

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra Farmaceutickej technológie**



**Diplomová práca**

**Vývoj a validace modelu korneocytální lipidové obálky in vitro I**

*(Corneocyte lipid envelope in vitro model development and validation I)*

**FREDERIKA TKÁČOVÁ**

Vedúci diplomovej práce PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Použitú literatúru a ďalšie zdroje ktoré som pri písaní použila sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 28.8.2024

Frederika Tkáčová

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som chcel vyjadriť veľké poďakovanie svojej vedúcej diplomovej práce PharmDr. Anne Paraskevopoulou Ph.D. za ústretovosť, porozumenie, pomoc a veľkú dávku trpezlivosti pri spracovaní tejto diplomovej práce. Rovnaká vďaka patrí prof. PharmDr. Kateřině Vávrovej Ph.D a všetkým členom výskumnej skupiny Skin Barrier Research Group. Za meranie IR ďakujem doc. PharmDr. Andrejovi Kováčikovi, Ph.D. Ďalej ďakujem za finančnú podporu Univerzite Karlovej (SVV 260 547) a Grantovej agentúre ČR (GAČR 120/53/ 225308). Za osobný záujem ďakujem rodine a priateľom.

## 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.

## **Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Anna Paraskevopoulou, Ph.D.

Author: Frederika Tkáčová

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

The skin serves many functions, one of which is to defend the body and protect its internal systems. This defence is primarily carried out by the epidermis, specifically its outermost layer known as the stratum corneum (SC). The SC is composed of specialized cells called corneocytes that have undergone differentiation and developed an envelope directly beneath their cytoplasmic membrane known as the corneocyte lipid envelope (CLE). This envelope is made up of lipids covalently bound to proteins on the corneocytes' surface and is believed to play a crucial role in supporting extracellular lamellae or promoting corneocyte cohesion. To gain a better understanding of its function, it is necessary to develop various models for studying the CLE.

The objective of this study was to establish and validate a method for isolating the CLE and to evaluate the effectiveness of CLE purification using gradient centrifugation. The initial step in the CLE isolation process involved extracting the SC from human skin, following previously published protocols, and extracting the free lipids from it. Subsequently, individual corneocytes needed to be separated from this delipidized SC in order to examine the isolated CLE. To purify this isolated fraction and remove any residual extraction buffers, gradient centrifugation with sucrose solutions was employed. However, due to significant losses and inadequate purification of the samples, various modifications were attempted during the purification process. Finally, after the CLE buffer extraction using sucrose solutions, the CLE fraction was purified from sucrose residues using water. The presence, purity, and residue content of

the isolated CLE were confirmed using techniques such as optical microscopy, infrared spectroscopy, and dynamic light scattering.

In conclusion, the CLE was successfully isolated and purified using gradient centrifugation. However, given the time-consuming nature of this method and the significant losses encountered, it is recommended to replace it with a simpler filtration method.

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Obsah.....	8
Použité skratky.....	10
<b>1. Úvod a cieľ práce.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Teoretická časť.....</b>	<b>13</b>
2.1. Koža.....	13
2.2. Stratum corneum.....	16
2.2.1. Korneocyty.....	16
2.2.2. Korneocytálna lipidová obálka (CLE).....	17
2.2.3. Extracelulárne lipidy v SC.....	18
<b>3. Metodická časť.....</b>	<b>22</b>
3.1. Gradientová centrifugácia.....	22
3.2. Infračervená spektroskopia.....	25
3.3. Optická mikroskopia.....	27
<b>4. Experimentálna časť.....</b>	<b>28</b>
4.1. Chemikálie a materiál.....	28
4.2. Prístrojové vybavenie.....	28
4.3. Izolácia SC.....	28
4.4. Extrakcia voľných lipidov.....	29
4.5. Príprava pufrov.....	29
4.5.1. Fosfátový pufer 10 mM, pH 7,4 (PBS).....	29
4.5.2. Extrakčný pufer s obsahom SDS.....	29
4.5.3. Extrakčný pufer s obsahom dSDS.....	30
4.5.4. Extrakčný pufer bez SDS.....	30



4.6.	Nastavenie podmienok izolácie CLE.....	30
4.7.	Čistenie disperzie CLE.....	31
4.7.1.	Čistenie disperzie CLE pomocou gradientovej centrifugácie s roztokom sacharózy.....	31
4.7.2.	Čistenie a gradientová centrifugácia s roztokom sacharózy a EP-DDAO.....	32
4.7.3.	Čistenie a gradientová centrifugácia za použitia EP-dSDS.....	32
4.8.	Charakterizácia vzorky.....	32
4.8.1.	Optická mikroskopia.....	32
4.8.2.	Počítanie buniek pomocou hemocytometru.....	33
4.8.3.	Overenie čistoty vzorky pomocou infračervenej spektroskopie.....	33
4.8.4.	ZetaSizer.....	34
<b>5.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>35</b>
5.1.	Nastavenie podmienok izolácie.....	35
5.2.	Optická mikroskopia.....	36
5.3.	Počítanie buniek pomocou hemocytometra.....	38
5.4.	Infračervená spektroskopia.....	38
5.5.	Zetasizer.....	39
<b>6.</b>	<b>Diskusia.....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Záver.....</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>Citované diela.....</b>	<b>43</b>

## Použité skratky

CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
C(L)E	Korneocytálna (lipidová) obálka
CER	Ceramidy
DDAO	Dodecyldiamin oxid
(d)SDS	(deuterovaný) Dodecylsírán sodný
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Kys. ethylendiamintetraoctová
EP-DDAO	Extrakčný pufer s obsahom DDAO
EP-dSDS	Extrakčný pufer s obsahom (deuterovaného) SDS
EP-SDS	Extrakčný pufer s obsahom SDS
EtOH	Etanol
CHOL	Cholesterol
IČ	Infračervená (spektroskopia)
KC	Korneocyty
LPP	Fáza s dlhou periodicitou
MK	Mastné kyseliny
PBS	Fosfátom pufovaný fyziologický roztok
SC	Stratum corneum
SPP	Fáza s krátkou periodicitou

Tris-báza

Tris-(hydroxymetyl)aminometan

## 1. Úvod a cieľ práce

Koža ako najväčší orgán v ľudskom tele zaisťuje a kontroluje v organizme veľké množstvo pochodov. Skladá sa z mnohých rôznych štruktúr a obsahuje veľké množstvá rozličných látok. Ako už bolo potvrdené pri defektoch alebo nedostatku niektorých z týchto dôležitých látok dochádza k rôznym závažným a kvalitu života znižujúcim ochoreniam.

Táto práca je zameraná na jednu konkrétnu časť a to epidermis konkrétne jej najvrchnejšiu časť *stratum corneum* (SC), elementy z ktorých je táto vrstva zložená korneocyty (KC) a ich obal korneocytálnu lipidovú obálku (CLE). Tieto časti SC sú dôležité pre nepriepustnosť kožnej bariéry a prispievajú k jej ochrannej funkcii. Doposiaľ však nie je do detailu známe, ako je táto časť bariéry formovaná a ako je táto funkcia zaisťovaná. Preto je potrebné vyvinúť modely, ktoré by pomohli k pochopeniu vyššie uvedeného.

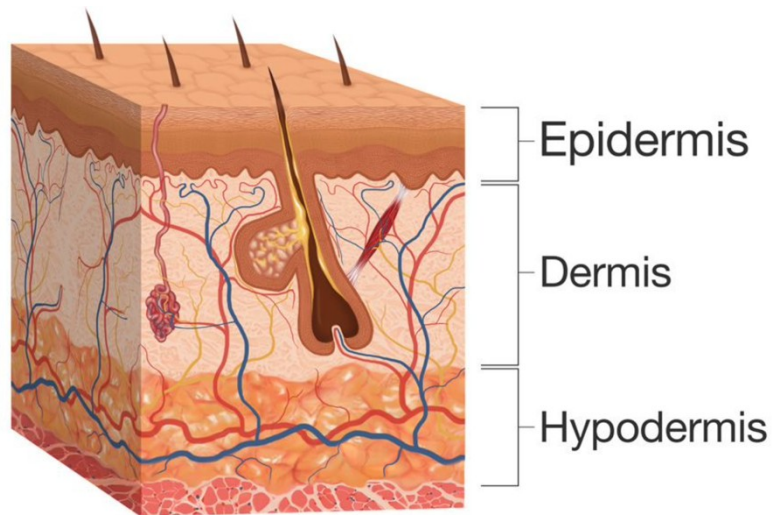
Cieľom tejto práce bolo vytvoriť a validovať metódu pre izoláciu CLE. Aby bolo do budúca možné ďalej pracovať už so samotnými izolovanými štruktúrami CLE a viac prehĺbovať pochopenie aj tých najmenších komponentov ľudskej kože, ktoré majú častokrát nezameniteľnú a jedinečnú funkciu v organizme.

## 2. Teoretická časť

### 2.1. Koža

Koža je najväčším a primárnym ochranným orgánom tela, pokrýva celý jeho vonkajší povrch a slúži ako fyzická bariéra prvého rádu proti vonkajšiemu prostrediu. Medzi jej funkcie patrí regulácia teploty, ochrana pred (UV) svetlom, traumou, patogénmi, mikroorganizmami a toxínmi. Koža tiež hrá úlohu pri imunologickom dohľade, zmyslovom vnímaní, kontrole straty tekutín a homeostáze vo všeobecnosti. (1)

Plošný rozsah kože je asi 1,7 – 2,0 m<sup>2</sup>, hrúbka kolíše medzi 0,5 - 4,0 mm. Hmotnosť samotnej kože je asi 3 kg – s tukovým tkanivom môže dosiahnuť až 20 kg. (2) Ľudská koža pozostáva z vrstvenej bunkovej epidermis a pod ňou ležiacej dermis zo spojivového tkaniva. Pod dermis je vrstva podkožného tuku (hypodermis), ktorá je oddelená od zvyšku tela vrstvou priečne pruhovaného svalstva. (3) Štruktúra ľudskej kože je znázornená na nasledujúcom obrázku (**Obrázok 1**).



**Obrázok 1** Štruktúrny popis základných vrstiev ľudskej kože. Obrázok je prevzatý z <https://www.acne.org/human-skin-basic-anatomy-and-functions>. (4)

## Hypodermis

Hypodermis pozostáva hlavne z voľného spojivového tkaniva, ktoré v závislosti od miesta, vytvára klznú vrstvu alebo veľké vrecká tukového tkaniva, ktoré izoluje a chráni pokožku. Väzivové septá súvisia s väzivom dermis a tvoria sieť, v ktorej sú lalôčky tukového tkaniva uložené. (5) Tkanivo je obzvlášť bohaté na proteoglykány a glykozaminoglykány, ktoré priťahujú tekutinu do tkaniva, čo mu dodáva slizničné vlastnosti. (6)

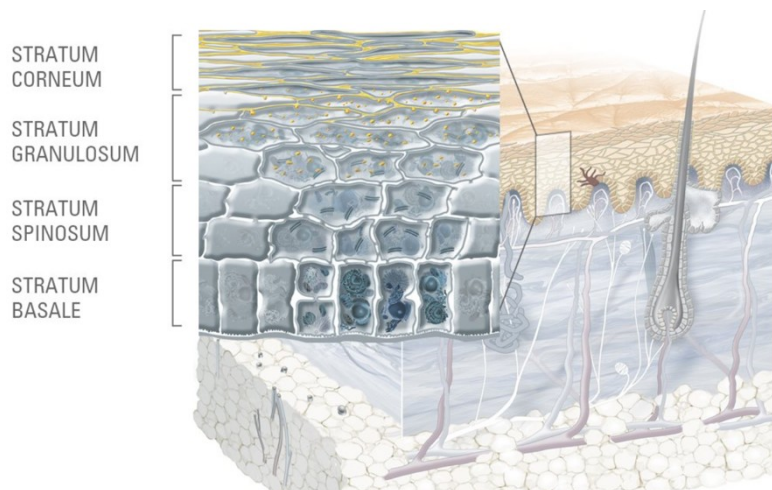
## Dermis

Dermis je vrstva kože ležiaca bezprostredne pod epidermou. Slúži na poskytovanie podpory a živín nad ňou ležiacej epidermis. (7) Matrica tohoto spojivového tkaniva sa skladá z kolagénových, elastických, retických vlákien, uložených v amorfnej základnej látke mukopolysacharidov. Kolagénové a elastické vlákna sú navzájom zapletené a vytvárajú sieť, ktorá umožňuje napätie v mnohých smeroch a poskytuje fyzickú podporu nervom a cievam. (8)

V dermis prevažujú tri základné druhy buniek: *fibroblasty* (aktívna forma fibrocyty) sú najdôležitejšie bunky pre syntézu väziva. *Histocyty*, ich enzymaticky aktívne formy sa označujú ako makrofágy, ktoré fagocytujú antigény, odpadové produkty metabolizmu a produkujú rôzne mediátory. *Mastocyty* obsahujú histamín, heparín, serotonín a ďalšie mediátory, ktoré sa uvoľňujú pri alergickej reakcii. (5)

## Epidermis

Epidermis je vonkajšia vrstva kože, poskytuje vodeodolnú bariéru a prispieva taktiež k tónu pokožky. Pokožka je ďalej rozdelená do piatich vrstiev, ktoré sa na jednotlivých miestach kože líšia. Hrubá koža dlaní a chodidiel má päť vrstiev, zatiaľ čo na iných miestach má epidermis iba štyri vrstvy, bez *stratum lucidum*. (1) Vrstvy epidermis zahŕňajú *stratum basale* (najhlbšia vrstva), *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum* (najvrchnejšia vrstva). (9) Tieto vrstvy sú znázornené na **Obrázku 2**.



**Obrázok 2** Schematické znázornenie jednotlivých vrstiev epidermis. Dostupné z: <https://www.eucerin.sk/o-kozi/zakladne-informacie/struktura-a-funkcie-koze>. (10)

**Stratum basale**, tiež známa ako *stratum germinativum*, je najhlbšia vrstva, oddelená od dermis bazálnou membránou (bazalna lamina) a pripojená k bazálnej membráne hemidesmozómami. Táto vrstva obsahuje aj melanocyty. (9) Keratinocyty sa počas svojej migrácie z bazálnej vrstvy epidermy smerom k vonkajšiemu povrchu kože diferencujú v usmerňovanom procese a následne vylučujú veľké množstvo špecifických proteínov, ako sú rôzne druhy keratínu, involucrín, lorikrín, korneodesmozín, filagrín a iné. Paralelne prechádzajú sériou štrukturálnych zmien a transformujú sa na spinózne a potom granulárne. (11)

**Stratum spinosum** - cytoplazma granulárnych keratinocytov obsahuje početné granule, známe ako keratohyalínové granuly a tubulo-vezikulárne štruktúry. (11) Sú to nepravidelné polyedrické bunky s cytoplazmatickými výbežkami tiež nazývanými aj „tŕne“, pretože sa rozširujú smerom von a prepájajú susedné bunky pomocou desmozómov. (9)

**Stratum granulosum** – na úrovni granulárnej vrstvy tvoria proteíny s tesným spojením tiež fokálne upevňovacie štruktúry, ktoré môžu ohraničovať extracelulárne komponenty. (11)

**Stratum lucidum** tvorí prechod medzi nezrohovatenou epidermis a SC. (5) Je to tenká číra vrstva pozostávajúca z eleidínu, ktorý je produktom transformácie keratohyalínu. (9)

Počas zrohovatenia (keratinizácie) špecializovanej bunkovej smrti v epiderme, bunky vytláčajú bohaté lipidové agregáty a spracovávajú ich na multilamelárnu extracelulárnu maticu s dominanciou ceramidov v najvrchnejšej vrstve kože a teda stratum corneum. (12) Tej bude venovaná nasledujúca podkapitola.

## **2.2.Stratum corneum**

*Stratum corneum* (SC), 20 – 30 bunkových vrstiev, je najvrchnejšia vrstva tvorená keratínom a zrohovatenými šupinami tvorenými mŕtvymi korneocytami. (9) Podieľa sa na regulácii uvoľnenia vody z orgánov do vonkajšieho prostredia, tiež známej ako transepidermálna strata vody (TEWL). (13) SC tvorí súvislú vrstvu buniek obohatených o proteíny spojených korneodesmózomami a uložených v medzibunkovej matici obohatenej o nepolárne lipidy a organizovanej ako lamelárne lipidové vrstvy. (14)

### **2.2.1. Korneocyty**

Sú to vlastne bezjadrové keratinocyty, ktoré dosiahli konečné štádium diferenciácie. Korneocyty zadržiavajú keratínové vlákna vo filagrínovej matici a zrohovatený lipidový obal nahrádza plazmatickú membránu keratinocytov. (13)

Korneocyty poskytujú mechanickú a chemickú ochranu a spolu s ich medzibunkovým lipidovým prostredím zabraňujú nadmernej strate vody. Keratíny a filagrín spolu tvoria 80 – 90 % proteínovej hmoty epidermy. (14) V epidermis existuje určitý vápnikový gradient, ktorý má v jednotlivých vrstvách rôzne koncentrácie. Tento gradient je veľmi dôležitý pri terminálnej diferenciácii keratinocytov. Vyššia koncentrácia vápnika v *stratum granulosum* spôsobuje, že keratohyalínové granuly uvoľňujú svoj obsah, čím je profilagrín vystavený spracovaniu a fragmentácii na aktívne monoméry filagrínu. Tento filagrín sa viaže na intermediárne keratínove filamenty, čo spôsobuje ich agregáciu a zhutňovanie, a to vyvoláva kolaps a sploštenie buniek. (15) Na základe uvedeného a predchádzajúcich výskumov bolo dokázané, že nulové mutácie v géne kódujúcom filagrín silne predisponuje k rôznym kožným ochoreniam ako je napríklad atopický ekzém. (16)

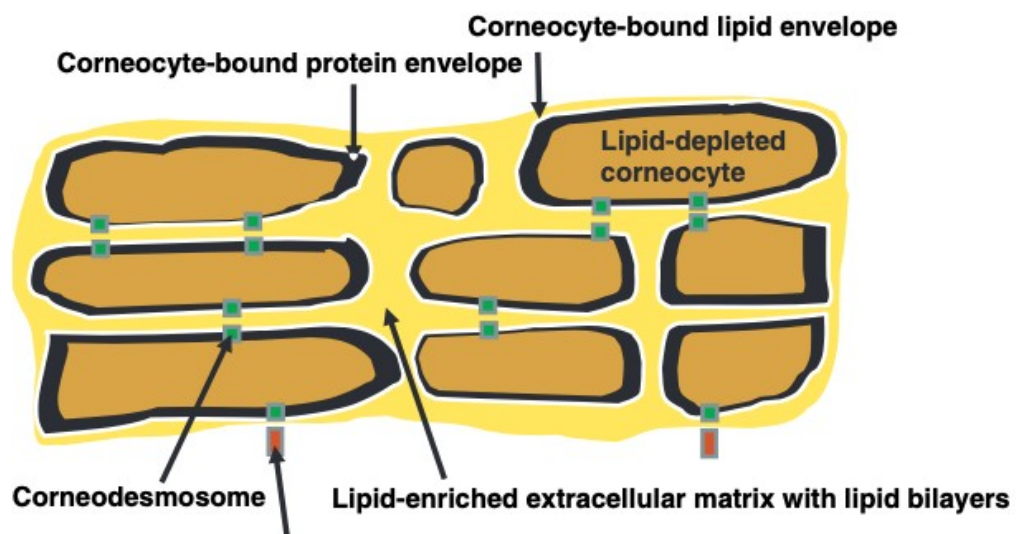


Preto je SC a jeho obsahovým zložkám, ako je napríklad filagrín, pripisovaná veľká dôležitosť.

Ďalším komponentnom korneocytov sú keratíny, hlavné štrukturálne proteíny syntetizované v keratinocytoch. Sú zostavené do sieťového vzoru medziľahlých vlákien. (14) V ľudskom organizme je 54 druhov keratínu, ktoré sa delia do dvoch typov. Typ I obsahuje 17 kožných keratínov a 11 vlasových keratínov. Typ I má mnoho funkcií, vrátane ochrany buniek pred mechanickým stresom. Typ II obsahuje 20 kožných keratínov a šesť vlasových keratínov. Pretože keratín typu II je menej kyslej povahy ako typu I, pomáha vyrovnávať rovnováhu a riadiť bunkovú aktivitu. (17) Pri poruchách keratínu sa vlákňité siete zrutia okolo jadra a interakcia medzi susednými bunkami je preto pozmenená. (14)

### 2.2.2. Korneocytálna lipidová obálka (CLE)

Zrohovatený bunkový obal, resp. korneocytálna obálka (CE), je tuhá proteín/lipidová polymérna štruktúra vytvorená tesne pod cytoplazmatickou membránou na vonkajšej strane KC. Skladá sa z dvoch častí proteínového obalu a lipidového obalu (**Obrázok 3**). Proteínový obal prispieva k biochemickým vlastnostiam CE ako výsledok zosieťovania špecializovaných štruktúrnych proteínov zrohovateného obalu, vrátane involukrínu, lorikrínu, trichohyalínu a ďalších proteínov. (14)

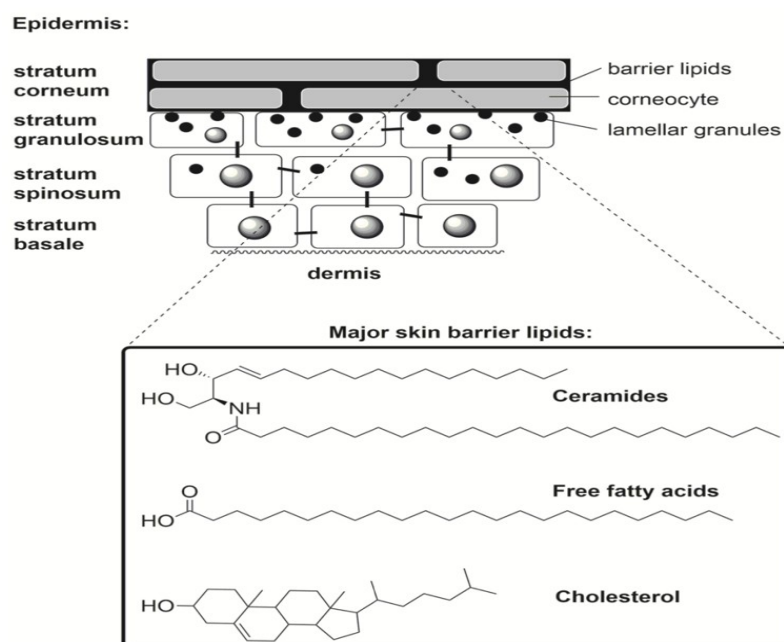


**Obrázok 3** Korneocyty zbavené lipidov a obklopené vnútorným proteínovým obalom a vonkajším lipidovým obalom. (14)

Lipidový obal naviazaný na korneocyty je štruktúra podobná plazmatickej membráne, ktorá nahrádza plazmatickú membránu na vonkajšej strane cicavčích korneocytov. Involukrín, envoplakín a periplakín slúžia ako substrát pre kovalentné pripojenie  $\omega$ -hydroxyceramidov s N-acylovými masnými kyselinami s veľmi dlhým reťazcom. (14) Avšak, involukrín je najdôležitejším proteínom pre kovalentné napojenie ceramidov na zrohovatený obal. Vylučovanie involukrínu je bežne pozorovaný len v horných trňových a granulárnych vrstvách. (18)

### 2.2.3. Extracelulárne lipidy v SC

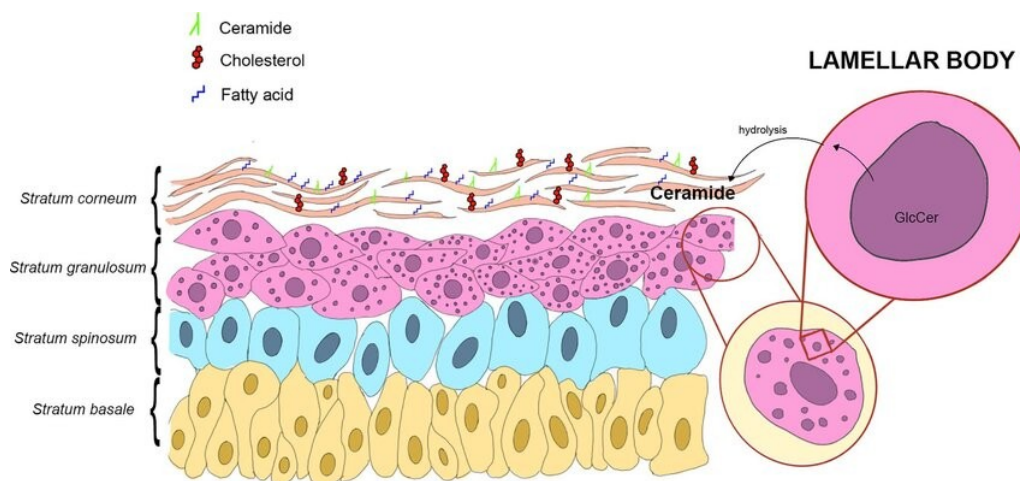
Na zabezpečenie kompetentnej bariérovej funkcie sú lipidy v SC vysoko špecializované, prakticky neobsahujú žiadne fosfolipidy a hlavnými zložkami sú ceramidy (CER), voľné masné kyseliny a bunkový cholesterol (CHOL) v molárnom pomere približne 1:1:1 (**Obrázok 4**). Tieto lipidy SC zabraňujú nadmernej strate vody z tela a bránia prieniku nežiadúcich látok, alergénov a mikrobov z prostredia do organizmu. (19)



**Obrázok 4** Štruktúra SC a lipidov kožnej bariéry (19)

V horných trňových a granulárnych vrstvách sú epidermálne lamelárne telieska, lamelárne vezikuly, ktoré pochádzajú z Golgiho aparátu a sú obohatené o polárne lipidy. V reakcii na určité signály, napr. zvýšenie koncentrácie vápnika

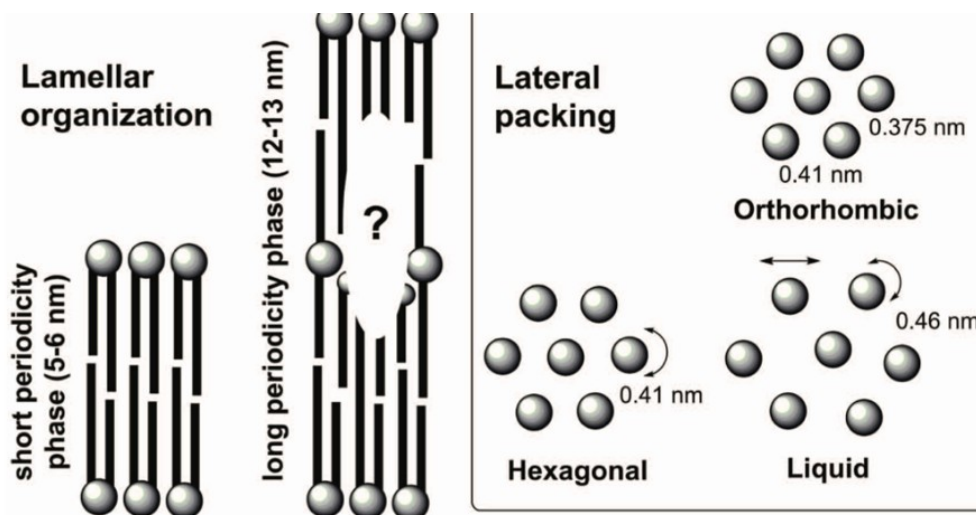
v granulárnych vrstvách, sa lamelárne telieska presunú k vrcholu najvyšších granulárnych buniek (koordinovaných vezikulo – tubulárnym systémom). Tu splynú s plazmatickou membránou a vylučujú svoj obsah do medzibunkových priestorov prostredníctvom exocytózy. Lipidy odvodené z lamelárnych teliesok sú následne modifikované a usporiadané do medzibunkových lamiel umiestnených rovnobežne s povrchom bunky. Polárne lipidy sa enzymaticky premieňajú na nepolárne produkty. Hydrolýzou glykosfingolipidov vznikajú CER zatiaľ čo fosfolipidy sa premieňajú na voľné mastné kyseliny. (14) Tento proces je znázornený na nasledujúcom obrázku (**Obrázok 5**).



**Obrázok 5** Rozhranie stratum granulosum/ corneum a lamelárne telieska (20)

Pokožka obsahuje voľné mastné kyseliny (MK), ako aj MK viazané v triglyceridoch, fosfolipidoch, glykozylceramidoch a CER. Dĺžka reťazca MK sa pohybuje od C 12 do C 24. CHOL je treťou hlavnou triedou lipidov v SC. Hoci bazálne bunky sú schopné resorbovať CHOL z obehu, väčšina CHOL v epidermis sa syntetizuje *in situ* z acetátu. (14) Okrem voľných lipidov sú v SC prítomné lipidy viazané na KC (popísané vyššie v kapitole o CLE).

Molekulárne usporiadanie lipidov SC je tiež vysoko špecializované: lipidy kožnej bariéry netvoria konvenčné dvojvrstvy, ale multifaktorálne membrány. Prevládajúce **laterálne** usporiadanie lipidov kožnej bariéry je ortorombické, čo je veľmi tesné spojenie s veľmi obmedzenou voľnosťou pohybu. Okrem toho sú niektoré lipidy usporiadané hexagonálne s väčšou voľnosťou rotácie. Menšia lipidová frakcia je tekutá. (19) V cicavčej SC tvoria CER, CHOL, voľné MK dve koexistujúce kryštalické **lamelárne** fázy. Tieto fázy sa označujú ako fáza s dlhou periodicitou (LPP) a fáza s krátkou periodicitou (SPP) (**Obrázok 6**), s opakujúcou sa vzdialenosťou približne  $1,3 \times 10^{-6}$  cm. (21)



**Obrázok 6** Lamelárne usporiadanie lipidov a jeho SPP alebo LPP forma (vľavo), laterálne usporiadanie lipidov a jeho hexagonálna, ortorombická, tekutá forma (vpravo). (19)

### 3. Metodická časť

V tejto časti bude teoreticky popísaná metóda čistenia - gradientová centrifugácia a taktiež metódy použité na overenie čistenia ako optická mikroskopia a infračervená spektroskopia.

#### 3.1. Gradientová centrifugácia

Centrifúga je akékoľvek zariadenie, ktoré pôsobí trvalou odstredivou silou – to znamená silou spôsobenou rotáciou. Centrifúga efektívne nahrádza gravitačnú silu podobnou silnejšou silou. Rotačný prvok centrifúgy je zvyčajne poháňaný okolo pevnej osi elektromotorom alebo vzduchovou turbínou. Pri minimalizácii vibrácii a namáhania hriadeľa je nevyhnutné, aby zaťažený rotor bol dobre vyvážený, t.j. aby jeho celková hmotnosť bola rozložená okolo osi rotácie. (22) Centrifugácia sa využíva hlavne na odstredivkové oddeľovanie, čistenie zmesí biologických častíc v kvapalnom médiu. (23) Medzi faktory ovplyvňujúce odstred'ovanie patrí: teplota/viskozita, hustota vzoriek aj roztoku, vzdialenosť posunutia častíc, rýchlosť otáčania. (24)

Gradientová centrifugácia je typ centrifugácie, kedy je využívaná rozdielna hustota centrifugovaného média a centrifugovanej vzorky. Je predpokladateľné, že pokiaľ by bola suspenzia obsahujúca tuhé častice navrstvená na hustejšiu kvapalinu, častice zo suspenzie by sa pohybovali smerom nadol na základe ich hmotnosti. Avšak, pokiaľ na kvapalinu budú navrstvené častice, ktoré majú omnoho vyššiu hustotu ako príslušná kvapalina, prepadnú sa na dno ako celok a nebudú sa rozdeľovať na základe hustoty. Tomuto problému sa však predíde, ak sa suspenzia častíc navrství, nie na kvapalinu rovnomernej hustoty, ale na stĺpec kvapalín, ktorého hustota sa zvyšuje zhora nadol, t.j. cez gradient hustoty. (25) Vďaka tomuto gradientu hustoty bude možné jednotlivé častice separovať na základe rôznych hustôt média a tým pádom sa častice z navrstvenej suspenzie nebudú prepadať ako celok. Je možné ju ďalej rozdeliť na 2 podtypy, ktoré sú popísané ďalej.

## **Izopiknická centrifugácia**

Je analytická technika, ktorú môžeme použiť na oddelenie častíc roztoku v závislosti od hustoty, ale nie do veľkosti. (26) Suspendované častice hustejšie ako suspenzná kvapalina majú tendenciu migrovať smerom k okraju, zatiaľ čo tie menej husté sa pohybujú smerom k stredu. (22)

## **Rýchlostná zónová centrifugácia**

Rýchlostná zónová centrifugácia je technika používaná na efektívne oddelenie častíc rôznych veľkostí. (26) Týmto spôsobom rýchlejšie sedimentujúce častice nie sú kontaminované pomalšími časticami. (27) Tento typ centrifugácie bol použitý v tejto práci, preto tu bude popísaný detailnejšie.

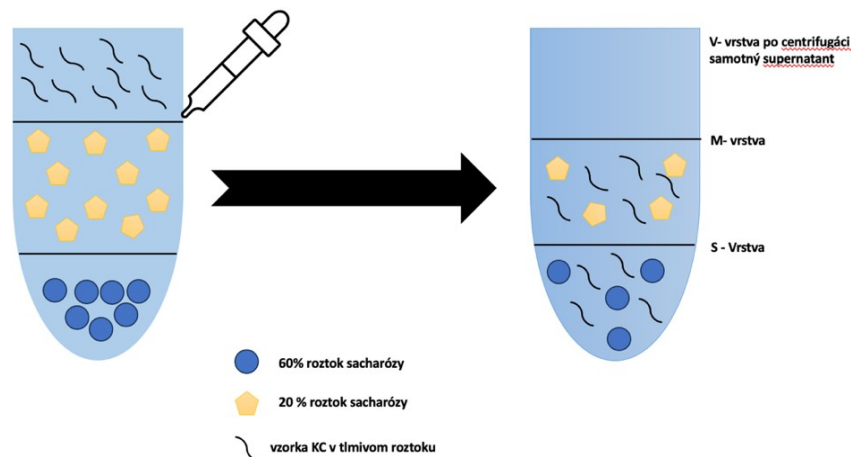
Rýchlosť sedimentácie častíc závisí od ich veľkosti a hmotnosti, nie od hustoty. Ako sa častice v páse pohybujú dole cez hustotné médium, vytvárajú sa zóny obsahujúce častice podobnej veľkosti. Pretože hustota častíc je väčšia ako hustota gradientu, všetky častice nakoniec vytvoria peletu, ak sú dostatočne dlho odstredované. (28)

Ak skúmavka obsahuje niekoľko kvapalín rôznych hustôt, odstredovaním ich udrží v samostatných vrstvách v poradí podľa hustoty, pričom najhustejšia kvapalina je najbližšie k dnu centrifugačnej skúmavky. Takéto vrstvenie viacerých kvapalín sa nazýva „gradient hustoty“. (29)

Dôležitým krokom pri gradientovej centrifugácii je výber média. Médium preto musí pri centrifugácii s gradientom hustoty spĺňať nasledujúce požiadavky: malo by mať dostatočnú rozpustnosť na vytvorenie rozsahu požadovaných hustôt (netvorí roztok s vysokou viskozitou v požadovanom rozsahu hustoty), neinterferuje s testovacími postupmi ani nereaguje s centrifugačnými skúmavkami, ľahko sa odstraňuje z čisteného produktu, vykazuje vlastnosti, ktoré možno použiť ako mieru koncentrácie. (28) Médium by tiež nemalo byť hyperosmotické alebo hypoosmotické, keď sú častice, ktoré sa majú oddeliť osmoticky citlivé, malo by mať nastaviteľné pH

a ionovú silu, ktorá je kompatibilná so separovanými zložkami, taktiež by nemalo byť ani toxické a metabolizované bunkami testovaného materiálu. (27)

Na **obrázku 7** je schematické znázornenie navrstvenia vzorky a média dvoch rozdielnych hustôt, a to na základe teórie o centrifugácii s gradientom hustoty (viz 3.1. **Gradientová centrifugácia**). Na ľavej strane je zobrazené navrstvenie suspenzie KC na stĺpec kvapalín o dvoch rozdielnych hustotách, a to 20% a 60% sacharózu. Pravá strana poukazuje na rozdelenie KC medzi jednotlivé vrstvy na základe hustotného gradientu.



**Obrázok 7** Vzorka SC pred navrstvením na sacharózu a odstredení (vľavo) a po odstredení (vpravo).

Gradientová centrifugácia má však aj nevýhody, napr. odstredovanie môže spôsobiť určité premiešanie alebo difúziu medzi vrstvami, čím sa zníži rozlíšenie alebo presnosť separácie. Okrem toho tieto gradienty nemusia byť vhodné pre častice, ktoré majú podobné hustoty alebo sa prekrývajú hustoty vrstiev. Taktiež viskozita a osmolarita roztokov môže ovplyvniť rýchlosť, sedimentáciu alebo stabilitu častíc. (30) Avšak, samotná centrifugácia má aj výhody, ako sú praktická jednoduchosť vykonania, ekonomická nenáročnosť a dostačujúce výsledky aj z malého objemu vzorku. (31)

### 3.2. Infračervená spektroskopia

Infračervená (IČ) spektroskopia meria absorpciu IČ žiarenia chemickými väzbami v materiáli. Chemické štruktúrne fragmenty, známe ako funkčné skupiny,

majú tendenciu absorbovať IČ žiarenie v rovnakom frekvenčnom rozsahu bez ohľadu na štruktúru zvyšku molekuly. (32) Je možné ju opísať ako použitie prístrojového vybavenia pre meranie fyzikálnych vlastností hmoty a vzťahu údajov k chemickému zloženiu. Používaný prístroj sa nazýva infračervený spektrofotometer a meranou fyzikálnou vlastnosťou je schopnosť hmoty absorbovať, prenášať alebo odrážať IČ žiarenia. Je to nedeštruktívny typ analýzy. (33)

IČ spektrum je dvojrozmerné zobrazenie absorpčných charakteristík molekuly. Charakteristickým rysom sú oblasti absorpcií, ktoré označujeme ako absorpčné pásy a obvykle ich charakterizujeme polohou maxima (vlnočet) a relatívnou intenzitou. (34) Poloha je bod na ose x alebo úsečka, kde sa pás objavuje a je vyjadrená číselne. Na opis polohy sa používajú štyri rôzne parametre: energia (v ergoch), frekvencia (v sekundách), vlnočet (v  $\text{cm}^{-1}$ ) a vlnová dĺžka (v mikrónoch). (33)

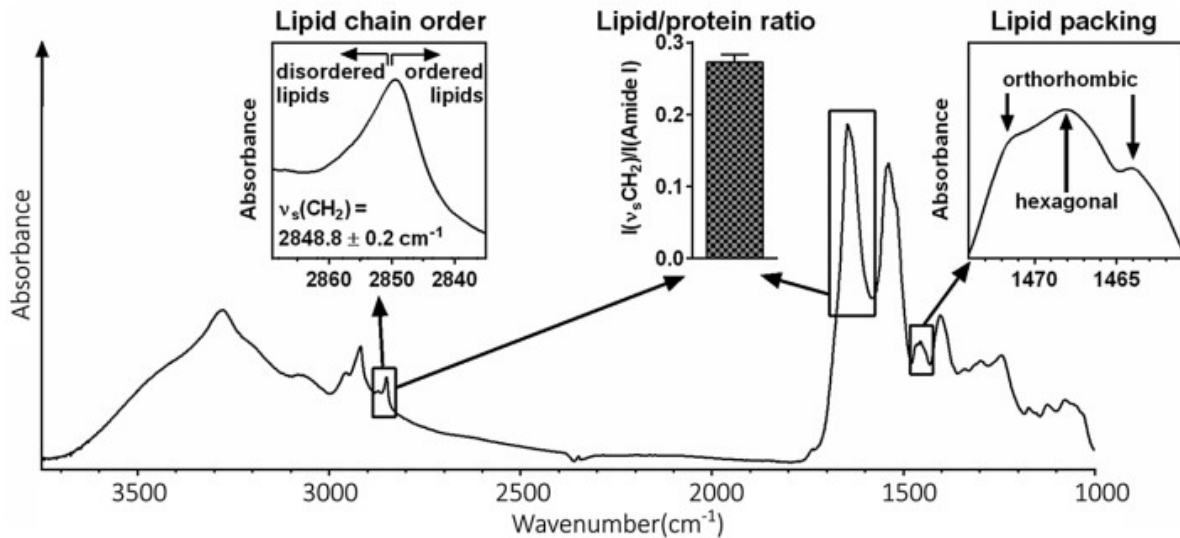
Nie každá hmota je schopná produkovať IČ spektrum (napr. kovy). Aby mohla molekula interagovať s IČ žiarením musí mať trvalý dipólový moment a musí vibrovať okolo väzby, alebo sa otáčať okolo osi kolmej na väzbu. Hoci existuje veľa možných vibrácií, najdôležitejšie vibrácie sú tie, ktoré spôsobujú zmenu dipólového momentu a teda pohyb naťahovania alebo ohýbania (nožnicové, kývavé...). (35) Spektra väčšiny zlúčenín poskytujú množstvo pásiem, vlnové dĺžky alebo frekvencie, pri ktorých sa objavujú, poskytujú primárne údaje použiteľné na identifikáciu zlúčenín. (33)

Priame informácie o molekulovej štruktúre sú neoddeliteľnou súčasťou vibračnej spektroskopie. Vo vibračných spektrách membránových zložiek je niekoľko pásov, ktoré priamo monitorujú lipidy. (36) Vďaka IČ spektroskopii je teda možné odvodiť laterálne usporiadanie lipidového reťazca. Demonštruje aplikáciu tohoto parametra na porovnanie organizácie lipidov SC v ľudskej koži a na odhad zmien molekulárnej organizácie lipidov po lokálnej aplikácii chemikálií. (37)

Čo sa týka analýzy SC, charakteristická vibrácia pre lipidy SC je napríklad symetrická valenčná vibrácia metylénových skupín ( $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ ), ktorá charakterizuje konformáciu acylových reťazcov (Obrázok 8). (38) Ďalšou vibráciou sledovanou pri analýze ľudskeho SC či jeho buniek, môže byť vibrácia karbonylovej funkčnej



skupiny, tzv. amid I (obvykle  $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ). Pokiaľ sa intenzita tejto vibrácie dá do pomeru s intenzitou symetrickej vibrácie metylenových skupín, môžeme z hodnoty odvodiť pomer lipidov (charakterizovaný v tomto prípade metylenovou vibráciou) a proteínov (charakterizovaný vibráciou amid I). (39) Ďalšia je v IČ spektroskopii lipidov SC obvykle sledovaná oblasť deformačných vibrácií, kde prítomnosť dubletu značí ortorombické (tesné) usporiadanie lipidov do kryštálovej mriežky. (40)



**Obrázok 8** Pre IČ analýzu sú používané charakteristiky znázornené schematicky na tomto obrázku a vyššie popísané v texte. Zľava sú sledované charakteristické valenčné vibrácie metylénovej skupiny a karbonylové funkčné skupiny. Ďalším popisom je pomer lipidov a proteínov a nasleduje koexistencia veľmi pevného ortorombického reťazca s mierne vonkajším hexagonálnym obalom lipidov. (39)

### 3.3. Optická mikroskopia

Účelom svetelnej mikroskopie je poskytnúť zväčšené obrazy vzoriek osvetlených alebo emitujúcich svetlo vo viditeľnom rozsahu spektra alebo v príslušných ultrafialových alebo blízkych infračervených oblastiach spektra. Optické zväčšenie sa

dosiahne prechodom svetla cez šošovku. Po určitom bode zväčšenia neodhalí žiadne ďalšie detaily a obraz bude vysoko rozpixelovaný. (41)

## **4. Experimentálna časť**

### **4.1. Chemikálie a materiál**

Dodecyldiamin oxid (DDAO), dodecylsírán sodný (SDS), dithiotreitol (DTT), kys. Ethylenamintetraoctová (EDTA), NaOH (hydroxid sodný), PBS ((fosfatom pufrovaný fyziologický roztok), CHCl<sub>3</sub> (chloroform), MeOH (metanol), tris-(hydroxymetyl) aminometan (Tris-baza), trypsin z prasačieho pankreasu, Merck (Schelldorf, Nemecko), nylonové filtre s veľkosťou ôk 0,47 μm, sacharóza - Merck (Schelldorf Nemecko), acetón, etanol 96%, koncentrovana HCl Penta (Chrudim, ČR), čistena voda FaF UK KFT.

### **4.2. Prístrojové vybavenie**

Dermatóm, centrifúga podtyp MPW–260 R (MPW Medical Instrument ,Varšava, Poľsko), optický mikroskop Olympus BX51, s digitálnou kamerou DP72 so softwarom analySIS auto 5.1 (Olympus GmbH, Nemecko ), laboratórne analytické váhy Ohaus PR SERIES (Ohaus, USA), IČ spektrofotometer Nicolet 6700 FTIR (Thermo Fisger Scientific, USA), vyhodnotenie pomocou programu OPUS (Bruker, Nemecko), Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Spojené kráľovstvo), exsikátor, vákuová odparka, Vortex, ultrazvuk, magnetická miešačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Nemecko) 100- 1000 ot./min.

### **4.3. Izolácia SC**

SC bolo izolované z kože pacientov po abdominoplastike v Sanatoriu Sanus (Hradec Králové, ČR) po podpísaní informovaného súhlasu a schválení etickej komisie pre Sanatoriu Sanus (suhlas č. 5/4/2018). Zmrazená koža bola voľne rozmrazená a dermatómovaná na 0,5 mm. Izolácia SC bola prevádzaná v roztoku trypsínu v PBS pH 7,4. Koža bola ponechaná v inkubátore cez noc pri 32 °C. Oddelené SC bolo odobrané pinzetou a následne premyté v Milipore vode, acetóne a opláchnuté zase vo vode.

Izolované SC bolo porozprestierané na Petriho miske a uložené do exsikátora pod vákuom, kde bolo ako sušidlo použité P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, parafín a NaOH. Izolované SC bolo uchovávané pri – 20 °C a pripravené na ďalšie použitie.

#### 4.4. Extrakcia voľných lipidov

Na extrakciu bolo odvážené 0,3946 g rozmrazeného, izolovaného SC. Zmesi rozpúšťadiel CHCl<sub>3</sub>/MeOH v pomeroch 2:1, 1:1, 1:2 boli postupne pridávané v príslušných pomeroch k SC.

Na 1 mg SC pripadal približne 1 ml rozpúšťadla a extrakcia v každej zmesi prebiehala 2 hodiny na magnetickej miešačke. Zmes bola následne filtrovaná a delipidizované SC bolo vysušené pod vákuom a uchované pri – 20 C°. (42) Filtráty boli spojené a odparené na vákuovej odparke, vyextrahované lipidy uložené na ďalšie použitie.

#### 4.5. Príprava pufov

##### 4.5.1. Fosfátový pufer 10 mM, pH 7,4 (PBS)

PBS bol pripravený z tabliet, rozpustením vo vode, pH bolo overené pomocou pH metra a prípadne upravené hydroxidom sodným. Pufer bol uchovaný v chlade.

##### 4.5.2. Extrakčný pufer s obsahom SDS

Pre rozvolnenie korneocytov z izolovaného SC bol použitý extrakčný pufer s obsahom SDS (EP-SDS), podľa skôr publikovanej metodiky. (42) Roztok obsahoval 8 mM DDAO a 2 mM SDS v PBS, molárne hmotnosti a návažky použitých látok sú zhrnuté v **tabuľke 1**. Po predchádzajúcom rozpustení PBS a overení príslušného pH bolo do fľaše pridané navážene DDAO a SDS, zmes sa dala rozpustiť na magneticú miešačku. Kvôli prípadným zhlukom, ktoré boli v pufre bol umiestnený na pár minút do ultrazvuku. Celý pufer bol následne filtrovaný cez nylónové filtre s veľkosťou ôk 0,47 µm. Takto pripravený pufer bol uchovávaný pri laboratórnej teplote.

*Tabuľka 1* Zloženie extrakčného pufru EP-SDS

	DDAO	SDS	dSDS
Koncentrácia (mM)	8,00	2,00	2,00
Molárna hmotnosť (g/mol)	229,40	288,38	313,53
Použitá množstvo (g)	1,84	0,58	0,63

#### 4.5.3. Extrakčný pufer s obsahom dSDS

Pre potvrdenie prítomnosti SDS vo finálnej vzorke, bol ďalej využitý extrakčný pufer s obsahom dSDS (EP-dSDS). Pri príprave sa postupovalo rovnako ako u EP-SDS s rozdielom prídavku dSDS namiesto SDS.

#### 4.5.4. Extrakčný pufer bez SDS

Kvôli problémom s odstránením SDS z finálnej vzorky, bola urobená aj extrakcia s puferom bez obsahu SDS, kde bol ako surfaktant prítomný len DDAO (EP-DDAO). Na prípravu pufru boli navážené množstvá odpovedajúce tabuľke 2. Tris-báza bola rozpustená na magnetickej miešačke v 2 litroch milipore vody. V tejto zmesi bolo pomocou pH metra odmerané pH a upravilo sa pomocou HCl na hodnotu pH približne 8. Do takto upravenej zmesi bola pridaná EDTA a zmes bola znovu umiestnená na magnetickú miešačku, po rozpustení EDTA došlo k poklesu pH, ktoré bolo znova potrebné upraviť. Nakoniec bolo pridané ešte DTT a overené pH. Pripravený bol aj umývací pufer a z jeho zloženia bol vynechaný surfaktant DDAO inak sa nelíšil od prípravy EP-DDAO. Postup prípravy bol tiež totožný.

*Tabuľka 2 Zloženie extrakčného pufru EP-DDAO*

	Tris	DTT	EDTA	DDAO
<b>Koncentrácia (mM)</b>	20,00	10,00	5,00	8,00
<b>Molárna hmotnosť (g/mol)</b>	157,60	154,30	416,24	229,40
<b>Použitá množstvo (g)</b>	4,85	3,09	4,16	3,67

#### 4.6. Nastavenie podmienok izolácie CLE

Najprv bolo stanovené, aké bude najvhodnejšie množstvo pufru na 1 mg SC. Bolo odvážené 39,1 mg SC (ďalej ako vzorka A) a 36,5 mg SC (ďalej ako vzorka B). K vzorke A bolo pridané 80ml EP-SDS (dvakrát viac) a k vzorke B 140 ml EP-SDS (štyrikrát viac).

Zmesi boli uložené na magnetickú miešačku s prednastavenou teplotou na 45 °C a ponechané 24 hodín.

Po 24 hodinách boli zmesi uložené do ultrazvuku na 10 minút pri laboratórnej teplote. Zmesi boli následne rozdelené do 50 ml centrifugačných skúmaviek a zcentrifugované na 6000 ot/min po dobu 20 min a pri teplote 20°C.

Peleta bola redispergovaná do 140 ml čerstvého EP-SDS. Zmes bola znovu ponechaná na miešačke 24 hodín. Po ukončení extrakcie bol zopakovaný postup s centrifugáciou a sonikáciou a prítomnosť CLE bola overená mikroskopicky.

#### **4.7. Čistenie disperzie CLE**

Nasledujúce podkapitoly popisujú čistenie disperzii CLE pomocou gradientovej centrifugácie s roztokom sacharózy a použitia rôznych pufrov.

##### **4.7.1. Čistenie disperzie CLE pomocou gradientovej centrifugácie s roztokom sacharózy**

Prvým krokom pre začatie celého čistenia ako nosnej metódy tejto práce bola príprava 60 % a 20 % roztoku sacharózy v PBS. Sacharózové roztoky boli pripravené rozpúšťaním za zvýšenej teploty v PBS, za použitia magnetickej miešačky. Do 15 ml centrifugačnej skúmavky bola opatrne navrstvená rôzne koncentrovaná sacharóza a vzorky, a to v nasledujúcom poradí. Na úplné dno bol daný 60% roztok, na tento roztok bol opatrne hrotom špičky pipety, na vrchnú hladinu, navrstvený 20% roztok a na tento opatrne, rovnako hrotom špičky, navrstvený roztok vzorky po izolácií.

Táto zmes bola zcentrifugovaná, po prvej centrifugácii boli viditeľne oddelené tri vrstvy. Vrchná vrstva (ďalej ako V), stredná vrstva (ďalej ako M) a vrstva spodná (ďalej ako S). Po odobratí vzorky z každej frakcie bolo mikroskopicky overené, že vrstva V obsahuje len minimálne množstvo KC, a preto s touto vrstvou už viac nebolo pracované. Všetky vrstvy S, respektíve M boli následne pospájané do menších skúmaviek a zcentrifugované. Z tejto zmesi bol odobratý supernatant, peleta redispergovaná a následne bola pridaná voda a zmes bola znovu zcentrifugovaná. Tento postup bol celkovo zopakovaný trikrát a po každom čistení boli mikroskopicky

pozorované zmeny. Vzorky boli tiež podrobené IČ spektroskopii, aby bolo zistené či sa tieto vrstvy líšia.

#### **4.7.2. Čistenie a gradientova centrifugácia s roztokom sacharózy a EP-DDAO**

Na cca 1 mg SC bolo pridaného asi 15 ml EP- DDAO a táto zmes sa tri dni miešala na magnetickej miešačke. Následne bola zcentrifugovaná 20 min pri 6000 ot\ min, bol odobratý supernatant, znova pridaný umývací pufr (bez DDAO) a tento postup bol zopakovaný dvakrát. Po druhom opakovaní bol odobratý supernatant a vzorka navrstvená na 60% a 20% roztok sacharózy a od tejto chvíle prebiehala gradientová centrifugácia - zhodne ako v prvom kroku kapitoly 4.7.1.

#### **4.7.3. Čistenie a gradientová centrifugácia za použitia EP-dSDS**

Pretože sa spektrum lipidov na povrchu CLE a SDS prekrývalo, bola extrakcia zopakovaná za totožných podmienok ako v predchádzajúcom kroku, avšak za použitia EP-dSDS. Až na použitie EP-dSDS bol postup zhodný s prvým krokom podkapitoly 4.7.1

### **4.8.Charakterizácia vzorky**

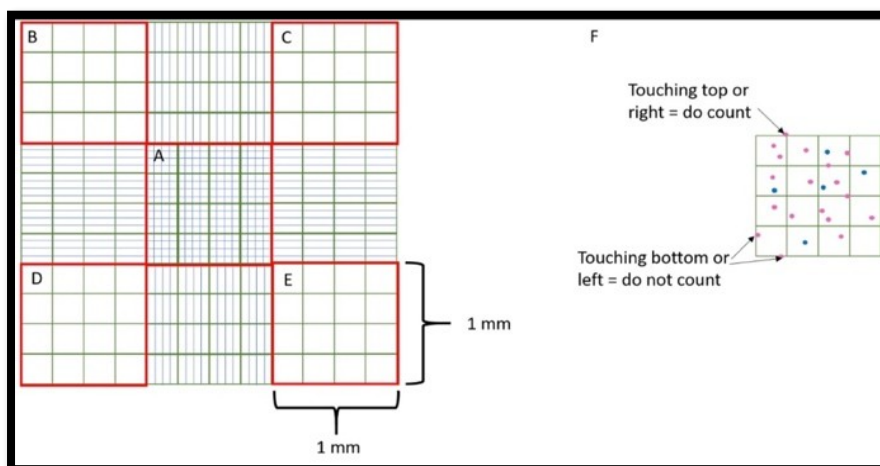
Pelety boli skladované v chladničke a pripravené na charakterizáciu, ktorá prebehla pomocou optickej mikroskopie, IČ spektroskopie a ZetaSizeru.

#### **4.8.1. Optická mikroskopia**

Pomocou optickej mikroskopie bola pozorovaná morfológia buniek na podložnom sklíčku, kam bola kvapnutá disperzia. Ďalej boli bunky počítané pre zaistenie efektivity extrakcie. Prečistené pelety boli spojené a uchované v chlade. Tieto vzorky boli následne pomocou vortexu redispergované v PBS.

#### **4.8.2. Počítanie buniek pomocou hemocytometru**

Do Neubauerovej komôrky bolo pipetované 10  $\mu$ l vzorky, kde boli pod mikroskopom pri zväčšení 10 $\times$  počítané bunky v piatich štvorcoch (**Obrázok 9**). Boli počítané len bunky neporušené, vo vnútri štvorca a na ľavom a spodnom okraji štvorca, aby nedošlo k duplicitám.



**Obrázok 9** Neubauerová komôroka pre počítanie buniek (43)

Následne boli bunky počítané na základe rovnice (Rovnica 1), kde  $y$  značí zistený počet buniek v piatich štvorcoch (A-E, viz Obrázok 7) a je vynásobený aplikovaným množstvom (v tomto prípade 10  $\mu\text{l}$ ),  $10^4$  pro prepočet z aplikovaných mikrolitrov na mililitre a množstvom vzorku, z ktorých bolo 10  $\mu\text{l}$  odobrané (teda 1 ml).

**Rovnica 1** Počítanie buniek pomocou hemocytometra

$$\text{počet buniek} = y \times \text{aplikované množstvo} (\mu\text{l}) \times 10^4 \times \text{množství vzorku} (\text{ml})$$

**4.8.3. Overenie čistoty vzorky pomocou infračervenej spektroskopie**

Peleta, získaná po prečistení, bola zmeraná pomocou IČ spektroskopie. Meranie bolo urobené na Katedre Bioorganické a organické chémie. Vysušená peleta bola aplikovaná priamo na ATR kryštál za podmienok 128 skenov pri rozlíšení 2  $\text{cm}^{-1}$ . Postup je už popísaný v predchádzajúcej kapitole.

**4.8.4. ZetaSizer**

100  $\mu\text{l}$  disperzie buniek v PBS bolo nariedené do 1 ml PBS a zvortexované. Táto nariedená disperzia bola naplnená do kyvety pre meranie zeta potenciálu a merané na ZetaSizeri.

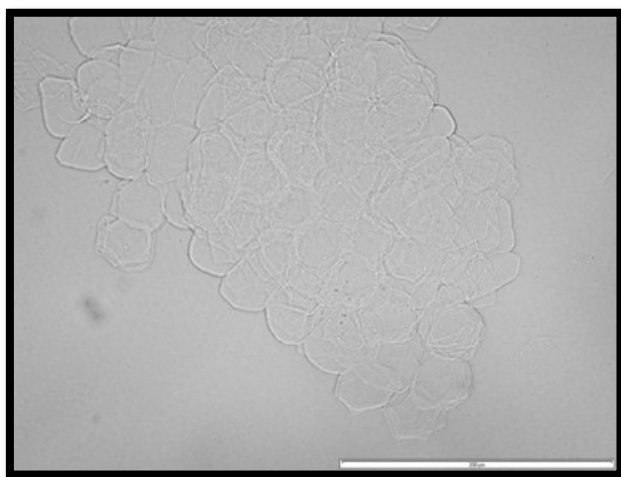


## 5. Výsledky

### 5.1. Nastavenie podmienok izolácie

Ako už bolo uvedené skôr, najprv bolo potrebné nastaviť podmienky extrakcie. Jednou z týchto podmienok bola rýchlosť centrifugácie. Po samotnej extrakcii pomocou EP-SDS a centrifugácii na 6000 ot/min (20 min, 20°C) bola časť získaného supernatantu odobratá a pipetovaná do centrifugačných mikroskúmaviiek, v ktorých bola ďalej zcentrifugovaná na 12000 ot/min (20 min, 20°C). Sediment bol redispergovaný v 10 ml PBS a z tejto disperzie bola odobratá vzorka na mikroskop. Pretože v supernatante nebolo prítomné väčšie množstvo CLE, bolo dokázané, že nižšie otáčky sú dostačujúce pre oddelenie CLE od ďalších zbytkov SC. Ďalej bola teda pre centrifugáciu po izolácii použitá rýchlosť otáčok 6000 ot/min.

Okrem supernatantu bola mikroskopicky pozorovaná aj získaná peleta buniek (sedimentované KC). **Obrázok 10** popisuje KC po prvej samotnej extrakcii, kedy je možné zaznamenať, že sa korneocyty vyskytujú vo forme veľkých zhlukov. Je potrebné, aby KC boli vo vzorke ako samostatné bunky, aby bolo potvrdené ich rozdelenie počas izolácie.



*Obrázok 10 KC po 24 hodinovej extrakcii a prvej samotnej centrifugácii*

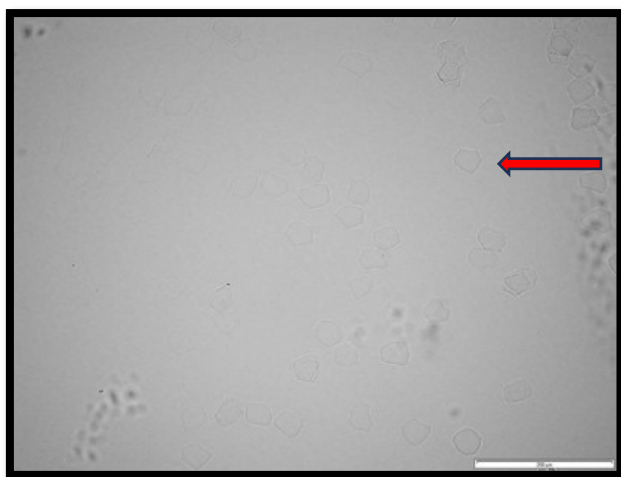
Po zhodnotení pilotného experimentu boli teda podmienky izolácie nastavené nasledovne: cca 4 ml EP-SDS boli použité na 1 mg SC, zmes bola miešaná 24h pri

45 °C, sonikovaná 10 min, a centrifugovaná na 6000 ot/min (20 min, 20°C). Ďalej bol supernatant odobratý, peleta redispergována v čerstvom EP-SDS o rovnakom objeme ako na začiatku a zmes bola ponechaná na miešačke ďalších 24 h pri 45°C.

## 5.2. Optická mikroskopia

Pod optickým mikroskopom boli sledované rôzne zmeny v priebehu celej práce a taktiež táto metóda charakterizácie slúžila ako dôležitá kontrola, kedy bol v experimente pri overení veľkosti, navrstvenosti a celkového výzoru jednotlivých KC.

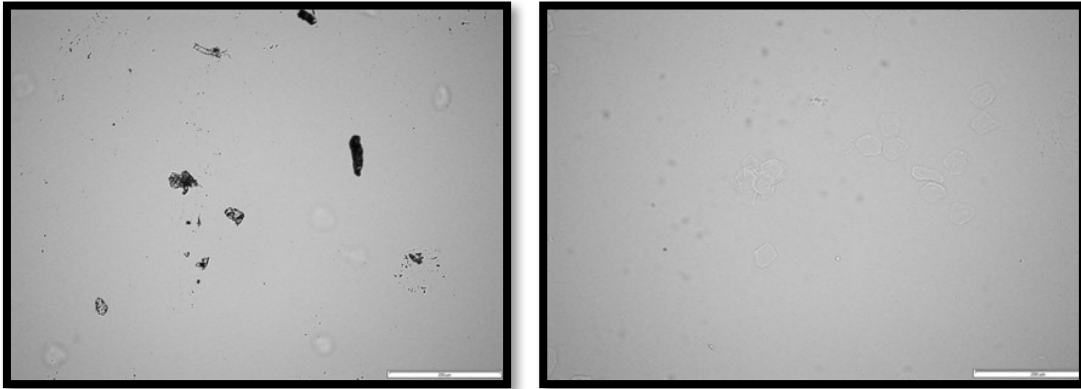
Na **obrázku 11** sú viditeľné KC, ktoré boli však pred mikroskopiou uložené do ultrazvuku. Vplyvom pôsobenia mechanických vln došlo k rozbitiu zhlukov KC na jednotlivé KC. Tieto už boli pod mikroskopom pekne viditeľné a teda pre ďalšiu prácu omnoho vyhovujúcejšie.



**Obrázok 11** KC ktoré boli pekne rozptýlené pretože pred centrifugáciou boli uložené na 5 minút do ultrazvuku. Šípka na obrázku označuje oddelený korneocyt.

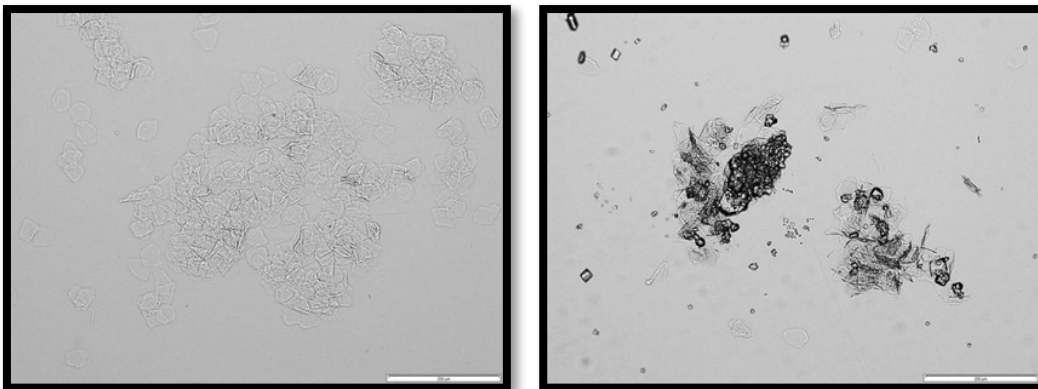
Pre ďalšie overenie či sa v jednotlivých oddelených vrstvách V, M, S (viz. Gradientová centrifugácia roztokom sacharózy) nachádzajú KC a či má vôbec opodstatnenie s touto vrstvou ďalej pracovať, bol taktiež použitý optický mikroskop. Na **obrázku 12** sú viditeľné KC po gradientovej centrifugácii cez sacharózu. V roztoku sacharózy sa oddelila vrstva „V“, kde je viditeľné, že obsahuje iba nečistoty zo vzorky, a preto nebola pre ďalšiu prácu použitá. Vrstva „M“ a „S“ (**obrázok 12 vpravo**) už

obsahovala samotné KC. Podľa pôvodného experimentálneho plánu mali byť tieto vzorky prečistené trikrát vodou a trikrát etanolom.



*Obrázok 12 Zľava vrstva V, ďalej S*

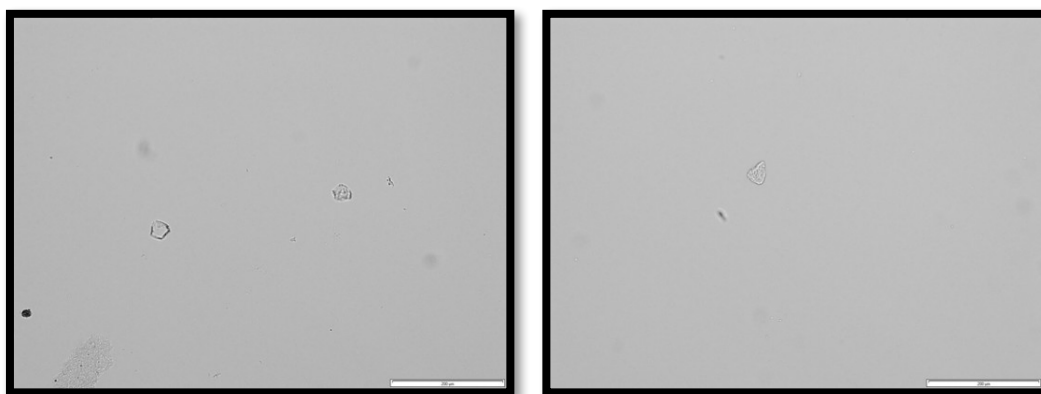
**Obrázok 13** popisuje na ľavej strane vzorku prečistenú vodou. Na tejto vzorke je viditeľné, že vplyvom centrifugácie a vody došlo k rozpusteniu sacharózy vo vode, a tá bola vo forme supernatantu nad usadenými KC odobratá a teda aj odstránená z roztoku. Na obrázku sprava však vidíme obrovské zhluky kryštálov sacharózy, ktoré po prečistení etanolom ostávajú stále vo vzorke.



*Obrázok 13 Zľava vzorka prečistená trikrát vodou a sprava vzorka prečistená etanolom*

Na základe tohoto porovnania bolo viditeľné, že etanol na prečistenie vzorky od sacharózy nie je dostatočný, keďže aj po treťom čistení obsahovala vzorka veľké množstvo kryštálov sacharózy, ktoré sa v tejto fáze experimentu už vo vzorke nachádzať nemali.

Keďže sa celková výtťažnosť a masívne straty KC zo vzorky v priebehu práce zdali priveľké, bol použitý extrakčný pufer EP-DDAO viz. 4.5.4. Na **obrázku 14** môžeme vidieť KC po extrakcii v extrakčnom pufre, kedy po odbere supernatantu a následnej centrifugácii v EP-DDAO bolo viditeľné veľmi malé množstvo KC. Výsledkom teda je, že sa pri použití EP-DDAO nepotvrdilo zvýšenie výtťažnosti.



*Obrázok 14 Extrakcia za použitia EP-DDAO*

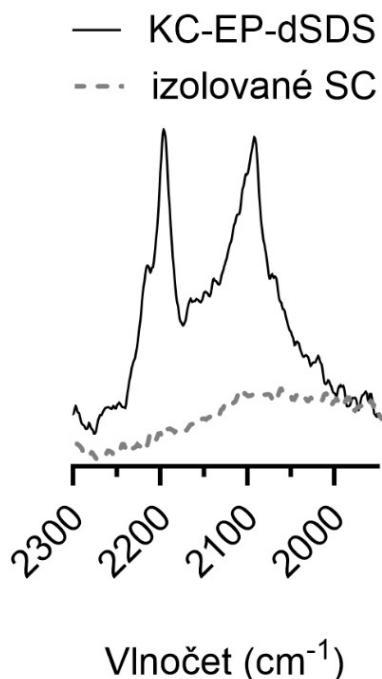
### 5.3. Počítanie buniek pomocou hemocytometra

Počty buniek z jednotlivých štvorcov boli spriemerované a následne dosadené do rovnice 1. Na jej základe bol po spriemerovaní výsledkov zistený počet buniek v pelete po prečistení, a to  $3 \times 10^4$  buniek.

### 5.4. Infračervená spektroskopia

Meranie IČ spektroskopie bolo využité pre sledovanie rezíduí surfaktantu vo vysušených peletách KC. Pretože sa vibrácie SDS prekrývajú s metylénovou symetrickou vibráciou lipidov naviazaných na KC ( $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ ), nebolo možné overiť, či bol surfaktant vymytý. Táto vibrácia je pre organizáciu lipidov v SC dôležitá a v budúcnosti by teda pri príprave modelov interferovala s ich charakterizáciou. Preto bolo prejdené k overeniu prítomnosti surfaktantu vo finálnej pelete a bola zopakovaná izolácia extrakčným pufrom, ktorý obsahoval namiesto SDS jeho deuterovanu verziu (dSDS). V literatúre bolo nájdené, že dSDS vykazuje dva vibračné pásy, a to okolo  $2095 \text{ cm}^{-1}$  a  $2197 \text{ cm}^{-1}$ . (44) Po prečistení gradientovou centrifugáciou bola vysušená peleta zmeraná a bola zistená prítomnosť týchto vibračných pásov (**Obrázok 15**). Tým

bolo potvrdené, že ani gradientová centrifugácia cez sacharózu neodstráni nežiadúcu prítomnosť SDS a bolo nutné hľadať inú cestu čistenia izolovaných KC. (44)



**Obrázok 15** IČ spektrum popisujúce rozdielnu odozvu dSDS so znázornením čiarkovanej krivky poukazujúcej na odozvu SC a plnej krivky poukazujúcej na dSDS.

Ďalej bolo pomocou IČ sledované, či je rozdiel v usporiadaní lipidov v CLE obsiahnutých vo vrstvách S a M po gradientovej centrifugácii. Bolo zistené, že jednotlivé spektrá sa nelíšia, a preto bolo s týmito vzorkami zachádzané ako so zhodnými v opakovaní experimentu, potom boli vždy vrstvy S a M zlúčené.

### 5.5. Zetasizer

Pomocou ZetaSizeru bolo zistené, že disperzia KC nemá vlastnosti vhodné pre meranie veľkosti častíc a zetapotenciálu metódou dynamického rozptylu svetla. Vzorka mala vysokú polydisperzitu ( $PI > 1$ ), čo značí disperziu s mnohými časticami rozdielnej veľkosti. Vzorka tiež v kvete príliš rýchlo sedimentovala.

## 6. Diskusia

Pri vývoji a validácii tejto metódy bolo potrebné nastaviť optimálne podmienky, ktoré budú pre potenciálne vyextrahované KC vhodné, nebudú pre nich agresívne a bude vhodná výťažnosť.

V literatúre bolo nájdené, že pre rozvoľnenie buniek SC sa bežne využíva povarenie tkaniva s detergentom SDS. (45) (42) SDS bol teda využitý ako hlavná zložka extrakčného pufru. Ďalej bola práca zameraná na vyvinutie metódy prečistenia. Podobné bunečné suspenzie môžu byť ďalej prečistené buď filtráciou alebo centrifugáciou, ktorá sa zdá účinnejšia. (46) V práci Schwarzendruber et al, je k tomuto účelu použitá centrifugácia za využitia roztokov o rôznej hustote. Preto bolo prejdené ku gradientovej centrifugácii za pomoci sacharózy, ktorá je k podobným vzorkám šetrná. (25)

Získané pelety boli podrobené IČ, avšak kvôli prekrývajúcim sa vibráciám SDS a lipidov SC (44) bola extrakcia zopakovaná tiež s dSDS. Bolo zistené, že (d)SDS sa zo vzorku nepodarilo vymyť, a to ani gradientovou centrifugáciou. Môže to byť spôsobené vysokou afinitou SDS k membránovým proteínom, čo už bolo skôr preskúmané. (47)

Pretože cieľom tejto práce bolo najprv vyvinúť a ďalej využiť pre prečistenie metódu gradientovej centrifugácie, bolo teda ďalej prejdené k zmene pufru. Bol použitý EP-DDAO, kde bol surfaktantom len DDAO, čo je na rozdiel od SDS surfaktantu bez náboja, čo by mohlo znížiť jeho afinitu k proteínom v CLE. (48) Tento pufer bol použitý tiež v súbežne prebiehajúcej diplomovej práci Táni Ryantovej, avšak len za prečistenie pomocou filtrácie. V tejto práci bolo cieľom zistiť, či gradientová centrifugácia v kombinácii s týmto pufrom poskytne vyšší výťažok KC. Nasledovalo teda samotné čistenie ktoré zahŕňalo gradientovú centrifugáciu v sacharóze, aby boli z KC odstránene zvyšky pufru. Následne bola vodou, eventuálne etanolom, čistená vzorka od kryštálikov cukru. Ako už bolo spomenuté vyššie etanol sa pre tieto účely neukázal ako vhodný, pretože zanechával kryštáliky sacharózy vo vzorke, čo je spôsobené nízkou rozpustnosťou sacharózy v etanole.

Čo sa týka charakterizácie vzorku, boli, okrem optickej mikroskopie, využité ďalšie metódy. Ako vhodná sa ukázala IČ spektroskopia, pretože pomohla odhaliť zbytky detergentu vo výslednej vzorke. Ako nevhodné sa naopak ukázalo meranie veľkosti častíc pomocou metódy dynamického rozptylu svetla. V literatúre bolo nájdené, že ľudské bunky boli touto metódou merané. KC sú však veľmi atypické bunky, je teda možné, že sa ich nepodarilo zmerať, buď kvôli ich tvaru/veľkosti, alebo prítomnosti menších fragmentov, ktoré vznikli opakovaným premývaním a spôsobili polydisperzitu vzorky. (49)

Nakoniec sa teda pomocou gradientovej centrifugácie podarilo získať peletu KC, ktorá bola čistá a s dobrou morfológiou. Avšak, táto metóda je veľmi časovo náročná a pre rutinné získavanie KC v laboratóriu je teda skôr vhodné zvoliť metódu prečistenia klasickou filtráciou. Je potrebné dodať, že výsledky tejto práce sú súčasťou komplexnej publikácie, ktorá sa zapodievala funkciou CLE na usporiadaní lipidov kožnej bariéry. (12)

## 7. Záver

Korneocytálna lipidová obálka (CLE) je jednou z veľmi dôležitých častí kože, na ktorých prebieha stále veľmi intenzívny výskum, ktorý je potrebný pre úplne pochopenie CLE a teda aj samotnej kože ako celku.

Cieľom tejto práce bol vývoj a validácia modelu CLE *in vitro*. Hlavným nosným pilierom tejto témy bolo teda upraviť a nastaviť podmienky pre prečistenie vzorky gradientovou centrifugáciou pomocou sacharózy. Cieľom celého prečistenia bolo odstrániť zo vzorky detergent a následne pomocou prečistenia vodou, odstrániť zo vzorky aj sacharózu. Všetko toto sa podarilo, avšak je potrebné povedať, že na základe veľkého množstva zlučovanií peliet a ich následnej redispergácií v novom médiu boli straty KC vysoké.

Z výsledkov tejto diplomovej práce je teda zrejmé, že vývoj a validácia celého procesu a hlavne gradientovej centrifugácie, bola úspešná a je možné, nastavené podmienky, reprodukovať. Avšak aj na základe toho, že bola získaná peleta KC, ktorá bola morfológicky v poriadku, je táto metóda časovo náročná a pre laboratórne získavanie KC prakticky nevhodná.



## 8. Citované diela

1. LOPEZ-OJEDA, Wilfredo, et al. Anatomy, skin (integument). In: StatPearls [Online]. Publishing, 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/>
2. DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. Grada Publishing as, 2009. ISBN 9788024732404
3. MCGRATH, John A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and organization of human skin. Rook's textbook of dermatology, 2004, 1:3.2-3.80. ISBN 1405141042.
4. KERN, Dan. Human skin: Basic Anatomy and Functions. [online]. [24.8.28]. Dostupné z <https://www.acne.org/human-skin-basic-anatomy-and-functions>
5. ŠTOREK, Jiří, et al. Dermatovenerologie 1. vydanie . Praha : Galén , 2008. ISBN 978-80-246-1360-4.
6. WONG, Richard, et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. Experimental dermatology [online]. 2016, 25.2: 92-98. Dostupné z: [doi.org/10.1111/exd.12832](https://doi.org/10.1111/exd.12832).
7. SATALOFF, Robert T., et al. (ed.). Sataloff's Comprehensive Textbook of Otolaryngology: Head & Neck Surgery: Pediatric Otolaryngology. JP Medical Ltd, 2015. ISBN 935152745X.
8. MONTEIRO-RIVIERE, Nancy A. Structure and function of skin. In: Toxicology of the Skin. CRC Press, 2010. s. 15-32. 2010. ISBN 1420079182 .
9. YOSEF, H, ALHAJJ, M, SHARMA, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis [online] In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk470464>
10. EUCERIN.sk. Ako funguje koža – Štruktúra a funkcia kože človeka. [online]. [24.8.28]. Dostupné z <https://www.eucerin.sk/o-kozi/zakladne-informacie/struktura-a-funkcie-koze>.
11. LE LAMER, Marina, et al. Defects of corneocyte structural proteins and epidermal barrier in atopic dermatitis. Biological chemistry, 2015, 396.11:1163-1179. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-014>.
12. DWIVEDI, Anupma, et al. Lipid Monolayer on Cell Surface Protein Templates Functional Extracellular Lipid Assembly. Small, 2024, 2307793. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/sml.202307793>.

13. MURPHEY MB, MIAO JH, ZITO PM. Histology, Stratum Corneum [online].In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/NBK/nbk513299>
14. PROKSCH, Ehrhardt; BRANDNER, Johanna M.; JENSEN, Jens-Michael. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* [online]. 2008, 17.12: 1063-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
15. RMENGOT-CARBO, M.; HERNÁNDEZ-MARTÍN, Á.; TORRELO, A. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [online]. 2015, 106.2: 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2014.12.007>
16. SANDILANDS, Aileen, et al. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of cell science* [online]. 2009, 122.9: 1285-1294. <https://doi.org/10.1242/jcs.033969>
17. CLEVELAND Clinic. Keratin [online]. [24-05-12]. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/23204-keratin>
18. PROKSCH, Ehrhardt; FÖLSTER-HOLST, Regina; JENSEN, Jens-Michael. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *Journal of dermatological science* [online]. 2006, 43.3: 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.06.003>
19. VÁVROVÁ, K.; KOVÁČIK, A.; OPÁLKA, L. Ceramides in the skin barrier. *European Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, 64.2: 28-35. <https://doi.org/10.1515/afpuc-2017-0004>
20. REZA, Safoura; UGORSKI, Maciej; SUCHAŃSKI, Jarosław. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology*, 2021, 31.11: 1416-1434. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab046>
21. MOJUMDAR, E. H., et al. Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* [online]. 2016, 1858.8: 1926-1934. DOI:10.1016/j.bbamem.2016.05.006
22. .BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia. "centrifuge"[online].[24-05-18].Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/centrifuge>

23. WALKER, John M.; WILSON, Keith (ed.). Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge university press, 2010. 7th ed s.73- 99. ISBN 978-0-521-51635-8.
24. FISHER SCIENTIFIC. Centrifugation theory [online].[2024-05-18]. Dostupné z: <https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html>
25. GRAHAM, D.J. Biological Centrifugation. Garland Science, 2001. 1st ed. s. 1-23. <https://doi.org/10.1201/9781003076797>
26. SUMAN, Swati. Density gradient centrifugation, types, advantages and disadvantages [online]. [24-04-17]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/slideshow/density-gradient-centrifugationtypes-advantages-and-disadvantages/233079878>
27. MAJEKODUNMI, Stephen Olaribigbe. A review on centrifugation in the pharmaceutical industry. Am. J. Biomed. Eng [online]. 2015, 5.2: 67-78. 10.5923/j.ajbe.20150502.03
28. FREI, Mark. Centrifugation separations [online]. [24-04-01].Dostupné z: [sigmaaldrich.com](http://sigmaaldrich.com)
29. JoVE Science Database.: Density Gradient Ultracentrifugation [online].[24-04-01]. Cambridge, MA, (2023). Dostupné z: <https://www.jove.com/t/5685>
30. LINKEDIN.com.: What are the advantages and disadvantages of different types of density gradients for separation [online]. [24-02-20] s.l.: Dostupné z: [https://www.linkedin.com/advice/1/what-advantages-disadvantages-different-types-9e?utm\\_source=share&utm\\_medium=guest\\_desktop&utm\\_campaign=copy](https://www.linkedin.com/advice/1/what-advantages-disadvantages-different-types-9e?utm_source=share&utm_medium=guest_desktop&utm_campaign=copy)
31. FORNAGUERA, Cristina; SOLANS, Conxita. Analytical methods to characterize and purify polymeric nanoparticles. International Journal of Polymer Science [online]. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6387826>
32. NG, Lily M.; SIMMONS, Reiko. Infrared spectroscopy. Analytical chemistry, 1999, 71.12: 343-350. <https://doi.org/10.1021/a1999908r>
33. ALPERT, Nelson L.; KEISER, William E.; SZYMANSKI, Herman A. IR: theory and practice of infrared spectroscopy. Springer Science & Business Media, 2012. s. 1-3. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8160-0>

34. KANIA, Patrik. Infračervená spektroskopie [online].[24-05-18]. Dostupné z: <https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/0007~~M9f1dAYA.pdf?redirected>
35. NIELSEN, S. Suzanne, et al. (ed.). Food analysis. Springer science ,2010. s. 107- 117. ISSN 2214 - 7799
36. MENDELSON, Richard; MOORE, David J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. Chemistry and physics of lipids, 1998, 96.1-2: 141-157. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00085-1)
37. BONCHEVA, Mila; DAMIEN, Fabienne; NORMAND, Valéry. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes [online].2008, 1778.5: 1344-1355. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.01.022>
38. BONCHEVA, Mila. The physical chemistry of the stratum corneum lipids. International journal of cosmetic science, 2014, 36.6: 505-515. <https://doi.org/10.1111/ics.12162>
39. SVOBODA, Marek, et al. Comparison of suction blistering and tape stripping for analysis of epidermal genes, proteins and lipids. Archives of dermatological research, 2017, 309: 757-765. DOI: 10.1007/s00403-017-1776-6
40. GROEN, Daniël, et al. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function?. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2011, 1808.6: 1529-1537. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.10.015>
41. DOKLAND, Terje, et al. Techniques in microscopy for biomedical applications. Vol. 2. World Scientific Publishing Company, 2006. s. 9-12. ISBN 9813101954.
42. SWARTZENDRUBER, D. C., et al. Isolation of corneocyte envelopes from porcine epidermis. Archives of dermatological research, 1988, 280: 424-429. <https://doi.org/10.1007/BF00429982>
43. YEVGENIY, Grigoryev. Cell counting with a homocytometer: As easy as 1, 2, 3...[online]. [24.1.20.]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>

44. SAAD, P., et al. Infrared spectroscopic studies of sodium dodecyl sulphate permeation and interaction with stratum corneum lipids in skin. *International journal of cosmetic science*, 2012, 34.1: 36-43. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00678.x>
45. PICHERY, Mélanie, et al. PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Human Molecular Genetics*, 2017, 26.10: 1787-1800. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx079>
46. JARNIK, Michal; SIMON, Martha N.; STEVEN, Alasdair C. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *Journal of cell science*, 1998, 111.8: 1051-1060. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.8.1051>
47. RATH, Arianna, et al. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.6: 1760-1765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
48. KOCH, Peter J., et al. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *The Journal of cell biology*, 2000, 151.2: 389-400. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.389>
49. KANYO, Nicolett, et al. Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Scientific reports*, 2020, 10.1: 22422. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80033-6>
50. HATTA, Ichiro, et al. Stratum corneum function: A structural study with dynamic synchrotron X-ray diffraction experiments. *Journal of Oleo Science*, 2021, 70.9: 1181-1199. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21159>
51. ELIAS, Peter M., et al. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014, 1841.3: 314-318. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.09.011>
52. CHIBA, Takahito, et al. Measurement of trihydroxy-linoleic acids in stratum corneum by tape-stripping: Possible biomarker of barrier function in atopic dermatitis. *PLoS One*, 2019, 14.1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210013>

53. BRAKKE, Myron K. Density gradient centrifugation: a new separation technique 1. Journal of the American Chemical Society, 1951, 73. 4: 1847- 1848.  
<https://doi.org/10.1021/ja01148a508>