

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



**VÝVOJ A VALIDACE MODELU KORNEOCYTÁRNÍ
LIPIDOVÉ OBÁLKY *IN VITRO* II**
(Corneocyte lipid envelope in vitro model development and validation II)

Diplomová práce

Táňa Ryantová
V Hradci Králové 2024

Vedoucí práce: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

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

V Hradci Králové 2024

Táňa Ryantová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Anně Paraskevopoulou, Ph.D. za odborné a cenné rady, podporu a vstřícný přístup při vedení této diplomové práce.

Poděkování také patří prof. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. a ostatním členům *Skin Barrier Research Group* za vytvoření příjemného pracovního prostředí při vykonávání experimentální části. Ráda bych také poděkovala PharmDr. Petře Svačinové, Ph.D. za měření na AFM a doc. PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za měření IR spekter.

Tato studie proběhla za finanční podpory Grantové agentury ČR prostřednictvím projektu 22-20839K.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Autor: Táňa Ryantová

Název diplomové práce: Vývoj a validace modelu korneocytární lipidové obálky *in vitro*
II

Nejvzdálenější vrstva kůže, *stratum corneum* (SC), tvoří bariéru mezi lidským organismem a vnějším prostředím. SC zabráňuje vstupu látek a bakterií do těla a pomáhá udržovat pokožku hydratovanou. Tato vrstva se skládá z několika vrstev korneocytů (KC) obklopených proteinovým obalem. Na povrch proteinového obalu je kovalentně navázána vrstva lipidů, nazývaná korneocytární lipidová obálka (CLE). Vzhledem k tomu, že znalosti o roli CLE nejsou úplné, cílem práce bylo studovat vliv CLE na lipidové uspořádání. Nejprve byly korneocyty izolovány z SC pufrem obsahujícím surfaktant N, N-dodecyldimethylaminoxid při 40-50 °C po dobu 72 hodin. Suspenze buněk byla zfiltrována přes 0,45 µm filtry a dvakrát promyta mycím pufrem bez povrchově aktivní látky a odstředěna. Byla získána velká viditelná peleta korneocytů. Buňky byly spočítány pomocí hemacytometru s Neubauerovou komůrkou a infračervená spektroskopie vysušené pelety potvrdila nepřítomnost zbytků surfaktantu. Poté byly na vodní subfázi vytvořeny a charakterizovány monovrstvy obsahující izolované lidské lipidy a korneocyty. Nakonec byly monovrstvy přeneseny na pevný podklad a vizualizovány mikroskopií atomárních sil (AFM). Závěrem lze říci, že přidání CLE způsobilo zvýšení fluidity lipidů, což vedlo ke zlepšení elasticity monovrstvy. To může také zlepšit schopnost lipidů organizovat se do více vrstev, jak bylo pozorováno pomocí AFM.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Author: Táňa Ryantová

Title of the thesis: Corneocyte lipid envelope *in vitro* model development and validation II

The outermost layer of the skin, the stratum corneum (SC), forms a barrier between the human organism and the external environment. SC prevents the entry of external substances and bacteria into the body and helps keep the skin hydrated. This layer consists of several layers of corneocytes surrounded by a protein envelope. To the surface of the protein envelope is covalently bound a layer of lipids, called the corneocyte lipid envelope (CLE). Since the knowledge of the CLE role is not complete, the aim of the work was to study the effect of CLE on lipid arrangement. At first, corneocytes were isolated from SC by buffer containing a surfactant N,N-dodecyldimethylamine oxide at 40-50°C for 72 hours. The cell suspension was filtered through 0,45 µm filters and washed twice with a surfactant-free washing buffer and centrifugation. a large visible pellet of corneocytes was obtained. Cells were counted using a hemacytometer with Neubauer chamber and infrared spectroscopy of the dried pellet confirmed the absence of surfactant residues. Afterwards, monolayers containing isolated human lipids and corneocytes were formed on water subphase and characterized. Finally, monolayers were transferred to a solid surface and visualised by atomic force microscopy (AFM). To conclude, the addition of CLE caused an increase in the fluidity of the lipids, leading to an improvement in the elasticity of the monolayer. This may also improve the ability of lipids to organize into multilayers, as observed by AFM.

Obsah

Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod a cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1. Lidská kůže, její funkce a stavba	10
3.1.1. Hypodermis.....	11
3.1.2. Dermis.....	11
3.1.3. Epidermis	11
3.2. Rohová vrstva kůže – <i>Stratum corneum</i>	13
3.2.1. Korneocytární lipidová obálka (CLE).....	14
3.2.2. Lipidová matrix rohové vrstvy kůže	15
3.2.3. Cholesterol	15
3.2.4. Volné mastné kyseliny.....	16
3.2.5. Ceramidy.....	16
3.2.6. Uspořádání lipidové matrix SC	19
3.3. Langmuirovy monovrstvy na rozhraní kapalina-vzduch.....	21
3.3.1. Langmuirovy izotermy	22
3.4. Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladě	24
3.4.1. Atomová silová mikroskopie (AFM).....	25
4. Experimentální část	26
4.1. Chemikálie a materiál.....	26
4.2. Přístrojové vybavení.....	26
4.3. Izolace <i>stratum corneum</i> z lidské kůže.....	27
4.3.1. Extrakce volných lipidů ze SC	28
4.4. Izolace korneocytů	29
4.4.1. Příprava pufrů	29
4.4.2. Izolace KC	30
4.4.3. Filtrace	30

4.4.4.	Čištění KC.....	30
4.5.	Metody hodnocení korneocytů (KC).....	31
4.5.1.	Optická mikroskopie.....	31
4.5.2.	Infračervená spektroskopie.....	32
4.6.	Příprava modelu korneocytární lipidové obálky (CLE).....	33
4.6.1.	Příprava lipidových vzorků.....	33
4.6.2.	Příprava acetátového pufru.....	33
4.6.3.	Langmuirovy monovrstvy na rozhraní kapalina-vzduch.....	33
4.6.4.	Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladě.....	35
4.7.	Zpracování výsledků.....	35
5.	Výsledky a diskuze.....	36
5.1.	Extrakce SC.....	36
5.1.1.	Čištění KC pomocí centrifugace.....	36
5.2.	Hodnocení KC.....	37
5.2.1.	Optická mikroskopie.....	37
5.3.	Příprava modelu - Langmuirovy monovrstvy.....	39
5.3.1.	Langmuirovy izotermy.....	39
5.3.2.	Plocha jedné molekuly.....	40
5.3.3.	Modul kompresibility.....	41
5.3.4.	AFM.....	42
6.	Závěr.....	44
7.	Reference.....	45

1. Seznam zkratek

AFM	Mikroskopie atomárních sil
Cer	Ceramid(y)
C(L)E	Korneocytární (lipidová) obálka (angl. <i>corneocyte (lipid) envelope</i>)
C _{max}	Modul kompresibility (angl. <i>Compression modulus</i>)
DDAO	N,N-dodecyldimethylamin oxid
DDT	Dithiotreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
Chol	Cholesterol
IR	Infračervená spektroskopie
KC	Korneocyt(y)
LPP	Dlouhá lamelární fáze (angl. <i>Long Periodicity Phase</i>)
MMA	Plocha jedné molekuly (angl. <i>Molecular Area</i>)
PBS	Fosfátový pufr
SC	Rohová vrstva (lat. <i>Stratum corneum</i>)
SP	Povrchový tlak (angl. <i>Surface Pressure</i>).
SPP	Krátká lamelární fáze (angl. <i>Short Periodicity Phase</i>)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VMK	Volné mastné kyseliny

2. Úvod a cíl práce

Nejsvrchnější vrstvou lidské kůže je *stratum corneum* (SC, rohová vrstva). Jedná se o bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím lidského těla, která zabraňuje pronikání toxinů a bakterií do těla. Pomáhá také zabránit odpařování vlhkosti do atmosféry, což udržuje pokožku hydratovanou. Tvoří tedy primární mechanickou bariéru lidského těla.

Rohová vrstva se skládá z několika vrstev korneocytů (KC), které jsou bez jader a jsou obklopeny proteinovým obalem. Na tento obal je kovalentně navázána vrstva lipidů, tzv. korneocytární lipidová obálka (CLE, *corneocyte lipid envelope*).

KC jsou dále obklopeny ekvimolární směsí volných lipidů (ceramidy, cholesterol, mastné kyseliny). Toto uspořádání je klíčové pro bariérové vlastnosti lidské kůže.

Doposud ale není objasněno, jakou roli hraje CLE v soudržnosti této vrstvy. Není jasné, zda dochází k interakcím mezi CLE a volnými lipidy, které by umožňovaly pevné uspořádání těchto lipidů či se jedná pouze o inertní vrstvu. Proto bylo cílem této práce vyvinout a validovat model CLE, který by umožnil sledování interakce CLE s kožními lipidy.

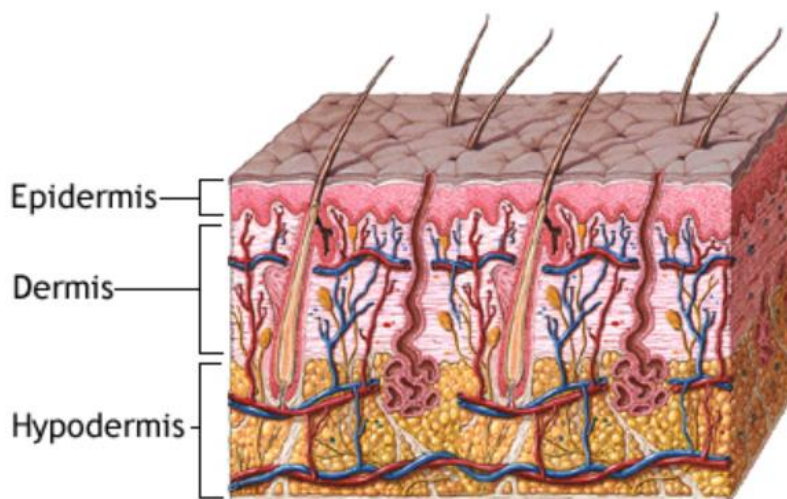
3. Teoretická část

3.1. Lidská kůže, její funkce a stavba

Kůže (*cutis, derma*) je rozsáhlý orgán lidského těla, který tvoří zevní povrch organismu, a tím tedy i bariéru vůči okolí. U dospělého člověka zaujímá plochu přibližně 2 m². Průměrná tloušťka kůže činí 0,5 - 4 mm a hmotnost je přibližně 4 kg.¹

Poskytuje mechanickou bariéru proti vnějším vlivům (chemickým, fyzikálním a mikrobiálním) a působí jako ochrana proti bakteriím a virům. Kůže ochraňuje lidský organismus před ztrátou důležitých látek zevnitř z organismu. Dále hraje klíčovou roli v udržování optimální hladiny vody a mezi další neméně důležité funkce patří regulace tělesné teploty (tzv. termoregulace).^{1,5,9}

Kůže se skládá ze třech hlavních vrstev. Nejsvrchnější částí je *epidermis* (pokožka), pod ní se nachází *dermis* (škára) a nejspodnější částí je *hypodermis* (podkožní vazivo),² viz Obrázek 1.



Obr. 1 Stavba kůže. Na obrázku jsou znázorněny všechny tři vrstvy kůže – *epidermis*, *dermis*, *hypodermis* (převzato z *medlineplus.gov*).⁶

3.1.1. Hypodermis

Představuje spodní vrstvu kůže, která umožňuje spojení kůže s vazivovým povrchem kostí a svalů. V podkožním vazivu je značné množství tukových buněk, které zastupují izolační funkci, díky které ochraňují organismus před ztrátami tepla a také tvoří významnou energetickou rezervu.^{1,3,4}

3.1.2. Dermis

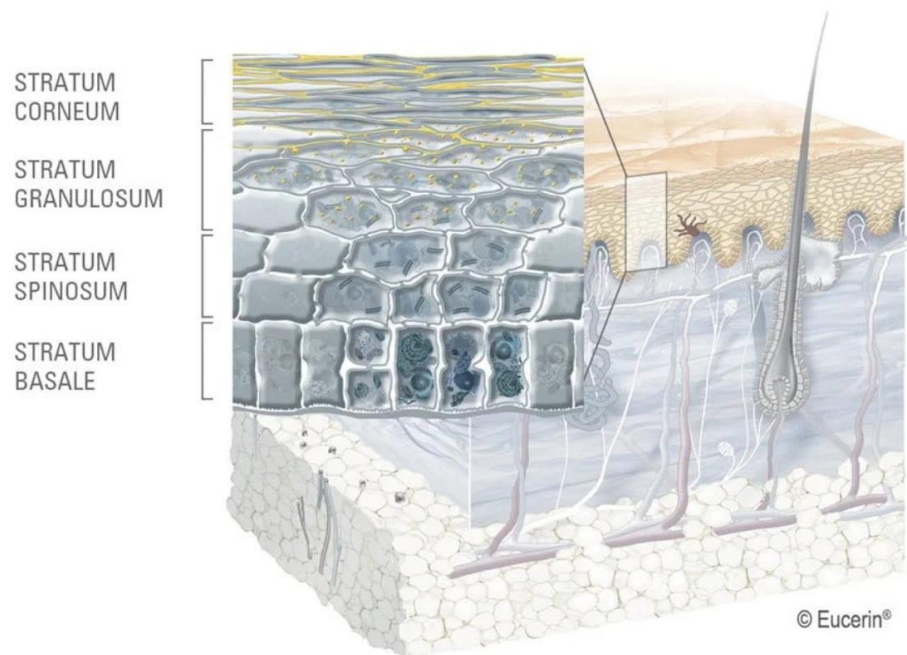
Jedná se o střední vrstvu kůže, která se skládá z kolagenních a elastických vláken, které jsou propletené a zajišťují jak pružnost, tak i pevnost. Tloušťka škůry je přibližně 0,5 – 2 mm. Objevují se zde lymfatické a krevní cévy, receptory smyslového vnímání a receptory nervového zakončení. Mimo jiné také potní a mazové žlázy nebo dokonce i vlasové kořínky.^{1,3,4}

3.1.3. Epidermis

Epidermis je povrchovou vrstvou kůže, která je nepropustná pro vodu a představuje hlavní bariéru lidského těla. V této vrstvě se nachází několik typů buněk a nejvíce zastoupenými jsou kožní buňky keratinocyty. Dále se zde vyskytují Langerhansovy buňky významné pro imunitní funkci a pigmentové buňky melanocyty. *Epidermis* je tvořena vícevrstevným dlaždicovým epitelem, který na povrchu rohovatí.^{1,3,10}

Epidermis se dělí na čtyři základní vrstvy (Obrázek 2). Jednotlivé vrstvy klasifikujeme dle charakteristického stupně diferenciaci keratinocytů (tzv. keratinizace). Zespona se dělí na *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* a *stratum corneum* (SC). Nejspodnější vrstvu představuje *stratum basale*, kde se vytvářejí nové keratinocyty. Ty se v navazujících vrstvách diferencují (*stratum spinosum*), získávají typický oploštělý tvar a posouvají se směrem do zevních vrstev. Ve *stratum granulosum* dochází k pevnému spojení buněk, díky kterému je propustnost pro vodu oběma směry velmi malá. V nejsvrchnější vrstvě *stratum corneum* jsou buňky už úplně zploštělé a bezjaderné. Tyto buňky se nazývají korneocyty.^{1,3,4} *Stratum basale*, *stratum spinosum* a *stratum granulosum* jsou součástí životaschopné *epidermis* (tloušťka

50-100 μm) a SC (tloušťka 10-20 μm) je součástí neživotaschopné *epidermis* a je konečným produktem diferenciaci. ¹⁰

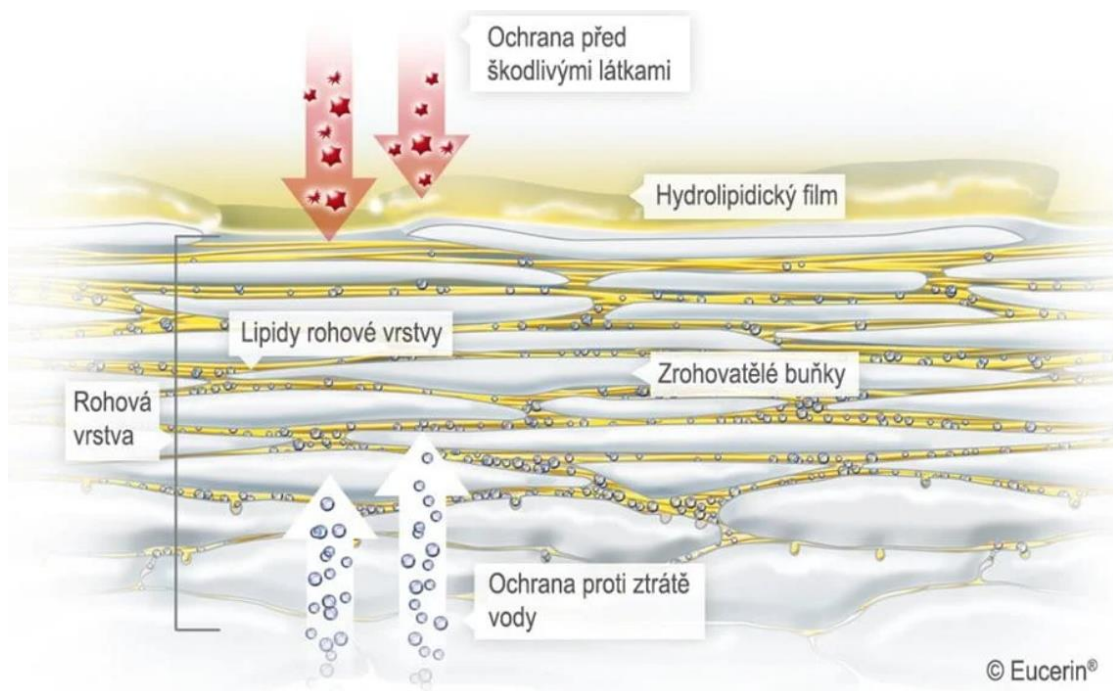


Obr. 2 Vyobrazení základních vrstev epidermis (převzato z *Eucerin.cz*).

3.2. Rohová vrstva kůže – *Stratum corneum*

Samotnou kožní bariéru tvoří nejsvrchnější vrstva epidermis, tedy *Stratum corneum* (SC) neboli rohová vrstva. SC je konečný produkt diferenceiace epidermálních buněk a je zodpovědná za bariérovou funkci.⁸

Rohová vrstva je tvořena z 18-21 vrstev odumřelých a zrohovatělých korneocytů (KC), které jsou obklopeny lipidovou matrix a tu představují volné a kovalentně vázané lipidy v intracelulárním prostoru. Tato struktura buněk a intracelulární hmoty ve SC je často nazývána „cihly a malta“, kde KC představují cihly a maltu představuje lipidová matrix v mezibuněčných prostorech. Toto celé připomíná postavenou zeď (Obrázek 3).^{8, 13, 14}

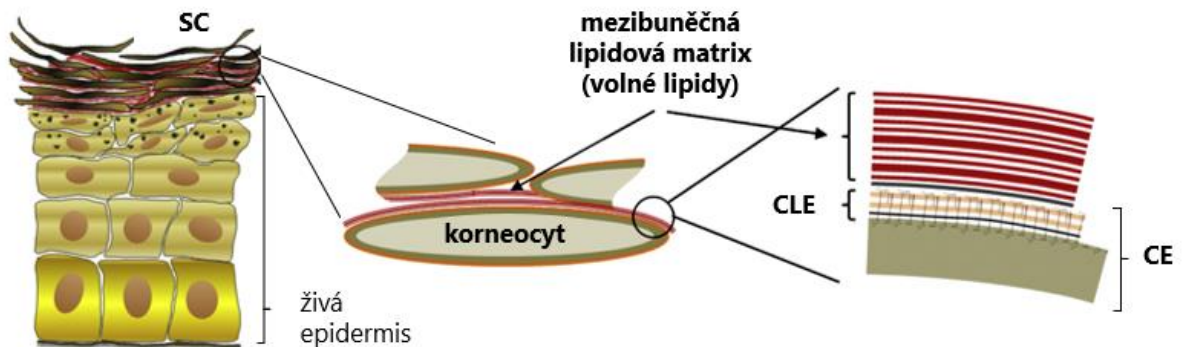


Obr. 3 Stavba SC. Struktura KC a lipidové matrix ve SC připomíná model „cihly a malta“ (převzato z Eucerin.cz).

3.2.1. Korneocytární lipidová obálka (CLE)

Součástí kožní bariéry je struktura mezi KC a extracelulární lipidovou matrix, která se nazývá korneocytární lipidová obálka (CLE), detailně popsáno na *Obrázku 4*. KC jsou obklopeny zrohovatěným obalem skládající se z vrstvy vysoce zesíťovaných nerozpustných proteinů, které jsou kovalentně vázány na vrstvu lipidů. Mezi tyto proteiny patří zejména lorikrin (zastoupený z 80–85 %) a involukrin (minoritní). Na glutamátové zbytky zmíněných proteinů se váží Cer přes ω -hydroxyskupiny, což vede k vytvoření pevného uspořádání důležitého jako základ lamelární struktury SC. Takto vzniklá monovrstva lipidů je označována jako lipidový obal. Předpokladem je, že tento obal tvoří základ pro tvorbu mezibuněčných lipidových vrstev.^{10, 12, 16, 17, 18}

Lipidový obal společně se zrohovatěným obalem umožňuje správnou tvorbu lipidové matrix. Nedostatečný lipidový obal by měl za následek narušenou funkci propustnosti kůže.¹⁰



Obr. 4 Znáznění korneocytární lipidové obálky (CLE).¹⁵ Obal na povrchu KC tvořen kovalentně navázanými lipidy.

3.2.2. Lipidová matrix rohové vrstvy kůže

Výsledné diferencované a odumřelé korneocyty ve SC jsou obklopeny lipidovou matrix, která vyplňuje mezibuněčné prostory SC. Na rozdíl od většiny biologických membrán se tato matrix nevyznačuje přítomností žádných fosfolipidů, ale skládá se z ekvimolárního poměru (přibližně 1:1:1) vysoce specializovaných lipidů, které jsou zde hlavními konstitutivními složkami. Mezi tyto lipidy patří ceramidy (Cer), cholesterol (Chol) a volné mastné kyseliny (VMK). V lipidové matrix jsou lipidy uspořádány do lamelárních struktur. Ekvimolární množství zmíněných lipidů je velmi důležité pro epidermální homeostázu a jakékoliv výkyvy z tohoto poměru mohou způsobit narušení kožní bariéry.^{12, 19}

3.2.3. Cholesterol

Cholesterol (Chol) je klíčovým steroidem v lidském SC, který je nezbytný pro správnou funkci kožní bariéry. Zastává významnou úlohu v rámci přispívání ke správnému lamelárnímu a laterálnímu uspořádání lipidů a zároveň je důležitý pro udržení jejich fluidity.¹²

Kromě Chol se zde v menší míře nachází jeho esterový derivát cholesterol-sulfát. Funkce esteru není doposud zcela objasněna, ale je vysoká pravděpodobnost, že přispívá k soudržnosti SC a reguluje tzv. deskvamaci.¹²

3.2.4. Volné mastné kyseliny

V SC se nacházejí především nasycené VMK s dlouhým a nerozvětveným uhlíkovým řetězcem. Délka jejich řetězce je obvykle 14-34 uhlíků. Nejhojněji se ve SC nachází mastné kyseliny s 24 uhlíky (kyselina lignocerová) a 26 uhlíky (kyselina cerotická). Tyto dva druhy tvoří přibližně 50 % hmotnosti z celkového množství VMK ve SC. Nenasycené krátké mastné kyseliny jsou zde přítomné pouze v minimálním množství, nicméně jejich koncentrace se zvyšuje při výskytu patologických stavů (např. atopická dermatitida). Ke zvýšení nejspíše dochází v důsledku nedostatku filaggrinu.¹²

Přítomnost VMK ve SC je důležitá, poněvadž se z části podílejí na tvorbě kyselého pH, které je potřeba pro správnou funkci lidské kožní bariéry. Jejich výskyt je významný pro bariérovou homeostázu, integritu a soudržnost SC.²²

3.2.5. Ceramidy

Ceramidy (Cer) jsou hlavní složkou lipidů ve SC a tvoří přibližně 50 % z celkové hmotnosti lipidové matrix. Hrají důležitou roli v udržování bariérové funkce kůže. Mimo to se podílí i na různých buněčných procesech, např. imunologické aktivity, transportní funkce, proliferace, diferenciaci a apoptóza buněk v epidermis.^{7, 11, 12, 23}

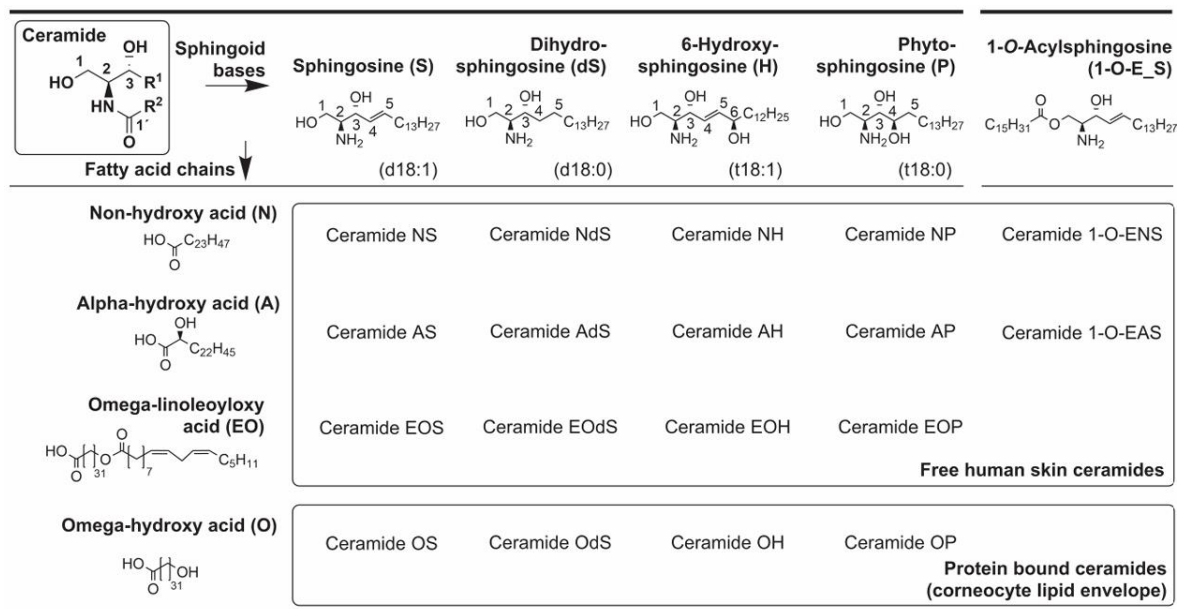
Jedná se o strukturně heterogenní a komplexní skupinu sfingolipidů. Cer typicky mají polární hlavu a dva hydrofobní uhlovodíkové řetězce. Polární hlava Cer je poměrně menší oproti fosfolipidům, tvořící běžné buněčné membrány. Díky tomu jsou lipidy v mnohem těsnějším uspořádání. Hydrofobní řetězce Cer jsou významně delší a vytvářejí multivrstvy. Jedná se o vzájemně propojené lamelární struktury. Vzhledem k těmto okolnostem je propustnost ceramidových lamel SC mnohonásobně nižší, než je tomu tak u fosfolipidových dvojvrstev.⁷

Základem molekuly Cer je sfingoidní báze a acylový řetězec mastné kyseliny. Sfingoidní báze je aminoalkohol o délce nejčastěji 18 uhlíků. Pro epidermis je specifický sfingosin (S), dihydrosfingosin (dS), fytosfingosin (P) nebo 6-hydroxysfingosin (H). Mezi novější objevené řadíme

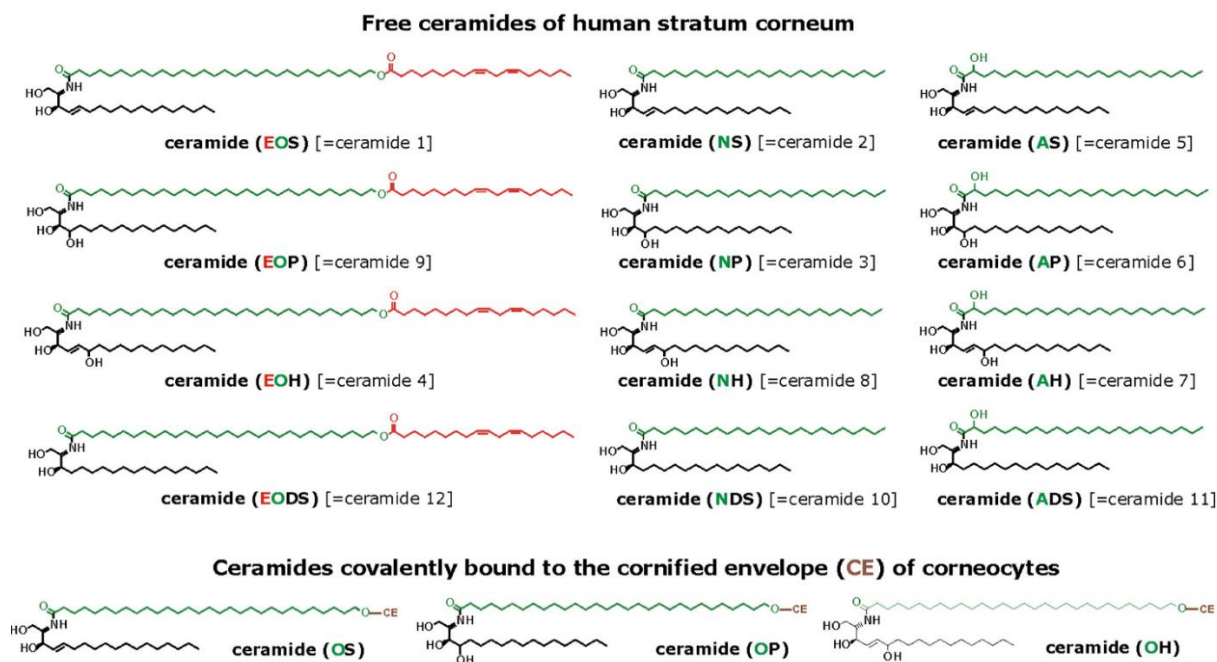
tetrahydroxylovanou sfingoidní bázi (T), která ale není plně strukturně popsána. Na primární aminoskupinu sfingoidní báze se přes amidovou vazbu váže mastná kyselina, která je nasycená, nerozvětvená a má dlouhý řetězec. U dlouhých řetězců mastných kyselin je jejich délka obvykle 24 uhlíků, zatímco u tzv. ultradlouhých Cer je to obvykle 30-32 uhlíků. Řetězec mastných kyselin v Cer může být buď bez substituce (N), nebo substituovaný hydroxylovou skupinou v poloze α (A) či ω (O). Na ω -hydroxylovou skupinu se dále může esterově vázat kyselina linolová (EO) anebo se tento hydroxyl může vázat na proteiny zrohovatěného obalu (CE), hlavně involucrin. Touto vazbou dochází ke vzniku tzv. korneocytární lipidové obálky (CLE).^{7, 11, 12, 20, 21}

V lidském SC bylo popsáno celkem 15 tříd Cer, které mají různou délku řetězce. Díky tomu může vzniknout velké množství odlišných struktur Cer. Pro lepší přehled bylo zavedeno pro pojmenování Cer názvosloví dle Motty, které je v současnosti u Cer běžně používané. Dle zmíněné nomenklatury je název Cer založen na principu kombinace písmen označující acyl mastné kyseliny (N, A, O nebo EO) a sfingoidní bázi (S, dS, P, H, T nebo 1-O-E_S).^{11, 24, 26} Přehled Cer a názvosloví je znázorněné na *Obrázcích 5 a 6*.

Pokud dojde ke snížení množství Cer ve SC, tak to vede ke ztrátám vody a k narušení bariérové funkce. To by dále způsobilo snížení ochrany proti bakteriím, a následkem může dojít ke kožním abnormalitám, jako je atopická dermatitida nebo psoriáza.^{21, 25}



Obr. 5 Rozdělení a názvosloví Cer v SC se strukturami sfingoidních bází a acylových řetězců.¹²



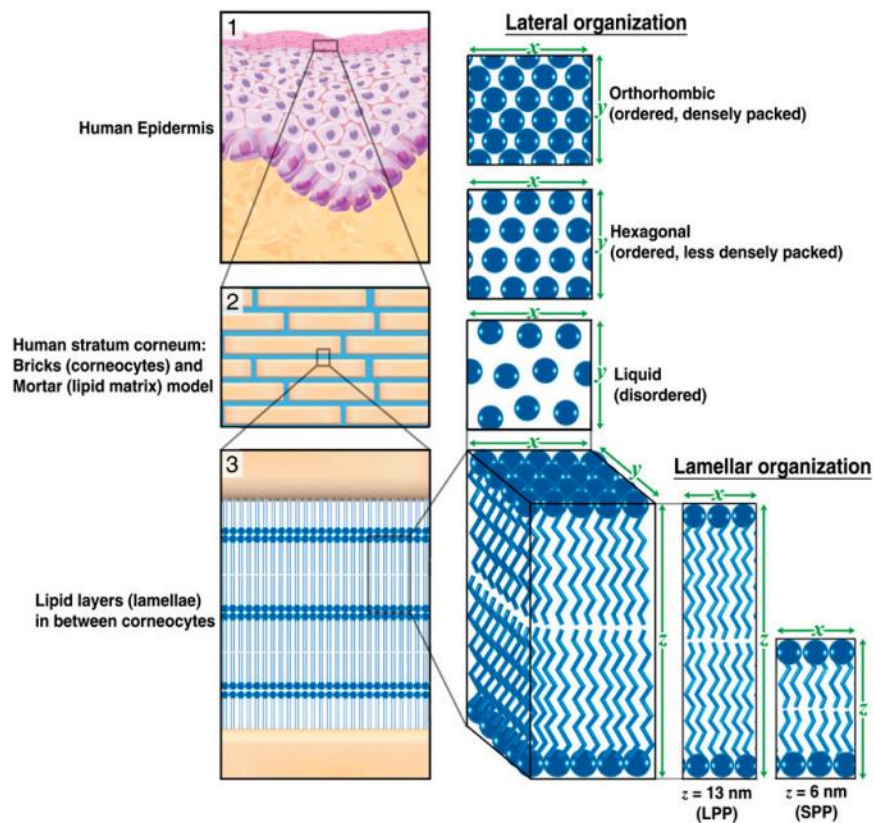
Obr. 6. Struktury volných a kovalentně vázaných Cer lidského SC.²⁴ Struktury jsou znázorněny v souladu s terminologií navrženou Mottou et al. Ceramidy jsou klasifikovány podle acylového řetězce (znázorněno zelenou barvou) a sfingoidní baze (znázorněno černou barvou).

3.2.6. Uspořádání lipidové matrix SC

Mezibuněčné lipidy ve SC charakteristicky vytvářejí lamely. Ty jsou uspořádané do dvojvrstev, ve kterých jsou lipidy orientovány tak, že svou hydrofobní částí směřují dovnitř a hydrofilní částí ven do vodného prostředí. Dvojvrstvy lipidů se skládají na sebe a vytváří multivrstevné lamelární struktury. Tyto struktury jsou přes ω -hydroxy skupinu Cer kovalentně navázány na proteinovou obálku KC, a tak vytváří již zmíněnou CLE. Lipidy mohou být v lamelárním nebo laterálním uspořádání.^{8, 10}

Lamely, do kterých se uspořádávají lipidy SC mohou být o různých délkách. Dle délky klasifikujeme dvě základní fáze – dlouhá lamelární fáze (LPP, angl. *long peridicity phase*) s opakující se vzdáleností ~13 nm a méně výrazná krátká lamelární fáze (SPP, angl. *short periodicity phase*) s opakující se vzdáleností ~6,3 nm. Zejména LPP je velmi důležitá pro bariérovou funkci SC a pro SC je esenciální.^{10, 28, 30} Zmíněné fáze jsou detekovány pomocí širokoúhlé rentgenové difrakce.²⁹

Laterální uspořádání popisuje uspořádání lipidů uvnitř lamely. Pomocí širokoúhlé rentgenové difrakce byly pozorovány tři typy konformací – orthorombické, hexagonální a kapalně-krystalické (Obrázek 7). Lipidové molekuly nejčastěji tvoří orthorombickou konformaci. Zde dochází k velmi těsnému uspořádání řetězců Cer a VMK, které jsou v *all-trans* konformaci a molekuly jsou tak v obdélníkové krystalické mřížce, která zabraňuje volné rotaci řetězců. Tato konformace převažuje u většiny lipidů SC a je podstatná pro správnou funkčnost kožní bariéry. O něco méně častější je konformace hexagonální, kde jsou lipidy uspořádané do méně těsné šestiúhelníkové mřížky, která poskytuje částečnou rotaci řetězců. Tato konformace se typicky vyskytuje více u pacientů s poruchami kožní bariéry. Kapalně-krystalická konformace se vyskytuje u velmi malé části lipidů a vytváří spíše nepravidelné uspořádání.^{12, 26,}

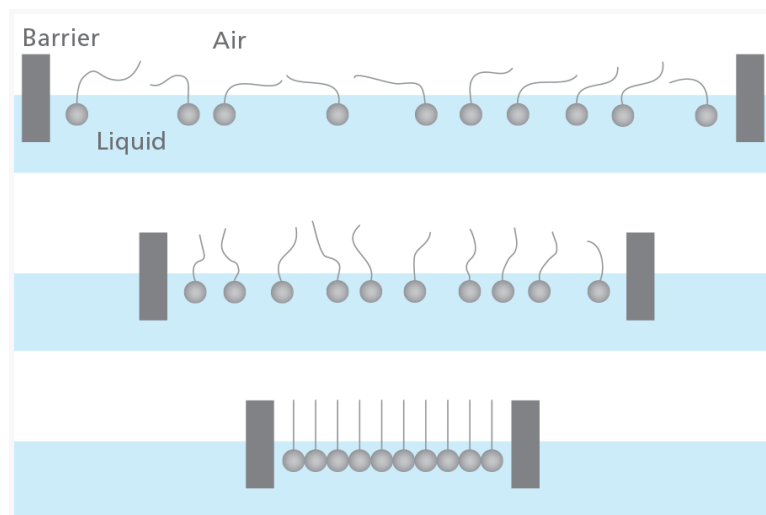


Obr. 7 Lamelární a laterální uspořádání lipidů v lidském SC.²⁷ Mezbuněčné lipidy jsou uspořádané do lamel, v lidském SC jsou lamely s dlouhou periodicitou (LPP, ~13 nm) a krátkou periodicitou (SPP, ~6 nm). Dále rozlišujeme laterální uspořádání molekul lipidů uvnitř lamely (orthorombické, hexagonální a kapalné uspořádání lipidů).

3.3. Langmuirovy monovrstvy na rozhraní kapalina-vzduch

Jedná se o metodu umožňující vytvoření vysoce kvalitních uspořádaných monovrstev. Metoda vede ke vzniku monovrstevného lipidového filmu tzv. Langmuirova monovrstva na rozhraní dvou fází: kapalina-vzduch. Kapalina je spodní polární fáze a vzduch je horní plynnou fází. Nerozpustnou monovrstvu mohou tvořit látky s amfifilním charakterem. Hydrofilní segment molekuly musí vykazovat dostatečnou afinitu k vodě a je orientován směrem k polární fázi (subfázi). Hydrofobní segment molekuly směřuje směrem od subfáze do plynné fáze.

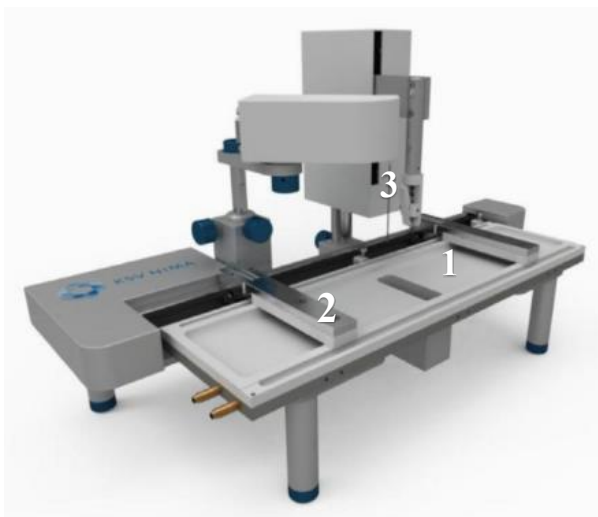
32, 33



Obr. 8 Langmuirova monovrstva (převzato z *Biolinscientific.com*).

Součástí zařízení určené k vytvoření monovrstvy (Obrázek 9) je mělká vanička vyrobená z hydrofobního materiálu (1), která je naplněna hydrofilní kapalinou, označovanou jako subfáze. Na povrch této kapaliny se aplikují amfifilní látky. Na okrajích vaničky jsou umístěné posuvné bariéry z hydrofilního materiálu (2), jejichž přibližováním o určité rychlosti do středu vaničky se monovrstva stlačuje. Bariéry jsou během měření ovládány pomocí softwaru. V důsledku komprese monovrstvy dochází ke změnám povrchového tlaku (SP, z angl. *Surface Pressure*). Tyto změny jsou sledovány pomocí senzoru, například platinovým plíškem, který je částečně ponořen do kapaliny. Teplota subfáze je udržována na předepsanou teplotu pomocí termostatu a měřena pomocí čidla, které je rovněž ponořeno do kapaliny. ³²,

34



Obr. 9 Přístroj pro přípravu Langmuirovy monovrstvy. ³⁵

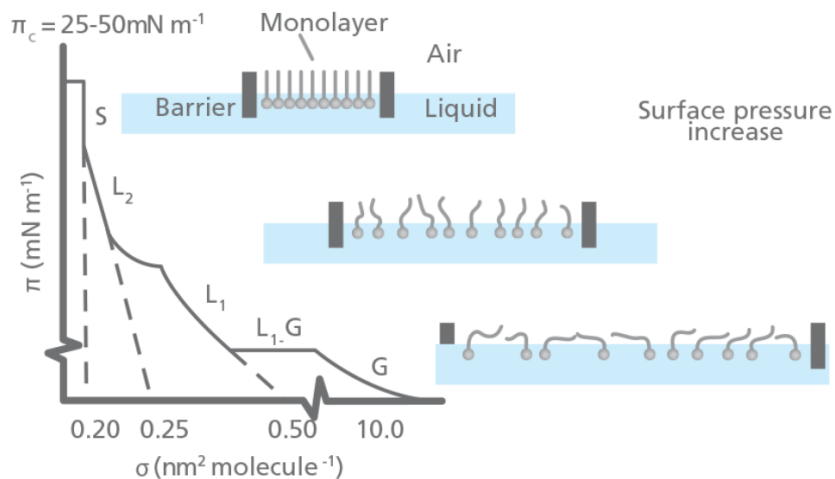
1 – Hydrofobní vanička, 2 – Hydrofilní bariéry, 3 – Platinový plíšek pro měření povrchového tlaku

3.3.1. Langmuirovy izotermy

Izoterma (Obrázek 10) je graf závislosti SP [mM/N]) na ploše jedné molekuly (MMA, z angl. *Molecular Area*, [\AA^2]) popisující kompresi monovrstvy během měření. MMA se vypočítá z molekulové hmotnosti a z koncentrace vzorku. Obě hodnoty se zadávají do softwaru pro každý vzorek individuálně před měřením. ^{32, 34}

Na začátku měření je SP nízký a díky tomu, že molekuly jsou od sebe dostatečně vzdálené, tak zabírají větší plochu na jednu molekulu. Stlačováním bariér začínají spolu interagovat uhlovodíkové řetězce molekul a díky tomu stoupá SP. Molekuly se organizují a dochází ke vzniku uspořádané monovrstvy na povrchu subfáze. Následkem posunu bariér se tedy snižuje hodnota MMA a SP stoupá. Izoterma nám říká, jak ochotně se lipidy uspořádávají a jestliže je izoterma strmější, tak se lipidy ochotněji uspořádávají do monovrstvy. ^{32, 34}

V průběhu komprese monovrstvy nastávají různé fázové přechody. Popsané jsou 4 fáze – plynná (*gas*, G), kapalně-rozptýlená (*liquid-expanded*, L₁), kapalně-kondenzovaná (*liquid-condensed*, L₂) a pevná (*solid*, S). Při přechodu fázemi dochází k zakřivení izotermy (Obrázek 10). ³²



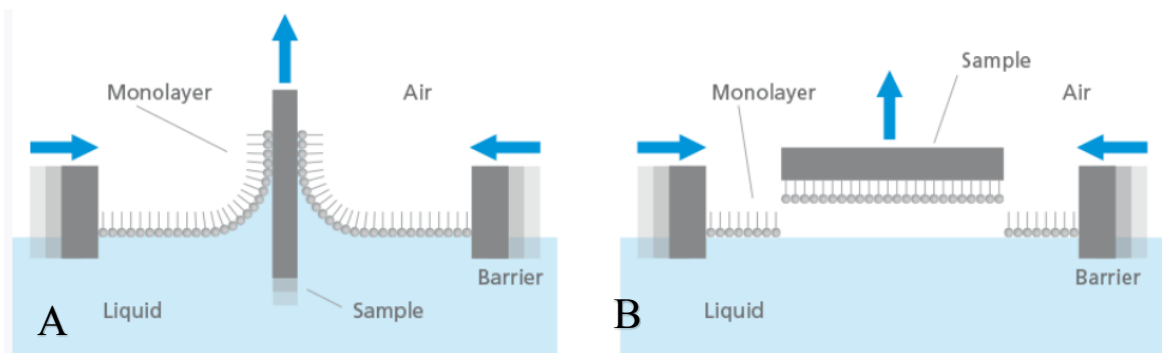
Obr. 10 Izoterma. Grafické znázornění závislosti povrchového tlaku (SP) na ploše jedné molekuly (MMA). Na obrázku jsou vyznačeny fázové přechody, ke kterým dochází díky zvyšujícímu se povrchovému tlak (převzato z *Biolinscientific.com*).

Dalším důležitým parametrem, je modul kompresibility (z angl. *Compression modulus*, C_{\max} [mN/m]). Tato veličina je převrácenou hodnotou kompresibility a C_{\max} získáme derivací izotermy. Modul kompresibility je ukazatel elasticity monovrstvy a platí, že čím je hodnota C_{\max} vyšší, tím je elasticita nižší. Průběh ovlivňuje zejména teplota a složení subfáze a pufry. ^{31, 32}

3.4. Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladě

Vzniklé langmuirovy monovrstvy lze přenést na pevný podklad, což umožňuje následně zkoumat jejich vlastnosti pomocí různých technik, jako jsou atomová silová mikroskopie (AFM), infračervená spektroskopie nebo rentgenová difrakce.³²

Přenos monovrstvy na pevný podklad lze provést dvěma způsoby. Prvním způsobem je metoda Langmuir-Blodgett (Obrázek 11-A, převzato z *Bioscientific.com*), při které se monovrstva přenáší vertikálním ponořením pevného podkladu do monovrstvy. V tomto případě se používá hydrofilní podklad, např. slídové sklíčko. Druhý způsob je metoda Langmuir-Schaefer (Obrázek 11-B, převzato z *Bioscientific.com*), kdy dochází k přenosu monovrstvy horizontálním přiložením hydrofobního podkladu shora na monovrstvu. Příkladem hydrofobního materiálu může být pyrolytický grafit nebo silanizovaný oxid křemičitý.^{34, 35}



Obr. 11 A – Langmuir-Blodgett metoda (vertikální přenos monovrstvy na pevný podklad), **B – Langmuir-Schaefer metoda** (horizontální přenos monovrstvy na pevný podklad).³⁵

Při přenosu monovrstvy na pevný substrát je nezbytné zachovat konstantní kompresi (tj. SP) v rozmezí 20 až 40 mN/m. Důležitým faktorem pro zachování soudržnosti monovrstvy je dostatečně vysoká hodnota SP, kdy přitažlivost mezi molekulami v monovrstvě je dostačující k tomu, aby se předešlo rozpadu monovrstvy během přenosu na pevný podklad. Pokud by byl SP příliš vysoký, tak to může vést ke zhroucení monovrstvy^{32, 35}

Adsorpci monovrstvy na pevný substrát může ovlivnit několik faktorů. Mezi tyto faktory patří povaha nanášeného filmu, teplota a složení subfáze, povrchový tlak během přenosu a rychlost nanášení, povaha látky pevného substrátu.³⁵

3.4.1. Atomová silová mikroskopie (AFM)

K zobrazení monovrstvy přenesené na hladký povrch slídového sklíčka slouží metoda Mikroskopie atomárních sil (AFM, z angl. *Atomic Force Microscopy*). AFM umožňuje určení nanorozměrové organizace lipidové multivrstvy a poskytuje obrázky s vysokým rozlišením. Tato metoda poskytuje schopnost, kterou jiné charakterizační techniky nemohou nabídnout, a to schopnost fungovat ve vodném prostředí a teplotě, která kopíruje přirozené prostředí biologických vzorků, které charakterizuje.^{32,36}

Pro samotné měření je důležitá sonda, která je v kontaktu s povrchem vzorku a snímá ho. Další součástí přístroje je piezoelektrický skener, který velmi přesnými pohyby zajišťuje polohování vzorku, poté laserový zdroj a polohově citlivý detektor. Na horní část měkké konzoly AFM se odráží laserový paprsek a následně je shromažďován fotodiodou, aby zjistila vychýlení hrotu. Sonda na svém konci má ostrý hrot a ve chvíli, kdy je hrot v těsné blízkosti se vzorkem, tak kvantitativní mechanické interakce mezi hrotem sondy a povrchem vzorku jsou ihned zaznamenány detektorem a dochází k vykreslení záznamu jako 3D topografie.^{36,37,38}

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a materiál

Fosfátový pufr (PBS, 10mM, pH 7,4; Merck, Německo), ultračištěná voda Milipore (čištěná systémem Milli-Q na Farmaceutické fakultě UK), aceton, trypsin z prasečí slinivky (Merck, Německo), sušidla (oxid fosforečný, tuhý parafin a hydroxid sodný), extrakční pufr se složením Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), DDT (Dithiotreitol), EDTA (Kyselina ethylendiamintetraoctová) a DDAO (N,N-dodecyldimethylamin oxid), dále mycí pufr (Tris-HCl, DDT, EDTA), hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), lipidy z lidského SC v chloroformu a methanolu.

Skalpel, kádinky, pinzety, vatové tyčinky, Petriho miska, gáza a centrifugační zkumavky o různých velikostech (50 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 2 ml, 1 ml).

4.2. Přístrojové vybavení

Pro získání požadované tloušťky (5 mm) kůže byl použit dermatom (Aesculap, Acculvan, Německo), pro navažování SC byla použita analytická váha Ohaus PR SERIES (Ohaus, USA). Dále byl využit inkubátor IN30 (Mettler, Německo) vytemperovaný na 32 °C.

Pomocí rotační vakuové odparky Hei-VAP Core (Heidolph, Německo) bylo zajištěno odpaření směsi organických rozpouštědel (chloroform/methanol) k získání extrahovaných volných lipidů ze SC.

Pro sušení vzorků SC byl použit exsikátor s obsahem sušidel (oxid fosforečný, tuhý parafin a hydroxid sodný).

Při filtraci SC byl využit filtr o velikosti ok 41 µm (Fischer scientific, USA).

K získání sedimentu buněk SC pomocí centrifugace byla využita multifunkční chlazená centrifuga MPW 260R (MPW MED. INSTRUMENTS, Polsko).

K hodnocení buněk SC byl použit optický mikroskop Olympus BX 51 s digitální kamerou DP72 se softwarem analySIS auto 5.1 (Olympus GmbH, Německo). KC byly počítány v hemocytometru s Neubauerovou komůrkou (Merc, Německo).

Metodou infračervené spektroskopie byly měřeny vzorky SC pomocí přístroje Nicolet 6700 FTIR (Thermo Fisger Scientific, USA). K vyhodnocení spekter byl využit program OPUS (Bruker, Německo).

Pro přípravu monovrstev byla použita vana KN 2001 *small*, posuvné bariéry KN 0040, mechanismus pro nanášení monovrstev na pevný podklad a LB software (KSV NIMA, Finsko). Pro hodnocení monovrstev nanesených na slídové sklíčko byl použit mikroskop atomárních sil. Nanosurf easyScan 2 FlexAFM (nanosurf, Švýcarsko) v kontaktním módu.

4.3. Izolace *stratum corneum* z lidské kůže

Lidská kůže byla získána od pacientů, kteří podstoupili abdominoplastiku v Sanatoriu Sanus v Hradci Králové ČR po podepsání informovaného souhlasu a schválení etické komise při Sanatoriu Sanus (souhlas č. 5/4/2018). Čerstvá kůže byla po operaci pomocí skalpelu zbavena podkožního tuku, následně byla omyta v PBS, osušena gázou a skladována při -20 °C v mrazáku.

Zmražená kůže byla po vyjmutí z mrazícího boxu a po rozmrazení při laboratorní teplotě upravena dermatomem na požadovanou tloušťku 5 mm.

Poté se připravila Petriho miska s obsahem PBS o pH 7,4 a trypsinu, do které se jednotlivé kusy dermatomované kůže vložily. Takto se Petriho miska uložila do inkubátoru přes noc při teplotě 32°C.

Díky trypsinu došlo k enzymatickému oddělení SC od ostatních zbytků kůže.⁴⁰ SC bylo pomocí pinzety z Petriho misky opatrně vyjmuta a očištěno vatovou tyčinkou od zbytků epidermis a dermis. Dále bylo několikrát opláchnuto ponořením do kádinky s ultračištěnou vodou Milipore, pak na několik vteřin do acetonu a poté

znovu do kádinky s vodou Milipore. Čisté SC bylo uloženo do Petriho misky na gázu s následným sušením v exsikátoru vybaveným sušidly.

4.3.1. Extrakce volných lipidů ze SC

Extrakce volných lipidů ze SC se provedla ve směsi chloroform/methanol, a to v poměru 2:1 (v/v), dále v poměru 1:1 (v/v) a 1:2 (v/v).⁴¹ Extrakce se provedla tak, že určité množství SC bylo pomocí pinzety převedeno do malé kádinky, kde byla připravená směs organických rozpouštědel nejdříve v poměru 2:1 (v/v). Takto se kádinka položila na magnetickou míchačku s míchadlem, a probíhalo pomalé míchání za laboratorní teploty po dobu dvou hodin. Následně proběhla filtrace SC s rozpouštědlem přes filtrační papír. Zfiltrované SC bylo vloženo do kádinky, kam se poté vložil další poměr organických rozpouštědel, v tomto případě 1:1 (v/v). Dále se postupovalo stejným způsobem jako na začátku extrakce a k znovu odfiltrovanému SC se přidala naposledy směs rozpouštědel v poměru 1:2 (v/v). Když tento celý postup proběhl i potřetí, tak filtrovaná směs rozpouštědel s extrahovanými lipidy byla vložena do rotační vakuové odparky, aby se rozpouštědlo odpařilo a zbyly pouze lipidy. Získané lipidy pak byly přečištěny pomocí sloupcové chromatografie a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější využití.⁴¹

Delipidizované SC po extrakci lipidů bylo přes noc vysušeno pod vakuem a uchováváno při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto vysušená SC byla dále využita k izolaci KC (Obrázek. 12).



Obr. 12 Vysušené SC

4.4. Izolace korneocytů

Tato část experimentu zahrnovala jednotlivé kroky, které byly velmi důležité pro samotnou izolaci korneocytů (KC). Níže jsou jednotlivé kroky popsány,

4.4.1. Příprava pufrů

Pro samotnou izolaci KC bylo nutné připravit dva pufrы – extrakční a mycí pufr. Extrakční pufr se skládal z 20 mM Tris-HCL, 10 mM DDT, 5 mM EDTA, 8 mM DDAO a mycí pufr měl stejné složení až na DDAO, který v tomto pufru chyběl. Pufrы byly upravené na pH 7-8, které bylo nastavené pomocí NaOH.

Bylo naváženo dvojnásobné množství Tris-HCl, DDT, EDTA, které bylo předem vypočítané (viz *Tabulka 1*) a vložené do 2 l skleněné lahve. Dále bylo přidáno 2 l čištěné vody a roztok byl míchán na magnetické míchačce při teplotě 45 °C. Následně byl tento roztok rozdělen přesně napůl do dvou 1 l lahví, kdy jedna z těch lahví obsahovala již připravený mycí pufr. Do druhé lahve se nakonec navážilo DDAO, což byl extrakční pufr.

Látka	Molekulová hmotnost [Mw (g/mol)]	Koncentrace [mM]	Navážka [g/L]
Tris-HCl	157,6	20	3, 152
DDT	416, 2	10	1,5425
EDTA	154, 25	5	2, 081
DDAO	229, 4	8	1, 8352

Tab. 1 Navážky jednotlivých látek pufrů

Ale nastal problém hned po smíchání všech látek s vodou, kdy se látky vůbec nerozpouštěly. Skleněná lahev byla vložena na magnetickou míchačku, ale jelikož bylo rozpouštění látek velmi pomalé, tak láhev byla vložena do ultrazvuku (45 °C) pro rychlejší rozpouštění. Ale i poté látky rozpuštěné nebyly, proto míchání bylo zapnuté i přes noc, ale to také nepomohlo.

Bylo zjištěno, že problémem byla EDTA, která snižovala pH pod 5 a proto se nic nerozpouštělo. Jelikož je to kyselina, tak pro rozpuštění bylo potřeba pH 7-8. Pro nastavení správného pH byl využit NaOH.

Důležitý byl postup přidávání jednotlivých složek, kdy jako první do vody byl přidán Tris-HCl. Pro jeho rozpuštění bylo nastavené pH na 7,5 pomocí NaOH, který se postupně přikapával za současné kontroly pH na pH metru. Po rozpuštění byla přidána EDTA, pro kterou se následně nastavilo ideální pH na 8, při kterém byla velmi dobře rozpuštěna. Poté přidáno DDT, které bylo rozpuštěno během chvilky. Pokud pH bylo vyšší než 7,5 po rozpuštění všech látek, tak bylo zpět nastaveno okyselením HCl.

4.4.2. Izolace KC

Po přípravě pufrů následoval krok, během kterého došlo k oddělování KC ze SC. V uzavřené skleněné lahvi bylo SC ponořeno do extrakčního pufru (250 ml pufru na 15 mg SC). Za neustálého míchání bylo ponecháno na magnetické míchačce po dobu 72 hodin při teplotě 40-50°C.

4.4.3. Filtrace

Následně se provedla filtrace získané disperze KC v extrakčním pufru. Filtrace se provedla pomocí jednoduché filtrační aparatury. Její součástí byla přepážka, na kterou byl položen filtr o velikosti ok 41 μm , skrze který probíhala samotná filtrace. Aparatura byla našroubována na 250 ml skleněnou láhev, do které byl filtrován extrakční pufr s KC oddělenými od větších zbytků SC.

4.4.4. Čištění KC

Získaný filtrát byl využit pro následné čištění KC. Pro čištění KC byl použit mycí pufr bez obsahu DDAO.

Čištění bylo provedeno celkem třikrát, a to tím způsobem, že filtrát byl nejdříve rozdělen do větších 50 ml centrifugačních zkumavek, které byly vloženy do centrifugy s nastavením na 6000 RPM, 20 min a 22 °C. Po uplynutí doby této

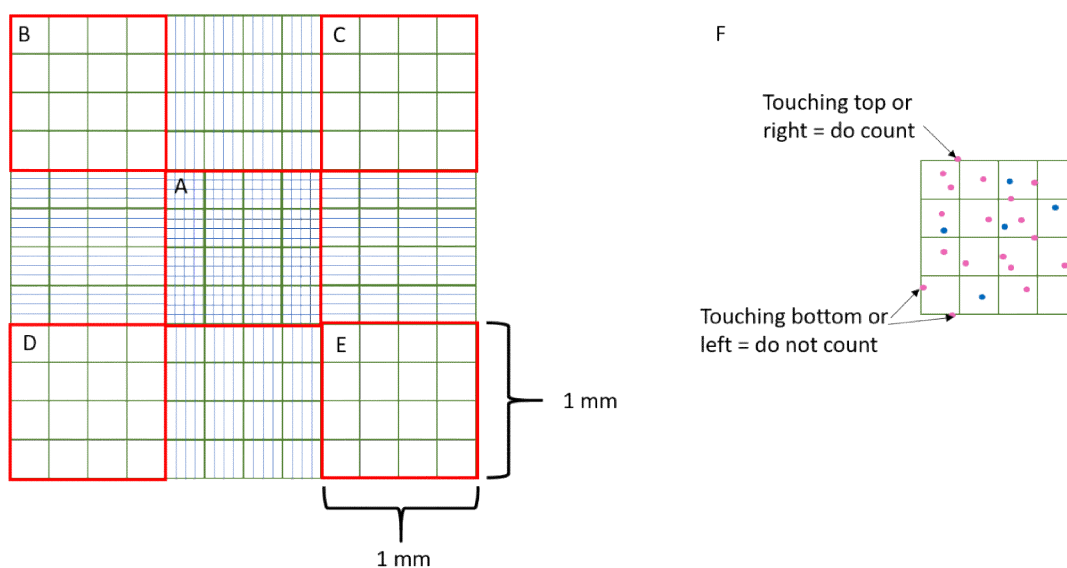
první centrifugace byly sedimentovány na dně zkumavek pelety buněk, které bylo potřeba získat pro další zpracování.

Následně byl vždy odebrán svrchní supernatant do odpadu, tak aby nedošlo k poškození pelety buněk. K peletám buněk a zbytku extrakčního pufru byl přidán mycí pufr a takto byla postupně celá směs převedena postupně do menších centrifugačních zkumavek. Dále proběhla znovu centrifugace se stejným nastavením. Tento postup s mycím pufrem se provedl poté znovu dvakrát s tím, že na konci se pracovalo už jen s 2 nebo 1 ml centrifugačními zkumavkami.

4.5. Metody hodnocení korneocytů (KC)

4.5.1. Optická mikroskopie

Metoda optické mikroskopie byla využita pro sledování morfologie buněk a zjištění jejich počtu v jedné peletě, která byla získána díky čištění buněk. Samotnému hodnocení předcházelo suspendování KC do vhodného média. Pro hodnocení byl použit hemocytometr s Neubauerovou komůrkou, do které bylo pipetováno 10 μ l média s KC. Pod mikroskopem při zvětšení 10x byly spočítány buňky v 5 čtvercích podle následujícího schématu.



Obr. 13 Schéma pro počítání KC. ⁴² Červeně zvýrazněné čtverce představují prostory pro počítání KC.

Byly počítány všechny buňky, které byly dobře viditelné, a i s dobrou morfologií. Pokud se buňky dotýkaly horní a pravé hranice čtverce, tak se počítaly, ale pokud se dotýkaly levé a dolní hranice čtverce, tak se nepočítaly. Tímto způsobem se spočítaly KC ve všech čtvercích A-E, které se sečetly a udělal se průměr. Jelikož hemocytometr s Neubauerovou komůrkou obsahoval toto schéma dvakrát, tak byly získány dva průměry buněk, které se poté také sečetly a zprůměrovaly. Následně byly dosazeny do rovnice (*Rovnice 1*), ve které $\bar{\varnothing}$ počet buněk znamená průměrný počet buněk v jednom čtverci a 10^4 znamená přepočít na aplikované množství objemu na 1 čtverec.

$$\text{počet buněk v 1 ml} = \bar{\varnothing} \text{ počet buněk} \times 10^4 \times \text{ml suspenze}$$

Rovnice 1 Výpočet počtu KC

4.5.2. Infračervená spektroskopie

Tato metoda byla využita ke kontrole zbytků rezidua surfaktantu v izolovaných KC. Měření byly pelety buněk, které se po izolaci nechaly volně uschnout při laboratorní teplotě. Samotné měření probíhalo na Katedře bioorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK. Peleta byla přímo aplikována na ATR krystal a bylo změřeno 128 skenů při rozlišení 2 cm^{-1} .

4.6. Příprava modelu korneocytární lipidové obálky (CLE)

4.6.1. Příprava lipidových vzorků

Pro přípravu modelu byla použita směs cholesterolu (Chol; $M_r = 386,67$ g/mol), ceramidů (Cer; $M_r = 650,13$ g/mol) a směsi volných mastných kyselin (VMK; $M_r = 345,58$ g/mol) extrahovaná z lidského SC. Přesný postup extrakce volných lipidů je popsán v podkapitole 4.3.1.

Všechny vzorky byly skladovány při teplotě -20°C a před každým měřením byly lipidy rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (2:1; v/v), a to v koncentraci 1 mg/ml.

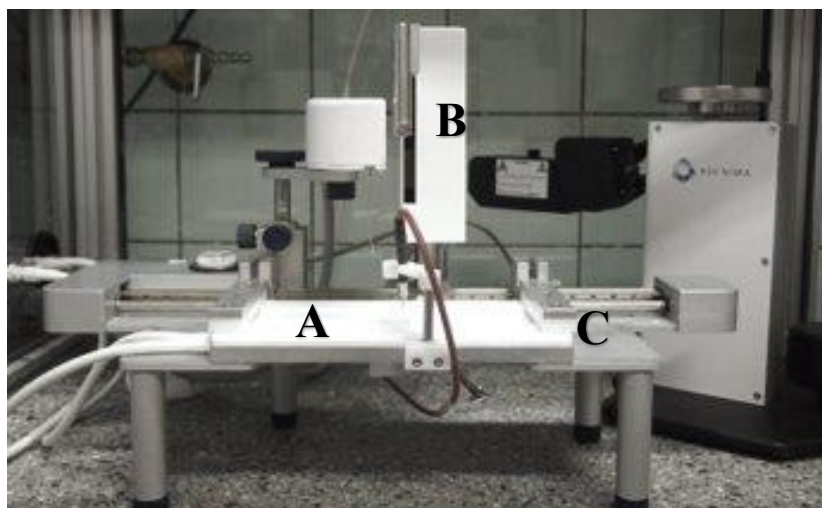
4.6.2. Příprava acetátového pufru

Pro přípravu acetátového pufru (10 mM, pH 5,5) byla potřeba ultračištěná voda Milipore, kyselina octová, NaCl a roztok hydroxidu sodného (NaOH).

Samotná příprava zahrnovala rozpuštění 8,5 g NaCl a 0,6 g kyseliny octové v 1 l ultračištěné vody Milipore za stálého míchání. Po úplném rozpuštění bylo nutné zkontrolovat pH a dle potřeby správné pH nastavit pomocí NaOH. Následně byl pufr před použitím zfiltrován ve filtrační aparatuře přes filtry o velikosti ok 0,45 μm za přítomného vakua a mezi jednotlivými měřeními byl získaný pufr uchovávan v chladničce.

4.6.3. Langmuirovy monovrstvy na rozhraní kapalina-vzduch

Pro přípravu modelů monovrstev byl použit přístroj skládající se z mělké vaničky vyrobené z hydrofobního materiálu. Na okrajích vaničky byly umístěny pohyblivé bariéry (vyrobené z hydrofilního materiálu), jejichž posunem (ovládáno softwarem KSV NIMA) do středu vany dochází ke stlačení monovrstvy. Další součástí přístroje byla platinová destička sloužící pro sledování změn SP a čidlo termostatu zaznamenávající teplotu kapaliny.



Obr. 14 Zařízení určené k přípravě Langmuirových monovrstev
A – mělká vanička, B – ponorný mechanismus pro nanášení vzorků na pevný podklad a závěsné zařízení pro platinový plíšek, C – bariéry

Do čisté a osušené vaničky byl nalit acetátový pufr, který sloužil jako subfáze. Do subfáze byl ponořen platinový plíšek tak, aby se nedotýkal dna vaničky. Na okraje vaničky byly umístěny bariéry a do subfáze bylo ponořeno čidlo termostatu.

Před měřením se očistil povrch subfáze opakovaným přibližováním pohyblivých bariér směrem ke středu vaničky, kde byl situovaný plíšek. Pomocí pipety se odsály případné nečistoty přítomné na bariérách. Pomocí stejné pipety byly odstraněny i vzniklé bubliny v subfázi. Tento proces čištění byl proveden minimálně dvakrát.

Subfáze byla vytemperována na teplotu 22 °C a během temperace byl vzorek lipidů rozpuštěn ve směsi chloroform:methanol (2:1, v/v) na koncentraci 1 mg/ml. Následně pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky s teflonovým koncem bylo nanášeno 10 µl tohoto roztoku rovnoměrně po kapkách po celém povrchu subfáze.

Po odpaření rozpouštědla (20 minut) byl vynulován SP a následně bylo zahájeno měření. Během měření se bariéry k sobě přibližovaly rychlostí 10 mm/min. Bariéry se pohybovaly až do maximální hodnoty SP 50 mN/m, kdy po

dosažení této hodnoty se bariéry zastavily, případně měření bylo ukončeno manuálně. Samotné měření probíhalo přibližně 20 minut,

Po ukončení měření všechny součásti přístroje byly očištěny určenými rozpouštědly. Vanička, platinový plíšek a čidlo byly opláchnuty směsí rozpouštědel chloroform:methanol (3:1, v/v), bariéry methanolem a nakonec všechny součásti byly osušeny.

Výsledkem těchto měření byly izotermy (křivka závislosti SP na MMA).

4.6.4. Langmuirovy monovrstvy na pevném podkladě

Přenos Langmuirova filmu byl proveden na slídové sklíčko ve vaničce, která byla opatřena zařízením na vertikální posun pevného podkladu. Do držáku bylo upevněno slídové sklíčko (15x15 mm), které bylo protaženo skrze subfázi tak, aby byl vytvořen meniskus kapaliny. Naneseno 10 μ l vzorku, následovalo odpaření rozpouštědla (20 minut) a ekvilibrace hodnoty SP na hodnotu 20 mN/m, což zajišťují pohyblivé bariéry. Během působení konstantního SP bylo slídové sklíčko vytaženo (2 mm/min) ze subfáze nad hladinu. Poté se sklíčko zachytilo držákem pro jednodušší manipulaci a bylo vloženo do široké vialky, která byla napuštěna inertní atmosférou dusíku, uzavřena víčkem a opatřena parafilmem.

Takto získané lipidové monovrstvy byly měřeny pomocí AFM na katedře farmaceutické technologie dr. Svačinovou.

4.7. Zpracování výsledků

Pro zpracování výsledků byl použit Microsoft Excel a GraphPad Prism.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Extrakce SC

5.1.1. Čištění KC pomocí centrifugace

DDAO je neionický surfaktant, kdy jeho přítomnost byla klíčová, protože pomáhá rozvolnit KC ve SC, avšak ve výsledném modelu by mohl výsledky zkreslovat. Proto bylo potřeba ho z disperze KC vymýt pomocí mycího pufru, ve kterém se nenacházel.

Zpočátku bylo čištění provedeno celkem třikrát s mycím pufrem pomocí centrifugace.⁴³ Po třetím mytí buněk ale nebyla vůbec viditelná peleta buněk. Pro zjištění, zda byly získané nějaké buňky byla provedena optická mikroskopie (viz následující kapitola). Celý experiment od filtrace až po čištění byl proveden celkem čtyřikrát.

Vždy před třetím mytím byla pod mikroskopem viditelná peleta, ale po třetím přečištění už se ji získat nepodařilo. Proto bylo u dalších experimentů provedeno promývání s mycím pufrem pouze dvakrát.

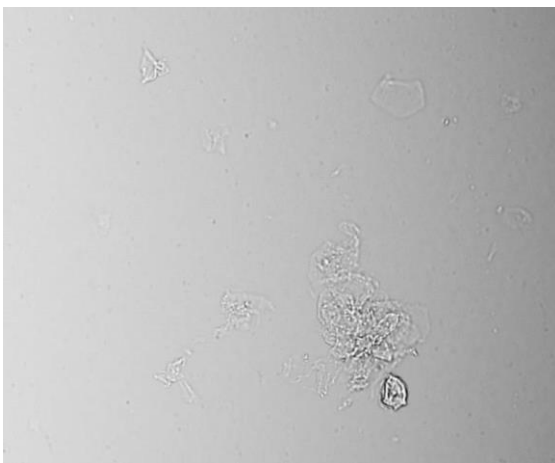
5.2. Hodnocení KC

5.2.1. Optická mikroskopie

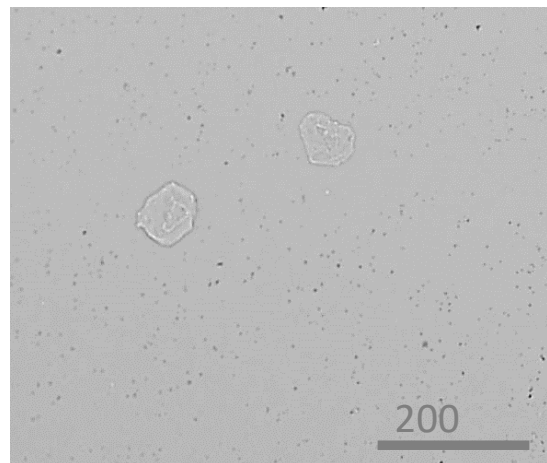
Na *Obrázcích 15-17* jsou zobrazeny KC po jejich čištění s mycím pufrem. Po prvním mytí (*Obrázek 15*) byly viditelné pouze shluky buněk, kdy v každém jednotlivém shluku bylo velké množství korneocytů. Kvůli shlukům nebylo ani možné zjistit přesný počet buněk ani jejich přesnou morfologii.

Po druhém přečištění (*Obrázek 16*) byly získané buňky s velmi dobrou morfologií, kdy víceméně všechny měly stejný tvar. Pod mikroskopem byly shluky minimálně, tudíž bylo možné vidět jednotlivé KC vedle sebe a díky tomu je bylo možné přesněji spočítat.

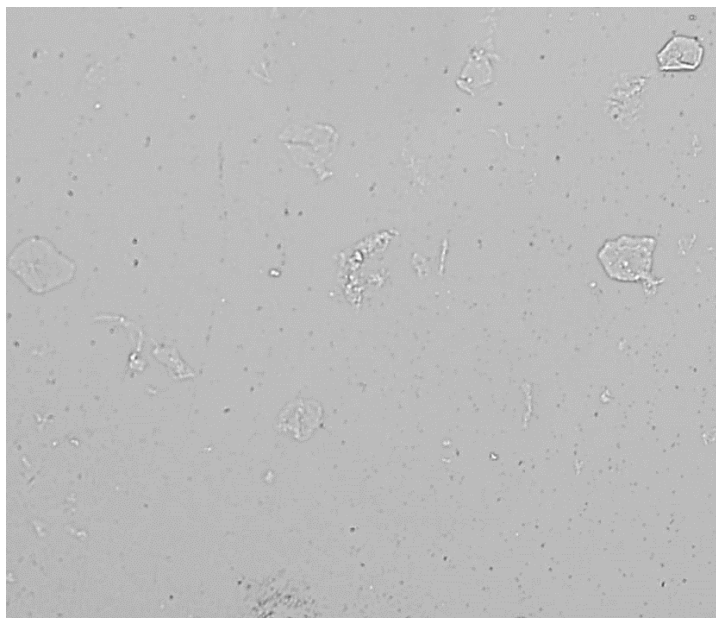
Na *Obrázku 17* můžeme vidět KC po třetím mytí, kdy takto přečištěné buňky mají narušený tvar. Po jejich přepočítání, byl oproti počtu KC po 2. mytí, získán velmi nízký počet, se kterým nebylo možné dále pracovat. Z tohoto důvodu v dalších experimentech bylo mytí provedené pouze dvakrát.



Obr. 15 Shluky KC po 1. mytí

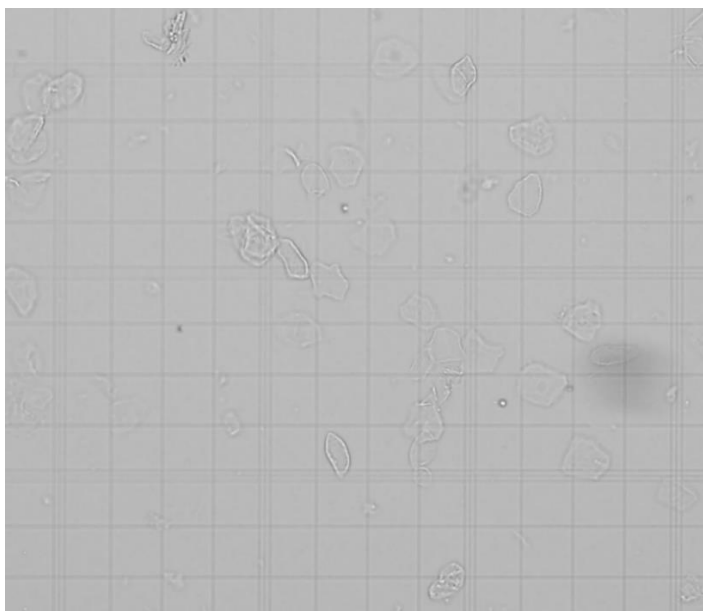


Obr. 16 KC po 2. mytí



Obr. 17 KC po 3. mytí

Při každém experimentu byly KC vždy spočítány po druhém mytí a dosazeny do *Rovnice 1*, ze které byly získány následující počty buněk: KC1 = 550 000; KC2 = 615 000; KC3 = 436 000; KC4 = 662 000. Průměrně tak bylo získáno z jedné extrakce cca $5-6 \times 10^5$ KC.

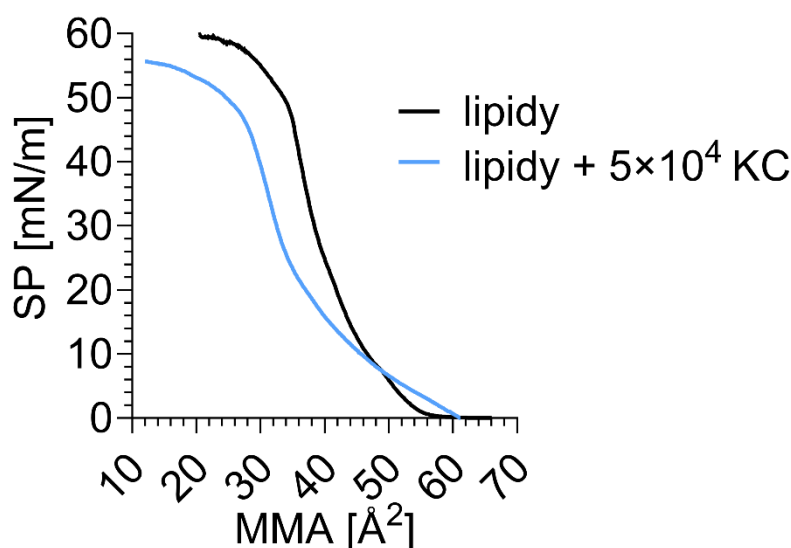


Obr. 18 Počítání KC pomocí hemocytometru s Neubauerovou komůrkou

5.3. Příprava modelu - Langmuirovy monovrstvy

5.3.1. Langmuirovy izotermny

KC získané v předchozí části práce pak byly použity pro modely CLE, kde KC reprezentovaly CLE, na kterou by se mohly navázat volné lipidy SC. Chování těchto směsí bylo pozorováno pomocí Langmuirových monovrstev. V grafu (Obrázek 19) vidíme naměřené dvě reprezentativní izotermny, které jsou barevně odlišené. Černě je znázorněn průběh uspořádání samotných lipidů.



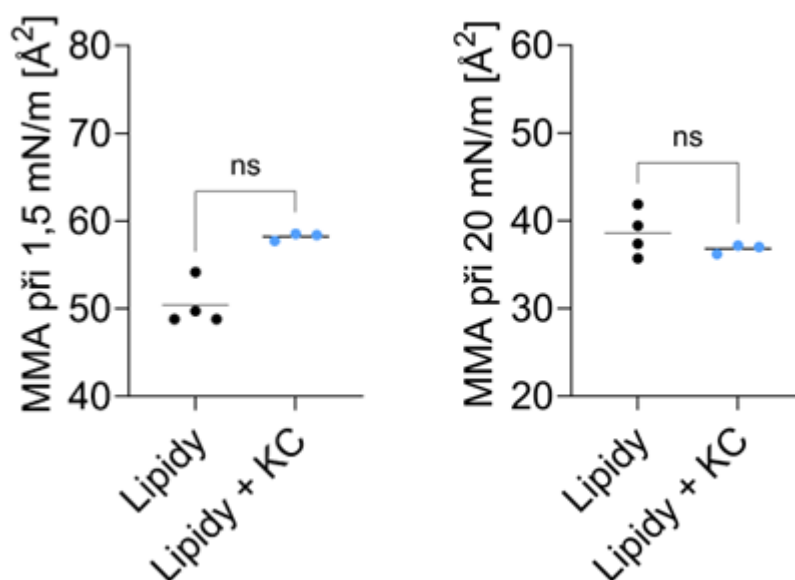
Obr. 19 Izoterma lipidů – Graf znázorňuje závislost povrchového tlaku (SP) na ploše jedné molekuly (MMA) u samotných lipidů a u lipidů s KC, které reprezentují model CLE.

Kontrolní izoterma samotných lipidů nastupuje při MMA kolem 57 Å², což je v souladu s literaturou pro podobné modely.³⁹ Nástup pro lipidy s KC je mírně posunut k vyšším hodnotám. Dále u nich dochází k uspořádání pomaleji, než je tomu u samotných lipidů, u kterých je izoterma z počátku strmější. K tomu dochází díky interakcím mezi jednotlivými molekulami monovrstvy.⁴⁴

Během měření dochází v určitou chvíli k překročení SP (přibližně 20–25 mN/m), kdy se tvar izotermny lipidů s KC začal podobat izotermě samotných lipidů. Obě izotermny ke konci měření probíhaly velmi podobně.

5.3.2. Plocha jedné molekuly

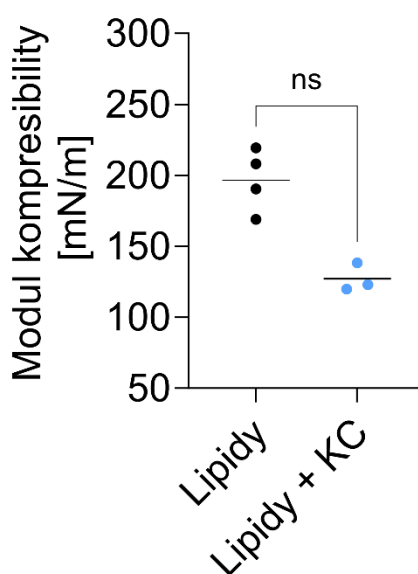
Na *Obrázku 20* jsou graficky znázorněny hodnoty získané z izoterm, a to MMA při SP 1,5 mN/m (vlevo) a při 20 mN/m (vpravo). Na začátku komprese, tedy při nižším SP 1,5 mN/m, lipidy obecně zabírají větší plochu na jednu molekulu, což je způsobeno volností pohybu molekul. ⁴⁴ Průměrná plocha pro kontrolní vzorek byla $50,5 \pm 3$ a pro lipidy s KC $58,2 \pm 0,5$. Lipidy s KC tedy zabírají mírně větší plochu, i když tento rozdíl není statisticky významný. Ve chvíli, kdy se SP zvýšil na 20 mN/m, tak se hodnoty lipidů s KC a bez KC téměř neliší. To může být způsobené tím, že se lipidy navázaly na CLE a díky tomu se zlepšila jejich schopnost se uspořádat. Další hypotézou je, že mohlo dojít k jejich vytlačení z monovrstvy. Tomu se dále věnovala navazující práce výzkumné skupiny Skin Barrier Research Group, ve které bylo zjištěno, že se jedná o první případ a CLE zlepšuje uspořádání lipidů. ⁴⁵



Obr. 20 Plocha jedné molekuly – Grafické znázornění plochy jedné molekuly (MMA) na lipidy a na lipidy s KC při povrchovém tlaku (SP) 1,5 a 20 mN/m.

5.3.3. Modul kompresibility

Modul kompresibility (C_{\max}) představuje převrácenou hodnotou kompresibility (C_s), kterou lze získat derivací izotermy ze vztahu $C_s = (-1/A)/(dA/d\pi)$, kde A je teoretická plocha jedné molekuly při povrchovém tlaku π . Z daného vztahu platí, že $C_{\max} = C_s^{-1}$. Čím těsnější je uspořádání lipidů v monovrstvě, tak tím je hodnota modulu kompresibility vyšší. C_{\max} tedy udává míru stlačitelnosti nebo naopak elasticitu monovrstvy. Volnější uspořádání lipidů v monovrstvě je charakterizováno nižšími hodnotami C_{\max} a to vypovídá o elastičtější charakteru monovrstvy.²⁰



Obr. 21 Modul kompresibility (C_{\max})

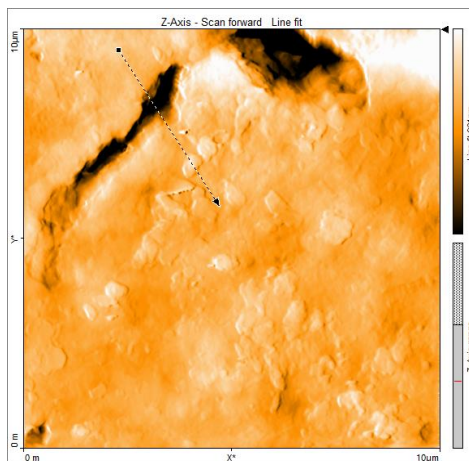
Na Obrázku č. 21 jsou znázorněny samotné lipidy (černě) a lipidy s KC (modře), kdy v grafu můžeme vidět jejich C_{\max} (modul kompresibility). Průměrná hodnota kontrolního vzorku byla $196,7 \pm 22$ a po přidání KC klesla na 127 ± 10 , rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Tento klesající trend C_{\max} po přidání KC značí zvyšující se fluiditu lipidů, tudíž zlepšení elasticity monovrstvy. Díky tomu se může zlepšit schopnost lipidů uspořádat se do multivrstev. Samovolné přetváření lipidových monovrstev v multivrstvy při měření podobných modelů bylo již pozorováno v dřívějších studiích, avšak nikdy při laboratorní teplotě.³⁹ Toto chování by rovněž vysvětlovalo nižší MMA po přidání KC k lipidům. Kvůli

tomu tedy byly monovrstvy přeneseny na pevný podklad a bylo sledováno jejich uspořádání pomocí AFM.

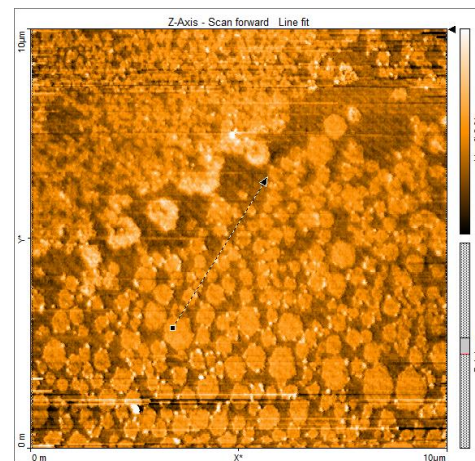
5.3.4. AFM

Metoda AFM byla využita k zobrazení monovrstev na pevném podkladě. Díky této metodě bylo možné pozorovat domény lipidů a buněk. Záznamy vzorků byly pořízené při zvětšení 10 μm . Světlejší oblasti jsou vyšší a tvoří je domény lipidů.

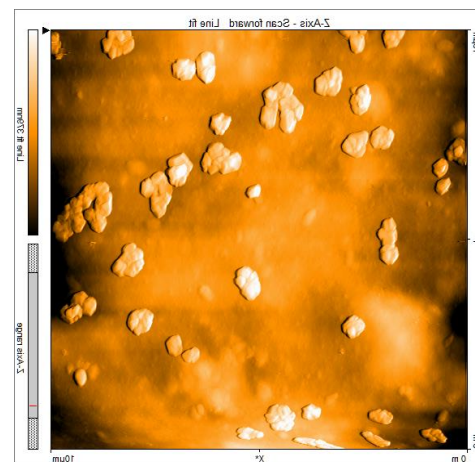
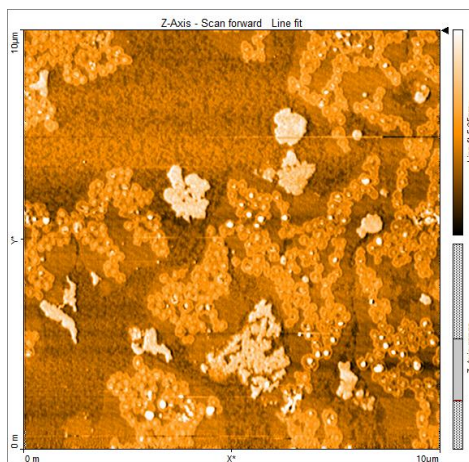
Na *Obrázku 22* můžeme vidět samotné KC, na *Obrázku 23* vidíme samotné lipidy a na *Obrázcích 24 a 25* můžeme vidět KC s navázanými lipidy.



Obr. 22 Samotné KC



Obr. 23 Samotné lipidy



Obr. 24 a 25 KC s lipidy

Na druhém mikrografu samotných lipidů (*Obrázek 23*) je zobrazen okraj buňky s charakteristickou strukturou. Na třetím mikrografu (*Obrázek 24*) jsou zobrazeny domény lipidů, které se zachytily při přenosu na slídové sklíčko. Ty jsou v porovnání se samotnými lipidy bez KC uspořádány spíše řetízkově a objevují se větší plochy lipidů uspořádaných do dvojvrstev (světlejší barva značí vyšší domény). Na čtvrtém mikrografu (*Obrázek 25*) lze opět pozorovat povrch buněk s doménami charakteristických pro lipidy, které se již uspořádávají dokonce do multivrstev. Tomuto zjištění odpovídají i výškové profily domén. Samotné lipidy mají výšku typickou pro podobný vzorek kolem 2 nm (*Obrázek 23*), u dvojvrstvy byly naměřeny ~4 nm (*Obrázek 24*), zatímco multivrstevné útvary (*Obrázek 25*) mají výškový rozdíl v desítkách nm. Je tedy pravděpodobné, že volné lipidy mají afinitu ke KC, a tedy CLE, která je schopna měnit vlastnosti těchto lipidů a umožňuje jejich uspořádávání do multivrstev. To by odpovídalo dříve navržené teorii,¹⁷ že obálka KC slouží jako templát pro volné lipidy. Je třeba dodat, že tato teorie byla dále potvrzena v současně probíhajícím výzkumu (Dwivedi et al),⁴⁵ jak už bylo zmíněno výše.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce bylo cílem vyvinout a validovat model korneocytární lipidové obálky (CLE), díky kterému by bylo možné sledovat interakce právě mezi CLE a volnými kožními lipidy.

Na začátku experimentu byly izolovány KC, které byly dále v práci využity pro přípravu modelu. Po druhém přečištění buněk mycím pufrem a po přepočítání KC pomocí hemocytometru s Neubauerovou komůrkou bylo průměrně získáno z jedné extrakce přibližně $5-6 \times 10^5$ KC.

Z izotermy lipidů vyplývá, že k uspořádání lipidů s KC dochází o něco pomaleji než u samotných lipidů a také je jejich izoterma z počátku měření strmější, to značí interakci mezi lipidy a KC. Ve chvíli, kdy se při měření překročil určitý SP, tak se hodnoty MMA u obou vzorků prakticky neliší. To může být zapříčeno navázáním lipidů na CLE, a tím dojde ke zlepšení jejich schopnosti se uspořádat. Hodnota C_{max} se po přidání buněk snížila, což poukazuje na zlepšení elasticity monovrstvy a díky tomu se může zlepšit schopnost lipidů se uspořádat do multivrstev. Z výsledků Langmuirových monovrstev na rozhraní kapalina-vzduch lze vyvodit, že nejspíše k interakcím mezi volnými lipidy a CLE dochází.

Langmuirovy monovrstvy přeneseny na slídové sklíčko zobrazené pomocí AFM, kdy na záznamu lipidů s buňkami lze sledovat domény lipidů, které se uspořádávají do dvojvrstev až multivrstev. Tomu odpovídají i výškové profily domén. Pro samotné lipidy ~ 2 nm, u dvojvrstvy ~ 4 nm a u multivrstev je výškový profil v desítkách nm. Je tedy možné shrnout, že volné lipidy mají afinitu k CLE, která umožňuje jejich uspořádání do multivrstev.

7. Reference

1. **ČIHÁK, R.** *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
2. **KITTNAR, O.** *Lékařská fyziologie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN ISBN978-80-247-3068-4.
3. **EUCERIN**. Jak kůže funguje. [online]. [cit. 2024-06-16]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
4. **PETROVICKÝ, Pavel.** *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi*. III. svazek. Martin: Osveta, c2001. ISBN 80-806-3045-3.
5. **McGrath, J. A.; Uitto, J.**, Anatomy and Organization of Human Skin. In Rook's Textbook of Dermatology, 8th ed.; Blackwell Publishing Ltd: 2010; Vol. 1, pp 1-53.
6. **Skin layers**. Online. MEDLINE PLUS. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/8912.htm>. [cit. 2024-06-27].
7. **VÁVROVÁ, K. a HRABÁLEK, A.** Role ceramidů v kůži. *Praktické lékařství*. 2006, č. 2 (2), s. 55-58.
8. **VÁVROVÁ, K. a HRABÁLEK, A.** Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékařství*. 2005, č. 1 (1), s. 8-11.
9. **LANGMEIER, M.** *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
10. **JANSSENS, M.; GOORIS, G. S. a BOUWSTRA, J. A.** The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, č. 1841 (3), s. 295-313.
11. **KOVÁČIK, A.** *Studium vlivu hydroxylace ceramidů na permeabilitu a mikrostrukturu modelových lipidových membrán*. Univerzita Karlova. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta, 2017. Disertační práce.
12. **VÁVROVÁ, K.; KOVÁČIK, A.; OPÁLKA, L. a BOUWSTRA, J. A.** Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal*. 2017, č. 64 (2), s. 28-35.
13. **ELIAS, P. M. a FEINGOLD, K. R.** *Skin barrier*. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0-8247-5815-8.

14. **PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M. a JENSEN, J. M.** The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008, č. 17 (12), s. 1063-1072.
15. **KRIEG, P. a FÜRSTENBERGER, G.** The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, č. x 41 (3), s. 390-400.
16. **ELIAS, P. M.; GRUBER, R.; CRUMRINE, D.; MENON, G.; WILLIAMS, M. L. et al.** Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, č. 1841 (3), s. 314-318.
17. **CANDI, E.; SCHMIDT, R. a MELINO, G.** The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, č. 6 (4), s. 328-340.
18. **LÓPEZ, O.; CÓCERA, M.; WERTZ, P. W.; LÓPEZ-IGLESIAS, C. a DE LA MAZA, A.** New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2007, č. 1768 (3), s. 521-529.
19. **ANTUNES, E. a CAVACO-PAULO, A.** Stratum corneum lipid matrix with unusual packing: a molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020, roč. 110928, č. 190.
20. **ŠKOLOVÁ, B.; JANUŠOVÁ, B.; ZBYTOVSKÁ, J.; GOORIS, G.; BOUWSTRA, J. et al.** Ceramides in the skin lipid membranes: length matters. *Langmuir*. 2013, č. 29 (50), s. 15624-15633.
21. **MIZUTANI, Y.; MITSUTAKE, S.; TSUJI, K.; KIHARA, A. a IGARASHI, Y.** Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*. 2009, č. 91 (6), s. 784-790.
22. **FLUHR, J. W.; KAO, J.; JAIN, M.; AHN, S. K.; FEINGOLD, K. R. et al.** Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001, č. 117 (1), s. 44-51.

23. CODERCH, L.; LÓPEZ, O.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L.; FEINGOLD, K. R. et al. Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2003, č. 4 (2), s. 107-129.
24. BREIDEN, B. a SANDHOFF, K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, č. 1841 (3), s. 441-451.
25. CHOI, M. J.; MAIBACH, H. I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2012, č. 6, s. 215-233.
26. NOVÁČKOVÁ, A. *Studium látek ovlivňujících propustnost kožní bariéry*. Univerzita Karlova. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta, 2021. Disertační práce.
27. JANSSENS, M.; VAN SMEDEN, J.; GOORIS, G. S.; BRAS, W.; PORTALE, G. et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of Lipid Research*. 2012, č. 53 (12), s. 2755-2766.
28. DE SOUSA NETO, D.; GOORIS, G. a BOUWSTRA, J. Effect of the ω -acylceramides on the lipid organization of stratum corneum model membranes evaluated by X-ray diffraction and FTIR studies (Part I). *Chemistry and Physics of Lipids*. 2011, č. 164 (3), s. 184-195.
29. UCHINO, T.; KAMIYA, D.; YAGI, H.; FUJINO-SHIMAYA, H.; HATTA, I. et al. Comparative analysis of intercellular lipid organization and composition between psoriatic and healthy stratum corneum. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2023, roč. 105305, č. 254.
30. BEDDOES, C. M.; GOORIS, G. S.; FOGLIA, F.; AHMADI, D.; BARLOW, D. J. et al. Arrangement of Ceramides in the Skin: Sphingosine Chains Localize at a Single Position in Stratum Corneum Lipid Matrix Models. *Langmuir*. 2020, č. 36 (34), s. 10270-10278.
31. ŠKOLOVÁ, B. *Syntéza a studium analogů ceramidů*. Univerzita Karlova. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta, 2015. Disertační práce.
32. BARNES, G. a GENTLE, I. In: *Interfacial Science: An Introduction*. New York: Oxford University Press, 2011, s. 107-149.

33. **ELDERDFI, M. a SIKORSKI, A. F.** Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2018, č. 212, s. 61-72.
34. **GIRARD-EGROT, A. P. a LUM, L. J.** Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*. 2007.
35. *Langmuir, Langmuir-Blodgett and Langmuir-Schaefer Technologies*. Online. Biolin Scientific. Dostupné z: https://www.biolinscientific.com/measurements?brand=ksv_nima. [cit. 2024-06-30].
36. **NAJERA, J.; ROSENBERGER, M. R, a DATTA, M.** Atomic Force Microscopy Methods to Measure Tumor Mechanical Properties. *Cancers*. 2023, roč. 3285, č. 15 (13).
37. **MORANDAT, S.; AZOUZI, S.; BEAUVAIS, E.; MASTOURI, A. a EL. KIRAT, K.** Atomic force microscopy of model lipid membranes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, č. 405, s. 1445–1461.
38. **LI, J.; LIU, Y.; YUAN, Y. a HUANG, B.** Applications of atomic force microscopy in immunology. *Frontiers of Medicine*. 2020, č. 15, s. 43-52.
39. **NOVÁČKOVÁ, A.; SAGRAFENA, I.; PULLMANNOVÁ, P.; PARASKEVOPOULOS, G.; DWIVEDI, A. et al.** Acidic pH Is Required for the Multilamellar Assembly of Skin Barrier Lipids In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 2021, č. 141 (8), s. 1915-1921.
40. **KLIGMAN, A. M. a CHRISTOPHERS, E.** Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Archives of Dermatological*. 1963, č. 88 (6), s. 702-705.
41. **BLIGH, E. G. a DYER, W. J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959, č. 37 (8), s. 911-917.
42. *Cell Counting with a Hemocytometer*. Online. Bitesize Bio. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>. [cit. 2024-06-27].

43. **SWARTZENDRUBER, D. C.; KITKO, D. J.; WERTZ, P. W.; MADISON, K. C. a DOWNING, D. T.** Isolation of corneocyte envelopes from porcine epidermis. *Dermatological Research*. 1988, č. 280, s. 424-429.
44. **LÖFGREN, H. a PASCHEER, I.** Molecular arrangements of sphingolipids. The monolayer behaviour of ceramides. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1977, č. 20 (4), s. 273-284.
45. **DWIVEDI, A.; MAZUMDER, A.; PULLMANNOVÁ, P.; PARASKEVOPOULOU, A.; OPÁLKA, L. et al.** Lipid Monolayer on Cell Surface Protein Templates Functional Extracellular Lipid Assembly. *Small*. 2024, roč. 2307793, č. 20 (26)