno uz jezgru te razvoj i umrežavanje trans-golgijeve mreže i lamelarnih granula kroz slojeve pri čemu se postupno stvara kontinuirana mreža tubula na periferiji stanice koja je u 1. sloju *stratum granulosum* ujedno i prevladavajući oblik ovih organela (Yamanishi i sur., 2019).



Slika 8. (A-C) Vizualizacija sazrijevanja trans-golgijeve mreže (TGN) i lamelarnih granula (LG) kroz *stratum spinosum* i sva 3 sloja *stratum granulosum*; (D) Uvećani prikaz odnosa trans-

golgijske mreže i lamelarnih tjelešaca u 2. sloju *stratum granulosum*; (F-I) 3D prikaz dijela slike (D) koji potvrđuje stvaranje kontinuirane tubularne mreže između trans-golgijske i lamelarnih tjelešaca (strelice) (preuzeto iz Yamanishi i sur., 2019).

Postojanje retikularno-tubularne morfologije ključno je za odvijanje tako opsežnog lučenja sadržaja granula u međustanični prostor iz razloga što vezikularna morfologija podrazumijeva proces formacije pupanjem vezikula iz trans-golgijske mreže, difuziju vezikula do stanične membrane i u konačnici fuziju s membranom što zahtjeva utrošak mnogo veće količine energije, vremenski je dugotrajnije, a sama kontrola procesa stvaranja barijere je smanjena zbog promjene topologije membrane. Posljedično to čini tu metodu dopreme velikih količina lipida i drugih tvari izvan stanice znatno manje učinkovitom (Norlen, 2001).

### **Orožena ovojnica**

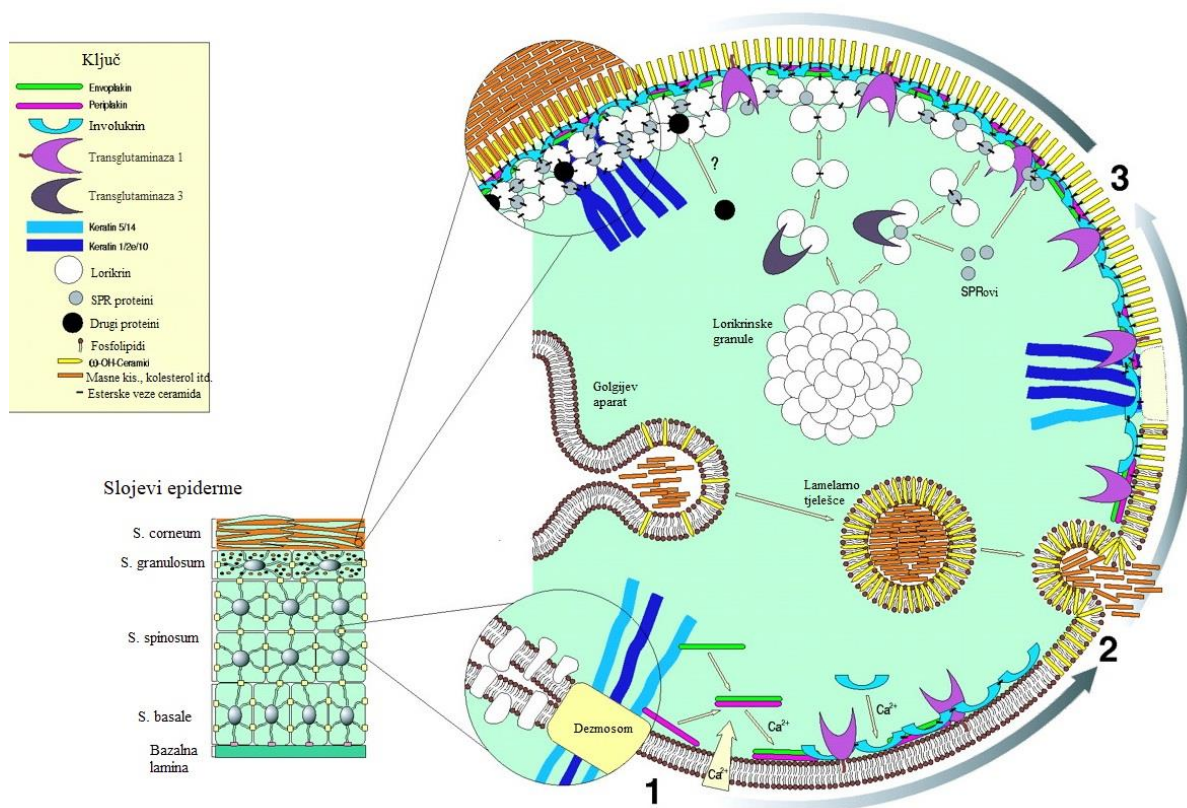
U višim slojevima *stratum granulosum*, paralelno s razvojem retikularne mreže lamelarnih tjelešaca započinje i stvaranje orožene ovojnice na periferiji stanice. Sam proces odvija se u tri ključne faze, a uključuje sintezu i organizaciju nekoliko važnih proteina, a to su: involukrin, lorikrin, envoplakin, periplakin te novije otkriven perifilin (Lopez i sur., 2006).

Najprije se eksprimiraju geni za periplakin, envoplakin i involukrin povezano s porastom unutarstanične razine kalcija kroz stanične slojeve radi postupne razgradnje endoplazmatskog retikuluma. Nakon sinteze, envoplakin i periplakin stvaraju heterotetramere te zajedno s involukrinom postaju asocirani uz staničnu membranu. Istovremeno nastaje i enzim transglutaminaza 1 (TG1) koji se usidruje u staničnu membranu te potaknuto povišenom razinom kalcijevih iona započinje proces umrežavanja navedenih proteina stvarajući N-( $\gamma$ -glutamil)lizin izopeptidne veze. Posljedično, stvara se kontinuirani proteinski monosloj uz staničnu membranu koji uključuje i dezmosome zahvaljujući njihovim vezama s plakinskim dimerima (Egawa i Kabashima, 2017; Kalinin i sur., 2001).

Sljedeći korak predstavlja sinteza lipidne ovojnice koja započinje lučenjem sadržaja lamelarnih tjelešaca. Tim putem  $\omega$ -hidroksi ceramidi dospijevaju u staničnu membranu, premošćuju ju svojim dugim hidrofobnim repovima i povezuju se s proteinskim monoslojem uz aktivnost TG1 stvaranjem  $\omega$ -hidroksiesterskih veza između hidroksilnih krajeva ceramida i aminokiselinskih ostataka glutaminske kiseline iz polipeptidnih lanaca proteina (Kalinin i sur., 2001). Istodobno se

luče i razni enzimi iz porodice kiselih hidrolaza poput sekretornog oblika fosfolipaze A<sub>2</sub> koja uklanja masne kiseline s fosfolipida stanične membrane (Wertz, 2018; Maury i sur., 2000). Rezultat takvih procesa je postupna razgradnja membrane i njena zamjena ceramidima kovalentno vezanim na oroženu proteinsku ovojnici.

Treći i konačni korak je učvršćivanje nastale ovojnice dodatnim proteinima pri čemu je najznačajniji lorikrin čiji udio u proteinskoj ovojnicu prelazi 80% (Ishida-Yamamoto i Igawa, 2014). Kao netopljivi protein, lorikrin se prvotno sekvstrira u obliku granula, a zatim stvara homo i heterodimere s topljivim proteinima iz porodice SPR-ova (engl. small proline-rich proteins) uz aktivnost citosolne transglutaminaze 3 (TG3) čime se lorikrinu povećava solubilizacija. Translokacijom na periferiju, nastali kompleksi postaju dostupni TG1 te se povezuju s postojećom proteinskom skelom postupno stvarajući nove slojeve (Kalinin i sur., 2001).

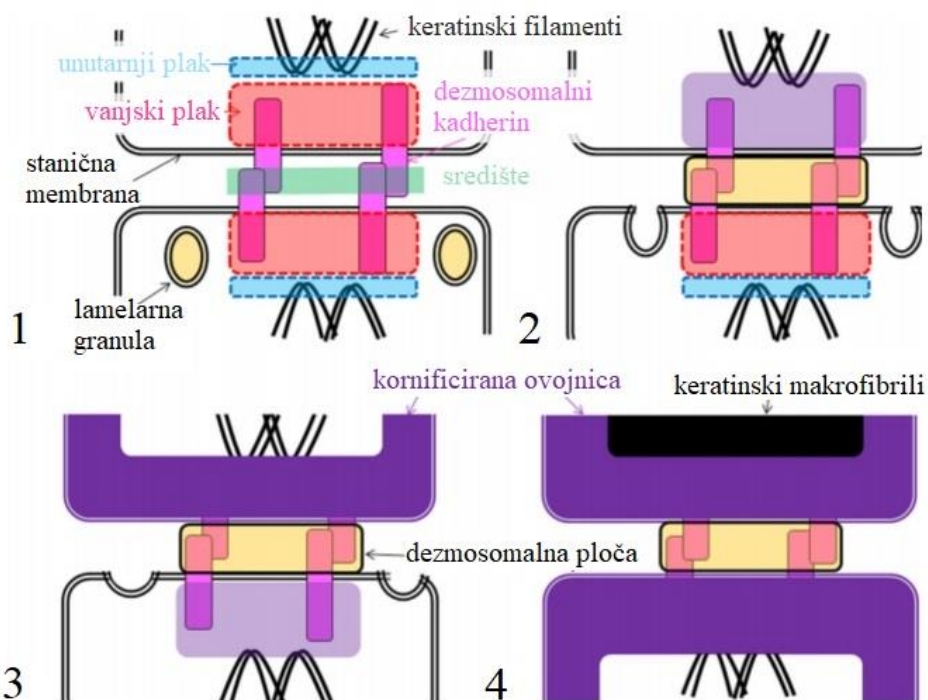


Slika 9. Slijed procesa uključenih u stvaranje orožene ovojnice (preuzeto i prilagođeno prema Kalinin i sur., 2001).

## Korneodezmosomi

Drugi stanični organeli poput već navedenog endoplazmatskog retikuluma, jezgre, ali i mikrotubula, dezmosoma itd. za to se vrijeme razgrađuju. Dezmosomi pri razgradnji zapravo prolaze transformaciju u mnogo čvršće korneodezmosome predvođeno molekulama koje dopijevaju u međustanični prostor tokom sekrecije lamelarnih tjelešaca već između 2. i 1. sloja *stratum granulosuma*. Ključne molekule u tom procesu su CDSN (korneodezmozin) te enzim CRP (engl. kallikrein-related peptidase) i LEKTI (engl. lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor) (Jonca i sur., 2011).

Važan korak je vezanje korneodezmozina na izvanstanični dio dezmosoma koji na taj način postaje tzv. dezmosomalna ploča (Raknerud, 1975), proces kojim se radi snažnog adhezivnog svojstva korneodezmozina u konačnici doprinosi funkcionalnosti kožne barijere smanjenjem nepoželjne deskvamacije (Ishida-Yamamoto i Igawa, 2014).



Slika 10. Shematski prikaz stvaranja korneodezmosoma (preuzeto i prilagođeno prema Ishida-Yamamoto i Igawa, 2014).

## Voda

Voda se do epidermisa dovodi uglavnom preko akvaporina (pretežno AQP3) bazalnog sloja gdje su oni najbrojniji, a njihov udio značajno se smanjuje prema *stratum granulosum* te iz tog razloga i sam udio vode pada u suprabazalnom smjeru. Za održavanje optimalne hidratacije viših slojeva važan je glicerol koji veže i zadržava vodu. Ipak, između *stratum granulosum* i *stratum corneum* ustanovljen je drastičan pad udjela vode sa 70% na svega 10-15%. Takav gradijent vode važan je za odvijanje procesa djelomične proteolize filagrina u korneocitima kojim nastaju higroskopske aminokiseline koje spadaju u skupinu kožnih humektansa poznatu kao NMF (prirodni faktor vlažnosti, engl. natural moisturising factor). Većinom, to su Glu, Arg i His (oko 48%), ali i njihovi daljnji derivati urokanska kiselina i pirolidon karboksilna kiselina, čiji nastanak je reguliran kaspazom 14, kalpainom 1 i bleomicin hidrolazom. Uz sve navedene molekule zaštitu od pretjeranog gubitka vode pružaju i mliječna kiselina (10%), ioni minerala poput kalcija, natrija i kalija (5%) za čije podrijetlo se zaslužne smatraju žlijezde znojnice, zatim urea (oko 5%) i glukoza. Nadalje, i sam keratin ima važnu ulogu u određivanju udjela vode zbog toga što njezino zadržavanje ovisi i o strukturnoj organizaciji keratinske mreže u stanici. Promatrajući *stratum corneum*, većinu vode posljedično nalazimo unutar stanica, a ne u međustaničnom prostoru (Egawa i Kabashima, 2017; Guzman-Alonso i Cortazar, 2016; Caspers i sur., 2001).

Ispravno odvijanje svih navedenih staničnih promjena uslijed diferencijacije keratinocita u konačnici će rezultirati nastankom funkcionalne kožne barijere.



## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Zbog kompleksnosti lipidnog sastava kože, znanstvenici su dugi niz godina pokušavali doći do istinskih odgovora na pitanje konkretne strukturne organizacije svih uključenih lipida i njihovih pojedinačnih funkcija. Sva otkrića području iznimno su važna za bolesnike koji pate od različitih kožnih oboljenja poput psorijaze, akni, seboroičnog dermatitisa, rozaceje, atopičnog dermatitisa, ihtioze itd. Za mnoge od tih bolesti patogeneza dugo nije bila poznata, a pozornost nije bila dovoljno skrenuta na poremećaje u sastavu lipidnih komponenti i na sveukupne promjene koje vode do narušenosti kožne barijere. S obzirom da su to bolesti koje oboljelima narušavaju kvalitetu svakodnevnog života i smanjuju samopouzdanje, ovaj rad služi kao pregled svih važnih procesa koji se odvijaju u koži kako bi nastala funkcionalna kožna barijera, te njenog cjelokupnog lipidnog sastava, potkrijepljeno rezultatima novijih znanstvenih istraživanja, uz prikaz aktualno prisutnih kozmeceutika na tržištu s aktivnom ulogom u obnovi kožne barijere, a sve s ciljem boljeg razumijevanja kože, a time i racionalnijeg pristupa odabiru kozmetičkih pripravaka.

### 3. METODE I MATERIJALI

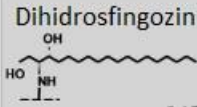
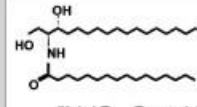
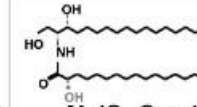
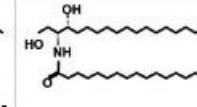
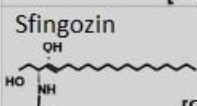
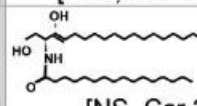
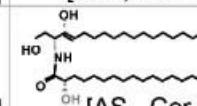
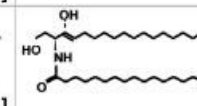
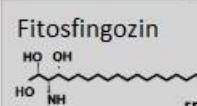
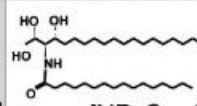
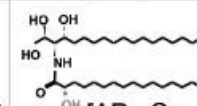
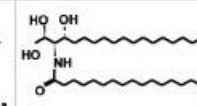
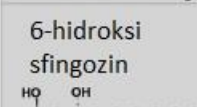
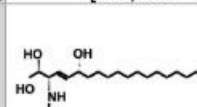
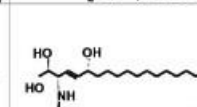
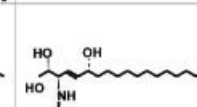
Za izradu diplomskog rada korištene su *on-line* baze podataka: *Pub Med*, *Elsevier*, *Journal of Experimental Biology* i *NCBI* kao izvor znanstvenih radova objavljenih u različitim stručnim časopisima. Za potrebe istraživanja korištene su ključne riječi na engleskom jeziku: *skin lipid composition*, *role of cholesterol sulfate*, *ceramide types*, *lamellar granules*, *desquamation*, *keratin types*, *lipid lamellae organisation*, *lipid lamellae composition*, *sebaceous lipids*, *ceramide synthesis*, *free fatty acids in skin*, *skin barrier function*, *corneocyte lipid envelope*, *corneocyte differentiation*, *skin lipid models*, *epidermal surface lipids*, *role of cholesterol in skin*, *water content in stratum corneum*, *lateral packing of lipids*, *orthorhombic lateral packing*, *electron diffraction on lipids*, *involucrin*, *filaggrin*, *corneodesmosomes* itd.

Pretraživanjem članaka traženi su odgovori na problematiku ovog rada i u tu svrhu izdvojeni kritički proučeni značajniji rezultati istraživanja.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. CERAMIDI

Ceramidi su sfingolipidi građeni od sfingoidne baze, koju čini dugolančani amino alkohol i masnih kiselina povezanih amidnom vezom. Prema masenom udjelu čine 50% lipidnog matriksa u međustaničnom prostoru *stratum corneuma* što ih čini njegovom glavnom komponentom (Vavrova i sur., 2017). Do danas je otkriveno 18 podvrsta ceramida (Uche i sur., 2019a) od kojih u građi kožne barijere potvrđeno sudjeluje njih 12, a kategorizirani su prema razlikama u građi njihovih baza te stupnju hidroksilacije vezanih masnih kiselina. Prema bazi dijelimo ih na: sfingozin (S), fitosfingozin (P), 6-hidroksisfingozin (H) i dihidrosfingozin (dS) ceramide, a masne kiseline mogu biti: nehidroksilirane (N),  $\alpha$ -hidroksilirane (A) ili  $\omega$ -hidroksilirane (O) pri čemu slova u zagradama predstavljaju oznake nomenklature prema Motta i suradnici (1993) (Slika 11) (Cha i sur., 2016).

| tip masne kiseline<br>tip sfingoidne baze  | Nehidroksilirane masne kis. [N]  | $\alpha$ -hidroksilirane masne kis. [A]  | esterificirane $\omega$ -hidroksi masne kis. [EO]  |
|--|--|--|--|
| Dihidrosfingozin<br><br>[dS]    | <br>[NdS, Cer 10] | <br>[AdS, Cer 11] | <br>[EOdS]       |
| Sfingozin<br><br>[S]            | <br>[NS, Cer 2]   | <br>[AS, Cer 5]   | <br>[EOS, Cer 1] |
| Fitosfingozin<br><br>[P]        | <br>[NP, Cer 3]   | <br>[AP, Cer 6]   | <br>[EOP, Cer 9] |
| 6-hidroksi sfingozin<br><br>[H] | <br>[NH, Cer 8]   | <br>[AH, Cer 7]   | <br>[EOH], Cer 4 |

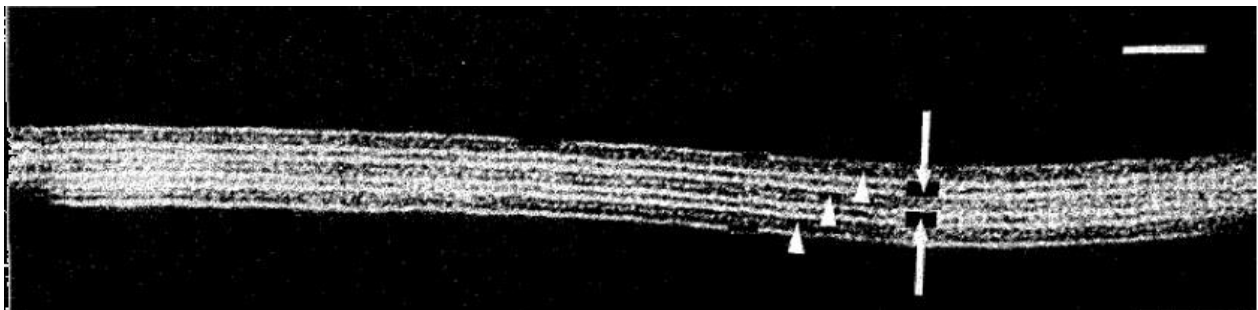
Slika 11. Tablični prikaz tipova ceramida (Cer) potvrđenih u *stratum corneumu*. Sivom bojom slijeva nadesno prikazane su vrste vezanih masnih kiselina, a od vrha prema dolje vrste baza (preuzeto i prilagođeno prema Jun Cha i sur., 2016).

Svi ceramidi bitni za izgradnju funkcionalne kožne barijere sintetiziraju se u endoplazmatskom retikulumu prilikom sazrijevanja keratinocita, zatim se prevode u glukozilceramide i

sfingomijeline kao svoje polarne prekursore uz aktivnost glukozilceramid sintaze i SM sintaze, te se kao takvi translociraju do Golgijevog aparata. Putem lamelarnih tjelešaca izlučuju se u izvanstanični prostor, a izvan stanice se prevode u funkcionalne ceramide uz aktivnost  $\beta$ -glukocerebrozidaze i kisele sfingomijelinaze te sudjeluju u izgradnji lipidne ovojnice i lipidnih lamela. (Hanada, 2010). Sama lipidna ovojnica stvara se kako bi se organizacija međustaničnih lipida ispravno usmjerila te kako bi cijela struktura bila umrežena s ciljem smanjenja praznih prostora, a time i boljeg ograničavanja nekontrolirane permeacije tvari kroz kožu (Vavrova i sur., 2017).

### **Organizacija lipida u međustaničnom prostoru *stratum corneuma***

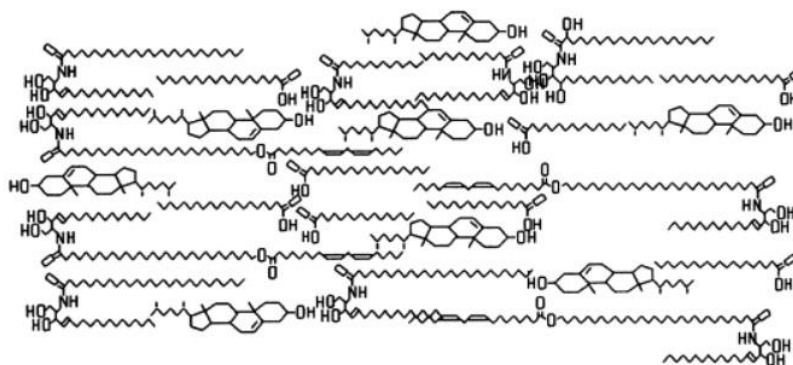
Već 1989. godine uz pomoć transmisijske elektronske mikrofije utvrđena je lamelarna organizacija lipida u međustaničnom prostoru *stratum corneuma*, pri čemu je uočeno javljanje po 3, 6 ili 9 vidljivih vrpca ovisno o udaljenosti između stanica, i to uvijek u obliku ponavljanja uzorka široka-uska-široka vrpca, što je znanstvenike navodilo na zaključak da se određeni lipidi (dužih lanaca) organiziraju u vanjske dvije lamele, te da samo kraći lipidni lanci i kolesterol mogu stati u središnju lamelu (Swartzendruber i sur., 1989). Opisana struktura, koju čine tri lamele, nazvana je dugom ponavljajućom fazom, zbog činjenice da je duga 13 nm, nasuprot kratkoj ponavljajućoj fazi čija duljina iznosi 6 nm i koja predstavlja drugu mogućnost organizacije lipida (Groen i sur., 2011).



Slika 12. Prikaz dobiven transmisijskom elektronskom mikrofijom na uzorku *stratum corneuma* kože svinje. Vidljivo je 9 vrpca s ponavljanjem uzorka široka-uska-široka. Strelice pokazuju po dva susjedna lipidna dvosloja (pri čemu izraz dvosloj predstavlja sloj lipida širine slične fosfolipidnom dvosloju), a trokuti monoslojeve (preuzeto i prilagođeno prema Swartzendruber i sur., 1989).

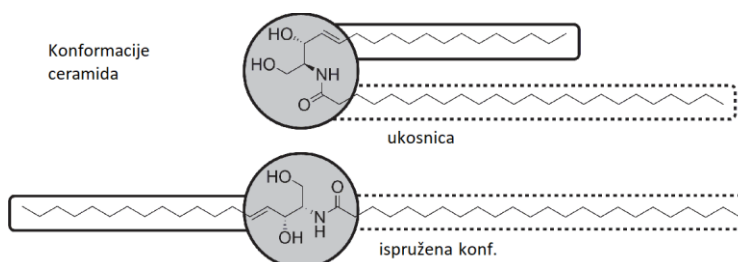
U novije vrijeme znanstvenici se ne slažu s idejom homogene i definirane raspodjele lipida, već njihove studije ukazuju na mogućnost netočnosti modela u kojem se duga ponavljajuća faza sastoji

od tri lamele u obrascu široka-uska-široka vrpca. Naime, pokazalo se da bi takav obrazac mogao jednostavno biti manjkavost metode fiksacije lipida s rutenijevim tetroksidom. Prema njihovom modelu lipidnih lamela, centralna lamela sadrži nezasićene linoleatne lance koje dvije vanjske lamele nemaju (iz dugih Cer EOS-a koji se pružaju iz dvije vanjske lamele u središnju) te se prema tome rutenijev tetroksid značajno više reducira upravo u središnjoj lameli i nakuplja uz polarne skupine na njezinim rubovima. Ako je ovaj model točan, to bi značilo da su sve tri lamele zapravo iste duljine te da ne postoje restrikcije u tome koji se lipidi mogu nalaziti u pojedinačnim lamelama (Hill i Wertz, 2003).



Slika 13. Predloženi model organizacije lipida u strukturalnoj jedinici građenoj od tri lamele (preuzeto iz Hill i Wertz, 2003).

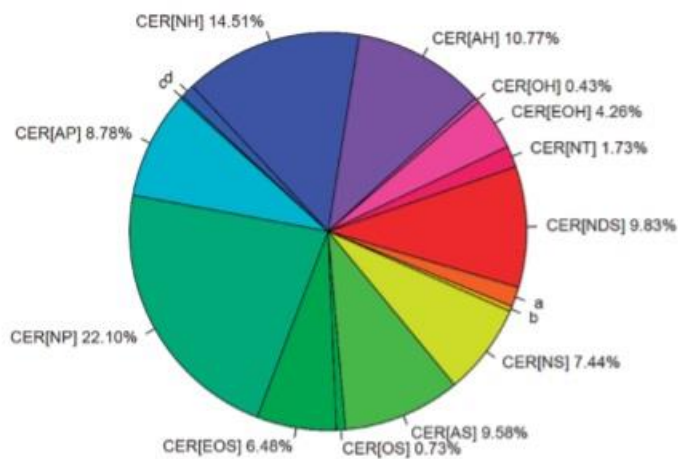
Ceramidi se u izvanstaničnom prostoru teoretski mogu nalaziti u jednoj od dvije konformacije, konformaciji ukosnice ili ispruženoj konformaciji (slika 14), pri čemu se ispružena smatra preferiranom zbog povezivanja susjednih lamela u cjelinu te omogućavanja gušćeg lateralnog pakiranja lipida koje prati porast van der Walsovih interakcija između acilnih lanaca te stvaranje više vodikovih veza između polarnih skupina lipida što u konačnici rezultira smanjenjem permeacije kroz takvu strukturu (Champagne i sur., 2018; Vavrova i sur., 2017).



Slika 14. Prikaz dviju mogućih konformacija ceramida (preuzeto i prilagođeno prema Vavrova i sur., 2017).

## Vrste ceramida prisutne u koži

Iako je točna karakterizacija svih ceramida kožne barijere vrlo zahtjevan proces uzevši u obzir stupanj kompleksnosti građe kože, utvrđeno je da njihovo ponašanje i mogućnost stvaranja funkcionalne barijere ovisi o dužini njihovih acilnih lanaca. Istraživanja obujma permeacije na modelnoj membrani *stratum corneuma*, s indometacinom kao testnom lipofilnom supstancom, pokazala su da kratkolančani CER povećavaju permeabilnost membrane do maksimalnog učinka od 6,5 puta, uočenog na duljini acilnog lanca C4-C6. Zaključak istraživanja je taj da kraći ceramidi, iako se od dužih razlikuju samo u duljini acilnih lanaca te stoga imaju istu građu polarne skupine, a time i jednaku mogućnost stvaranja vodikovih veza, ipak nisu pogodni za stvaranje funkcionalne barijere zbog nemogućnosti stvaranja prikladnih hidrofobnih interakcija s drugim lipidima (dokazano loše miješanje s masnim kiselinama pri čemu dolazi do razdvajanja faza) (Školova i sur., 2013). Nadalje, istraživanjem provedenom na uzorku zdrave kože tekućinskom kromatografijom visoke rezolucije spregnutom s Q-TOF masenom spektrometrijom utvrđena je raspodjela različitih ceramidnih skupina prema zastupljenosti pri čemu je kao najzastupljeniji određen CER [NP] (slika 15) (t'Kindt i sur., 2011). Važnost većinskog udjela tog tipa ceramida potvrđena je i eksperimentalno *in vitro* studijama permeabilnosti uz UPLC metodu na modelnim membranama *stratum corneuma*, pri čemu je pokazano kako povećanje udjela sfingozin, a smanjenje fitosfingozin ceramida vodi smanjenoj funkciji duge ponavljajuće faze i time povećanja permeabilnosti cjelokupne membrane (Uche i sur., 2019b).



Slika 15. Dijagram prikazuje raspodjelu određenih CER tipova u ljudskom *stratum corneumu*. Neimenovani tipovi su redom: a) CER [ADS] 1,63%, b) CER [EODS] 0,40%, c) CER [OP] 0,17% i d) CER [EOP] 1,14% (preuzeto iz Kindt i sur., 2011).

### Ceramidi i bolesti kože

Važnost ceramida uočena je i proučavanjem etiologija različitih kožnih bolesti poput atopijskog dermatitisa, kontaktnog dermatitisa, ihtioze, psorijaze, te suhe i/ili na druge načine oštećene kože kojima je zajednička narušenost kožne barijere. Ispitivanja su dokazala između ostalog i značajno smanjenje količine ukupnih ceramida, te posljedično promjena u lateralnom pakiranju lipida u lamelama (smanjuje se gustoća pakiranja) što dovodi do povećanog transepidermalnog gubitka vode (TEWL).

Eksperimentalno je potvrđeno da topikalna primjena ceramida, ali u smjesi koja sadrži i ostale važne lipide (kolesterol i masne kiseline), značajno ubrzava obnovu kožne barijere što pokazuje da je ne samo jedna skupina, već pravilan omjer svih ključnih lipida, nužan za postizanje kožne homeostaze i time smanjenje simptoma poput ljuštenja kože, crvenila, svrbeža, suhoće itd. (Choi i Maibach, 2005).

Tablica 1. Kozmetički proizvodi s ceramidima dostupni u ljekarnama na području RH.

| <i>Proizvođač</i>            | <i>Ime proizvoda</i>       | <i>Tip ceramida</i> | <i>Namjena</i>                                |
|------------------------------|----------------------------|---------------------|---|
| <b><i>La Roche-Posay</i></b> | Toleriane Sensitive        | ceramid [NP]        | njega osjetljive kože                         |
| <b><i>Eucerin</i></b>        | AtopiControl Akut<br>krema | ceramid [NP]        | smanjenje svrbeža i<br>crvenila atopične kože |
| <b><i>Eucerin</i></b>        | AtopiControl losion        | ceramid [NP]        | njega tijela atopične<br>kože                 |
| <b><i>Eucerin</i></b>        | AtopiControl krema         | ceramid [NP]        | Njega lica atopične<br>kože                   |

|                        |                          |   |  |
|------------------------|--------------------------|---|--|
| <b><i>Eucerin</i></b>  | Urea repair rich         | ceramid [NP]                                      | Intenzivna noćna njega suhe do vrlo suhe kože lica |
| <b><i>Eucerin</i></b>  | Lipo-Balance             | ceramid [NP]                                      | za suhu i osjetljivu kožu koja zateže              |
| <b><i>Bioderma</i></b> | Atoderm Intesive Baume   | fitosfingozin, ceramid [NP], ceramid [EOP]        | obnova atopične kože                               |
| <b><i>Vichy</i></b>    | Nutrilogie 1             | ceramid [NdS] (2-oleamido-1,3-oktadekanediol)     | njega suhe kože lica                               |
| <b><i>Vichy</i></b>    | Nutrilogie 2             | ceramid [NdS] (2-oleamido-1,3-oktadekanediol)     | njega vrlo suhe kože lica                          |
| <b><i>Uriage</i></b>   | Xémose krema             | fitosfingozin                                     | njega suhe kože sklone atopiji                     |
| <b><i>Uriage</i></b>   | Xémose mlijeko za tijelo | fitosfingozin, $\omega$ -3 i $\omega$ -6 ceramidi | njega suhe kože sklone atopiji i psorijazi         |
| <b><i>Caudalie</i></b> | Resveratrol Lift         | ceramid [NP]                                      | noćna regenerativna njega                          |

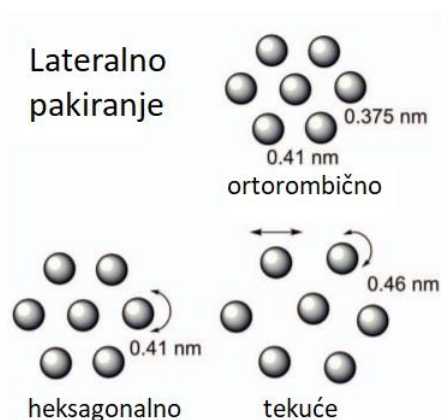
## 4.2. MASNE KISELINE

Masne kiseline se u *stratum corneumu* nalaze u rasponu duljine lanaca od 14 do 34 C atoma i pretežno su zasićene i nerazgranate iako se mogu naći i male količine hidroksi masnih kiselina te jednostruko i višestruko nezasićenih masnih kiselina. Više od 50% masenog udjela slobodnih masnih kiselina čine lignocerinska (C24:0) i cerotinska (C26:0) kiselina (Van Smeden i Bouwstra, 2016). Za kožnu homeostazu ključno je da se one s ceramidima i kolesterolom nalaze upravo u ekvimolarnom omjeru (Vavrova i sur., 2017).

### Laterano pakiranje lipida u lamelama



Iako su ceramidi najzastupljeniji lipidi u *stratum corneumu*, bez masnih kiselina i kolesterola ne mogu tvoriti lamele. Dugolančane masne kiseline pridonose miješanju svih lipida i omogućavaju njihovo gusto pakiranje. Naime, proučavajući lipidne lamele širokokutnom difrakcijom X-zraka (engl. wide angle X-ray diffraction, WAXD) na površini uzorka 1-2 mm<sup>2</sup> utvrđeno je postojanje tri moguća oblika lateralnog pakiranja lipida, a to su tekući (dokazan širokim pikom na 0,46nm), heksagonalni (dokazan uskim pikom na 0,41nm) i ortorombični (dokazan s dva uska pika, na 0,41nm i 0,37nm) pri čemu gustoća pakiranja, a time i funkcionalnost barijere raste od tekućeg prema ortorombičnom obliku (slika 16). Nadalje, elektronska difrakcija je kao metoda omogućila promatranje pojedinačnih kristala lipida izlaganjem površine od svega 1 μm<sup>2</sup> snopu elektrona pri čemu su heksagonalni oblik okarakterizirale refleksije pod kutem od 60°, s pravilnim međusobnim razmakom od 0,41 nm, a ortorombični oblik refleksije pod kutem različitim od 60°, s dvije refleksije udaljene 0,37nm, a četiri 0,41nm (Bouwstra i sur., 2002).

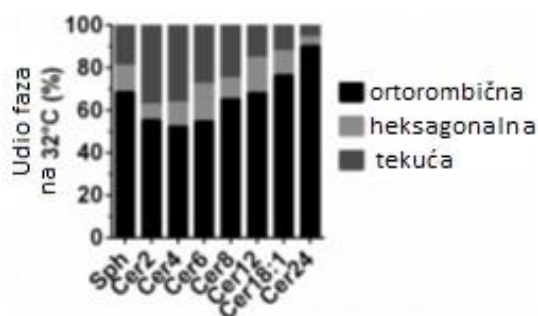


Slika 16. Prikaz mogućih oblika lateralnog pakiranja lipida u građi lamela (preuzeto i prilagođeno prema Vavrova i sur., 2017).

Također, IR spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) koja koristi vibracije svijanja kako bi se identificirale interakcije susjednih kemijskih skupina, pokazuje dublet kod ortorombičnog pakiranja zbog interakcija bliskih susjednih lanaca, dok heksagonalno pakiranje pokazuje singlet (Mojumdar i sur., 2015).

Navedene analize pokazale su da je ortorombično lateralno pakiranje ujedno i najzastupljeniji oblik organizacije lipida u *stratum corneumu* jer takav stupanj uređenosti najbolje sprječava pretjerani gubitak vode i ograničava prodor štetnih tvari dublje u kožu. Ipak, manje uređena stanja poput

tekućeg i heksagonalnog također su prisutna u manjem udjelu zbog toga što omogućavaju svijanje lamela nužno za praćenje kontura korneocita i sprječavanje deformacija kod mehaničkog stresa (slika 17). Predložen je i tzv. "sendvič model" koji pretpostavlja da se, u strukturi od tri lamele, dio lipida središnje lamele nalazi u tekućem obliku između ostalog i kako bi se omogućila facilitacija signala između korneodezmosoma putem signalnih molekula. Takav model bio je prihvaćen jer je sugerirao da sve tvari uvijek moraju proći vanjsku kristaliničnu fazu koja ograničava permeaciju, i tek onda mogu doći do tekuće faze u središtu (Bouwstra i sur., 2002).



Slika 17. Relativni udio triju faza određen na modelnim lipidnim membranama koje sadrže smjesu odgovarajućih ceramida, kolesterola, kolesteril sulfata i masnih kiselina pri 32°C. Vidljivo je da dugolančane CER vrste omogućavaju većinsko ortorombično pakiranje lipida (preuzeto i prilagođeno prema Školova i sur., 2013).

### Utjecaj broja C atoma lipida na funkciju kožne barijere

Istraživanja su potvrdila važnost visokog udjela dugolančanih masnih kiselina u ukupnom udjelu slobodnih masnih kiselina u sastavu lipidnih lamela time što je na uzorcima bolesne kože uvijek nađen njihov smanjen udio, a znatno povećan udio kratkolančanih masnih kiselina, što korelira s manjim stupnjem uređenosti pakiranja lipidnih lamela, a time i smanjenjem funkcije kožne barijere. Na modelnim membranama pokazano je kako zamjena kratkolančanih masnih kiselina dugolančanima uspeva dovesti do obnove funkcije kože (Jia i sur., 2017).

Najnovija studija permeabilnosti s etil-PABA-om provedena je na pet modelnih membrana *stratum corneum* kojima je mijenjan lipidni sastav na način da je prvi model predstavljao sastav zdrave kože, u drugom modelu udjeli dugolančanih CER [NS]24 i CER [AS]24 smanjeni su za 50% i zamijenjeni s CER [NS]16 i CER [AS]16. U trećem modelu CER [NS]24 i CER [AS]24 vraćeni su gotovo na normalnu razinu, no znatno su smanjeni važni CER [NP]24 i CER [EOS]24, te

dodatno povećani udjeli CER [NS]16 i CER [AS]16, dok je u četvrtom modelu udio svih CERova ostao jednak onome zdrave kože, no mijenjan je sastav masnih kiselina na način da su udjeli C22 i C24 masnih kiselina značajno smanjeni, a udjeli C16, C18 i C20 povećani. Zadnji model predstavljao je kombinaciju modela tri i četiri (tablica 2).

Tablica 2. Sastav lipida prema ispitivanim modelima.

| <i>Naziv lipida i dužina lanca</i> | <i>Molarni udio pojedinih lipida (%)</i> |          |          |              |              |
|------------------------------------|--|----------|----------|--------------|--------------|
|                                    | Model 1                                  | Model 2  | Model 3  | Model 4      | Model 5      |
| <i>CER [EOS]30</i>                 | 15                                       | 15       | 7        | 15           | 7            |
| <i>CER [NS]24</i>                  | 13                                       | 6,5      | 12       | 13           | 12           |
| <i>CER [NS]16</i>                  | -  | 6,5      | 12       | -            | 12           |
| <i>CER [AS]24</i>                  | 13                                       | 6,5      | 12       | 13           | 12           |
| <i>CER [AS]16</i>                  | -  | 6,5      | 12       | -            | 12           |
| <i>CER [NP]</i>                    | 30                                       | 30       | 16       | 30           | 16           |
| <i>CER [AP]</i>                    | 16                                       | 16       | 16       | 16           | 16           |
| <i>Masne kiseline</i>              | normalno                                 | normalno | normalno | promijenjeno | promijenjeno |

Istraživanje je pokazalo da je permeabilnost membrane u modelu 2 slabo povećana, a u modelu 3 je zamijećeno još malo veće povećanje, no razlika nije bila znatna prema zdravom modelu. Znatno povećanje permeabilnosti dokazano je u modelu 4 i još više u modelu 5 što je pokazalo da prisutnost ceramida s masnim kiselinama dužine 16 C atoma još uvijek omogućava normalno nastajanje lamela i time održavanje funkcije barijere dok god su prisutne dugolančane masne kiseline u normalnom udjelu. Naime, kratkolančane masne kiseline se uz mješavinu CER 24 i kolesterola odvoje u zasebnu domenu jer je smanjena kompatibilnost dugih i kratkih lanaca u takvoj miješavini lipida. Zaključak je da je sastav ceramida važan za lamelarnu organizaciju lipida odnosno

postojanje duge lamelarne faze, no za gustoću pakiranja i cjelokupnu funkciju barijere presudna je i prisutnost odgovarajućih masnih kiselina te stoga povećani udio kratkolančanih masnih kiselina ima veću ulogu u patogenezi bolesti kože nego u istoj mjeri smanjena dužina CER lanaca (Uche i sur., 2019a).

Sve navedene studije ukazuju na važnost topikalnog nadomještanja masnih kiselina zajedno s drugim funkcionalnim lipidima kako bi se omogućila najbolja njega i obnova bolesne kože s prisutnim oštećenjima kožne barijere.

Tablica 3. Kozmetički proizvodi s masnim kiselinama dostupni u ljekarnama na području RH.

| <i>Proizvođač</i>                | <i>Ime proizvoda</i>     | <i>Vrsta masne kiseline</i>          | <i>Namjena</i>                 |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Vichy</b>                     | Nutrilogie 1             | stearinska, miristinska, palmitinska | njega suhe kože lica           |
| <b>Vichy</b>                     | Nutrilogie 2             | stearinska, miristinska, palmitinska | njega vrlo suhe kože lica      |
| <b>La Roche-Posay</b>            | HYDRAPHASE Intense riche | stearinska kiselina                  | intenzivna rehidratantna njega |
| <b>La Roche-Posay</b>            | KERIUM DS krema          | stearinska, palmitinska              | poticanje deskvamacije kože    |
| <b>La Roche-Posay</b>            | TOLERIANE Sensitive      | stearinska, miristinska, palmitinska | njega osjetljive kože lica     |
| <b>Pierre Fabre DERMATOLOGIE</b> | DEXERYL krema            | stearinska                           | emolijentna njega              |
| <b>Dr. Wolff</b>                 | Linola® Fett krema       | nezasićene masne kis. C18:2          | obnova kože s atopijom         |
| <b>Becutan</b>                   | Dječja krema             | stearinska                           | svakodnevna njega kože         |

|                      |                                   |  |  |
|----------------------|-----------------------------------|--|--|
| <i>Eucerin</i>       | AtopiControl krema                | $\omega$ -6 masne kiseline                                   | njega atopične kože                                |
| <i>Eucerin</i>       | pH5 krema za ruke                 | palmitinska, stearinska, oleinska, miristinska i arahidonska | zaštita kože od isušivanja i obnova kožne barijere |
| <i>A-derma</i>       | Exomega Control krema             | 10-hidroksidekanska  | emolijentna njega protiv svrbeža                   |
| <i>A-derma</i>       | Exomega Control ulje za tuširanje | laurinska  | emolijens za čišćenje atopične kože                |
| <i>dermalogica</i> ® | barrier defense booster           | stearinska   | jačanje kožne barijere                             |

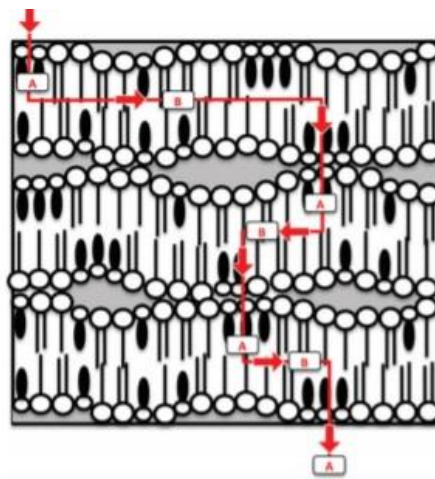
### 4.3. KOLESTEROL

Kolesterol je lipid iz skupine sterola. Građen je od četiri ugljikovodična prstena te ugljikovodičnog lanca na jednom kraju molekule, a hidroksilne skupine na drugom. Osim što sudjeluje u građi staničnih membrana, preteča je i drugih važnih steroida poput žučnih soli, vitamina D i steroidnih hormona (progestagena, glukokortikoida, androgena, estrogena i mineralokortikoida) koji su važne molekule u regulaciji različitih funkcija ljudskog organizma (Berg i sur., 2013). Govoreći o lipidnom sastavu kožne barijere, kolesterol masenim udjelom čini njegovih 30-35% te se nalazi u već spomenutom ekvimolarnom odnosu s ostalim lipidima (Pappas, 2009).

Nužnost kolesterola za postizanje kožne homeostaze proizlazi iz činjenice da se bez njega ceramidi i slobodne masne kiseline ne miješaju dobro te ne može doći do stvaranja duge ponavljajuće faze u organizaciji lamela. Također, dokazano je da s povećanjem udjela kolesterola (od nule do normalno prisutne razine u koži) raste i udio ortorombičnog lateralnog pakiranja lipida (Mojumdar i sur., 2015). Kako se ni same masne kiseline i kolesterol ne miješaju dobro, potvrđeno na modelnim sustavima, u strukturi ih nalazimo odvojene na suprotnim krajevima ceramida u izduženoj konformaciji. Točnije, prema hidrofobnoj podudarnosti masne kiseline se organiziraju uz dugi acilni lanac izduženih ceramida, a kolesterol uz njihovu sfingoidnu bazu. To je potvrđeno i metodom širokokutne difrakcije X-zraka (WAXD) na izoliranom *stratum corneumu* koja je ukazala na kristalinično pakiranje ugljikovodičnih lanaca s određenim obrascem ponavljanja

udaljenosti (3,7-3,8 Å i 4,1-4,2 Å) koji se ne bi pojavili u slučaju da se kolesterol nalazi i uz sfingoidnu bazu i uz acilne lance ceramida (Iwai i sur., 2012).

Kolesterol moguće predstavlja i odgovor na pitanje načina kretanja vode i otopljenih tvari kroz *stratum corneum*. Smatra se da sama međustanična voda stvara diskontinuirane plosnate bazenčice između lamela smještajući se uz polarne glave lipida, te da se lateralna difuzija preferirano odvija kroz područja bogata upravo kolesterolom, dok je difuzija u ravnini okomitoj na položaj lipida u lamelama najbrža uz manje guste regije odnosno uz tzv. "centar mase dvosloja" (Slika 18) (Del Regno i Notman, 2017).



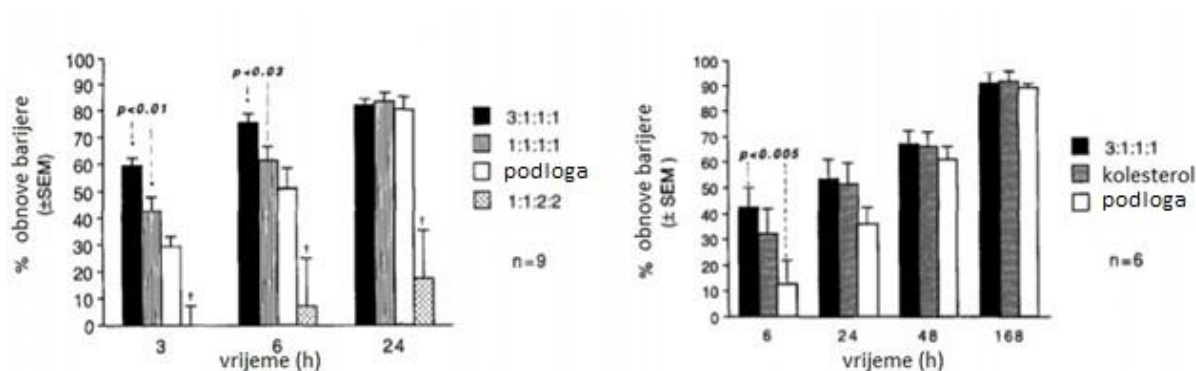
Slika 18. Pojednostavljeni prikaz triju lipidnih lamela. Crvene linije i strelice pokazuju predloženi put permeacije vode i otopljenih tvari. Slova redom predstavljaju: A) lateralna difuzija i B) vertikalna difuzija (preuzeto iz Del Regno i Notman, 2017).

Utjecaj kolesterola na obnovu kože u topikalno primjenjenim pripravcima proučavan je još 1997. godine u Kaliforniji na laboratorijskim miševima i na starijim muškarcima. Za potrebe eksperimenta, metodom s trakama (engl. tape stripping) narušavan je integritet kožne barijere dok transepidermalni gubitak vode nije iznosio 2-4 mg/cm<sup>2</sup> na sat, a zatim je mjereno još nakon 3, 6 i 24 sata na koži miševa te nakon 6, 24, 48 i 168 sati na ljudima uz primjenu određenog topikalnog pripravka (Tablica 4).

Tablica 4. Topikalni pripravci korišteni u eksperimentu koji su proveli Zettersten i suradnici (1997).

| TOPIKALNI<br>PRIPRAVAK | Omjer kolesterola,ceramida, palmitinske i<br>linoleinske kiseline u 2% lipidnoj smjesi |            |
|------------------------|--|------------|
|                        | NA MIŠEVIMA  | NA LJUDIMA |
| 1                      | 3:1:1:1  | 3:1:1:1    |
| 2                      | 1:1:1:1  | Kolesterol |
| 3                      | Podloga  | Podloga    |
| 4                      | 1:1:2:2  | /          |

Dobiveni rezultati pokazali su da uz korištenje topikalnih pripravaka s optimiziranim udjelom fiziološki prisutnih lipida poput onog s udjelom kolesterola u omjeru 3:1:1:1 prema ostalim lipidima značajno ubrzava proces obnove funkcije oštećene kožne barijere u usporedbi s ekvimolarnim pripravkom lipida, pripravkom sa 2% kolesterola te samom podlogom, dok pripravak na bazi masnih kiselina (1:1:2:2) rezultira značajno sporijim oporavkom u odnosu na samu podlogu (kod miševa). Rezultati su prikazani slikom 19 (Zettersten i sur., 1997).



Slika 19. Rezultati eksperimenta obnove barijere uz topikalne pripravke s 2% lipida. Brojevi predstavljaju omjere kolesterola, ceramida, palmitinske i linoleinske kiseline u ispitivanim

pripravicima. Lijeva slika prikazuje rezultate dobivene na laboratorijskim miševima, a desna slika na muškarcima starosti 80 ( $\pm 5$ ) godina (preuzeto i prilagođeno prema Zettersten i sur., 1997).

Novija istraživanja pokazuju da bolesna koža i starija/suha koža pokazuju narušen omjer kolesterola i CER [EOS] koji je tada značajno povećan. Uz to, vidljiv je i porast ukupnog udjela slobodnih masnih kiselina i to onih kratkolančanih, dok se udio dugolančanih smanjuje. Te promjene zajedno dovode do već opisanih promjena u lateralnom pakiranju lipida i ukupno smanjenoj funkciji kožne barijere (Dähnardt i sur., 2018; Jia i sur., 2017).

#### **4.3.1. Uloga kolesterol sulfata**

Sulfokonjugacija kolesterola započinje u bazalnom sloju keratinocita (uz aktivnost sulfotransferaze SULT2B1b) i nastavlja se kroz njihove faze diferencijacije sve do postizanja maksimalne količine kolesterol sulfata u *stratum granulosum*. U *stratum corneum* se zatim njegova količina progresivno smanjuje hidrolizom uz aktivnost steroid sulfat sulfataze (Strott i Higashi, 2003).

Porastom njegovog udjela u ukupnom lipidnom sastavu epidermisa do 5%, a zatim pada do 1% u vanjskim slojevima *stratum corneum* zatvara se tzv. "ciklus kolesterol sulfata". Viši udio kolesterol sulfata u diferencirajućim stanicama važan je zbog njegove uloge u regulaciji transkripcije i povećavanja kohezije između stanica uslijed inhibitornog djelovanja na serin proteaze. S druge strane, upravo zbog inhibitornog djelovanja od presudne je važnosti njegov pad koncentracije u višim slojevima *stratum corneum* jer se u protivnom odgađa proces deskvamacije pretjeranim zadržavanjem korneodezmosoma. Također, bitna činjenica je da kolesterol sulfat povećava topljivost kolesterola u lipidnoj mješavini vodeći fluidnijem pakiranju lipida, što se u dubokim slojevima epidermisa uravnotežava povećanom koncentracijom iona  $Ca^{2+}$  koji promoviraju njihovo gušće pakiranje. Nadalje, kako se koncentracija  $Ca^{2+}$  iona brzo smanjuje kroz slojeve epidermisa prema površini, tako fluidnost lipida prati promjene koncentracije kolesterol sulfata, koji pri površini svojim udjelom od 1% omogućava kristaliziranje kolesterola, a time i gušće pakiranje lipida (Elias i sur., 2014; Bouwstra i Dubbelaar, 2000).



Tablica 5. Kozmetički proizvodi s kolesterolom / kolesterolskim esterima dostupni u ljekarnama na području RH.

| <i>Proizvođač</i> | <i>Ime proizvoda</i>           | <i>Vrsta lipida</i>             | <i>Namjena</i>                       |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Vichy</b>      | Nutrilogie 1                   | kolesterol                      | hranjiva njega za lice               |
| <b>Vichy</b>      | Nutrilogie 2                   | kolesterol                      | hranjiva njega za lice               |
| <b>Bioderma</b>   | Atoderm Intesive<br>Baume      | kolesterol                      | njega atopične kože<br>lica i tijela |
| <b>Eucerin</b>    | AtopiControl krema             | kolesterol                      | njega atopične kože                  |
| <b>Eucerin</b>    | UreaRepair krema za<br>stopala | kolesterol                      | olakšanje simptoma<br>suhe kože      |
| <b>Avene</b>      | Cold Cream Body<br>lotion      | kolesterol/lanosterol<br>esteri | njega suhe i osjetljive<br>kože      |

#### 4.4. ULOGA I SASTAV SEBUMA

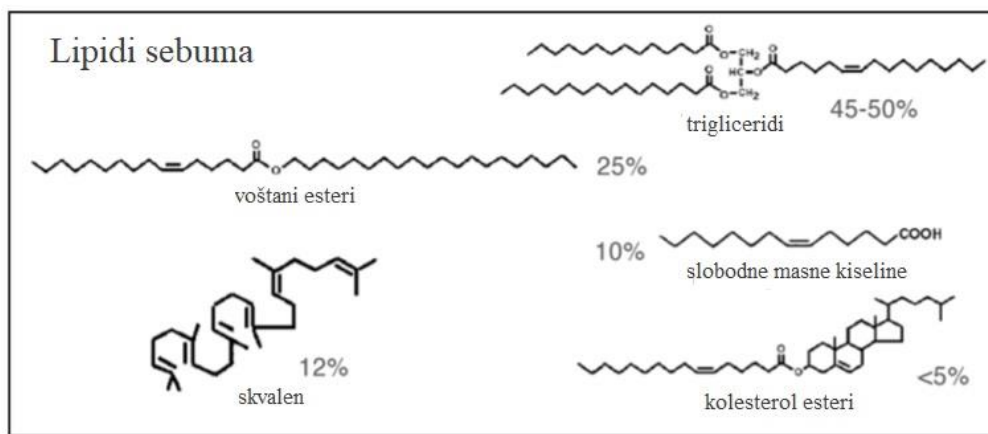
Uz sve navedene skupine lipida koje su uključene u izgradnju kompleksnog međustaničnog prostora *stratum corneum*, sebacealne žlijezde zaslužne su za stvaranje smjese nepolarnih lipida poznate pod nazivom sebum ili loj i njezino svakodnevno lučenje na samu površinu kože. Sebum je građen od triglicerida, slobodnih masnih kiselina, voštanih estera, skvalena i male količine kolesterola, kolesterol estera i diglicerida (Slika 20), a neke od glavnih uloga su mu zaštitno djelovanje protiv sunčevog zračenja, omogućavanje rasta povoljne mikroflore te ograničavanje naseljavanja gram-pozitivnih bakterija, zaštita od oksidacije, pro- i protuupalno djelovanje te sprječavanje pretjeranog gubitka vode iz epidermisa (Picardo i sur., 2009).

## Trigliceridi

Trostruki esteri glicerola i masnih kiselina, trigliceridi, sačinjavaju prosječno 45% ukupne mase lipida sebuma. Proučavanjem sastava masnih kiselina koje ulaze u njihovu građu, pokazalo se da su najzastupljenije C16:0, C16:1 $\Delta^6$ , C14:0 i C18:1 $\Delta^6$  s ukupnim udjelom od  $\approx$  85% (Akaza i sur., 2014).

## Voštani esteri

Esteri dugolančanih masnih kiselina i dugolančanih alkohola sačinjavaju u prosjeku 25% sebacealnih lipida, a uz to su i specifični za žlijezde lojnice ne stvarajući se ni u jednom drugom tipu stanica u ljudskom organizmu. Kao što im je uloga i u prirodi tako i na koži ova skupina lipida ima zaštitnu ulogu koja proizlazi iz njihove visoke otpornosti na hidrolizu, oksidaciju i visoke temperature, svojstva koja ih čine izdržljivijima od primjerice triglicerida. Iz tog razloga oni su važan izvor zaštite kože od dehidracije, a uz to djeluju i kao lubrikanti.



Slika 20. Strukturni prikaz svih skupina lipida prisutnih u sebumu (preuzeto i prilagođeno prema Pappas, 2009).

## Skvalen

Skvalen je po svojoj građi nezasićeni triterpen nastao povezivanjem šest izoprenskih jedinica i kao takav je prekursor lanosterola i u konačnici kolesterola, a zanimljivo je njegovo nakupljanje u sebumu gdje mu je maseni udio visokih 12%, za razliku od kolesterola koji čini svega 2%. Važan je zbog činjenice da je snažan prirodni lubrikant te zbog svog antioksidativnog djelovanja koje

proizlazi iz njegovih strukturnih karakteristika. Iz tog razloga smatra se da bi mogao imati potencijalnu ulogu u zaštiti kože od UV zračenja (Jia i sur., 2017).

### **Slobodne masne kiseline**

Udio masnih kiselina u sebumu je procjenjen na 10% iako se mogu naći u rasponu od svega 5 pa do 40%. Njihov udio i sastav uvelike ovisi i o sastavu bakterijske flore koja ih također stvara hidrolizom triglicerida i drugim karakterističnim kemijskim reakcijama. Najzastupljenija od svih je sapienska kiselina (C16:1 $\Delta^6$ ), s udjelom od oko 40%, koja je specifična za sebum i ne može se naći ni na kojem drugom mjestu u ljudskom organizmu, a ne dobiva se ni prehranom. Uz sapiensku, dokazan je i visok udio masnih kiselina C14:0, C16:0 i C18:1 $\Delta^6$  s ukupnim udjelom od oko 45% (Akaza i sur., 2014). U sebacealnim žlijezdama dolazi i do jedinstvene sintetske reakcije te iz sapienske kiseline nastaje sebaleinska kiselina (C18:2 $\Delta^{5,8}$ ) (Pappas, 2009).

Poznato je da sastav i količina sebuma utječu na funkciju kože pri čemu njegov nedostatak dovodi do dehidracije i suhoće kože, pojave bora itd., dok je pak njegovo pretjerano stvaranje uslijed hormonskog disbalansa glavna podloga u patogenezi akni. Iz tog razloga i lipidi koji grade sebum trebaju biti uzeti u obzir pri oblikovanju kozmetičkih proizvoda čija uloga je obnavljanje funkcije bolesne i oštećene kože.

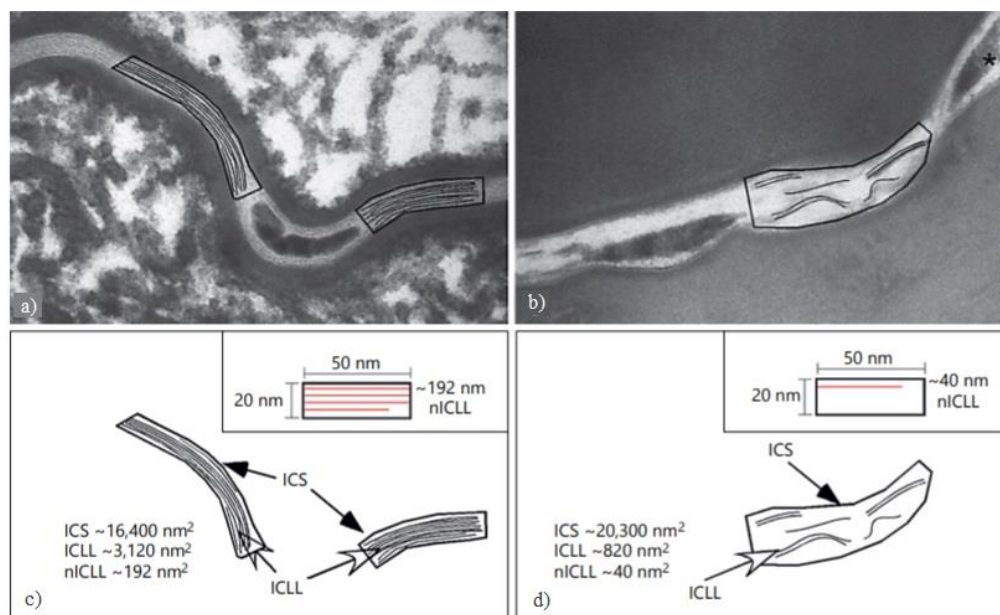
### **Istraživanje utjecaja topikalno primijenjenih lipida na obnovu kože**

Lipbarvis® metodom uzorkovanja i analiziranja lamelarne organizacije *stratum corneum*, znanstvenici iz Švicarske uspjeli su vizualno pratiti razlike u lipidnoj organizaciji kod različitih starosnih skupina i prema statusu kože. Provedena su mjerenja ukupne duljine lamela u nanometrima na određenom promatranom području (engl. intercellular lipid lamellae, ICLL) koja su zatim normalizirana na površinu od 1000 nm<sup>2</sup> (engl. normalised ICLL, nICLL) kako bi se rezultati mogli uspoređivati (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz rezultata praćenja prosječne duljine lipidnih lamela Lipbarvis® metodom koje su proveli Dähnardt i suradnici (2018).

| <i>STAROST (god)</i> | <i>ZDRAVA KOŽA<br/>(nICLL), nm</i> | <i>SUHA KOŽA<br/>(nICLL), nm</i> | <i>ATOPIČNA KOŽA<br/>(nICLL), nm</i> |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 2-15                 | ≈ 195                              | ≈ 100                            | ≈ 50                                 |
| 20-50                | ≈ 200                              | ≈ 90                             | ≈ 40                                 |
| >70                  | /                                  | ≈ 85                             | /                                    |

Istraživanje pokazuje kako narušen sastav lipida smanjuje obujam lamelarne organizacije lipida i gustoću njihovog pakiranja (Slika 21). Nadalje, isti tim stručnjaka dokazao je da primjena pažljivo oblikovanih topikalnih pripravaka može dovesti do značajnog poboljšanja funkcije kožne barijere kroz provedenu placebo kontroliranu, randomiziranu studiju. Na SLS (natrijev lauril sulfat) tretiranu kožu dva puta dnevno, kroz 21 dan, primijenjen je emolijent koji sadrži vodu, ureu, deciloleat, butan, pantenol, cetilni alkohol, glicerol, propan, skvalan, ceramid 3, alantoin, karite maslac, sorbitol, gliceride palme, stearinsku kiselinu, gliceril stearat, trigliceride, hidrogenirani lecitin itd. te je praćena nICLL vrijednost drugi dan te nakon 15, 22 i 29 dana. U grupi na kojoj je korišten emolijent nICLL vrijednost se vratila na normalnu (≈ 200 nm) nakon 15 dana i ostala trajna, dok je kod netretirane grupe zabilježen značajno usporen povratak funkcije kože te se nICLL vrijednost povećala do ≈ 125 nm nakon 22 dana. Također, nakon studije praćen je i povratak lipidnog sastava kože na normalne vrijednosti i najznačajniji je bio za kolesterol (Dähnardt i sur., 2018).



Slika 21. Prikaz intercelularnih lamela dobiven transmisijom elektronskom mikroskopijom nakon analize Lipbarvis® metodom. A) lamelarna organizacija kod zdrave kože, B) lamelarna organizacija kod bolesne kože. C) i D) predstavljaju pojednostavljene prikaze i dobivene računске rezultate za ICLL i nICLL, dok ICS predstavlja ukupnu površinu označenog međustaničnog prostora u  $\text{nm}^2$  (engl. intercellular space) (preuzeto i prilagođeno prema Dähnardt i sur., 2018).

Tablica 7. Kozmetički proizvodi s esterima glicerola, voštanim esterima i/ili skvalanom dostupni u ljekarnama na području RH.

| <i>Proizvođač</i>            | <i>Ime proizvoda</i> | <i>Vrsta lipida</i>                                    | <i>Namjena</i>                    |
|------------------------------|----------------------|--|-----------------------------------|
| <b><i>La Roche-Posay</i></b> | CICAPLAST Baume B5   | tristearin, karite maslac (trigliceridi)               | smirivanje i obnova oštećene kože |
| <b><i>La Roche-Posay</i></b> | CICAPLAST Levres     | kaprilik/kaprik triglicerid, shea maslac               | njega ispucalih usnica            |
| <b><i>La Roche-Posay</i></b> | CICAPLAST Mains      | karite maslac, gliceril stearat (tri- i monogliceridi) | njega suhe kože ruku              |

|                       |                              |  |  |
|-----------------------|------------------------------|--|--|
| <i>La Roche-Posay</i> | HYDRAPHASE Intense Legere    | gliceril stearat   | intenzivna rehidratantna njega         |
| <i>La Roche-Posay</i> | HYDRAPHASE Intense Riche     | karite maslac, gliceril-linoleate, stearat, linolenat, oleat (monogliceridi) | intenzivna rehidratantna njega         |
| <i>La Roche-Posay</i> | HYDREANE Riche               | gliceril stearat, kaprilik/kaprik/sukcinik triglicerid, karite maslac        | njega osjetljive suhe kože             |
| <i>La Roche-Posay</i> | LIPIKAR Baume AP+M           | karite maslac, gliceril stearat  | njega iznimno suhe kože sklone atopiji |
| <i>La Roche-Posay</i> | TOLERIANE Ultra              | skvalan, karite maslac, gliceril stearat                                     | njega suhe kože lica                   |
| <i>La Roche-Posay</i> | TOLERIANE Sensitive Riche    | skvalan, karite maslac   | njega suhe kože lica                   |
| <i>Eucerin</i>        | AtopiControl Akut krema      | triizostearin, kaprik/kaprilik triglicerid                                   | njega atopične kože                    |
| <i>Eucerin</i>        | UltraSensitive soothing care | skvalan  | rehidratacija suhe kože                |
| <i>Avene</i>          | Cicalfate Repair cream       | cera alba (voštani esteri), kaprik/kaprilik triglicerid                      | ubrzana obnova oštećene kože           |
| <i>Dr. Wolff</i>      | Linola® Fett krema           | decil oleat, ulje kikirikija, ulje suncokreta                                | obnova kože s atopijom                 |
| <i>Ducray</i>         | DEXYANE MeD                  | cera alba, kaprik triglicerid, karite maslac                                 | umirujuća njega kože s ekscemima       |

|                        |                 |   |  |
|------------------------|-----------------|---|--|
| <b><i>Bioderma</i></b> | Atoderm Xereane | karite maslac, skvalan                    | njega kože isušene<br>tretmanima ili bolešću |
| <b><i>Bayer</i></b>    | Bepanthol® body | cetearil etilheksanoat<br>(voštani ester) | njega i vlaženje vrlo<br>suhe kože           |

## 5. ZAKLJUČCI

Istraživanja pokazuju kako je za oblikovanje kvalitetnih topikalnih pripravaka za njegu oboljele/oštećene kože uz samu primjenu fiziološki prisutnih lipidnih komponenti nužno pažljivo određivanje njihovog međusobnog omjera. U protivnom, ne postiže se zadovoljavajuće ubrzanje procesa oporavka kožne barijere niti se značajno nadoknađuju funkcionalni lipidi kože. Funkcionalne lipidne komponente široko su zastupljene u kozmetičkim proizvodima dostupnim na tržištu, no pitanje je učinkovitosti njihovog djelovanja s obzirom da se u malom broju pripravaka nalaze svi potrebni lipidi. Iz tog razloga je potrebno provesti daljnja istraživanja koja bi pokazala koji su kozmetički proizvodi doista relevantni, odnosno koje bi se moglo neupitno preporučavati pacijentima s različitim vrstama kožnih oboljenja.



## 6. LITERATURA

Akaza N, Akamatsu H, Numata S, Matsusue M, Mashima Y, Miyawaki M, Yamada S, Yagami A, Nakata S, Matsunaga K. Fatty acid compositions of triglycerides and free fatty acids in sebum depend on amount of triglycerides, and do not differ in presence or absence of acne vulgaris. *J Dermatol*, 2014, 41, 1069-1076.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Preveli sa engleskog jezika Đurašević IW, Jernej B, Kućan Ž. Zagreb, Školska knjiga, 2013, 331, 748-749.

Bouwstra A, Dubbelaar FER, Gooris GS, Ponc M. The Lipid Organisation in the Skin Barrier. *Acta Derm Venereol*, 2000, 80, 23-30.

Bouwstra J, Gooris G, Ponc M. The Lipid Organisation of the Skin Barrier: Liquid and Crystalline Domains Coexist in Lamellar Phases. *J Biol Phys*, 2002, 28, 211-223.

Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*, 2003, 42, 1-36.

Caspers PJ, Bruining HA, Puppels GJ, Lucassen GW, Carter EA. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles. *J Invest Dermatol*, 2001, 116, 434-442.

Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, AN S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med*, 2016, 38, 16-22.

Champagne AM, Pigg VA, Allen HC, Williams JB. Presence and persistence of a highly ordered lipid phase state in the avian stratum corneum. *J Exp Biol*, 2018, 221, jeb176438.

Choi MJ, Maibach HI. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am J Clin Dermatol*, 2005, 6, 215-223.

Dähnhardt D, Surber C, Dähnhardt-Pfeiffer S. Influence of Topical Formulations: Lipid Lamella Organization and Lipid Composition of Stratum Corneum as a Surrogate Marker for Barrier Integrity. *Curr Probl Dermatol*, 2018, 166-172.

Del Regno A, Notman R. Permeation pathways through lateral domains in model membranes of skin lipids. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20, 2162-2174.

Den Hollander L, Han H, de Winter M, Svensson L, Masich S, Daneholt B, Norlen L. Skin Lamellar Bodies are not Discrete Vesicles but Part of a Tubuloreticular Network. *Acta Derm Venereol*, 2015, 96.

Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res*, 1992, 33, 301-313.

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq Q. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res*, 2013, 1833, 3471-3480.

Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergol Int*, 2017, 67, 3-11.

Elias PM, Wakefield JS. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 134, 781-791.

Elias PM, Williams ML, Choi EH, Feingold KR. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol L*, 2014, 1841, 353-361.

Freeman SC, Sonthalia S. Histology, Keratohyalin Granules. StatPearls [Internet], 2019.

Groen D, Poole DS, Gooris GS, Bouwstra JA. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function?. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*, 2011, 1808, 1529-1537.

Guzman-Alonso M, Cortazar TM. Water content at different skin depths and the influence of moisturizing formulations. *HPC Today*, 2016, 11.

Hanada K. Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2010, 86, 426-437.

Hill JR, Wertz PW. Molecular models of the intercellular lipid lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*, 2003, 1616, 121-126.

Howe GA, Addison CL.  $\beta$ 1 integrin. *Cell Adh Migr*, 2012, 6, 71-77.

Ishida-Yamamoto A, Igawa S. The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res*, 2014, 360, 477-482.

Iwai I, Han HM, den Hollander L, Svensson S, Öfverstedt LG, Anwar J, Brewer J, Bloksgaard M, Laloëuf A, Nosek D, Masich S, Bagatolli LA, Skoglund U, Norlén L. The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *J Invest Dermatol*, 2012, 132, 2215-2225.

Jennings R, Premanandan C. *Veterinary Histology*. Ohio State, Ohio State University Libraries, 2017, 88-89.

Jia Y, Gan Y, He C, Chen Z, Zhou C. The mechanism of skin lipids influencing skin status. *J Dermatol Sci*, 2017, 89, 112-119.

Jonca N, Leclerc EA, Caubet C, Simon M, Guerrin M, Serre G. Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *Eur J Dermatol*, 2011, 21, 35-42.

Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*, 2001, 114, 3069-3070.

Landmann L. Epidermal Permeability Barrier: Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J Invest Dermatol*, 1986, 87, 202-209.

Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Med J*, 2006, 47, 293.

Lopez O, Cocera M, Wertz PW, Lopez-Iglesias C, de la Maza A. New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*, 2007, 1768, 521-529.

Lu X, Lane EB. Retrovirus mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: Specific domain functions in keratin stabilisation and filament formation. *Cell*, 1990, 62, 681-696.

Maury E, Prevost MC, Simon MF, Chap H, Redoules D, Ceruti I, Tarroux R, Charveron M. Identification of Two Secreted Phospholipases A2 in Human Epidermis. *J Invest Dermatol*, 2000, 114, 960-966.

Mojumdar EH, Gooris GS, Bouwstra JA. Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization. *Soft Matter*, 2015, 11, 4326-4336.

Mojumdar EH, Groen D, Gooris GS, Barlow DJ, Lawrence MJ, Deme B, Bouwstra JA. Localization of Cholesterol and Fatty Acid in a Model Lipid Membrane: A Neutron Diffraction Approach. *Biophys J*, 2013, 105, 911-918.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 2008, 129, 705-733.

Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1993, 1182, 147-151.

Norlen L. Skin Barrier Formation: The Membrane Folding Model. *J Invest Dermatol*, 2001, 117, 823-829.

Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol*, 2009, 1, 72-76.

Picardo M, Ottaviani M, Camera E, Mastrofrancesco A. Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol*, 2009, 1, 68-71.

Proksch E, Folster-Holst R, Jensen J-M. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*, 2006, 43, 159-169.

Raknerud N. The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr/hr) mouse III. Desmosomal transformation during keratinization. *J Ultrastruct Res*, 1975, 52, 32-51.

Sastry S, Horwitz A. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993, 5, 819-831.

Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12, 565-580.

Strott CA, Higashi Y. Cholesterol sulfate in human physiology. *J Lipid Res*, 2003, 44, 1268-1278.

Swartzendruber DC, Wertz PW, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. Molecular models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum. *J Invest Dermatol*, 1989, 92, 251-257.

Školova B, Janušova B, Zbytovska J, Gooris G, Bouwstra J, Slepíčka P, Berka P, Roh J, Palat K, Hrabalek A, Vavrova K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir*, 2013, 29, 15624-15633.

t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, Sandra K. Profiling and Characterizing Skin Ceramides Using Reversed-Phase Liquid Chromatography – Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 2011, 84, 403-411.

Uche LE, Gooris GS, Beddoes CM, Bouwstra JA. New insight into phase behaviour and permeability of skin lipid models based on sphingosine and phytosphingosine ceramides. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes*, 2019, 1861, 1317-1328.

Uche LE, Gooris GS, Bouwstra J, Beddoes CM. Barrier capability of skin lipid models: Effect of ceramides and free fatty acid composition. *Langmuir*, Just Accepted Manuscript, 2019.

Van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Curr Probl Dermatol*, 2016, 8-26.

Vavrova K, Kovačik A, Opalka L. Ceramides in the skin barrier. *Eur Pharm J*, 2017, 64, 28-35.

Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130, 21-54.

Wertz P. Epidermal Lamellar Granules. *Skin Pharmacol Phys*, 2018, 31, 262-268.

Yamanishi H, Soma T, Kishimoto J, Hibino T, Ishida-Yamamoto A. Marked Changes in Lamellar Granule and Trans-Golgi Network Structure Occur during Epidermal Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol*, 2019, 139, 352-359.

Zettersten EM, Ghadially R, Feingold KR, Crumrine D, Elias PM. Optimal ratios of topical stratum corneum lipids improve barrier recovery in chronologically aged skin. *J Am Acad Dermatol*, 1997, 37, 403-408.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Cilj diplomskog rada je opisati trenutno relevantne činjenice o cjelokupnom razvoju i organizaciji zdrave i funkcionalne kožne barijere. Rad je strukturiran na način da su prvo izložene osnovne činjenice o diferencijaciji keratinocita, odnosno procesu nastanka funkcionalnih korneocita, a zatim su kategorizirane sve informacije o građi intercelularnog prostora *stratum corneum* i kožnoj homeostazi prema glavnim lipidnim skupinama. Konačno, radu su pridodani i tablični prikazi kozmetičkih proizvoda dostupnih u ljekarnama koji u svom sastavu imaju jednu ili više vrsta lipida iz glavnih skupina, a čija namjena je obnova kožne barijere i ublažavanje karakterističnih tegoba poput svrbeža, crvenila, ljuštenja i zatezanja s kojima se svakodnevno susreću osobe koje pate od različitih kožnih bolesti.

The main goal of this diploma thesis is to describe currently relevant facts concerning development and organisation of healthy and fully-functional skin barrier. This thesis is conceptualized in a way that the main information regarding keratinocyte differentiation (the process of formation of functional corneocytes) is stated first, followed by information about the structure of *stratum corneum* intercellular space and skin homeostasis categorized by the main lipid groups. Finally, added tables present lists of commercially available cosmeceuticals which contain one or more lipid species from the main lipid groups and whose main purpose is to renew damaged skin barrier and reduce signs of commonly present problems like itchyness, redness, scaling and tightness which people struggling with various skin diseases are faced with in their daily life.