

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie



**Kultivace kožních štěpů jako modelů pro výzkum bariérové
funkce kůže**
Diplomová práce

Petra Kašparová

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

V Hradci Králové 2024

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Petra Kašparová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí PharmDr. Anně Paraskevopoulou, Ph.D. za její trpělivost, přátelský přístup, odborné vedení a pomoc při zpracování a realizaci mé diplomové práce. Mé poděkování nadále patří Univerzitě Karlově (SVV 260 661) a Grantové agentuře České republiky (GAČR 22-20839K) za finanční podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Autor: Petra Kašparová

Název diplomové práce: Kultivace kožních štěpů jako modelů pro výzkum bariérové funkce kůže

Kůže ochraňuje lidský organismus před vnějšími škodlivými vlivy prostředí a udržuje stálost vnitřního prostředí. Ochranná funkce je považována za nejdůležitější roli kůže, kterou primárně zajišťuje nejsvrchnější vrstva epidermis *stratum corneum* (SC). Je pro ni zvláště důležité uspořádání lipidové vrstvy obklopující keratinocyty. Dokladem toho je spojitost mezi zvýšenou incidencí kožních onemocnění a nerovnováhou přítomných lipidů.

Tato diplomová práce se zabývá vyvinutím *ex vivo* modelu lidské kůže, který by v budoucnu sloužil pro studium kožní bariéry a hodnocení topicky podávaných formulací. Cílem této práce je stanovit vhodné kultivační podmínky, tak aby bylo dosaženo dostatečné viability a zároveň byla zachována biosyntéza kožních lipidů.

K nastavení kultivačních podmínek bylo zapotřebí zjistit, zda je z hlediska viability výhodné použít dermatomovanou kůži. Dále byla kultivace prováděna ve čtyřech zkoumaných médiích s obsahem DMEM, kdy se sledoval vliv přídatku Ham's F-12 a fetálního bovinního séra (FBS) na viabilitu a obsah lipidů ve SC. Viabilita byla kvantifikována v definovaných dnech kultivace implementací TTC assay. Obsah lipidů ve SC byl analyzován pomocí HPTLC.

Vzhledem k vyšším hodnotám viability během pilotní kultivace byla metoda validována na dermatomovanou kůži. Byla potvrzena vhodnost přídatku Ham's F-12 pro déletrvající kultivaci. Avšak vhodnost FBS složky v kultivačních médiích nebyla z výsledků kultivace jednoznačně prokázána. Hlavním zjištěním této práce je skutečnost, že kultivací modelů v médiu DMEM-F12 je dosaženo srovnatelné viability v porovnání s kontrolním vzorkem. Zároveň se potvrdil vzrůstající trend celkového obsahu lipidů ve SC, který naznačuje žádoucí růst SC. Podařilo se tedy vyvinout validovaný *ex vivo* model lidské kůže se zachovalou viabilitou a rostoucím obsahem lipidů ve SC po dobu 12 dnů kultivace.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Author: Petra Kašparová

Title of the thesis: Human skin explants as models for research of skin barrier functions

The skin protects the human organism from harmful environmental effects and maintains the stability of the internal environment of the human body. The protective function is considered the most important role of the skin. It is provided primarily by the uppermost layer of the epidermis, the stratum corneum (SC). The arrangement of the lipid layer surrounding keratinocytes is especially important for it. This is evidenced by the association between the increased incidence of skin diseases and the imbalance of present lipids.

This thesis deals with the development of an *ex vivo* model of human skin, which would be used in the future to investigate skin barrier and topically administered formulations. The aim of this thesis is to establish suitable *ex vivo* skin cultivation conditions to achieve its sufficient viability and at the same time the biosynthesis of skin lipids.

Initially, it was necessary to determine whether the adjustment of the skin graft thickness by dermatome is advantageous for their viability. Furthermore, the culture was maintained in four media containing DMEM and different supplements (Ham's F-12; fetal bovine serum, FBS). The effect of supplements addition on viability and lipid content in SC was investigated. Viability was quantified at defined days of cultivation by implementing the TTC assay. The lipid content of the SC was analyzed by HPTLC.

Due to the higher viability values obtained during the pilot study, the method was validated using dermatome-adjusted skin. The profitable presence of Ham's F-12 for long-term cultivation was confirmed. On the other hand, the role of the FBS could not be clearly proven. The main finding of this thesis is that using DMEM-F12 medium a viability comparable than the control is achieved. Concurrently, the increasing trend of the total lipid content in the SC was confirmed, indicating desirable growth of SC. To conclude, an *ex vivo* human skin model with preserved viability and increasing lipid content in the SC for 12 days of cultivation was developed and validated.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Zkratky	9
Teoretický úvod a cíl práce	10
1 Stavba a funkce kůže.....	11
1.1 Hypodermis (podkožní vazivo, <i>tela subcutanea</i>).....	11
1.2 Dermis (škára, <i>corium</i>)	11
1.3 Epidermis (pokožka).....	12
1.3.1 Charakteristika buněk v epidermis.....	12
1.3.2 Popis vrstev epidermis a průběh keratinizace.....	12
1.3.3 Funkce epidermis	13
1.3.3.1 Ochranná funkce	13
2 Lipidy ve <i>Stratum corneum</i>	15
2.1 Uspořádání „cihel a malty“	15
2.2 Třídy lipidů ve SC	15
2.2.1 Ceramidy	15
2.2.2 Cholesterol.....	17
2.2.3 Mastné kyseliny	17
2.2.4 Triacylglyceroly a diacylglyceroly	18
3 Kultivace kožních štěpů	19
3.1 <i>Ex vivo</i> kůže	19
3.1.1 Význam a využití <i>ex vivo</i> kůže (explantát lidské kůže)	19
3.1.2 Nevýhody <i>ex vivo</i> kůže.....	20
3.1.3 Délka kultivace <i>ex vivo</i> kůže v kultivačním médiu.....	20

3.1.4	Kultivační techniky	20
3.1.5	Složení kultivačních médií	21
3.2	Další modely používané pro výzkum kůže	22
3.2.1	2D modely	22
3.2.2	3D modely	22
4	TTC	23
4.1	Využití a princip účinku	23
5	HPTLC	24
5.1	Charakteristika a princip metody	24
5.2	Průběh	24
5.3	Výhody	25
5.4	Analýza lipidů v kůži	26
5.4.1	Extrakce lipidů	26
5.4.2	Chromatogram HPTLC analýzy lipidů	26
	Experimentální část	27
6	Materiál a chemikálie	28
6.1	Přístroje	28
6.2	Komponenty kultivačních médií	28
6.3	Lipidy	28
6.4	Chemikálie	28
6.5	Kůže	29
6.6	Laboratorní příslušenství	29
7	Použité metody	30
7.1	Dermatomování	30
7.2	Kultivace kožních štěpů	30
7.3	Viabilita, TTC assay	30
7.4	Izolace <i>stratum corneum</i> (SC)	31

7.5	HPTLC analýza	31
7.5.1	Extrakce lipidů.....	31
7.5.2	Kalibrační roztoky.....	31
7.5.3	HPTLC měření.....	31
8	Výsledky a diskuze	33
8.1	Nastavení podmínek kultivace	33
8.1.1	Porovnání dermatomované a nedermatomované kůže.....	33
8.1.2	Hledání vhodného kultivačního média.....	34
8.1.3	Vyhodnocení pilotního experimentu.....	37
8.2	Validace modelu.....	38
8.2.1	TTC assay	38
8.2.2	HPTLC analýza.....	39
	Závěr	44
	Reference	45

Zkratky

AB	amfotericin B
CER	ceramid
D3 (5,..)	den 3 (5,..)
DMEM	médium „ <i>Dubelco's modified eagle medium</i> “
DMEM/F-12	směs médií „ <i>Dubelco's modified eagle medium/Ham's F-12 medium</i> “ v poměru 1:1
FBS	fetální hovězí sérum (<i>fetal bovine serum</i>)
GlcCer	glukosyl ceramid
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (<i>high performance thin layer chromatography</i>)
CHCl ₃	chloroform
CH ₃ OH	methanol
Chol	cholesterol
Chol S	sodná sůl cholesterol-3-sulfátu
M1 (2,..)	médium 1 (2,..)
MF	mobilní fáze
PBS	fosfátový pufr, pH 7,4
SC	<i>stratum corneum</i>
SF	stacionární fáze
S/P	streptomycin/penicilin
TTC	2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid
(V)MK	(volné) mastné kyseliny

Teoretický úvod a cíl práce

Hlavním cílem této práce je vytvořit vhodné podmínky pro kultivaci zdravé kůže, tak aby byl vytvořen *ex vivo* model s vyhovující viabilitou a obsahem lipidů po stanovenou dobu. Navazující výzkum na tuto práci bude věnován cílenému poškození kůže metodou stripování a následné sledování regenerace kožní bariéry za použití topicky aplikovaných lipidů. Metody a naměřená data z kultivace zdravé kůže umožní sledovat nadcházející výzkum funkce kožní bariéry.

V experimentu bude sledována kultivace v DMEM, ze začátku bez suplementů a později v obměněném DMEM. Jednotlivá média budou mezi sebou porovnána a vyhodnotí se vhodnost nastavených podmínek, případně dojde k jejich úpravě. Před, během a po kultivaci bude zjištěna viabilita za použití TTC assay, obsah lipidů bude změřen HPTLC metodou.

1 Stavba a funkce kůže

Kůže je největším lidským orgánem o průměrné ploše 1,73 m² tvořící 8–16 % hmotnosti těla. ¹ Součástí kůže jsou přídatné kožní orgány (kožní adnexa), jako chlupy (vlasy), nehty a kožní žlázy (mazové, potní a aromatické). Kůže plní širokou škálu funkcí. Vytváří velmi důležitou ochrannou bariéru. Ochraňuje lidský organismus před škodlivými fyzikálními a chemickými vlivy prostředí. Skrze kůži se vylučuje mnoho látek, zejména voda, chlorid sodný, močovina, kyselina močová, aminokyseliny a další. Svoji stavbou ovlivňuje termoregulaci těla vylučováním potu potními žlázami, změnou průtoku krve škarou a přítomností tukové vrstvy v hypodermis. Plní funkci imunitní, metabolickou, udržuje stálost vnitřního prostředí (zabraňuje ztrátám vody, bílkovin a iontů) a jako smyslový orgán umožňuje cítit bolesti, chladu, tepla a hmatu.

Kůže se dělí na tři části – nejspodnější vrstva hypodermis, navazující dermis a nejsvrchnější epidermis. ^{1,2} Následující kapitola bude věnována anatomii kožních vrstev s detailním popisem charakteristických funkcí pro každou z nich.

1.1 Hypodermis (podkožní vazivo, *tela subcutanea*)

Hypodermis připojuje kůži ke kostře a svalům. ³ Upevnění bývá volné (oční víčka) nebo méně pohyblivé (nadpažek). Součástí podkoží je tukové vazivo, které dosahuje i několik centimetrů v oblasti břicha, hýždí či stehen. ² V hypodermis se nachází cévní zásobování a hmatová tělíška. ¹

Tukové buňky zajišťují teplotní izolaci a mechanickou odolnost. ³ Zároveň se jedná o zdroj tuků (energie). V subkutánní oblasti je uloženo kolem 80 % tělesného tuku (nezahrnuto obézní lidi). Tukové buňky zastávají endokrinní funkci v produkci hormonu leptinu, který ovlivňuje pocit hladu a energetický metabolismus. ⁴

1.2 Dermis (škára, *corium*)

Dermis představuje vazivovou vrstvu kůže tvořenou fibroblasty o tloušťce v rozmezí 0,5 mm–5 mm. ^{1,4} Mezi epidermis a dermis se nachází bazální membrána, kterou tvoří síť proteinů a glykoproteinů. ⁴ V dermis nalezneme hladkou svalovinu a senzorké zakončení. Škára se dělí na dvě vrstvy. *Stratum papillare* vybíhá prostřednictvím papil do epidermis a *stratum reticulare* jako centrum potních, aromatických, mazových žláz a vlasových folikul. ¹ Dermis je z velké části (60 %) tvořena vodou. ⁴

Na rozdíl od bezcévné epidermis je dermis vaskularizovaná a zajišťuje tak výživu pokožky. *Stratum reticulare* je protkaná kolagenními a elastickými vlákny. ² Takové uspořádání dodává kůži mechanickou pevnost, tažnost, ohebnost a odolnost vůči tahu. Prostřednictvím elasticity se kůže navrácí do původní polohy. ⁵ Dermis ovlivňuje termoregulaci a to vasokonstrikcí či vasodilatací nebo sekrecí potu. ^{2,4} Dermis udržuje kůži hydratovanou v důsledku vysoké vazby vody z kyseliny hyaluronové na proteoglykany. ⁴

1.3 Epidermis (pokožka)

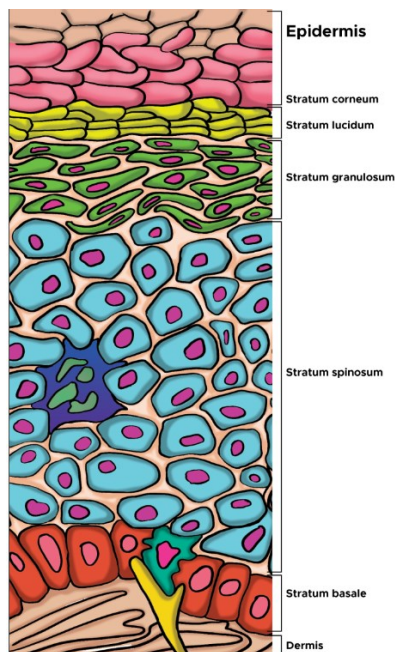
1.3.1 Charakteristika buněk v epidermis

Epidermis sestává z vícevrstevného dlaždicového epitelu. Tloušťka se pohybuje v rozmezí 0,05–0,10 mm. ^{1,4} Pokožka je rozčleněna do šesti vrstev podle typu obsažených buněk. ¹ Nejčtenějším typem buňky jsou keratinocyty. V hlubších vrstvách kůže se mitoticky dělí a postupným oplošťováním rohovatí. Výsledkem jsou odumřelé korneocyty ve *stratum corneum*. Jedná se o buňky vyplněné vodou, hygroskopickými látkami a ve vodě nerozpustným proteinem keratinem. ^{3,6} Společně s keratinocyty se v kůži vyskytují melanocyty a Langerhansovy (dendritické) buňky umístěné v hlubších vrstvách kůže (*stratum spinosum*, *stratum basale*). Dendritické buňky jsou zástupci antigen-prezentujících buněk. Merkelovy buňky (Merkelova hmatová tělíska) patří do skupiny mechanoreceptorů. ¹

1.3.2 Popis vrstev epidermis a průběh keratinizace

Nejhlubší vrstvou pokožky je *stratum basale*. Základním buněčným typem jsou keratinocyty (bazální buňky) navzájem propojené proteinovými útvary dezmozomy. ^{3,6,7} Mezi keratinocyty jsou rozptýleny Merkelovy buňky a melanocyty poutající se ke *stratum basale* pomocí hemidezmozomů. ^{1,3} *Stratum basale* společně s další vrstvou *stratum spinosum* jsou místem vzniku keratinocytů. Ty se postupnou diferenciací z bazálních buněk oplošťují a posouvají do vyšších sfér epidermis. ^{4,7} Ve *stratum granulosum* ztrácejí buněčné organely. Granule se postupně začínají plnit keratohyalinem. V této fázi dochází k transformaci životaschopných keratinocytů na korneocyty. ⁷ Na tenkou vrstvu *stratum lucidum* navazuje poslední vrstva epidermis *stratum corneum* (SC). Nejsvrchnější vrstva kůže je tvořena zcela oploštěnými, zrohovatělými a neživými zbytky keratinocytů zvané korneocyty. V korneocytech je obsažen keratin vznikající přeměnou z eleidinu, který vzniká z keratohyalinu ve *stratum lucidum*. ^{2,4,7} Na povrchu pokožky se po odbourání dezmozomů odlupují tenké vrstvy šupinek odumřelých buněk. ¹ Přeměna keratinocytů na korneocyty obvykle trvá 30 dnů.

U kožních onemocnění proces obnovy probíhá rychleji. ⁴ Přehledný popis vrstev epidermis je na Obrázku 1.



Obrázek 1 Vrstvy epidermis. Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum, Stratum corneum. ⁸

1.3.3 Funkce epidermis

1.3.3.1 Ochranná funkce

Ochranná funkce je řazena k nejdůležitějším rolím kůže, kterou primárně zajišťuje SC. Ochrana před vnějším prostředím spočívá v nízké propustnosti kůže pro vodu v důsledku přítomného tukového mazu. ¹ Lipofilní film má zvýšenou resorpci pro látky rozpustné v tucích. Resorpční schopnost kůže se využívá v aplikaci hydrofobních látek pro léčebné účely, např. ve formě mastí. ^{2,5} Hydrofobní kožní povrch zamezuje nadměrným transkutánním ztrátám vody odpařováním a působí protektivně před invazí mikrobů. ⁹ K ochranné bariérové funkci přispívá specifické uspořádání lipidů obklopující korneocyty viz podkapitola 2.1. ¹⁰

1.3.3.2 Antimikrobiální funkce

Kyselý plášť kůže o pH 4–6 vytváří nepříznivé prostředí pro růst patogenních mikroorganismů a naopak podporuje tvorbu fyziologické mikroflóry. ¹¹ Kyselý pH je mimo jiné výsledkem působení bakteriálních esteráz štěpící triacylglyceroly mazu za vzniku mastných kyselin. Imunologickou ochranu nadále plní Langerhansovy buňky. Svoji schopností prezentovat antigen lymfocytům pomáhají tělo ochraňovat před invazí virů a ektoparazitů. ^{2,3,5,6} Počet Langerhansových buněk může být snížen působením intenzivního UV záření. Důsledkem může být snížená obranyschopnost. ¹

1.3.3.3 Ochrana proti záření

Melanin je hnědý pigment syntetizovaný v cytoplasmě melanocytů. Absorbací UV záření ochraňuje hlubší vrstvy kůže před mutagenním účinkem záření. Počet melanocytů se s expozicí UV záření zvyšuje. ^{1,3}

1.3.3.4 Metabolická funkce

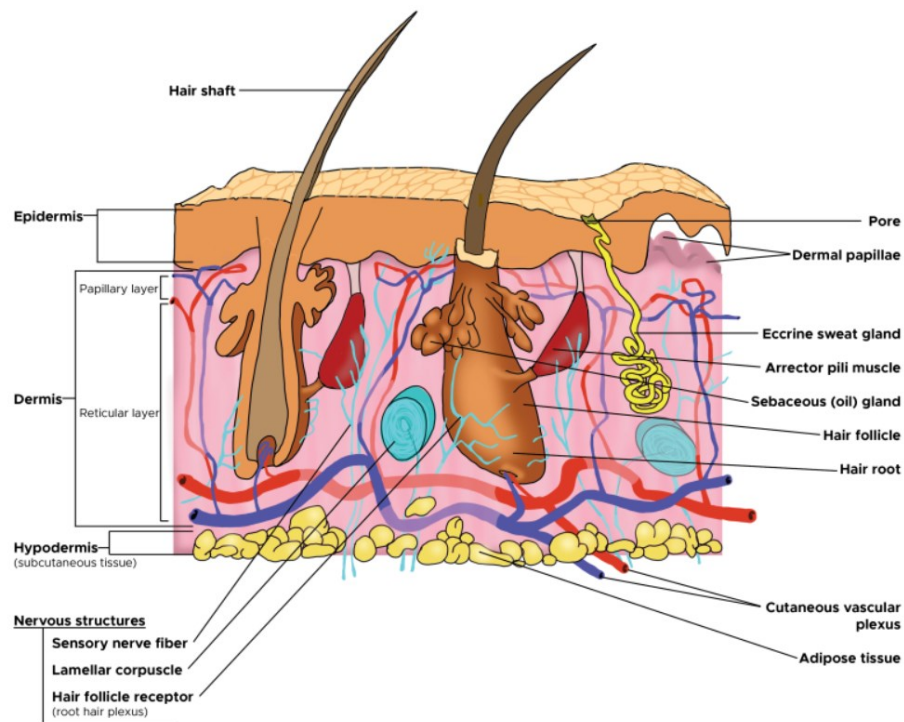
Kůže představuje významný zdroj vitamínu D. Působením UV záření (převážně v oblasti 290–320 nm) dochází k přeměně 7-dehydrocholesterolu ve *stratum granulosum* na cholekalciferol (vitamin D3). ²

1.3.3.5 Hydratační funkce

Hydratační schopnost pokožky snižuje náchylnost ke vzniku chorob. Optimální obsah vody v pokožce by se měl pohybovat kolem 7–10 %. Nižší obsah vede k suchosti kůže, šupinatění až popraskání. ¹² Snížená hydratace může být způsobena nedostatečnou produkcí mazu. Důležitou roli v udržení dostatečné hydratace mají lipidy mezibuněčné hmoty ve SC a voda s hygroskopickými látkami v korneocytech. ¹⁰

1.3.3.6 Senzorická funkce

V kůži jsou široce rozmístěné somato-senzorické receptory pro dotyk, tlak, teplo a pro bolest. ⁵



Obrázek 2 Řez lidskou kůží. Jsou zde viditelné jednotlivé vrstvy a uložení cév, potních žláz, nervových zakončení a vlasových folikul. ⁸

2 Lipidy ve *Stratum corneum*

Následující část bude věnována detailnímu popisu uspořádání lipidové struktury obklopující korneocyty.

2.1 Uspořádání „cihel a malty“

Fyziologické uspořádání lipidových lamel se podílí na ochranné bariéře kůže. ¹⁰ Dokladem je spojitost mezi snížením množství lipidů ve SC a zvýšeným výskytem kožních onemocnění (psoriáza, atopická dermatitida). ^{6,7} Přímá aplikace chybějících fyziologických lipidů by mohla mít terapeutický účinek v oblasti nemocné či zestárlé kůže. ^{7,13}

Zrohovatělou membránu korneocytů vytváří zesítený proteinový obal tvořen zejména involukrinem. Přes Ω -hydroxy skupinu ceramidů lipidové monovrstvy je kovalentně vázána proteinová vrstva na multilamelární lipidovou vrstvu (lipidové lamely). ^{6,7,9} Lipidový obal na rozhraní tak propojuje hydrofilní korneocyty a lipofilní vrstvu lamel. ⁷ Zjednodušeně si lze představit uspořádání „cihel a malty“, kdy „cihly“ symbolizují oploštěné korneocyty, které se zanořují do „malty“ lipidů. ⁹

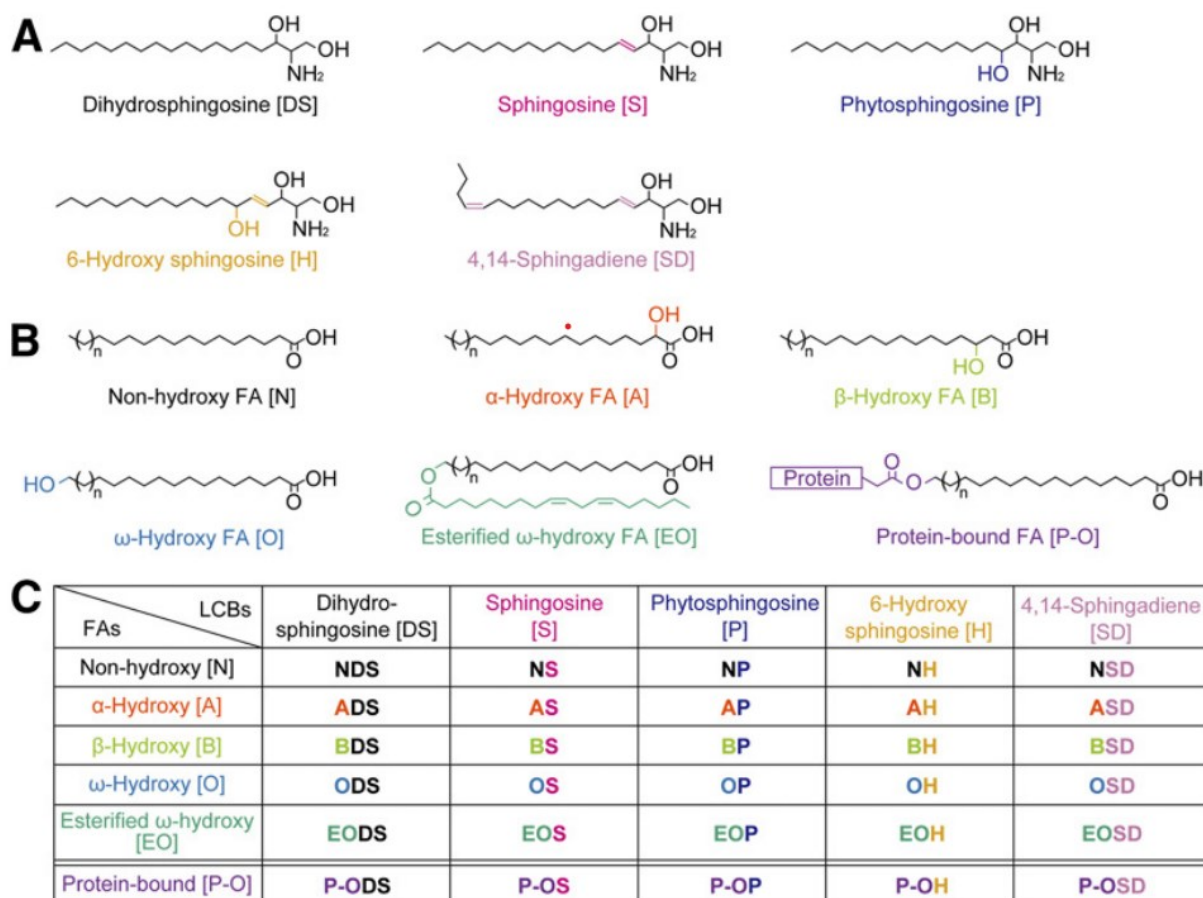
2.2 Třídy lipidů ve SC

Mezi hlavní zástupce lipidové matrix se řadí ceramidy (CER, 50 %), volné mastné kyseliny (VMK, 10-15 %), cholesterol (Chol, 27 %), estery cholesterolu (10 %) a cholesterol-3-sulfát (Chol S, 2-5 %). ^{7,10} Z obecného hlediska se SC skládá z 5–15 % lipidů, 75–80 % proteinů a 5–10 % z doposud neznámého materiálu. ⁷ Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují složení lipidů ve SC. Variabilita mezi pacienty se odvíjí od věku, pohlaví, tloušťky SC, množství mazových žláz či expozicí kůže UV zářením (např. vliv na CholS, kyselinu lignocerovou). ⁹

2.2.1 Ceramidy

CER se skládají z hydrofobní části řetězce mastné kyseliny (MK) a sfingosinové báze (aminoalkohol). Navzájem se pojí přes amidovou skupinu mezi aminoskupinou báze a hydroxyskupinou karboxylu MK. ⁹ U savců se vyskytuje pět typů sfingosinové báze: dihydrosfingosin (DS), sfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H), 4,14-sfingadien (SD) a 5 typů mastných kyselin: nonhydroxy (N), α -hydroxy (A), β -hydroxy (B), ω -hydroxy (O) a esterifikovaný ω -hydroxy (EO) (Obrázek 3). Tabulka C (Obrázek 3) představuje 24 možných kombinací MK se sfingosinovou bází. V lidské epidermis doposud nebyly nalezeny SD báze a β -hydroxy MK. Na obrázku 3B vidíme typickou proteinovou vazbu (P-O) mezi karboxylem

esterifikované ω -hydroxy MK. Porucha produkce EO MK či P-O vede k výskytu kožních onemocnění.⁶



Obrázek 3 Struktura a názvosloví 25 tříd CER vyskytující se u savců.⁶

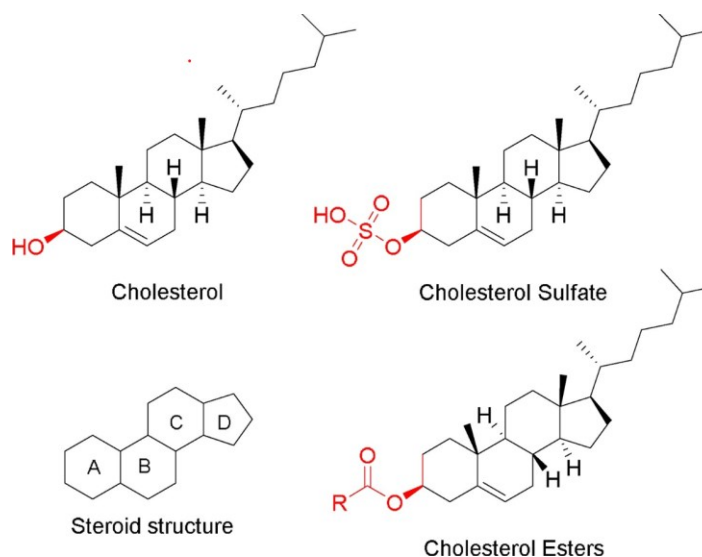
MK mají dlouhé nasycené uhlovodíkové řetězce o délce C24–26. Délka řetězce má významný vliv na kožní permeabilitu. Řetězce s délkou C4–6 zvyšují permeabilitu kůže v důsledku nedostatečných interakcí s ostatními lipidy v lamelární architektuře. Výsledkem mohou být kožní onemocnění.⁹

2.2.1.1 Biosyntéza ceramidů

Neosyntéza CER probíhá ve *stratum granulosum* v keratinocytech. Enzym serinpalmitoyl-CoA transferáza stojí na počátku syntézy všech sfingolipidů, mezi které se řadí i CER. Enzym katalyzuje kondenzační reakci mezi serinem a palmitoyl-CoA. Na konci syntézy jsou CER přeměněny na polární prekurzory (sfingomyelin a glukosylceramid, GlcCer) a přesouvají se do SC pomocí lamelárních tělísek. Tam jsou pak enzymaticky přeměněny na CER. Nejvíce CER v lidském SC vzniká hydrolýzou prekurzorů enzymem β -glukocerebrosidázou. Další cesta syntézy CER vede přes hydrolýzu sfingomyelinu kyselou β -sfingomyelinázou.¹⁴

2.2.2 Cholesterol

Chol a jeho deriváty jsou lipofilní steroidní látky s rigidní strukturou se čtyřmi kruhy označené ABCD (Obrázek 4). Všechny steroly obsahují v poloze 3 hydroxylovou skupinu (esterová vazba u derivátů) a v poloze 17 alifatický řetězec. Chol má zásadní roli v oblasti fluidity a udržuje rigidní strukturu lipidové matrix ve SC.^{9,15} CholS s přítomnou ionizovatelnou skupinou je zásadní pro tvorbu lipidové dvojvrstvy.¹⁴



Obrázek 4 Chemická struktura sterolů vyskytující se v kůži.⁹

2.2.2.1 Biosyntéza cholesterolu

Základem biosyntézy cholesterolu v epidermis je izoprenoidní jednotka. Syntéza začíná reakcí dvou molekul acetyl-CoA za vzniku acetoacyl-CoA. Následující reakce je katalyzována 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) syntázou za vzniku HMG-CoA.¹⁶ Přeměna na mevalonát je zprostředkována enzymem HMG-CoA reduktázou určující rychlost syntézy cholesterolu.¹⁴ Dalšími dvěma enzymatickými reakcemi vzniká základní izoprenová jednotka isopentenylidifosfát (C5). Reakcí šesti izoprenových jednotek vzniká skvalen (30C), jehož cyklizací se přeměňuje na lanosterol (30C). Následuje osmi kroková enzymová reakce na Chol.¹⁶

2.2.3 Mastné kyseliny

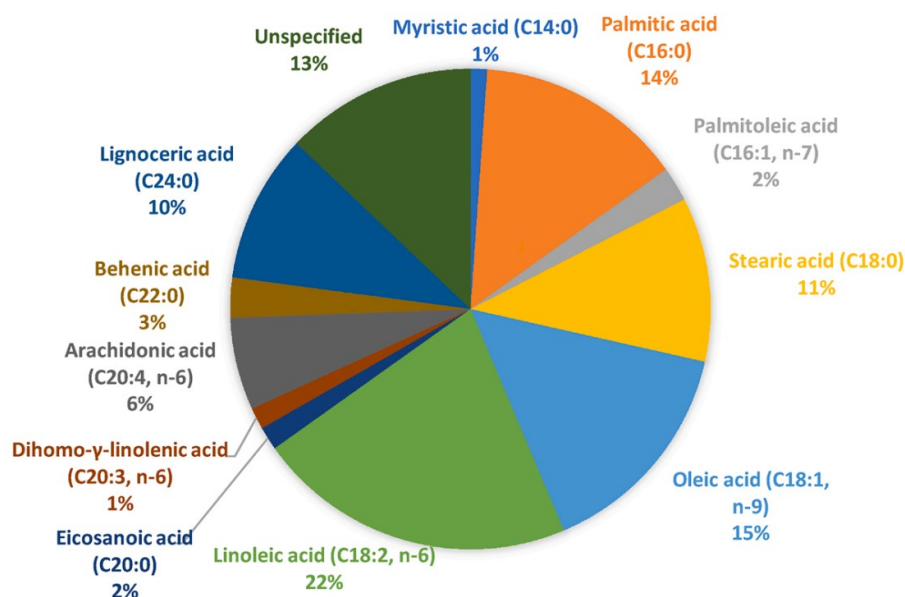
Ve SC se převážně objevují nasycené a nerozvětvené MK o C16–26 přítomné volně (neesterifikované) či vázané v CER.^{9,17} Přítomnost karboxylové skupiny ve struktuře zvyšuje kyselost kožní bariéry, která se pohybuje kolem pH 4–5,5. Společně s CholS jsou jediní zástupci lipidů s ionizovatelnou skupinou, která je zásadní pro tvorbu lipidové dvojvrstvy.¹⁴ V epidermis se vyskytuje široké spektrum volných MK, z nichž nejvíce rozšířená je kyselina

palmitová (C16:0), kyselina stearová (C18:0), kyselina behenová (kys. dokosanová) (C22:0), kyselina lignocerová (C24:0) a kyselina cerotová (hexakosanová) (C26:0). MK s kratším řetězcem (C16, C18, C18:1 a C18:2) jsou umístěné k vnějšímu povrchu epidermis. ^{9,17} V současné době se předpokládá jejich mazový původ, kterým je vysvětlován výskyt na povrchu kůže. Tyto MK jsou pravidelně eliminovány rozpouštěním prostřednictvím čistících surfaktantů. ¹⁷

Méně rozšířené MK (25 % na celkové množství neesterifikovaných MK) jsou nenasyčené. Mezi ně se řadí kyselina olejová (C18:1, n-9), kyselina eikosapentaenová (C20:5, n-3), kyselina dokosaheptaenová (C22:6, n-3) a kyselina linolová (C18:2, n-6). ⁹ Přehled MK vyskytujících se ve SC je znázorněn na Obrázku 5.

2.2.3.1 Biosyntéza MK

Klíčovým enzymem určující rychlost syntézy MK je acetyl-CoA karboxyláza. Ta katalyzuje karboxylaci acetyl-CoA na malonyl-CoA, který je substrátem pro syntézu MK. ¹⁴



Obrázek 5 Procentuální vyjádření MK vyskytujících se ve SC. ⁹

2.2.4 Triacylglyceroly a diacylglyceroly

Jedná se o triestery mastných kyselin. Triacylglyceroly jsou dodávány mazovými žlázami na povrch epidermis. Ve SC mají důležitou roli např. pro bariérovou funkci a epidermální diferenciaci. Hydrolýzou triacylglycerolů se uvolňují MK potřebné k syntéze Ω -O-acylceramidu. ⁹

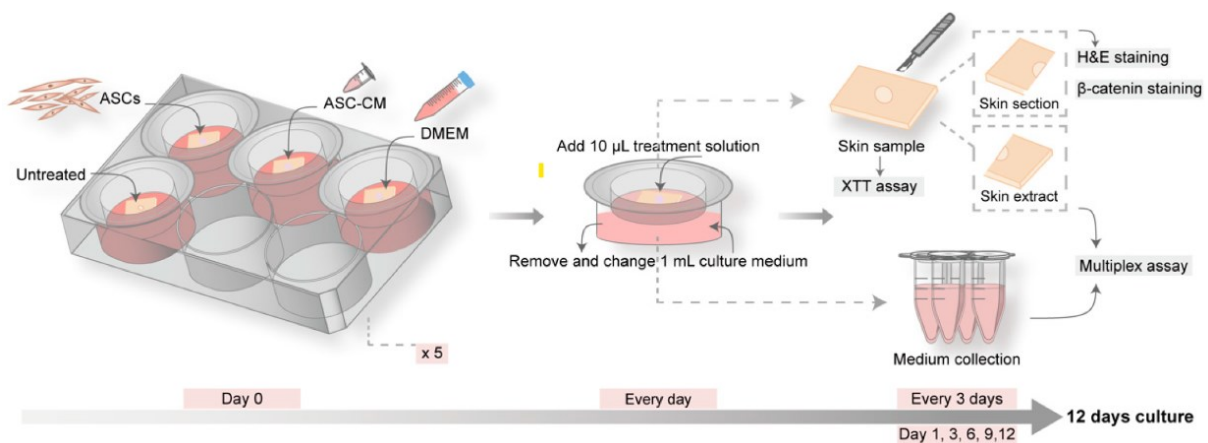
3 Kultivace kožních štěpů

3.1 *Ex vivo* kůže

Ex vivo lidská kůže z plastických operací se jeví jako nejvhodnější 3D model pro farmakologický, chemický, dermatologický a kosmetický výzkum. Umožňuje sledovat patologické, ale i fyziologické procesy v kůži. „Představuje 3D organizaci a kombinaci hlavních zástupců kožních buněk, jako jsou keratinocyty, fibroblasty, Langerhansovy buňky, endoteliální buňky a složky extracelulárního matrix (kolagen, elastin, glykosaminoglykany a proteoglykany).“¹⁸ Výhodou jsou přítomné dermální papily a proteinová vlákna.¹⁸

3.1.1 Význam a využití *ex vivo* kůže (explantát lidské kůže)

Velký význam tkví v eliminaci etické problematiky testování *in vivo* na dobrovolnících či zvířatech.^{18,19} Svoji dostupností a cenou představují přístupnější alternativu k rekonstruovaným modelům.¹⁸ V preklinických studiích je tak dostupný testovací model reflektující složitost lidské kůže, který je navíc standardizovaný a výsledky jsou reprodukovatelné.¹⁹ Rozvoj *ex vivo* modelů otevírá další možnosti testování látek s hojícím a regeneračním účinkem.²⁰ V experimentech se provádí poškození (například UV zářením či mechanicky) *ex vivo* kůže.^{20,21} Příkladem je zkoumaný reparační účinek (přesněji reepitelizace, vaskularizace a modulace zánětlivé imunitní odpovědi) aplikací kmenových buněk odvozených z tukové tkáně na model povrchové kožní rány. Názorný průběh výzkumu *ex vivo* kultivace s testovanými kmenovými buňkami lze vidět na Obrázku 6, kde ASC-CM představuje kondicionované médium kmenových buněk odvozených z tukové tkáně a aplikace ASCs představuje derivované tukové kmenové buňky.²⁰



Obrázek 6 Protokol experimentu účinku kmenových buněk na regeneraci poraněné *ex vivo* kožních modelů.²⁰

Ex vivo kůže může být nadále využita pro definování mechanismů rozvoje infekce v ráně nebo zánětlivých reakcích vznikajících po popálení kůže. Podrobnější poznatky mechanismů mohou vést ke vzniku nové terapie.^{22,23} Prostřednictvím modelů se může sledovat účinek plasmy bohaté na trombocyty na proces regenerace a hojení kůže.²⁴

Kultivace *ex vivo* kůže může sloužit jako model k odhalení mechanismu účinku a hodnocení kosmetických látek používaných ve spojitosti se zkrášlující, léčebnou (akné, vypadávání vlasů) a hojící metodou mikrojehličkování.²⁵

3.1.2 Nevýhody *ex vivo* kůže

Životaschopnost kultivovaných *ex vivo* kožních štěpů je stále časově omezená, jako je tomu u ostatních modelů. Po určitou dobu dochází k ireverzibilním změnám, jako degenerace bazální vrstvy, snížení počtu dermálních papil a oddělení dermis od epidermis. Během vyhodnocování dat je třeba brát do úvahy interindividuální variabilitu dárců.^{18,19} Další nevýhodou je nemožnost pozměnit složení takovýchto modelů, a tím vytvořit model nemocné kůže.

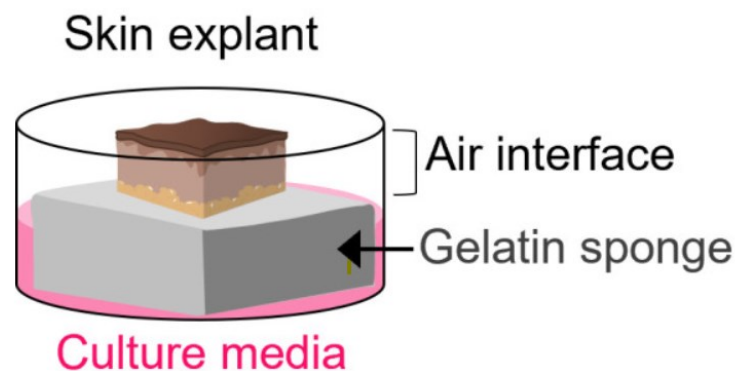
3.1.3 Délka kultivace *ex vivo* kůže v kultivačním médiu

Dlouhotrvající kultivace se zachovalou funkčností kůže je důležitá z toho hlediska, aby mohl být prováděn experimentální výzkum kůže po co nejdelší dobu. Kultivace kůže *ex vivo* v médiu je nejčastěji prováděna po dobu 7–8 dnů.^{18,26,27,28,29} Po tuto dobu jsou pozorovány minimální změny ve struktuře kůže ve srovnání s kůží v den 0.¹⁸ Dlouhotrvající kultivace po dobu 10–12 dnů se jeví jako stále vyhovující z hlediska struktury kůže.^{30,31,32} Den 14. se považuje za hraniční. Do tohoto dne jsou popsány změny v kultivované kůži, jako oddělování epidermis od dermis, změna v tloušťce epidermis (snížení počtu keratinocytů a dalších buněk).^{31,32}

3.1.4 Kultivační techniky

3.1.4.1 Kultivace orgánových systémů na rozhraní vzduch-kapalina

Kožní explantát je umístěn na rozhraní vzduch-kapalina pomocí vyvýšené kovové mřížky¹⁹ nebo položením na želatinovou chirurgickou houbu nasycenou kultivačním médiem, jak lze názorně vidět na Obrázku 7.²⁷ Rozhraní vzduch-kapalina napodobuje fyziologické prostředí neporušené kůže. Díky tomu probíhá přirozeněji keratinizace kožních štěpů. V této kultivační technice jsou pozorovány minimální změny ve struktuře kůže po dobu 7 dnů kultivace.^{18,19}



Obrázek 7 Vzduch-kapalina rozhraní ex vivo kultivace kožních štěpů.²⁷

3.1.4.2 Kultivace orgánových systémů v médiu

Kožní štěp je umístěn do kultivačního média. Výhodou této techniky je možnost provést déletrvající kultivaci se zachovalou viabilitou (viz 3.1.3) v důsledku udržení prokrvení tkáně. Kultivace epidermis může probíhat jak s odstraněnou, tak s přítomnou tukovou vrstvou. Výhodou přítomné tukové vrstvy je možnost simulovat prostředí vzduch-kapalina zvýšením svrchní části kůže nad hladinu média.¹⁹ Dále je možné provést kultivaci v médiu tak, aby byl štěp ponořen pouze částečně a povrch zůstal suchý. Tím je umožněno zrání SC na vzduchu tak jako v lidském těle a zároveň je povrch kůže volný pro případnou aplikaci formulací.^{33,34}

3.1.5 Složení kultivačních médií

3.1.5.1 Média s FBS

Rozšířenou komponentou v kultivačním médiu je fetální bovinní sérum (FBS). Řada výzkumníků předpokládá, že jeho přítomnost je nezbytná pro proliferaci, ne-li pro přežití buněk.^{18,19} V *in vitro* metodě jeho příměs ukazuje na dlouhodobou (40 dní) viabilitu tkáně. Jedním z nejdéle používaným médiem je *Eagle's minimal essential medium* s přidavkem 10 % FBS. Při volbě kultivačního média je rozhodujícím faktorem lokalita odebrané kůže. Pro oblast břicha a prsů se nejčastěji používá *Dubelco's modified eagle medium* (DMEM) s přidavkem 10 % FBS, například pro výzkum léčiv nebo sledování kožní biologické dostupnosti. Pro výzkum potních žláz je typické DMEM + 5 % FBS a pro oblast trupu, rukou, nohou či fetální tkáň se volí DMEM + 10 % fetální telecí sérum /FBS. Využíván je i *Dubelco's modified eagle medium/Ham's F-12 medium* (DMEM-F12) s přidavkem séra.¹⁹

3.1.5.2 Média bez FBS

Mezi zvířecím a lidským sérem existuje jistá odlišnost, která má vliv při kultivaci na epidermální permeabilitu lidské kůže, změnu buněčného cyklu a migraci buněk, buněčnou

diferenciaci a genovou expresi. Z tohoto důvodu se doporučuje započít kultivaci v bezsérovém médiu například ve *William's E medium* s přidavkem dalších látek. Zmíněné médium má definované kultivační prostředí a poskytuje kultivaci dostatečně dlouhou dobu pro výzkum kůže. Bezsérové složení média je nejčastější pro kultivaci pokožky hlavy. Mezi další média patří DMEM, DMEM-F12 či bazální médium keratinocytů. Bazální médium keratinocytů je typicky používané pro kultivaci kůže z oblasti kyčle.¹⁹ Kultivace na rozhraní vzduch-kapalina může být provedena v *EpiLife medium calcium-free*.²⁷

3.1.5.3 Suplementy

Přidávanými suplementy do média bývají antibiotika jako penicilin, streptomycin a antimykotikum amfotericin B. Proti rozvoji zánětu se přidává hydrokortizon. Nadále přidávanými látkami jsou aminokyseliny jako adenin, glutamín a L-serin. Mezi specifičtější suplementy patří insulin, epidermální růstový faktor, L-karnitin, L-thyronin, isoprenalin, kyselina selenová, tokoferol acetát, vitamin C a MK jako kyselina linolová, kyselina palmitová.^{18,26,27}

3.2 Další modely používané pro výzkum kůže

3.2.1 2D modely

Mezi alternativní modely kožní bariéry patří 2D modely využívané ke zkoumání jednotlivých buněk a specifických cílů *in vitro* metodou.³⁵ Řadí se sem testování na buněčných kulturách, které mohou být jednobuněčné nebo tzv. ko-kultury buněk obsahující keratinocyty, melanocyty, fibroblasty či endoteliální buňky. Nevýhodou jsou velké morfologické rozdíly od nativní kůže.^{18,35}

3.2.2 3D modely

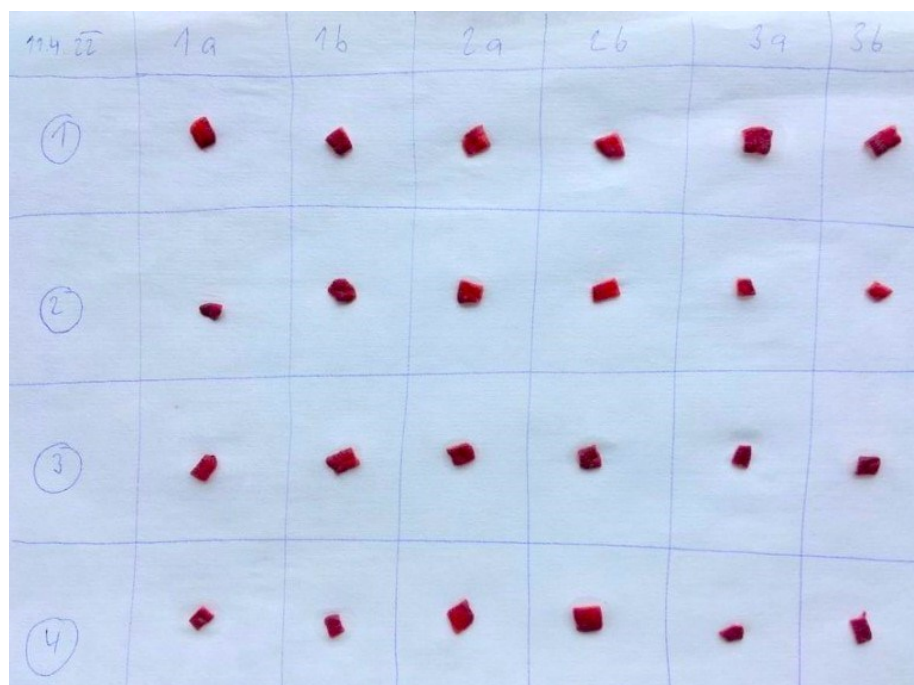
K lidské kůži mají blíže 3D modely obsahující fibroblasty, keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy a/nebo endoteliální buňky. Jedná se buď o rekonstruovanou lidskou epidermis nebo dermis s epidermis v *in vitro* podmínkách.^{18,35} Stále ale nelze hovořit o kožních ekvivalentech. Nedostatkem je absence celé řady složek kůže (dermální papily, nervová zakončení, krevní kapiláry, Merkelovy buňky).^{18,19} *In vitro* 3D modely se od nativní kůže liší zvýšenou propustností látek. K dalším nevýhodám se řadí náročná příprava a vyšší cena.¹⁸

4 TTC assay

4.1 Využití a princip účinku

Látka 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC) je používána jako barevné činidlo prokazující metabolickou aktivitu buněk ve zkoumané tkáni. Pokud je oblast tkáně životaschopná, dojde k redukci bezbarvého TTC přítomnými mitochondriálními dehydrogenázami na červený 1,3,5-trifenylylformazan. V nekróze se tyto enzymy nenachází a nedojde k redukci TTC následovanou zbarvením. U lidí a zvířat se tato metoda používá k detekci ischemické choroby srdeční nebo cévní mozkové příhody. Nadále se TTC využívá ke kvantifikaci životaschopných buněk v planktonických kulturách a vyjádření množství bakterií či kvasinek v koloniích.³⁶

Nověji se měří množství redukováného TTC s možností kvantifikovat životaschopnost kůže.³⁶ Na Obrázku 8 vidíme inkubaci epidermis při 37 °C v TTC roztoku s následným zčervenáním prokazující životaschopnost daných vzorků. Ke kvantifikaci viability je zapotřebí změřit absorbanci vyextrahovaného trifenylylformazanu. Extrakci lze provést do organického rozpouštědla, například do methoxyethanolu. Absorbance je pak měřena při 490 nm. Při práci s trifenylylformazanem je třeba brát v potaz jeho optickou nestabilitu.³⁷



Obrázek 8 Test viability za použití TTC.

5 HPTLC

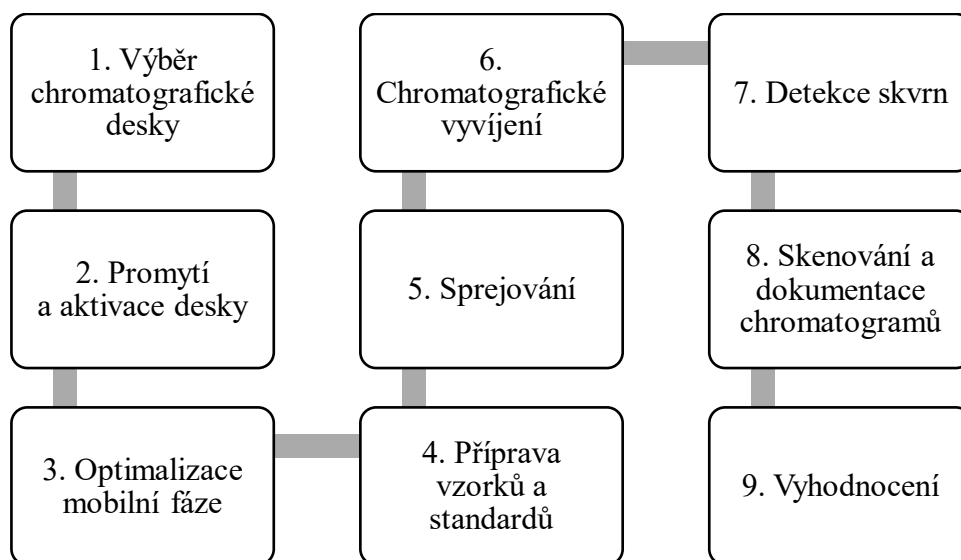
5.1 Charakteristika a princip metody

HPTLC (*high-performance thin layer chromatography*) patří k moderním instrumentálním chromatografickým metodám. Chromatografie zahrnuje skupinu technik umožňující separaci látek ze směsi podle jejich schopnosti se rozdělit mezi dvě nemísitelné fáze. Jedna fáze se označuje jako stacionární (SF) a druhá jako mobilní (MF). HPTLC lze kombinovat s jinými analytickými technikami (např. spektroskopie). Umožňuje provést kvalitativní a kvantitativní analýzu. Další výhody jsou uvedeny v kapitole č. 5.4.³⁸

5.2 Průběh

Vzorek se umístí na SF a je unášen MF. Látky ve vzorku se rozdělí podle své afinity (interakce) mezi obě fáze. Látka s nízkou afinitou ke SF je unášena MF rychleji. Pro správné rozdělení analytů jsou důležité vhodně navolené chemické a fyzikální vlastnosti SF a MF.³⁸ Stále není možné zcela separovat všechny druhy lipidů biologického původu v důsledku jejich složité molekulární stavby.³⁹ Vyhodnocení lze provést pomocí univerzálních a selektivních detektorů s možností elektronického uložení snímků. Všechny kroky lze řídit přes počítač.³⁸

Na Obrázku 9 je vytvořen chronologický postup HPTLC analýzy, jednotlivé kroky jsou podrobněji popsány dále.



Obrázek 9 Stručný postup HPTLC analýzy. Převzato a upraveno.³⁸

Výběr chromatografické desky (1): Pro studium léčiv a lipidů se nejčastěji provádí adsorpce na normálních fázích, tzn. SF je polární tvořena převážně ze silikagelu (silica gel 60). Desky s potaženou silikagelovou vrstvičkou mohou být skleněné nebo hliníkové. Deska se před

analýzou **promyje a aktivuje (2)**, aby se odstranily nečistoty a vlhkost. **MF (3)** může být nepolární např. $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ -kyselina octová 190:9:1,5 (v/v/v) nebo polární jako např. $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ -voda-kyselina octová 66:25:6:3 (v/v/v/v). Z obecného hlediska se SF a MF vybírá metodou pokus-omyl. Volba je závislá na vlastnostech separovaných analytů. ^{39,40}

Příprava vzorku (4) musí být minimalistická, tak aby byl co nejvíce zachován vzorek v nativní podobě. Pokud je vzorek v pevné formě, je potřeba udělat extrakci a následně lze roztok analyzovat. ⁴¹ Na desku jsou **sprejovány (5)** v proužkách vzorky a standardy nejčastěji za použití 100 μl injekční stříkačky a linomatu. ⁴⁰

Nejčastěji se k **vyvíjení desky (6)** používá zakrytá skleněná komora nasycená MF. Deskou se postupně ascendentně vyvíjí MF od startu až k čelu. Deska se následně vysuší (trouba, digestoř, ohřívač desek) tak, aby se MF zcela odpařila. ^{39,40}

Detekce (7) přímá zahrnuje sloučeniny, které vykazují zbarvení. Většina látek (lipidy) nejsou přirozeně zbarvené. Proto se k jejich vizualizaci na desce využívá reakcí tzv. postchromatografické derivatizace. Na analyty je buď navázán UV indikátor (detekční činidlo) a prostřednictvím UV absorpční denzitometrie lze látku detekovat a kvantifikovat. Nebo je látka derivatizována oxidačním činidlem a následně zuhelnatěna pomocí vysoké teploty. ⁴² Aplikace činidla může být např. nástřikem, ponořením desky do detekčního roztoku nebo vystavením parám. Příkladem detekčního činidla je Dragendorffovo činidlo (kofein, papaverin), 2,7-dichlorfluorescein, jodová parní lázeň (rychlé odbarvení pro vyhodnocení lipidů) nebo pro lipidy často používaný 7,5 % CuSO_4 nebo 8 % H_3PO_4 atd. ^{39,40}

Pomocí spektrofotometru (denzitometr, skener) za optimální vlnové délky se vytvoří **snímek/sken (8)** hodnotící vzorky a standardy vedle sebe. Nejčastěji se provádí **kvantifikace (9)** pomocí kalibrační křivky vytvořením standardů pokrývajících celý rozsah koncentrací. ^{40,41}

5.3 Výhody

HPTLC metoda má tyto charakteristiky: selektivní metoda (detekce analytu v přítomnosti dalších složek), citlivá metoda (vytvoření kalibrační křivky pro analyt), validovaná metoda, optimalizace, automatizace, reprodukovatelnost výsledků, relativně rychlá a přesná metoda, cena, skenování, minimální příprava vzorku, potřeba malého množství vzorku, možnost vyhodnocení více vzorků a standardů, relativně jednoduchá instrumentální metoda. ³⁸

5.4 Analýza lipidů v kůži

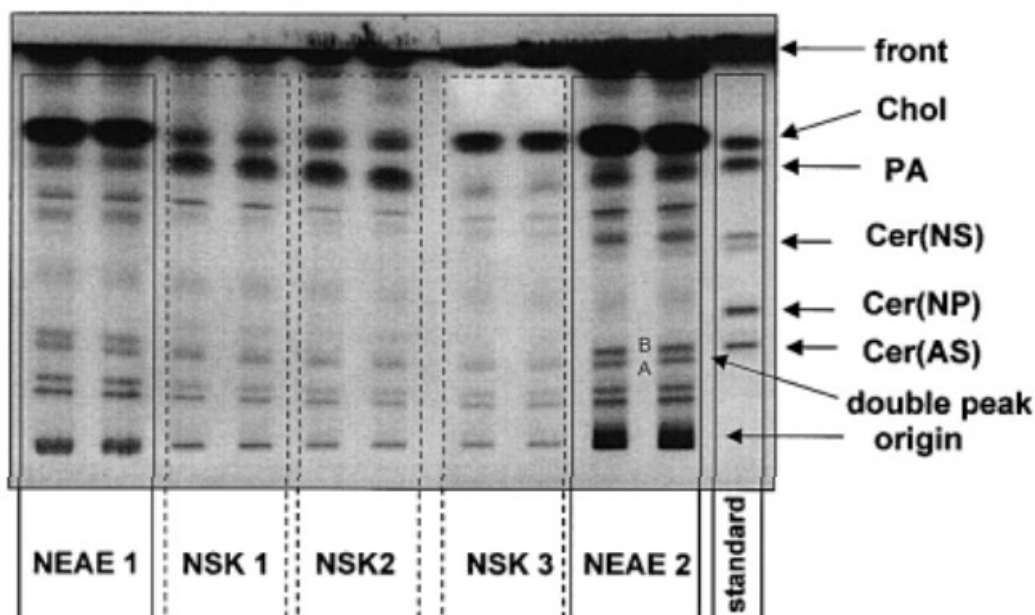
HPTLC umožňuje detekci a kvantifikaci lipidů ze vzorku změřením pomocí densitometrie. Mezi výhody HPTLC (mimo již vyjmenovaných) patří možnost stanovit molekulární strukturu zástupců lipidů CER, sfingolipidů nebo fosfolipidů.⁴³

5.4.1 Extrakce lipidů

K extrakci lipidů se nejčastěji používá Folchova metoda za použití směsi rozpouštědel $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v). Alternativním složením je 2-propanol/ CH_3OH (2:1 v/v) či hexan/ CH_3OH (2:1 v/v) nebo jiné poměry $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$.^{38,39}

5.4.2 Chromatogram HPTLC analýzy lipidů

Obrázek 10 je ukázkou chromatogramu proběhlé HPTLC analýzy lipidů na normálních fázích. Jak lze vidět nejvíce nepolárním lipidem je Chol a u startu naopak nejvíce polárními lipidy jsou CER (AS) a CER (NP). Dvojitý pík ve vzorku s označením NEAE 2 u CER (AS) je vytvořen v důsledku zvýšení polarity systému.⁴⁴ Dalším důvodem výskytu dvojitého píku může být přítomnost homologní série monohydroxylovaného nebo mononenasyceného lipidu lišící se délkou řetězce, jako např. podfrakce CER AS, které mohou být C16,18 nebo C22,24,26.³⁹



Obrázek 10 HPTLC analýza lipidů.⁴¹

Experimentální část

V úvodu experimentální části jsou představeny veškeré chemické látky, biologické látky, přístroje a nástroje, se kterými se během experimentu pracovalo.

Druhá část je věnovaná podrobnému popisu experimentálního plánu, cíle práce a použitých metod. V souhrnu se jedná o přípravu kožních štěpů, kultivace kožních štěpů v samotném DMEM a později s přidavkem suplementů, odebrání vzorků před kultivací k analýze SC a extrahovaných lipidů metodou HPTLC. Na závěr je zařazeno vyhodnocení výsledků experimentu.

6 Materiál a chemikálie

6.1 Přístroje

Dermatom (Aesculap, Německo), laboratorní ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Česko), třepačka LT 3 (Česko), Vortex genie 2 (Scientific industries, USA), Dry Bath Incubator (Major Science, Taiwan), vodní lázeň (VWR International, UK), analytická váha Ohaus Discovery (Švýcarsko).

Práce s kůží za sterilních podmínek byla prováděna v laminárním boxu CleanBench (Haier, Čína). Pro inkubaci kůže v kultivačním médiu byl používán CO₂ inkubátor (PHC Corporation, Japonsko). Médium se pipetovalo za použití laboratorní pipety Eppendorf Research Plus 100-1000 µl (Německo). K přípravě TTC roztoku a médií byla využita pipeta Accu-jet™ pro Pipet Controller (BrandTech™, Německo).

Přehled přístrojů využitých k HPTLC analýze: automatická vyvíjecí komora ADC 2 model, Linomat 5, TLC Scanner 3 (Camag, Švýcarsko). Laboratorní trouba UN 55 (Memmert, Německo).

6.2 Komponenty kultivačních médií

DMEM s obsahem 4,5 g/l D-Glukosy, L-glutaminu a pyruvátu. Druhým zkoumaným médiem byl DMEM/F-12 v poměru 1:1. Přidávanými komponenty byly: 1 % streptomycin/penicilin (S/P), 2,5 µl/ml amfotericin B (AB) a 10 % FBS. Vše bylo zakoupeno od firmy Merck (Německo).

6.3 Lipidy

Nepolární: Chol, kyselina palmitová, CER NS, CER NP, CER AS, (Avanti, USA). CER EOS, CER EOP a CER (S)-AP byly nasyntetizovány v rámci Skin Barrier Research Group na Farmaceutické Fakultě v Hradci Králové.

Polární: sodná sůl Chol S, CER AP, glukosyl ceramid (GlcCer), L- α -fosfatidylcholin, sfingomyelin (Avanti, USA).

6.4 Chemikálie

1,5 % 2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid (TTC), 3% sukcinát sodný, gentamycin sulfát, fosfátem pufrovaný fyziologický roztok pH 7,4 (PBS), 2-methoxyethanol, aceton, trypsin z prasečí slinivky břišní, dodekahydrát hydrogenfosforečnan disodný (Na₂HPO₄·12 H₂O), dihydrát hydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄·2 H₂O), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný

(KCl), chloroform (CHCl_3), methanol (CH_3OH), kyselina octová (CH_3COOH). Vše bylo pořízeno od firmy Merck (Německo).

Derivační činidlo: modrá skalice ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 85% kyselina fosforečná (H_3PO_4), methanol (CH_3OH), Millipore voda.

K promývání kůže byla používána ultračistá voda, která se deionizovala, destilovala a filtrovala přes Millipore Q systém (Farmaceutická fakulta, UK).

6.5 Kůže

Kůže byla poskytována dobrovolníky podstupující plastickou operaci v Privátním chirurgickém centru Sanus v Hradci Králové, po podepsání informovaného souhlasu a schválení Etickou komisí (souhlas č. 5/4/2018). Výzkum se prováděl s kůží z břišní oblasti od 3 dobrovolníků. Ihned po operaci se od epidermis a dermis odstranil podkožní tuk. Kůže byla omyta v Millipore vodě a v PBS (pH 7,4) s gentamycinem a položila se na gázu nasáklou PBS (pH 7,4) s gentamycinem.

6.6 Laboratorní příslušenství

6-jamkové sterilní destičky (VWR International, USA), 96-jamková destička (TPP, Švýcarsko), parafilm M (Sigma-Aldrich, USA), vialky se šroubovým hrdlem (VWR International, USA), 13 mm stříkačkový filtr o velikosti pórů $0,2 \mu\text{m}$ (VWR International, USA), Skleněná HPTLC silikagelová destička $20 \times 10 \text{ cm}$ (Merck, Německo).

7 Použité metody

7.1 Dermatotomy

K získání kožního štěpu se použil dermatom. Na podložní dřívko se umístila gáza a na ni kůže očištěná od podkožního tuku. Pomocí čepele bateriového dermatomu se upravila výška na cca 0,5 mm. Kožní štěp se skalpelem nařezal na potřebný počet čtverců o velikosti přibližně 1×1 cm. Vzorky se umístily na gázu s PBS (pH 7,4) a s gentamycinem.

7.2 Kultivace kožních štěpů

Dermatotomy či nedermatotomy kožní štěpy se pinzetou přendaly do 6-jamkové destičky v laminárním boxu. Napipetovalo se 750 μ l kultivačního média o teplotě cca 37 °C tak, aby byly štěpy částečně ponořeny a epidermis zůstala suchá. V souhrnu se zkoumala tato kultivační média:

1. DMEM
2. DMEM, 1 % S/P, 2,5 μ l/ml AB
3. DMEM, 1 % S/P, 2,5 μ l/ml AB, 10 % FBS
4. DMEM/F-12, 1 % S/P, 2,5 μ l/ml AB
5. DMEM/F-12, 1 % S/P, 2,5 μ l/ml AB, 10 % FBS.

Antibiotika (S/P) se přidávala k zabránění bakteriální kontaminace a antimykotikum (AB) proti vzniku plísně. Vzorky se uložily do inkubátoru za teploty 37 °C s obsahem 5 % CO₂. Médium se měnilo po 48 hodinách.

7.3 Viabilita, TTC assay

Pro přípravu TTC roztoku se použil 1,5 % TTC a 3% sukcinát sodný v PBS. Odběr kůže pro stanovení viability se prováděl v den výměny média. U ostatních vzorků se pokračovalo v kultivaci. Dvě čtvrtiny kultivované kůže se přendaly do 2 ml vialek a jednotlivě se zjistila jejich hmotnost (g). Samotné stanovení viability pak probíhalo na základě již publikovaných metod.^{37,45} Ke vzorkům se přidal 1 ml TTC roztoku. Po napuštění dusíkem proběhla inkubace při 37 °C. Zčervenáním kůže (vyloučení trifenylyformazanu) se prokázala životaschopnost epidermis. K osušeným vzorkům kůže se pipetovalo 1 ml methoxyethanolu a inkubovalo se přes noc na tmavém místě za laboratorní teploty. Methoxyethanol s vyextrahovanými látkami se přenesl do tmavých ependorfek. Skladovalo se při -20 °C. Pro ověření správnosti nastavených podmínek a pro výpočet viability se připravila negativní kontrola (povaření

v Millipore vodě) a blank (inkubace vzorku v 1 ml PBS). Následující den bylo pipetováno v duplikátech 100 μ l do 96-jamkové mikrodestičky a změřila se absorbance při 490 nm. Kvantitativně se viabilita vyjádřila absorbančí vzorku, od které se odečetla absorbance negativní kontroly dělené hmotností kůže v gramech a množstvím přidávaného rozpouštědla v mililitrech a převedla na procenta.⁴⁵

7.4 Izolace *stratum corneum* (SC)

Část kožních štěpů kultivovaných ve zkoumaném médiu se odebralo pro izolaci SC. Svrchní část kůže byla odejmuta působením trypsinu při teplotě 32 °C. SC se očistilo v HPLC vodě-acetonu-HPLC vodě a přes noc bylo ponecháno v exsikátoru. SC se skladovalo při -20 °C.

7.5 HPTLC analýza

7.5.1 Extrakce lipidů

Uchované SC v mrazicím boxu se rozmrazilo a vysušilo v exsikátoru. Zjistila se hmotnost SC v mg a doplnil se 1 ml rozpouštědla ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 2/1, v/v) na mg SC. Extrakce probíhala s mírnými modifikacemi, podle již popsané metody.⁴⁶ Nejprve se extrahovalo 90 min na třepačce.³⁸ Následovala filtrace za použití 13 mm stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,2 μ m. Extrakt lipidů se nasál do mikrostříkačky, jehla se zaměnila za filtr a obsah se vypustil do nové 4 ml vialky přes filtr. Dusíkem se odpařilo rozpouštědlo. Ke zkoncentrovaným lipidům se znovu napipetovalo rozpouštědlo v ml/mg a celý postup se opakoval. Vzorky se sušily přes noc v exsikátoru a byly skladovány při -20 °C do HPTLC měření.

7.5.2 Kalibrační roztoky

Připravovaly se dvě kalibrace s polárními a nepolárními lipidy, které se fyziologicky vyskytují v lidském SC. Za nepolární lipidy byly zvoleny: Chol, kyselina palmitová a CER EOS, EOP, NS, NP, AS, (S)-AP. Ředilo se 1 μ g/ml rozpouštědlem $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v). Druhou kalibraci tvořily polární lipidy: CholS, sfingomyelin, fosfatidylcholin, CER AP, GlcCer. Ředilo se 0,5 μ l/ml. Vialky se pro lepší rozpuštění zvortexovaly a sonifikovaly. Kalibrace se uchovaly při -20 °C.

7.5.3 HPTLC měření

Pomocí HPTLC se zjišťovalo, jaký vliv měla kultivace na lipidy ve SC. Extrakcí získané lipidy se porovnály s kalibračním roztokem obsahující lipidy přítomné v lidské kožní bariéře. HPTLC bylo provedeno podle publikované metody s mírnými úpravami.⁴⁷ Postupovalo se následovně.

Před vlastním nástřikem se nejdříve aktivovala silikagelová skleněná deska 20×10 cm. Parami rozpouštědla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) se nechala 15 min saturovat a rozpouštědlem pro vyvíjení se promyla. Deska byla vložena do trouby na 120°C , 30 min.

V programu Vision CATS se nastavily podmínky pro HPTLC analýzu: velikost desky 20×10 cm a vzdálenost nástřiku od okraje v mm. Pro vyvíjení se předvolila použitá mobilní fáze ve složení pro nepolární lipidy: CHCl_3 , CH_3OH , kyselina octová 95:4,5:0,75 (v/v/v) a vyvíjení do 85 mm. Složení pro polární lipidy: CHCl_3 , CH_3OH , kyselina octová a voda 66:25:6:3 (v/v/v/v) a vyvíjení do 85 mm. Nastavila se délka saturace na 15 min, délka aktivace desky na 10 min a délka sušení na 5 min pro nepolární a 15 min pro polární lipidy. Vyvíjení probíhalo při kontrolované vlhkosti (33–36 %) a teplotě (25 – 27°C). U skeneru se zvolil slit na $4 \times 0,3$ mm, deuterium a vlnová délka 350 nm. Připravilo se přístrojové vybavení. Byl použit přístroj pro nástřik vzorků Linomat 5, automatická vyvíjecí komora ADC 2 a skener TLC Scanner 3.

Sprejování pomocí Linomatu proběhlo ve střídavém pořadí kalibrace a vzorek (polární/nepolární deska). Na začátku a na konci byly nanášeny kalibrace. Vzorek se nastříkoval v koncentraci 1 mg/200 μl rozpouštědla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v). Vzorky se po HPTLC analýze daly odpařit pod dusík a uchovaly se v mrazicím boxu.

Nasprejovaná deska se vložila do připravené automatické vyvíjecí komory. Proběhla saturace a vyvíjení desky dle nastavených podmínek.

Nasprejované lipidy byly zviditelněny derivatizačním činidlem (7,5 % CuSO_4 , 8 % H_3PO_4 , 10 % MeOH ve vodě). Doba působení roztoku na lipidy byla v rozmezí 10–15 s. Deska se vložila do trouby na 160°C a po 20 minutách byly viditelné všechny skvrny lipidů (poslední kyselina palmitová).

Deska se naskenovala a vytvořila se kalibrační křivka v závislosti koncentraci lipidů na absorbanci. Body tvořící křivku byly posuzovány pomocí korelačního koeficientu. Koncentrace lipidů (μg) ve 20 μl nastříkovaného rozpouštědla byla přepočítána na hmotnost SC v mg. Data se převedla do programu MS Excel a vyhodnotil se obsah lipidů ve SC.

8 Výsledky a diskuze

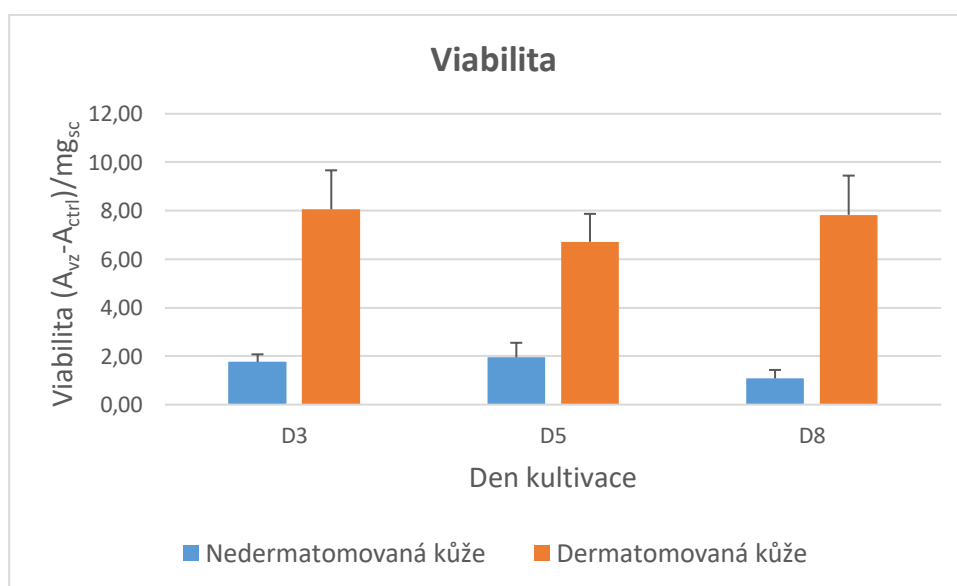
Cílem této práce bylo stanovit vhodné podmínky pro kultivaci kožních štěpů, aby bylo v našich laboratorních podmínkách dosaženo dostatečné viability a zároveň byla zachována biosyntéza kožních lipidů. Model byl testován nejprve v pilotních experimentech, kde byly nastavovány vhodné podmínky (dermatomování kůže, složení médií) a dále validován několika opakovanými experimenty za stanovených podmínek. Podle toho jsou tedy výsledky rozděleny do dvou odpovídajících částí.

8.1 Nastavení podmínek kultivace

8.1.1 Porovnání dermatomované a nedermatomované kůže

V první části experimentu byla prováděna kultivace s dermatovanou a nedermatovanou kůží. Cílem bylo zjistit, zda je výsledná viabilita závislá na úpravě tloušťky kůže a nastavit správné podmínky kultivace. V tomto pilotním experimentu bylo jako kultivační médium využito samotné DMEM a ke každé kůži se pipetoval 1 ml média. TTC assay byla provedena v D3, D5 a po ukončení kultivace (D8). Sedmý den kultivace byla zjištěna kontaminace dermatomované kůže jednoho vzorku, jehož kultivace byla tedy ukončena dříve.

Na Obrázku 11 vidíme významný rozdíl dosažené relativní viability mezi dermatovanou a nedermatovanou kůží v D3, 5 a 8. Hodnoty viability nedermatomované kůže dosahují průměrných hodnot v D3 $1,76 \pm 0,32$, v D5 $1,95 \pm 0,60$ a v D8 $1,08 \pm 0,35$ a dermatomované kůže v D3 $8,06 \pm 1,61$, v D5 $6,72 \pm 1,15$ a v D8 $7,83 \pm 1,62$.



Obrázek 11 Porovnání viability nedermatomované a dermatomované kůže.

Můžeme tedy shrnout, že pro dosažení vyšší relativní viability během kultivace, je vhodné kůži dermatomovat na cca 0,5 mm.

Výše zmíněný výskyt plísňe na několika vzorcích, může být zapříčiněn nepřítomností antimykotika v kultivačním médiu nebo zavedením kontaminace během výměny média. Do kultivačního média tedy bylo během následujících experimentů vždy přidáváno AB a S/P.

Zároveň bylo zjištěno, že při aplikaci 1 ml média ke každému vzorku, médium omývá i povrch dermatomované kůže, což je při stratifikaci SC nežádoucí.³³ Z toho důvodu bylo zapotřebí snížit objem přidávaného média na 750 μ l.

8.1.2 Hledání vhodného kultivačního média

Na základě literatury^{18,19,26} byla vybrána čtyři média, kde základem bylo vždy DMEM a zjišťoval se vliv přísadky F-12 a FBS. Zároveň byla k médiu vždy přidána antibiotika a antimykotika. Přesné složení médií je zde pro přehled zopakováno v Tabulce 1. Pomocí TTC assay a HPTLC se posuzoval vliv média na relativní viabilitu a obsah lipidů v kultivované kůži (SC). Viabilita byla změřena u 24 vzorků kultivovaných ve čtyř zkoumaných médiích po dobu 5 dnů. Po tuto dobu jsou pozorovány minimální změny ve struktuře kůže ve srovnání s kůží v den 0.¹⁸ Po ukončení kultivace bylo odebráno SC a lipidy extrahovány. Na HPTLC analýzu se sprejovaly polární a nepochární lipidy. Protože se jednalo o zdravou kůži, byl předpokládán nízký obsah polárních lipidů ve SC. Z tohoto důvodu byl kladen větší důraz na vyhodnocení nepochárních lipidů.

Tabulka 1 Přehled složení kultivačních médií M1, M2, M3 a M4.

Označení kultivačních médií	Komponenty kultivačních médií			
	DMEM (/F-12)	1 % S/P	2,5 μ l/ml amfotericin B	10 % FBS
M1	DMEM	ANO	ANO	NE
M2	DMEM	ANO	ANO	ANO
M3	DMEM/F12	ANO	ANO	NE
M4	DMEM/F12	ANO	ANO	ANO

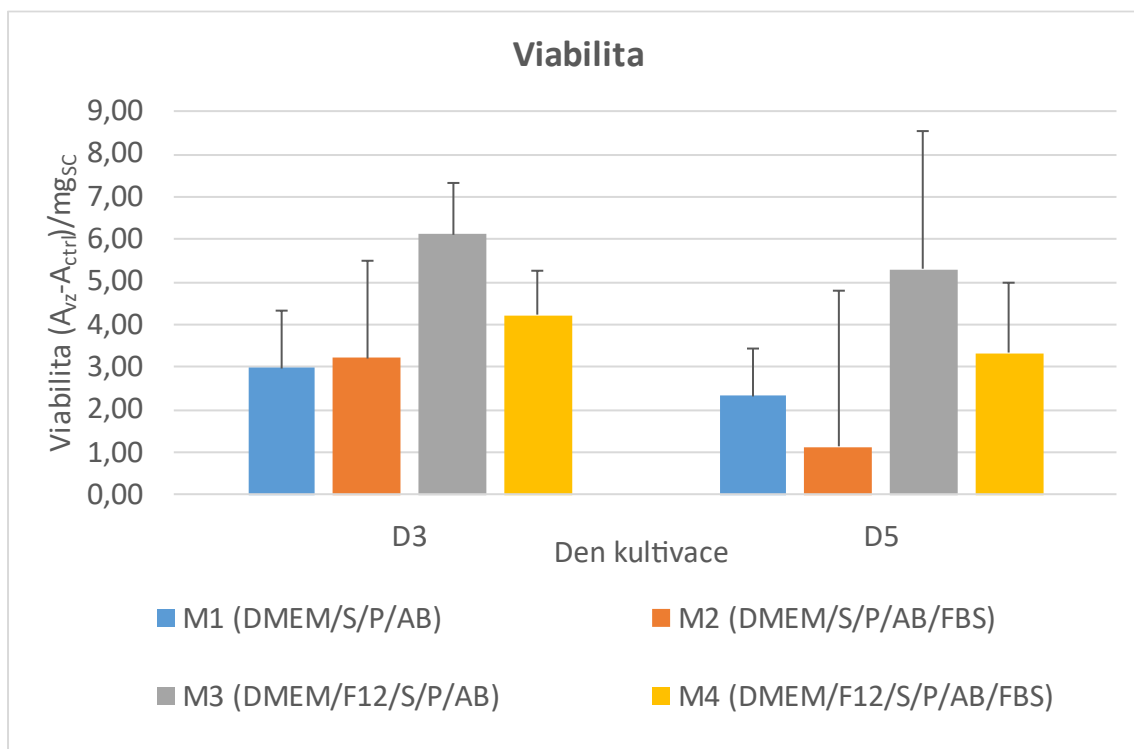
8.1.2.1 Viabilita sledovaná pomocí TTC assay

Na Obrázku 12 vidíme porovnání průměrných relativních viabilit jednotlivých médiích po třech a pěti dnech kultivace.

V M1 po tří denní kultivaci (D3) je viabilita $2,97 \pm 1,37$, která klesá pátý den kultivace (D5) k $2,32 \pm 1,09$. Po kultivaci v M2 v D3 dosahuje viabilita hodnoty $3,20 \pm 2,30$ a v D5 se

snižuje k $1,13 \pm 3,67$. Po kultivaci v M3 je v D3 změřena viabilita na $6,12 \pm 1,20$ a v D5 klesá k $5,29 \pm 3,25$.

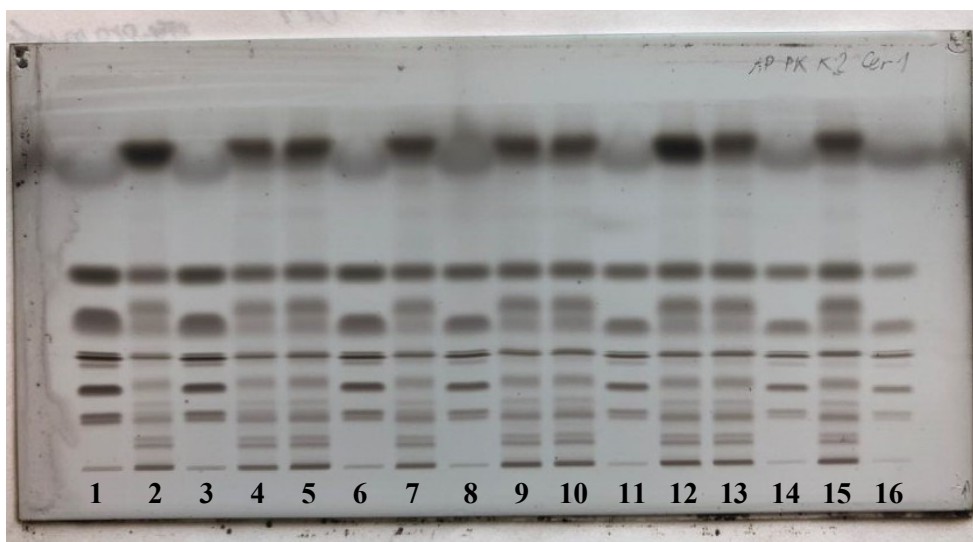
V M4 dosahuje viabilita v D3 $4,21 \pm 1,03$ a v D5 se snižuje k $3,32 \pm 1,65$. Nejvyšších hodnot viability je tedy dosaženo v D3 u M3 a M4. U všech médií je pozorován klesající trend viability s délkou kultivace.



Obrázek 12 Graf viability 2. kultivace ve čtyř médií.

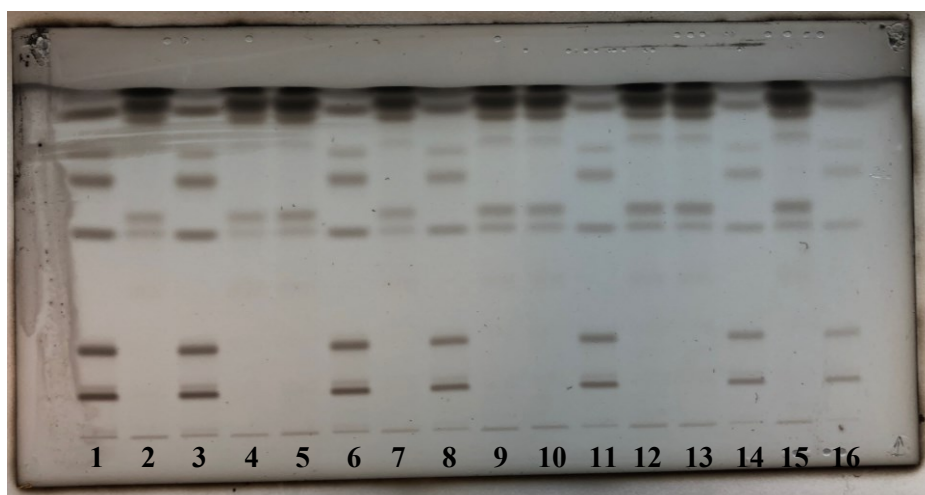
8.1.2.2 Obsah lipidů stanovený pomocí HPTLC

Na Obrázku 13 je ukázka reprezentativního chromatogramu nepolárních lipidů. Lze vidět separované lipidy v závislosti na jejich polaritě neboli afinitě k MF či SF. V dráze 1, 3, 6, 8, 11, 14, 16 se nachází kalibrační roztoky lipidů v klesající koncentraci. Mezi kalibrační roztoky jsou umístěné vzorky (extrakty lipidů) kultivované ve čtyřech médiích o složení viz tabulka 11. V dráze 2 se nachází kontrolní vzorek. V dráze 4, 5 je vidět kultivace v M1, v dráze 7, 9 v M2, v dráze 10, 12 v M3 a v dráze 13, 15 v M4. Skvrnu Chol vidíme nejbliže k čelu, retenční faktor je 0,6. Jedná se o zástupce nejvíce nepolárního lipidů. Následují MK a jednotlivé CER v pořadí: CER EOS, CER NS, CER EOP, CER NP, CER AS a CER AP.



Obrázek 13 Reprezentativní chromatogram pro nepolární lipidy.

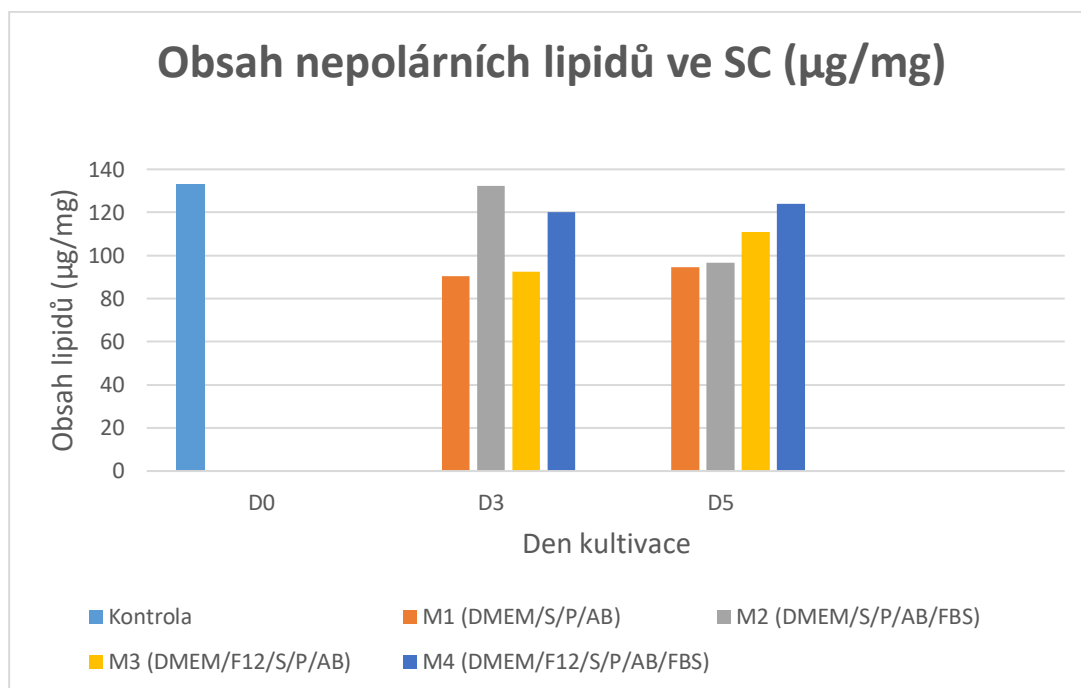
Na Obrázku 14 je zobrazen reprezentativní chromatogram s polárními lipidy. Kalibrace se nachází ve stejných drahách jako na chromatogramu výše, obsahuje (shora) CER AP, GlcCer, CholS, sfingomyelin a fosfatidylcholin. Zde vidíme, že SC obsahuje malé množství polárních lipidů, jak bylo předpokládáno kvůli tomu, že ve zdravém SC je již většina prekurzorů přeměněna na nepolární lipidy. Za zmínku stojí pouze CholS, jehož obsah ve SC následuje podobný trend jako nepolární lipidy. Retenční faktor CholS je 0,7, nachází se v blízkosti čela.



Obrázek 14 Reprezentativní chromatogram pro polární lipidy.

Co se týče kvantifikace lipidů, u všech médií, mimo M2, se objevuje rostoucí trend obsahu lipidů ve SC (Obrázek 15). Na grafu je porovnání s D0, tedy lipidy SC izolované před kultivací s lipidy izolovanými ze SC v D3 a D5. V tomto ohledu má nejzajímavější výsledky M3 a M4 (M3 z 92,51 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na 110,85 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a M4 z 120,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na 124,04 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Naopak

u M2 je pozorován prudký pokles lipidů (zejména VMK z 40,62 na 26,78 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Jedná se o druhý nejnižší obsah lipidů ve SC v D5 s obsahem 96,66 $\mu\text{g}/\text{mg}$.



Obrázek 15 Graf HPTLC analýzy, 2. kultivace.

8.1.3 Vyhodnocení pilotního experimentu

Z TTC assay a HPTLC analýzy lze zkonstatovat, že přidavek F-12 k DMEM v M3 a M4 je pravděpodobně pro delší kultivaci dermatomované kůže příznivější než samotný DMEM. Tento výsledek koreluje s literaturou, kde bylo nalezeno, že DMEM je používáno především pro krátkodobější kultivaci kůže.^{18,34} Ham's F-12 je komplexnější médium, které obsahuje více živin, a je proto častěji využíváno v kultivaci kožních štěpů.³⁴ Důležitým poznatkem je skutečnost, že během kultivace v M3 a M4 nedochází k poklesu obsahu lipidů ve SC, jako tomu je u M1 a M2.

Co se týče přídavku FBS, není pozorován jednoznačný efekt na viabilitu a obsah lipidů. Dle obecných doporučení popsanych v úvodu této práce byla provedena kultivace i bez přítomné FBS složky. Při počínajícím experimentu je vhodné zjistit, zda odlišnost zvířecího séra (přítomnost růstových faktorů) od lidského nemá vliv na strukturu a funkčnost kultivované lidské kůže.¹⁹

Závěrem je tedy možné shrnout, že média s obsahem F-12 se zdají být vhodnější z hlediska viability a zároveň nemají negativní vliv na množství lipidů ve SC. Vhodnost FBS

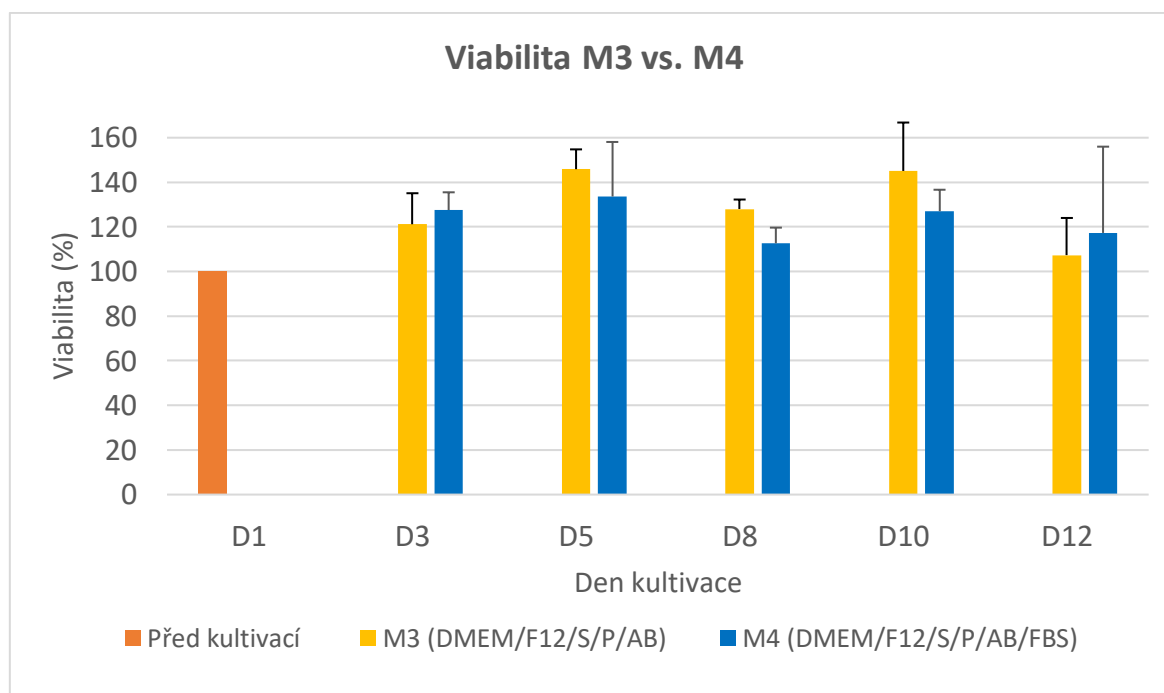
pro tyto modely nebyla jednoznačně prokázána. Proto byla pro další experimenty zvolena média M3 a M4.

8.2 Validace modelu

Experiment byl tedy pro potvrzení vhodnosti vybraných podmínek zopakován ve větším měřítku. Viabilita byla změřena u 15 vzorků kultivovaných 12 dní ve dvou vybraných médiích (M3 a M4), pro jednotlivé dny byla provedena TTC assay a extrakce lipidů ze SC. Tyto lipidy pak byly dále podrobeny HPTLC analýze.

8.2.1 TTC assay

Na Obrázku 16 je znázorněn přehled naměřených viabilit vzorků v M3 (žlutě) a M4 (modře) a jejich porovnání se vzorkem představující 100 % viabilitu s označením D0 (oranžově). Jednalo se o kožní štěp před kultivací, o stejné velikosti (cca 1 × 1 cm) a od stejného dárce.



Obrázek 16 Graf viability 3. kultivace ve dvou médií.

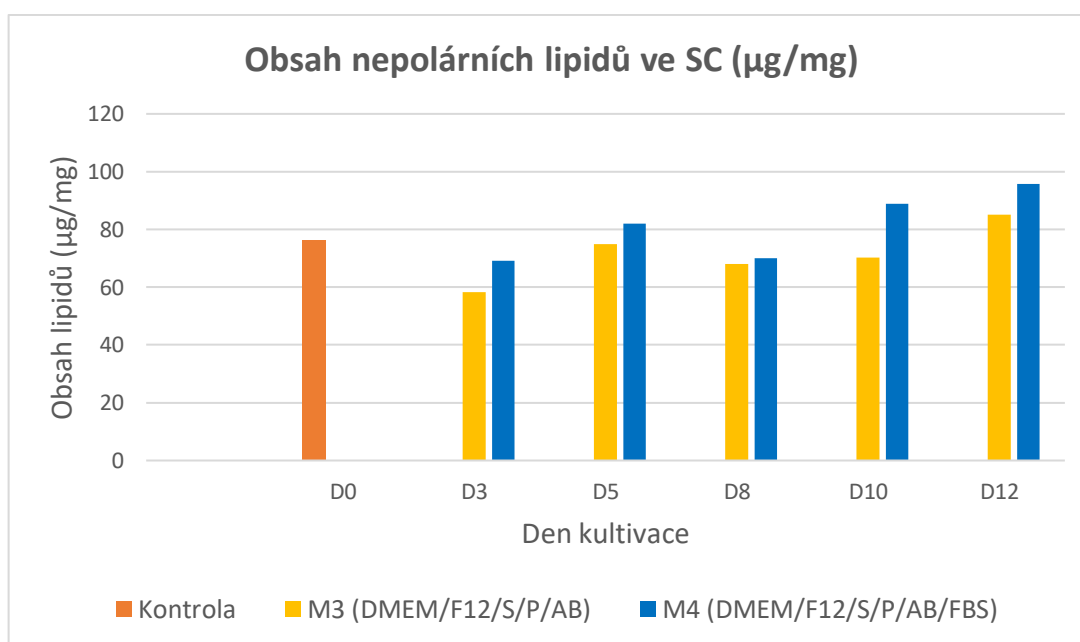
Hlavním poznatkem je skutečnost, že po dobu 12 dní je u M3 a M4 viabilita zachována. Viabilitu u obou médií lze považovat za srovnatelnou. Délka kultivace je v rámci zachování viability v souladu s literaturou. Při delší kultivaci se již začínají objevovat změny ve struktuře kůže.^{30,31,32} Hodnocení životaschopnosti *ex vivo* kůže pomocí TTC assay je prokazatelně citlivější než jiné testy viability, jako např. uvolnění laktátdehydrogenázy nebo MTT assay. Mezi další výhody patří rychlost a jednoduchost metody. Z uvedených důvodů lze TTC assay

považovat za metodu první volby k testování viability *ex vivo* kůže. V literatuře je popsán významný pokles viability od 4. dne kultivace, který by mohl zkreslovat výsledky testovaných sloučenin při dlouhodobé kultivaci.¹⁸ V tomto experimentu je zásadní, že viabilita po dobu 12 dní je srovnatelná s viabilitou kontrolního vzorku před kultivací. Tudíž se předpokládá minimální vliv kolísavé viability na výsledky testovaných látek.

8.2.2 HPTLC analýza

8.2.2.1 Obsah lipidů v jednotlivé dny kultivace

Nejprve byly hodnoceny lipidy extrahované ze SC po každém odběru (D3, D5, D8 a D12), aby bylo zjištěno, jestli dochází ke změnám ve všech sledovaných dnech. Je potřeba dodat, že každý vzorek byl analyzován pouze jednou, protože se jedná pouze o orientační měření. Na obrázku 17 je graf znázorňující vyhodnocení HPTLC analýzy porovnávající kultivaci vzorků v M3 a M4. Oranžově je znázorněna kontrola, tedy lipidy extrahované ze SC odebraného z kůže před kultivací. Žlutá barva znázorňuje M3 a modrá M4. U obou médií se potvrdil vzrůstající trend lipidů z D3 na D12 (M1 58,18–85,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 69,21–95,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ u M2). V poslední den kultivace byl u obou médií převyšena obsah nepolárních lipidů kontrolního vzorku 76,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. M3 85,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$, M4 95,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

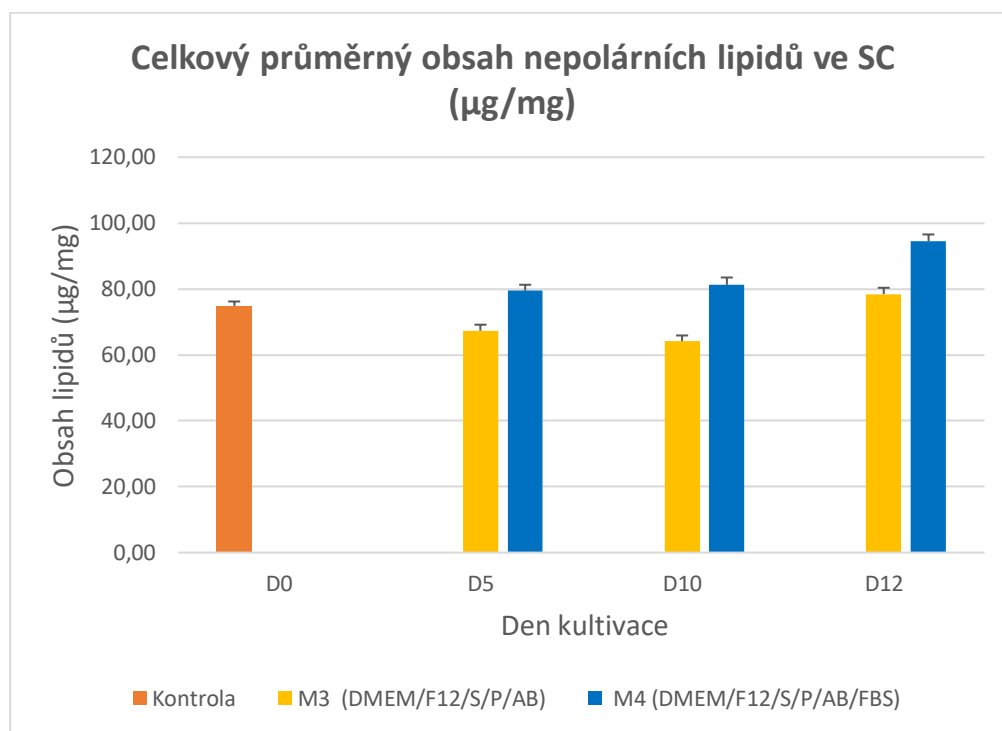


Obrázek 17 Graf HPTLC analýzy 3. kultivace v M3 a M4, D3–D12.

8.2.2.2 HPTLC analýza vybraných vzorků

Jelikož na začátku kultivace nebyly sledovány výrazné změny v obsahu lipidů (D3–D8), byly následně porovnány s kontrolou pouze D5, D10 a D12. Na grafu (Obrázek 18) je opět

oranžově značena kontrola, kde byl celkový obsah nepolárních lipidů $74,85 \pm 1,35 \mu\text{g}/\text{mg}$. Průměrný obsah nepolárních lipidů v D12 u M3 (žlutě) byl změřen ve výši $78,45 \pm 1,91 \mu\text{g}/\text{mg}$ a v druhém médiu (modře) $94,49 \pm 2,06 \mu\text{g}/\text{mg}$. V D5, 10 a 12 byl naměřen v M4 srovnatelný nebo vyšší průměrný obsah lipidů jako v kontrolním vzorku. V M3 byl zjištěn v D5, 10 a 12 nižší průměrný obsah lipidů. Průměrné hodnoty obsahů nepolárních lipidů jsou zobrazeny na Obrázku 18.

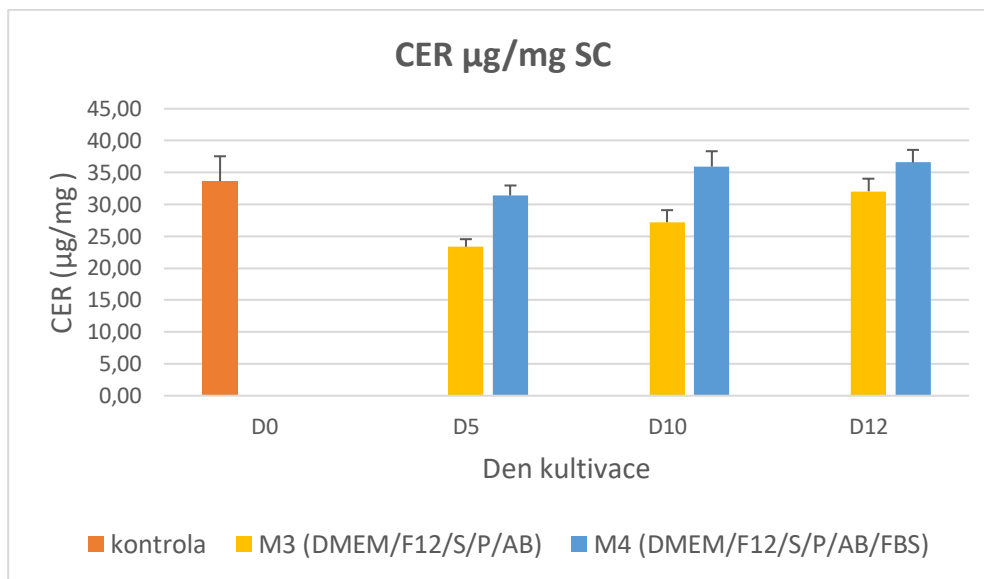


Obrázek 18 Graf HPTLC analýzy, průměr obsahů lipidů vybraných vzorků.

Z naměřených hodnot HPTLC analýzy lze zkonstatovat, že v M4 je zachováno srovnatelného či vyššího obsahu nepolárních lipidů v porovnání s kontrolou v D5, 10, 12. V M3 je v souhrnu nižší až srovnatelný obsah lipidů v porovnání s kontrolou v D5, 10, 12. Z naměřených hodnot ze dvou kultivací se opakovaně pozoruje nižší nález lipidů v M3 oproti M4. Zvýšený obsah lipidů ve SC po kultivaci v M4 by mohl naznačovat růst SC v průběhu kultivace. Je však třeba, aby tato domněnka byla v budoucnu prokázána i dalšími metodami, jako je například mikroskopie řezu kůží.

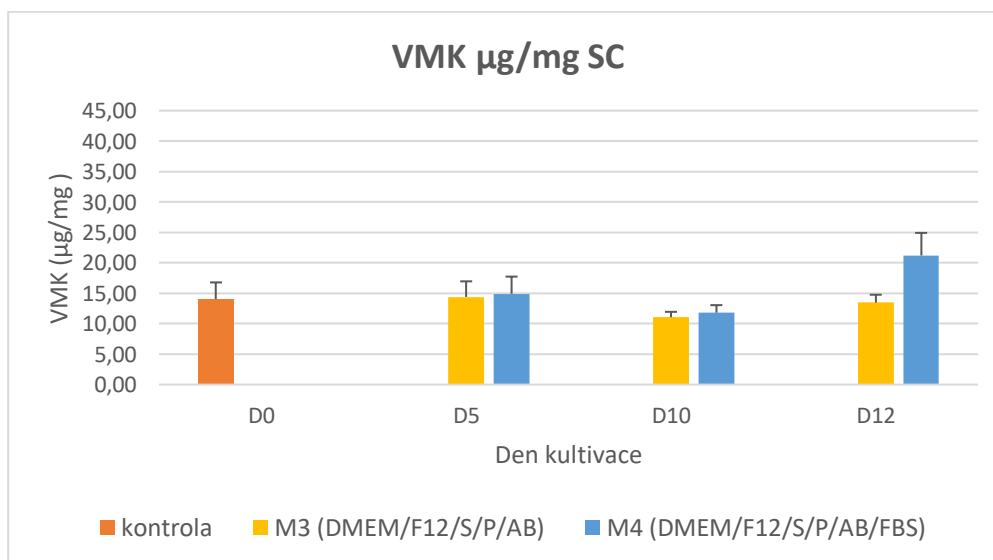
Dále byl porovnán obsah jednotlivých podskupin lipidů (Chol, MK, CER) ve vzorcích v D5, D10 a D12. Obsah CER je znázorněn na grafu (Obrázek 19). U obou médií je znatelný rostoucí trend obsahu CER, tedy u M3 v D5 $23,35 \pm 1,19 \mu\text{g}/\text{mg}$ a v D12 $32,06 \pm 1,98 \mu\text{g}/\text{mg}$. U M4 v D5 $31,40 \pm 1,57 \mu\text{g}/\text{mg}$ a v D12 $36,58 \pm 1,97 \mu\text{g}/\text{mg}$. M4 prokazuje značnou výhodu

oproti M3 a to takovou, že po dobu celé kultivace je v M4 dosaženo srovnatelného obsahu CER jako v kontrolním vzorku ($33,62 \pm 0,98 \mu\text{g}/\text{mg}$).



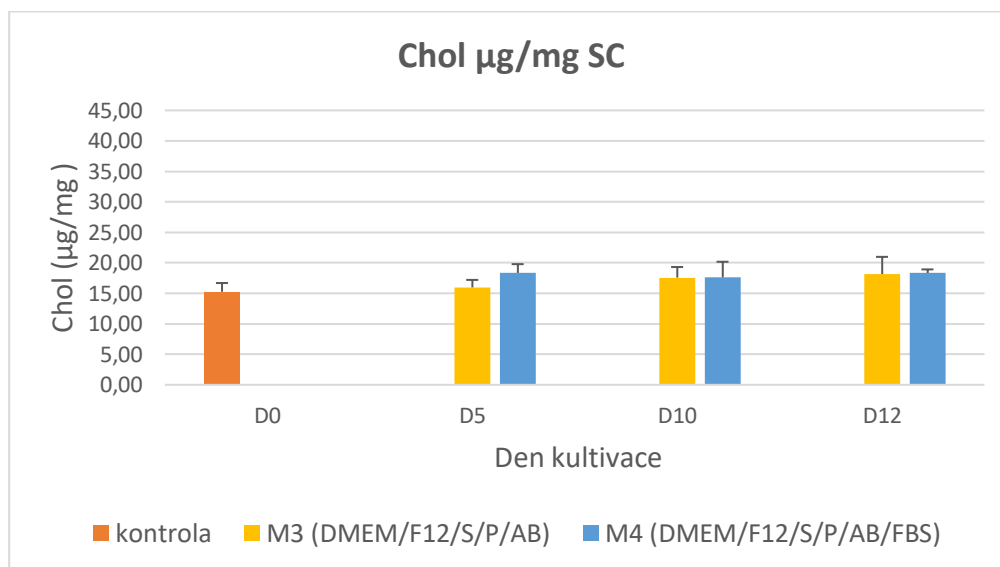
Obrázek 19 Průměrný obsah ($\mu\text{g}/\text{mg}$) CER ve vybraných dnech kultivace s kontrolním vzorkem.

Obsah VMK je znázorněn na grafu (Obrázek 20). Zvyšující trend VMK s délkou kultivace lze pozorovat pouze v M4. Nejvyšší obsah je dosažen v D12 u M4 ve výši $21,21 \pm 3,71 \mu\text{g}/\text{mg}$ v porovnání s kontrolou $14,40 \pm 2,94 \mu\text{g}/\text{mg}$. V D10 je viditelný pokles VMK u obou médií, kdy u M3 je obsah VMK ($11,06 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{mg}$) dokonce nižší než v kontrolním vzorku. V M4 je po celou dobu kultivace srovnatelný nebo vyšší obsah VMK v porovnání s kontrolním vzorkem.



Obrázek 20 Průměrný obsah VMK ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ve SC ve vybraných dnech kultivace s kontrolním vzorkem.

Chol je znázorněn na grafu (Obrázek 21). Obsah Chol je v M3 (D10 $17,58 \pm 1,74 \mu\text{g}/\text{mg}$) a v M4 (D10 $17,63 \pm 2,55 \mu\text{g}/\text{mg}$) srovnatelný s kontrolním vzorkem, v kterém je obsah Chol změřen ve výši $15,26 \pm 1,43 \mu\text{g}/\text{mg}$. Téměř konstantní hladiny Chol během kultivace v obou médiích naznačují, že přítomnost FBS složky v médiu nemá výrazný vliv na hladiny Chol v kultivované kůži.



Obrázek 21 Průměrný obsah Chol ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ve SC ve vybraných dnech kultivace s kontrolním vzorkem.

V porovnání s jinými studiemi se mohou výstupní data lišit. První rozdíl v literatuře²⁶ je popsán ve vyšším obsahu CER v kultivované kůži oproti kůži nativní. Studie nepřišla na přesný mechanismus odůvodňující zvýšený obsah CER. Publikace předpokládá zvýšenou aktivitu sfingomyelináz přeměňující sfingomyelin na CER NS a AS. Tento jev je odůvodněn jako stresová reakce keratinocytů na změnu vnějších podmínek a narušení kožní bariéry.²⁶ V této práci není sledován tento trend, obsah CER zůstává i po 12 dnech kultivace srovnatelný s kontrolou. Zvýšený obsah CER vzhledem k poměru Chol a VMK není žádoucí a nastavené kultivační podmínky v tomto ohledu jsou vyhovující.

Současně je známo, že fyziologicky se v kůži nejpočetněji vyskytují CER, dále CHOL a nejméně početně jsou VMK (v hmotnostních procentech). V přepočtu na molární množství se tyto lipidy vyskytují v ekvimolárním poměru.²⁶ V tomto experimentu bylo po přepočtení obsahu lipidů na molární množství zjištěno, že kontrolní vzorek obsahuje přibližně ekvimolární množství lipidů (CER:Chol:VMK). Toto množství zůstává s mírnými výkyvy beze změny během 12denní kultivace. Zajímavý je pokles množství MK při kultivaci v obou médiích M3 i M4 v D10. Naopak v D12 bylo opět sledováno vyšší množství MK ve SC. V literatuře lze dohledat souvislost se zvýšením hladin mediátorů RNA pro tvorbu syntáz syntetizující MK

při narušení kožní bariéry. ¹⁴ V tomto experimentu je použita zdravá a nepoškozená kůže. Je však možné, že nárůst množství MK je způsoben poškozením kožní bariéry během kultivace, který by však musel být ověřen dalšími metodami (například měření transepidermální ztráty vody nebo elektrické impedance). Avšak vzhledem k tomu, že množství ostatních lipidů zůstává bez výrazných změn, nejspíš se jedná pouze o nepřesnost analýzy. Lze se tedy domnívat, že kožní bariéra zůstává během kultivace neporušená.

Závěrem tedy můžeme shrnout, že během kultivace nedochází k výraznému poklesu lipidů v kůži. Stoupající trend v celkovém obsahu lipidů ve SC při kultivaci v obou médiích (Obrázek 18) naznačuje žádoucí růst SC. Zároveň je nejasná korelace mezi médií obsahující FBS a výsledky kultivace. Zdá se, že obsah lipidů byl mírně vyšší ve SC odebraného z kůže kultivované v M4 (Obrázek 17). Jak naznačují data na Obrázku 16, lze se domnívat, že FBS nebude mít výrazný vliv na viabilitu kůže.

Závěr

Experimentem se podařilo nastavit vhodné podmínky pro nastávající výzkum kožní bariéry. V souhrnu lze zkonstatovat, že obě vybraná média (M3, M4) vykazují vyhovující složení pro kultivaci zdravé kůže po dobu 12 dnů. Po tuto dobu je viabilita kožních štěpů zachována. Na rozdíl od M1 a M2 je v těchto médiích rostoucí trend obsahu lipidů. Mírně lepších výsledků z hlediska obsahu lipidů vykazuje kultivace v M4. Důvodem by mohlo být přítomné FBS, mezi jehož benefity patří stimulace proliferace buněk.^{18,19} Zvolené složení M4 má pravděpodobně ze všech čtyř zkoumaných médií nejpříznivější vliv na zachování zdravé kůže po dobu 12 dnů kultivace. Takovéto tvrzení by muselo být potvrzeno dalším experimentem.

V následujícím výzkumu mohou být použita zjištěná data z této práce jako referenční pro zjištění míry poškození kožní bariéry a míry regenerace kůže. Pro tuto skutečnost je zcela nezbytné dodržet stanovené podmínky a postupy použité v tomto experimentu. V následujících kultivacích je třeba mít na paměti, že nelze navodit opakovaně totožné podmínky. Hlavním důvodem je práce s biologickým materiálem, který se může od různých dárců lišit. Z tohoto důvodu je zcela nezbytné výsledky opakovaně potvrdit.

Reference

- (1) Balko, J.; Tonar, Z.; Varga, I. *Memorix Histologie*, 2. vyd.; Triton: Praha, **2017**.
- (2) Petrovický, P. *Anatomie s Topografií a Klinickými Aplikacemi*; Osveta, **2002**; roč. 560, s. 510–515.
- (3) Langmeier, M. *Základy Lékařské Fyziologie*; Grada: Praha, **2009**.
- (4) McGrath J.; Uitto J. Rook's Textbook of Dermatology. *Anatomy and Organization of Human Skin*; Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C., Eds.; Wiley, **2010**.
<https://doi.org/10.1002/9781444317633>.
- (5) Trojan, S. *Lékařská Fyziologie*; Grada: Praha, **2003**; s. 417–422.
- (6) Kawana, M.; Miyamoto, M.; Ohno, Y.; Kihara, A. Comparative Profiling and Comprehensive Quantification of Stratum Corneum Ceramides in Humans and Mice by LC/MS/MS. *J Lipid Res* **2020**, *61* (6), 884–895.
<https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000671>.
- (7) Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; Dobner, B.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H. H. Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. *Skin Pharmacol Physiol* **2015**, *28* (1), 42–55.
<https://doi.org/10.1159/000360009>.
- (8) Yousef, H.; Alhaji, M.; Sharma, S. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*; **2023**.
- (9) Knox, S.; O'Boyle, N. M. Skin Lipids in Health and Disease: A Review. *Chem Phys Lipids* **2021**, *236*, 105055. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055>.
- (10) Feingold, K. R.; Elias, P. M. Role of Lipids in the Formation and Maintenance of the Cutaneous Permeability Barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 280–294.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.007>.
- (11) Ali, S.; Yosipovitch, G. Skin PH: From Basic Science to Basic Skin Care. *Acta Dermatologica Venereologica* **2013**, *93* (3), 261–267. <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>.
- (12) Chalupová Z; Masteiková R. *Hydratace kůže a kosmetické prostředky*. SOLEN, **2006**.
- (13) Danby, S. G.; Andrew, P. V.; Kay, L. J.; Pinnock, A.; Chittock, J.; Brown, K.; Williams, S. F.; Cork, M. J. Enhancement of Stratum Corneum Lipid Structure Improves Skin

- Barrier Function and Protects against Irritation in Adults with Dry, Eczema-prone Skin*. *British Journal of Dermatology* **2022**, *186* (5), 875–886. <https://doi.org/10.1111/bjd.20955>.
- (14) Jungersted, J. M.; Hellgren, L. I.; Jemec, G. B. E.; Agner, T. Lipids and Skin Barrier Function – a Clinical Perspective. *Contact Dermatitis* **2008**, *58* (5), 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01320.x>.
- (15) Fandrei, F.; Engberg, O.; Opálka, L.; Jančálková, P.; Pullmannová, P.; Steinhart, M.; Kováčik, A.; Vávrová, K.; Huster, D. Cholesterol Sulfate Fluidizes the Sterol Fraction of the Stratum Corneum Lipid Phase and Increases Its Permeability. *J Lipid Res* **2022**, *63* (3), 100177. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2022.100177>.
- (16) Waterham, H. R. Defects of Cholesterol Biosynthesis. *FEBS Lett* **2006**, *580* (23), 5442–5449. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.027>.
- (17) Ananthapadmanabhan, K. P.; Mukherjee, S.; Chandar, P. Stratum Corneum Fatty Acids: Their Critical Role in Preserving Barrier Integrity during Cleansing. *Int J Cosmet Sci* **2013**, *35* (4), 337–345. <https://doi.org/10.1111/ics.12042>.
- (18) Vostálová, J.; Galandáková, A.; Zálešák, B.; Lichnovská, R.; Čížková, K.; Ulrichová, J.; Rajnochová Svobodová, A. Changes in Antioxidant, Inflammatory and Metabolic Markers during 1 Week Cultivation of Human Skin Explants. *Journal of Applied Toxicology* **2019**, *39* (5), 773–782. <https://doi.org/10.1002/jat.3766>.
- (19) Zhou, L.; Zhang, X.; Paus, R.; Lu, Z. The Renaissance of Human Skin Organ Culture: A Critical Reappraisal. *Differentiation* **2018**, *104*, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.10.002>.
- (20) Guo, X.; Schaudinn, C.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A.; Rancan, F. Effects of Adipose-Derived Stem Cells and Their Conditioned Medium in a Human Ex Vivo Wound Model. *Cells* **2022**, *11* (7), 1198. <https://doi.org/10.3390/cells11071198>.
- (21) Berkers, T.; Boiten, W. A.; Absalah, S.; van Smeden, J.; Lavrijsen, A. P. M.; Bouwstra, J. A. Compromising Human Skin in Vivo and Ex Vivo to Study Skin Barrier Repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2019**, *1864* (8), 1103–1108. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.005>.

- (22) Yoon, D. J.; Fregoso, D. R.; Nguyen, D.; Chen, V.; Strbo, N.; Fuentes, J. J.; Tomic-Canic, M.; Crawford, R.; Pastar, I.; Isseroff, R. R. A Tractable, Simplified Ex Vivo Human Skin Model of Wound Infection. *Wound Repair and Regeneration* **2019**, *27* (4), 421–425. <https://doi.org/10.1111/wrr.12712>.
- (23) Liu, A.; Ocotl, E.; Karim, A.; Wolf, J. J.; Cox, B. L.; Eliceiri, K. W.; Gibson, A. L. F. Modeling Early Thermal Injury Using an Ex Vivo Human Skin Model of Contact Burns. *Burns* **2021**, *47* (3), 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.08.011>.
- (24) Nicoletti, G.; Saler, M.; Villani, L.; Rumolo, A.; Tresoldi, M. M.; Faga, A. Platelet Rich Plasma Enhancement of Skin Regeneration in an Ex-Vivo Human Experimental Model. *Front Bioeng Biotechnol* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00002>.
- (25) Liu, X.; Barresi, R.; Kaminer, M.; Qian, K.; Thillou, F.; Bataillon, M.; Liao, I.-C.; Zheng, Q.; Bouez, C. Utilization of Ex Vivo Tissue Model to Study Skin Regeneration Following Microneedle Stimuli. *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 18115. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22481-w>.
- (26) Danso, M. O.; Berkers, T.; Mieremet, A.; Hausil, F.; Bouwstra, J. A. An Ex Vivo Human Skin Model for Studying Skin Barrier Repair. *Exp Dermatol* **2015**, *24* (1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/exd.12579>.
- (27) Shannon, J.; Kirchner, S.; Zhang, J. Human Skin Explant Preparation and Culture. *Bio Protoc* **2022**, *12* (18). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4514>.
- (28) Jardet, C.; David, A.; Braun, E.; Descargues, P.; Grolleau, J.; Hebsgaard, J.; Norsgaard, H.; Lovato, P. Development and Characterization of a Human Th17-driven Ex Vivo Skin Inflammation Model. *Exp Dermatol* **2020**, *29* (10), 993–1003. <https://doi.org/10.1111/exd.14160>.
- (29) Tiirikainen, M. L.; Woetmann, A.; Norsgaard, H.; Santamaria-Babí, L. F.; Lovato, P. Ex Vivo Culture of Lesional Psoriasis Skin for Pharmacological Testing. *J Dermatol Sci* **2020**, *97* (2), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.12.010>.
- (30) Sidgwick, G. P.; McGeorge, D.; Bayat, A. Functional Testing of Topical Skin Formulations Using an Optimised Ex Vivo Skin Organ Culture Model. *Arch Dermatol Res* **2016**, *308* (5), 297–308. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1645-8>.

- (31) Balaji, S.; Moles, C. M.; Bhattacharya, S. S.; LeSaint, M.; Dhamija, Y.; Le, L. D.; King, A.; Kidd, M.; Bouso, M. F.; Shaaban, A.; Crombleholme, T. M.; Bollyky, P.; Keswani, S. G. Comparison of Interleukin 10 Homologs on Dermal Wound Healing Using a Novel Human Skin Ex Vivo Organ Culture Model. *Journal of Surgical Research* **2014**, *190* (1), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.02.027>.
- (32) Xu, W.; Jong Hong, S.; Jia, S.; Zhao, Y.; Galiano, R. D.; Mustoe, T. A. Application of a Partial-Thickness Human Ex Vivo Skin Culture Model in Cutaneous Wound Healing Study. *Laboratory Investigation* **2012**, *92* (4), 584–599. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.184>.
- (33) Frankart, A.; Malaisse, J.; De Vuyst, E.; Minner, F.; de Rouvroit, C. L.; Poumay, Y. Epidermal Morphogenesis during Progressive in Vitro 3D Reconstruction at the Air–Liquid Interface. *Exp Dermatol* **2012**, *21* (11), 871–875. <https://doi.org/10.1111/exd.12020>.
- (34) Portugal-Cohen, M.; Soroka, Y.; Ma’or, Z.; Oron, M.; Zioni, T.; Brégégère, F. M.; Neuman, R.; Kohen, R.; Milner, Y. Protective Effects of a Cream Containing Dead Sea Minerals against UVB-induced Stress in Human Skin. *Exp Dermatol* **2009**, *18* (9), 781–788. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00865.x>.
- (35) Neves, L. M. G.; Wilgus, T. A.; Bayat, A. In Vitro, Ex Vivo and In Vivo. Approaches for Investigation of Skin Scarring: Human and Animal Models. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2023**, *12* (2), 97–116. <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0139>.
- (36) Vostálová, J.; Cukr, M.; Zálešák, B.; Lichnovská, R.; Ulrichová, J.; Rajnochová Svobodová, A. Comparison of Various Methods to Analyse Toxic Effects in Human Skin Explants: Rediscovery of TTC Assay. *J Photochem Photobiol B* **2018**, *178*, 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.011>.
- (37) Hershey, F. B.; Cruickshank, C. N. D.; Mullins, L. I. The Quantitative Reduction of 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride by Skin In Vitro. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1958**, *6* (3), 191–196. <https://doi.org/10.1177/6.3.191>.
- (38) Srivasta, M.: *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14025-9>.

- (39) Li D.; Zhang Z.T.; He C.W.; Xie Z. Yeast Lipid Extraction and Analysis by HPTLC. *Bio Protoc* **2021**, *11* (13). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4081>.
- (40) Jevtić, M.; Löwa, A.; Nováčková, A.; Kováčik, A.; Kaessmeyer, S.; Erdmann, G.; Vávrová, K.; Hedtrich, S. Impact of Intercellular Crosstalk between Epidermal Keratinocytes and Dermal Fibroblasts on Skin Homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2020**, *1867* (8), 118722. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118722>.
- (41) Morlock, G. E. High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Effect-Directed Assays and High-Resolution Mass Spectrometry as an Emerging Hyphenated Technology: A Tutorial Review. *Anal Chim Acta* **2021**, *1180*, 338644. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338644>.
- (42) Sochorová M. *Analýza Lipidů v Epidermis Se Sníženou Expresí Filaggrinu*, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, **2014**.
- (43) Sancho-Albero, M.; Jarne, C.; Savirón, M.; Martín-Duque, P.; Membrado, L.; Cebolla, V. L.; Santamaría, J. High-Performance Thin-Layer Chromatography-Densitometry-Tandem ESI-MS to Evaluate Phospholipid Content in Exosomes of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (3), 1150. <https://doi.org/10.3390/ijms23031150>.
- (44) Bleck, O.; Abeck, D.; Ring, J.; Hoppe, U.; Vietzke, J.-P.; Wolber, R.; Brandt, O.; Schreiner, V. Two Ceramide Subfractions Detectable in Cer(AS) Position by HPTLC in Skin Surface Lipids of Non-Lesional Skin of Atopic Eczema. *Journal of Investigative Dermatology* **1999**, *113* (6), 894–900. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00809.x>.
- (45) Bravo, D.; Rigley, T. H.; Gibran, N.; Strong, D. M.; Newman-Gage, H. Effect of Storage and Preservation Methods on Viability in Transplantable Human Skin Allografts. *Burns* **2000**, *26* (4), 367–378. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00169-2).
- (46) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37* (8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.

(47) Hergesell, K.; Paraskevopoulou, A.; Opálka, L.; Velebný, V.; Vávrová, K.; Dolečková, I. The Effect of Long-Term Cigarette Smoking on Selected Skin Barrier Proteins and Lipids. *Sci Rep* **2023**, *13* (1), 11572. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38178-7>.