

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutickej technológie

Školiteľ: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Autor: Frederika Tkáčová

Názov diplomovej práce: Vývoj a validace modelu korneocytální lipidové obálky in vitro I

Jednou z mnohých funkcií kože je obranyschopnosť organizmu a ochrana vnútorného prostredia. Túto bariérovú funkciu kože zaisťuje vo veľkej miere *epidermis*, ktorá sa ďalej člení až do jej najvrchnejšej vrstvy *stratum corneum* (SC). SC je štruktúra zložená z korneocytov, čo sú ploché bezjaderné keratinocyty, ktoré prešli určitým stupňom diferenciácie. Korneocyty majú na svojom povrchu tesne pod cytoplazmatickou membránou zrohovatený obal nazvaný *korneocytálna lipidová obálka* (CLE). Táto obálka je monovrstva lipidov kovalentne naviazaná na proteíny na povrchu korneocytov. Predpokladá sa, že CLE hrá dôležitú úlohu buď ako lešenie pre extracelulárne lamely alebo pre súdržnosť korneocytov. Aby táto funkcia mohla byť lepšie preskúmaná je potrebné vyvinúť rôzne modely CLE.

Cieľom tejto práce bolo teda vyvinúť a validovať metódu pre izoláciu CLE a otestovať metódu čistenia CLE pomocou gradientovej centrifugácie. Prvým krokom v tejto ceste izolácie CLE bola izolácia SC z ľudskej kože podľa už skôr publikovanej literatúry a z nej extrahovať voľné lipidy. Z takto delipidizovaného SC bolo následne potrebné jednotlivé korneocyty rozvoľniť, aby bolo možné sledovať už jednotlivé samotné korneocyty a tým pádom izolované CLE. Túto izolovanú frakciu bolo potrebné následne očistiť od zvyškov extrakčných pufrov načo bola v tejto práci vybraná metóda gradientovej centrifugácie s roztokmi sacharózy. Pri tomto čistení bola snaha o rôzne obmeny kvôli vysokým stratám a nedostatočnému očisteniu vzorky CLE.

Ďalším a zároveň posledným krokom bolo teda, po očistení frakcie CLE od pufrov pomocou sacharózy, už len očistiť frakciu CLE od zvyškov sacharózy, čo bolo

vykonané pomocou prečistenia vodou. Pre overenie prítomnosti, čistoty a obsahu rezíduí boli používané metódy optickej mikroskopie, infračervenej spektroskopie a merania veľkosti častíc pomocou dynamického rozptylu svetla. Nakoniec teda môžeme konštatovať, že bola úspešne izolovaná CLE a pomocou gradientovej centrifugácie prečistená. Kvôli časovej náročnosti a veľkým stratám je však vhodné túto metódu nahradiť jednoduchou filtráciou.