

Vliv kyseliny indol-3-octové na kůži

Bc. Petra Záleská, MBA

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Petra Záleská, MBA
Osobní číslo: T22321
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Vliv kyseliny indol-3-octové na kůži

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Provedte rešerši na zadané téma, zaměřte se na kyselinu indol-3-octovou (IAA), která patří k nejběžněji se vyskytujícím rostlinným hormonům ze skupiny auxinů, zároveň však patří mezi metabolity produkované střevním i kožním mikrobiomem.

Charakterizujte její potenciál v oblasti zlepšování kožní bariéry a odolnosti proti oxidačnímu stresu v procesu stárnutí kůže, které se ukazují být významné pro aplikace v kosmetologii a dermatologii.

II. Praktická část:

Navrhněte charakterizování efektu IAA na kůži se zaměřením na aktivaci aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) signální dráhy, produkci složek kožní bariéry a antioxidačních enzymů.

Zaměřte se na odolnost kůže vůči oxidačnímu stresu vyvolanému UVA/B zářením s použitím experimentálních modelů buněčných kultur a prasečích kožních explantátů.

Pro sledování efektů využijte metody molekulární biologie. Získané výsledky vhodnou formou zpracujte, diskutujte a formulujte závěry.

Experimentální část práce bude realizována v laboratořích společnosti Contipro a. s. v Dolní Dobrouči.

Konzultantkami práce jsou Mgr. Iva Dolečková, Ph.D. a Mgr. Ilona Matějková.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Kwon, S.h., M.y. Jeong, K.c. Park, S.w. Youn, C.h. Huh, a J.i. Na. 2014. "A New Therapeutic Option for Facial Seborrheic Dermatitis: Indole-3-Acetic Acid Photodynamic Therapy". *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28 (1): 94–99. <https://doi.org/10.1111/jdv.12070>.
- [2] Na, Jung-Im, So-Young Kim, Jeong-Hye Kim, Sang-Woong Youn, Chang-Hun Huh, a Kyoung-Chan Park. 2011. "Indole-3-Acetic Acid: A Potential New Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Acne Vulgaris". *Lasers in Surgery and Medicine* 43 (3): 200–205. <https://doi.org/10.1002/lsm.21029>.
- [3] Uberoi, Aayushi, Casey Bartow-McKenney, Qi Zheng, Laurice Flowers, Amy Campbell, Simon A. B. Knight, Neal Chan, et al. 2021. "Commensal Microbiota Regulates Skin Barrier Function and Repair via Signaling through the Aryl Hydrocarbon Receptor". *Cell Host & Microbe* 29 (8): 1235-1248.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.011>.
- [4] Vyhliďalová, Barbora, Kristýna Krasulová, Petra Pečinková, Adéla Marcalíková, Radim Vrzal, Lenka Zemánková, Jan Vančo, et al. 2020. "Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization". *International Journal of Molecular Sciences* 21 (7): 2614. <https://doi.org/10.3390/ijms21072614>.
- [5] Yu, Jinlei, Yang Luo, Zhenlai Zhu, Yufeng Zhou, Licheng Sun, Jixin Gao, Jinlv Sun, Gang Wang, Xu Yao, a Wei Li. 2019. "A Tryptophan Metabolite of the Skin Microbiota Attenuates Inflammation in Patients with Atopic Dermatitis through the Aryl Hydrocarbon Receptor". *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (6): 2108-2119.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.036>.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Pavlačková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Petra Záleská

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Kyselina indol-3-octová je jedním z nejčastěji se vyskytujících fytohormonů patřících do skupiny auxinů, zároveň je však také metabolitem střevní a kožní mikroflóry. Na různých tkáních a modelech byla popsána řada jejích zajímavých účinků, v současnosti však neexistuje studie, která by popisovala vliv této kyseliny na normální, zdravou kůži.

K charakterizaci efektu kyseliny indol-3-octové na kůži byly využity experimentální modely buněčných kultur a prasečích kožních explantátů. Pomocí běžných metod molekulární biologie, jako je qRT-PCR, fluorescenční mikroskopie a další, bylo prokázáno, že se kyselina indol-3-octová podílí na aktivaci aryl hydrokarbonového receptoru, který posiluje bariérovou funkci kůže, a zvyšuje odolnost proti oxidačnímu stresu vyvolanému UV zářením, které je jednou z nejčastějších příčin stárnutí kůže.

Klíčová slova: kyselina indol-3-octová, tryptofan, aryl hydrokarbonový receptor, genová exprese, kožní bariéra, oxidační stres, stárnutí kůže.

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid is one of the most common phytohormones belonging to the auxin group, but it is also a metabolite of the intestinal and skin microflora. Many of its interesting effects have been described in various tissues and models, but there is currently no study describing the effect of this acid on normal, healthy skin.

Experimental cell culture models and porcine skin explants were used to characterize the effect of indole-3-acetic acid on skin. Using conventional molecular biology methods such as qRT-PCR, fluorescence microscopy and others, indole-3-acetic acid was shown to be involved in the activation of the aryl hydrocarbon receptor, which enhances the barrier function of the skin, and increases resistance to UV-induced oxidative stress, one of the most common causes of skin aging.

Keywords: indole-3-acetic acid, tryptophan, aryl hydrocarbon receptor, gene expression, skin barrier, oxidative stress, skin aging.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat společnosti Contipro a.s. za možnost naměřit si svou diplomovou práci v jejich laboratořích. Obrovské díky patří především Mgr. Iloně Matějkové za nespočetné hodiny konzultací, trpělivé vedení a věnovaný čas, ať už během provádění experimentů, nebo při psaní práce. Dále děkuji celému oddělení Kosmetiky a dermatologie, zejména vedoucí, Mgr. Ivě Dolečkové, PhD, a také Kateřině Bečičkové za mnoho praktických rad během měření.

Další poděkování patří vedoucí mé diplomové práce, Ing. Janě Pavlačkové, PhD., za laskavé vedení a milý přístup. V neposlední řadě děkuji mé rodině za umožnění studia během rodičovské dovolené, protože bez jejich podpory by tato práce nikdy nevznikla.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 KŮŽE A JEJÍ BARIÉROVÁ FUNKCE	11
1.1 STAVBA KŮŽE.....	11
1.1.1 Epidermis	12
1.1.2 Dermis.....	13
1.1.3 Tela subcutanea.....	14
1.2 KOŽNÍ BARIÉRA.....	14
1.3 KOŽNÍ MIKROBIOM.....	16
2 STÁRNUTÍ KŮŽE	18
2.1 VNITŘNÍ STÁRNUTÍ.....	18
2.1.1 Genetické faktory	18
2.1.2 Hormonální působení	18
2.2 VNĚJŠÍ STÁRNUTÍ	19
2.2.1 Fotostárnutí	19
2.2.2 Kouření.....	22
2.2.3 Znečištění ovzduší.....	22
2.2.4 Výživa	23
3 METABOLISMUS TRYPTOFANU	24
3.1 KYNURENINOVÁ DRÁHA.....	25
3.2 SEROTONINOVÁ DRÁHA.....	26
3.3 INDOLOVÁ DRÁHA	26
4 ARYL HYDROKARBONOVÝ RECEPTOR	28
4.1 KANONICKÁ SIGNÁLNÍ DRÁHA	29
4.2 NEKANONICKÁ SIGNÁLNÍ DRÁHA	30
4.3 ARYL HYDROKARBONOVÝ RECEPTOR V KŮŽI	30
5 KYSELINA INDOL-3-OCTOVÁ	32
5.1 VÝZNAM PŘI LÉČBĚ KOŽNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	34
6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	36
7 CÍLE PRÁCE	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
8 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	39
8.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	39
8.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	41
9 METODIKA PRÁCE	44

9.1	KULTIVACE BUNĚK	44
9.1.1	Používané roztoky a média	44
9.1.2	Kultivace buněčné linie HaCaT	46
9.1.3	Kultivace buněčné linie HepG2	47
9.2	STANOVENÍ VLIVU KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA VIABILITU BUNĚK	47
9.2.1	Používané roztoky	47
9.2.2	Vliv na viabilitu keratinocytů HaCaT	49
9.2.3	Vliv na viabilitu buněk HepG2	50
9.3	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA AKTIVITU ARYL HYDROKARBONOVÉHO RECEPTORU	51
9.4	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA VIABILITU PRASEČÍ <i>EPIDERMIS</i>	52
9.4.1	Používané roztoky	52
9.4.2	Pracovní postup	52
9.5	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA EXPRESI GENŮ V KERATINOCYTECH HACAT A V PRASEČÍ <i>EPIDERMIS</i>	54
9.5.1	Používané roztoky	55
9.5.2	Vliv na expresi genů v keratinocytech HaCaT	55
9.5.3	Vliv na expresi genů v prasečí <i>epidermis</i>	61
9.6	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA TVORBU REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU	63
9.6.1	Používané roztoky	64
9.6.2	Pracovní postup	65
9.7	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ POMOCÍ 2,2'-DIFENYL-1-PIKRYLHYDRAZYLU	66
9.7.1	Používané roztoky	67
9.7.2	Pracovní postup	68
10	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	69
11	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	70
11.1	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA VIABILITU BUNĚK	70
11.2	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA AKTIVACI ARYL HYDROKARBONOVÉHO RECEPTORU	73
11.3	VLIV KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ	74
11.3.1	Vliv na genovou expresi v keratinocytech HaCaT	75
11.3.2	Vliv na genovou expresi v prasečí <i>epidermis</i>	78
11.4	ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY KYSELINY INDOL-3-OCTOVÉ	81
	ZÁVĚR	86
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	101
	SEZNAM OBRÁZKŮ	106
	SEZNAM TABULEK.....	108

ÚVOD

Kůže je jedním z největších a nejdůležitějších lidských orgánů, který pokrývá celé tělo a chrání ho před vnějšími vlivy. Jedná se o vícevrstvou strukturu, která plní mnoho funkcí, od obrany těla před škodlivými patogeny, regulace teploty, vylučování škodlivých látek, vnímání doteku, tlaku a bolesti, ale také psychosociální funkci, kdy stav a vzhled pokožky významně ovlivňuje sebevědomí a celkové sebevnímání jednotlivců [1–3].

Důležitou roli v udržování zdraví a celkového stavu kůže plní kosmetická péče, která může pomoci vylepšit vzhled kůže, minimalizovat projevy stárnutí, chránit ji před škodlivými vlivy životního prostředí a udržovat ji v optimálním stavu. Mezi hlavní cíle kosmetické péče patří hydratace, výživa, fotoprotekce, regenerace, udržení mladistvého vzhledu, vyhlazení pleti nebo posílení kožní bariéry [4].

Stále větší popularitu mezi spotřebiteli získávají kosmetické přípravky obsahující přírodní suroviny, které mají potenciál poskytnout efektivní péči o kůži a zároveň minimalizovat negativní účinky spojené s používáním syntetických látek [5]. Řada používaných přírodních surovin v kosmetice se přirozeně nachází i v kůži. Jejich výhodou bývá obecně dobrá snášenlivost i pro citlivou a problematickou pleť. Mezi takové suroviny patří např. kyselina hyaluronová, kolagen, elastin, vitaminy, antioxidanty nebo aminokyseliny a další [6]. Jednou z aminokyselin běžně se vyskytujících v kůži je tryptofan, který je pomocí kožního mikrobiomu metabolizován na zajímavé látky, mezi něž patří i kyselina indol-3-octová (IAA) [7].

Tato diplomová práce se zabývá vlivem IAA na normální zdravou kůži se zaměřením na funkci kožní bariéry nebo na odolnost proti oxidačnímu stresu, jenž se velkou měrou podílí na předčasném stárnutí kůže. A právě posílení kožní bariéry nebo prevence předčasného stárnutí kůže jsou jedny z hlavních cílů kosmetické péče.

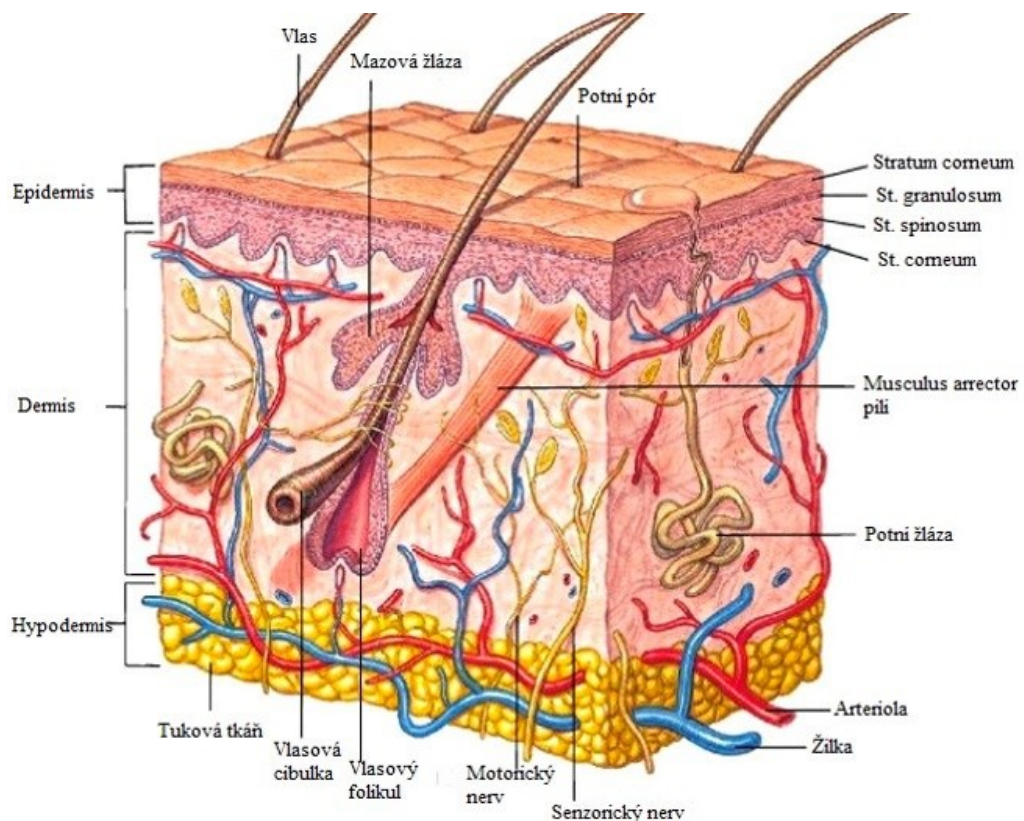
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KŮŽE A JEJÍ BARIÉROVÁ FUNKCE

Kůže je jedním z největších orgánů lidského těla, který tvoří jeho ucelený zevní povrch a vytváří tak bariéru organismu před nejrůznějšími vlivy okolního prostředí. Kromě toho zastává i mnoho jiných funkcí, od regulace tělesné teploty, přes ochranu před ultrafialovým (UV) zářením, až po tvorbu důležitého vitamínu D. Navíc je také naším největším smyslovým orgánem a prostřednictvím nervových zakončení v ní uložených získáváme spoustu informací o okolním prostředí [1].

1.1 Stavba kůže

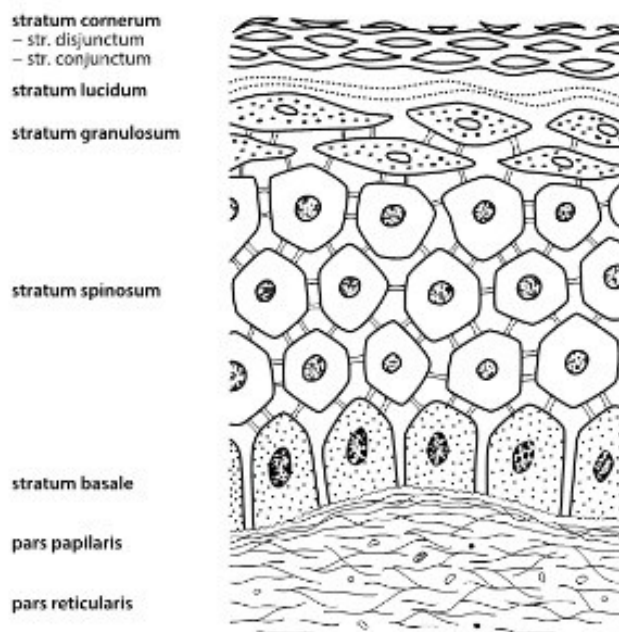
Kůže dospělého člověka má plochu 1,5–2 m² a váží 3 kg, s tukovou vrstvou však může v extrémních případech dosahovat hmotnosti až 20 kg. Tloušťka kůže se udává 0,5–4 mm. Nejtenčí je na očních víčkách a nejtlustší na zádech a stehnech. Je tvořena dvěma hlavními vrstvami, pokožkou (*epidermis*) a škárou (*dermis, corium*), viz Obr. 1. Pod kůží se nachází podkoží (*tela subcutanea, hypodermis*). V kůži se nachází i přídatné kožní orgány neboli kožní adnexa, které se dělí na keratinizovaná (nehet, vlas) a žlázová (mazová, potní a mléčná žláza) [2–3].



Obrázek 1 Průřez lidskou kůží, upraveno podle [8]

1.1.1 Epidermis

Epidermis je vrchní a nejtentčí vrstvou kůže. Je tvořena převážně z keratinocytů, což jsou buňky rohovějícího vícevrstevného dlaždicového epitelu ektodermálního původu. Tyto buňky postupně zrají, nejdříve v nich vznikají granula, postupně ztrácejí jádra, a nakonec odumírají a odlučují se. Tento proces od bazální membrány po vrstvu rohovou trvá přibližně 28 dní a v rámci tohoto procesu buňky projdou všemi 5 vrstvami *epidermis*: od nejspodnější *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* po nejsvrchnější *stratum corneum* [1], viz Obr. 2.



Obrázek 2 Struktura *epidermis* [3]

Stratum basale se skládá z jedné vrstvy keratinocytů, které jsou pomocí hemidesmozomů připojeny k bazální membráně, ve které dochází k buněčnému dělení a vzniku nových buněk, jež doplňují odlupující se buňky z vrchní vrstvy.

Na *stratum basale* navazuje 2–5 vrstev keratinocytů polyedrického ostnitého tvaru tvořících *stratum spinosum*. Směrem k povrchu se postupně oplošťují. V horní části této vrstvy dochází k diferenciaci buněk.

Stratum granulosum se skládá z 1–3 vrstev oploštělých buněk, obsahujících keratohyalinová granula, skládající se z prekurzorů keratinu a profilaggrinu, který se postupně, během rohovatění buněk, přeměňuje na filaggrin.

Stratum lucidum je přechod mezi nezrohovatělými a zrohovatělými buňkami *epidermis*. Buňky, označované jako tranzitní keratinocyty, ztrácejí jádro a organely a dochází k buněčné smrti. Keratohyalinová granula se zde přeměňuje na keratin.

Stratum corneum je vrstva plně zrohovatělých odumřelých buněk (korneocytů), které neobsahují jádra a které jsou na sebe hustě navrstveny. Vrchní vrstvy se neustále odlupují. Tento proces se nazývá deskvamace [1–3].

Kromě keratinocytů se v *epidermis* také vyskytují melanocyty, Merkelovy a Langerhansovy buňky. Melanocyty se nachází ve *stratum basale* a ve vlasových folikulech. Jednotlivé buňky mají dendritické výběžky, které se větví mezi keratinocyty, a pomocí endocytózy jim předávají pigment melanin. Melanocyty jsou po těle rovnoměrně zastoupeny (cca 1200 buněk/mm²) nezávisle na rase, výjimkou jsou silně pigmentované prsní bradavky a jejich dvorce a oblast zevního genitálu. Pigment melanin se podílí na fotoprotekci kůže, neboť je širokospektrálním absorbentem UV záření [9–10].

Langerhansovy buňky jsou uloženy ve *stratum spinosum*. Vznikají v kostní dřeni. Jejich hlavní funkcí je prezentovat antigen lymfocytům, jsou tedy součástí imunitního systému. Merkelovy buňky jsou uloženy v bazální vrstvě a jsou volně spojeny se synapsemi nervových zakončení. Mají funkci mechanoreceptorů [10].

1.1.2 Dermis

Dermis je tvořena vazivovou tkání, která je bohatě cévně i nervově zásobena. Tloušťka se udává od 0,6 do 3 mm. Skládá se z povrchové, tenčí části *pars papillaris*, která papilami vybíhá do *epidermis*, a hlouběji uložené *pars reticularis*.

Dermis se skládá z několika typů buněk obklopených mezibuněčnou hmotou, která se nazývá extracelulární matrix. Nejhojněji zastoupenými buňkami v *dermis* jsou fibroblasty, které mají vřetenovitý tvar a produkují složky extracelulární matrix, jako je kolagen, elastin nebo glykosaminoglykany (kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát apod.). Mezi další buňky v *dermis* patří fibrocyty, monocyty, astrocyty, makrofágy, lymfocyty atd.

Tkáň v *dermis* má vláknitou strukturu. Nejčastěji zastoupená vlákna jsou kolagenní a elastická. Kolagenní vlákna jsou zodpovědná za pevnost kůže, vyskytují se ve formě snopců a tvoří 75 % suché hmotnosti *dermis*. Stejně četná jako kolagenní vlákna jsou

i vlákna elastická, která jsou ale tenčí. V první řadě zajišťují pružnost kůže a nacházejí se okolo klubiček a vývodů potních žláz a vlasových folikulů [1–3].

1.1.3 Tela subcutanea

Tela subcutanea neboli podkožní vazivo spojuje *dermis* s povrchovou fascií. Základními stavebními buňkami jsou adipocyty – tukové buňky, které tvoří podkožní tuk. Na jeho množství má vliv pohlaví, věk, výživa, životní styl, genetické predispozice, ale i hormonální působení. Tuk je nejvíce ukládán v oblasti břicha, hýždí a stehů, kde tvoří tzv. tukový polštář. Podkožní vazivo je hojně cévně zásobeno a mezi jeho funkce patří skladování zásobních látek, izolace a termoregulace nebo ochrana vnitřních orgánů [2–3].

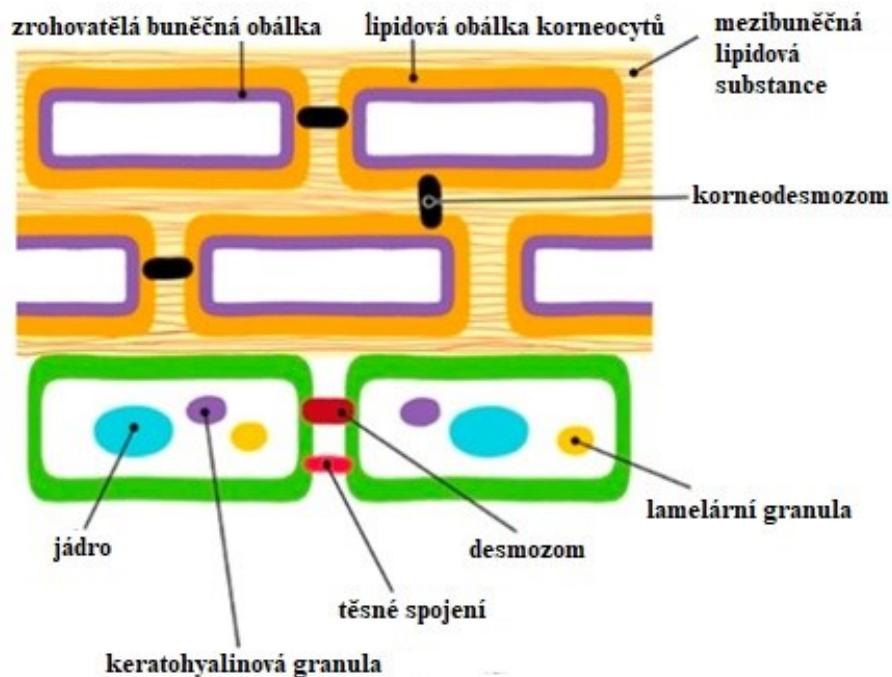
1.2 Kožní bariéra

V průběhu fylogenetického vývoje suchozemských živočichů bylo nutné vytvořit jedinečnou obranu vůči různým vlivům životního prostředí, která se souhrnně nazývá kožní bariéra. Jedná se o specifické uspořádání složek ve vrchních vrstvách pokožky, které kůži chrání před nejrůznějšími vlivy, jako je UV záření, oxidační stres, patogenní mikroorganismy, alergeny, xenobiotika a zadržuje dostatečné množství vody [11–12].

Pro správnou funkci kožní bariéry je klíčová rohová vrstva *epidermis – stratum corneum*, která svou strukturou připomíná cihlovou zeď. Pomyslnými cihlami jsou korneocyty navzájem pospojované korneodesmozomy. Prostor mezi nimi je vyplněn mezibuněčnou lipidovou substancí [13].

Na Obr. 3 jsou zvýrazněné důležité složky pro fungování kožní bariéry, mezi které patří [14]:

- keratin, filaggrin a jeho degradační produkty,
- zrohovatělá buněčná obálka,
- lipidová obálka korneocytů.



Obrázek 3 Složky kožní bariéry v *epidermis*, upraveno podle [14]

Filaggrin je protein bohatý na aminokyselinu histidin, syntetizovaný v keratohyalinových granulích *stratum granulosum* jako profilaggrin. Během přechodu zralé granulární buňky v korneocyt je profilaggrin rychle defosforylován za vzniku filaggrinu. Při dozrávání korneocytů dochází k úplné proteolýze filaggrinu na kyseliny *trans*-urokanovou a pyrrolidon-5-karboxylovou, čímž vzniká uvnitř korneocytů přirozený zvlhčující faktor, který udržuje optimální obsah vody a osmotickou rovnováhu ve *stratum corneum* a přispívá k pružnosti kůže. Přirozený zvlhčující faktor obsahuje mimo jiné i močovinu, kyselinu mléčnou, aminokyseliny (alanin, glycin, prolin, serin), glycerol a spoustu dalších látek. Načasování celého procesu degradace filaggrinu je částečně řízeno jeho asociací s keratinem, který pravděpodobně chrání filaggrin před jeho předčasnou proteolýzou. Filaggrin v korneocytech také umožňuje spojení keratinu v polymerizovaná vlákna. Kyselina *trans*-urokanová, která vzniká jeho proteolýzou, je navíc významným chromatoforem podílející se na ochraně kůže před UV zářením [13–14].

Buněčná obálka korneocytů je tvořena sítí kovalentně vázaných proteinů, zejména lorikrinu, keratolininu nebo involukrinu. Jsou do ní integrovány korneodesmozomy, které navzájem spojují jednotlivé korneocyty. Na involukrin v zrohovatělé buněčné obálce je dále kovalentně navázána lipidová obálka nacházející se vně buňky, která je tvořena z hydroxyceramidů a hydroxy-mastných kyselin s více než 20 uhlíky. Buněčná obálka

zároveň slouží jako jakési lešení pro ukotvení mezibuněčné lipidové substance. Ta je složena především z ceramidů, cholesterolu, acylceramidů, esterů cholesterolu a volných mastných kyselin a vytváří přísně organizované lamelární struktury, které zabraňují nadměrné transepidermální ztrátě vody [15].

Na povrchu *stratum corneum* se nachází tenká vrstva ochranného mastného filmu. Kromě kyselin, které vznikly degradací filaggrinu, obsahuje odlupující se korneocyty, produkty mazových žláz a složky potu jako je kyselina mléčná nebo mastné kyseliny s kratším uhlovodíkovým řetězcem. Tento film vytváří díky svému přirozeně kyselému pH 4–6 příznivé prostředí pro komenzální bakterie, jako např. *Staphylococcus epidermidis*, a zabraňuje usazování patogenních mikroorganismů, jako je *Staphylococcus aureus* a dalších [16–17].

Kožní bariéra se vytváří i propojením živých buněk *epidermis* dobře definovanými strukturami zvanými mezibuněčné spoje, což jsou těsné spoje, desmozomy a adhezní spoje. Tyto spoje vytváří přibližně 40 různých proteinů včetně kladinů, okcludinu (OCLN) a adhezivních molekul tvořících spoje (JAMs – Junctional Adhesion Molecules). Uvnitř buněk se nacházejí intracelulární proteiny *zonula occludens*, které s transmembránovými proteiny interagují. Některé proteiny, např. OCLN, se vyskytují pouze ve *stratum granulosum*, jiné, jako např. *zonula occludens* a kladiny, jsou lokalizovány ve všech epidermálních vrstvách [18–19].

Mezibuněčné spoje hrají významnou roli při vytváření a udržování paracelulární permeability molekul (tvoří selektivní bariéru, která řídí paracelulární pohyb molekul po elektrochemických gradientech), udržují iontovou propustnost a polaritu membrán. Určitou roli hrají i v kontrole buněčné proliferace a diferenciaci. Zvýšená paracelulární propustnost spolu s jinými faktory způsobuje řadu kožních onemocnění, jako je psoriáza, atopická dermatitida a další [18].

1.3 Kožní mikrobiom

Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, povrch kůže je trvale osídlen kožním mikrobiomem, který pomáhá udržovat integritu kožní bariéry a je nezbytný pro homeostázu tohoto orgánu. Jedná se o rozmanitý ekosystém tvořený převážně bakteriemi, ale i kvasinkami, plísněmi, viry nebo roztoči, které kolonizují lidskou kůži v různé hustotě a složení již od narození. V současnosti je kožní mikrobiom považován za funkční a aktivní

součástí epidermální bariéry, což je zajištěno jednak osídlením komenzálních bakterií, které kompetitivně brání růstu patogenních mikroorganismů, a také schopností vytvářet a vylučovat různé látky, jako např. antimikrobiální peptidy, mastné kyseliny s krátkým uhlovodíkovým řetězcem, metabolity aminokyseliny tryptofanu a mnoho dalších. Zmíněné látky pomáhají aktivovat imunitní systém a zmírňovat zánětlivé reakce.

Obecně mezi nejhojněji zastoupené bakteriální kmeny v kůži patří *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Bacteroidetes*. Mezi nejčastěji přítomné bakteriální rody potom patří *Corynebacteria* a *Cutibacteria* patřící do kmene *Actinobacteria* (např. *Cutibacterium acnes*) a *Staphylococcus* řadící se do kmene *Firmicutes* (např. *Staphylococcus epidermidis* nebo *Staphylococcus hominis*). Mezi nejčastěji se vyskytující kvasinky a mykotické mikroorganismy v kůži patří *Malassezia* a *Candida* (např. *Malassezia furfur* nebo *Candida albicans*), které se častěji vyskytují na trupu a horních končetinách, na dolních končetinách je potom čtenější výskyt *Aspergillus*, *Cryptococcus* nebo *Rhodotorula*. Mezi viry patří např. *Papillomavirus* nebo *Polyomavirus*. V oblasti vlasových folikulů a mazových žláz se mohou nacházet i roztoči, jako *Demodex folliculorum*, *Demodex brevis* atd.

Složení kožního mikrobiomu však závisí na mnoha faktorech, zejména na místě na těle. Na kůži se vyskytují jak suchá místa, tak místa vlhká nebo bohatá na mazové žlázy. Ve vlhkých oblastech se častěji vyskytují druhy *Corynebacterium* a *Staphylococcus*, zatímco s vyšší produkcí kožního mazu (typicky obličej či horní polovina zad) je charakteristická přítomnost *Cutibacterium acnes* nebo kvasinky *Malassezia*. Suchá místa v kůži jsou potom spíše osídlena druhem *Staphylococcus*. Věk, pohlaví, vlhkost, koncentrace kyslíku, teplota, hygienické návyky, používání kosmetiky a obecně na životní styl hostitele také silně ovlivňují kožní mikrobiom. Dokonce i složení střevního mikrobiomu má vliv na složení populace na kůži, neboť střevo – kůže je oboustranně komunikující systém, a dysbióza střevní mikroflóry může vést i k narušení kožní homeostázy a vzniku kožních onemocnění [20–22].

2 STÁRNUTÍ KŮŽE

Stárnutí kůže je nevyhnutelný proces související s vyčerpáním fyziologických funkcí její obnovy. Začíná přibližně kolem 25. roku života a postupně při něm dochází ke změnám vzhledu, ale i funkcím kůže, a to ve všech jejích vrstvách [23].

Stárnutí kůže je vyvoláno působením přirozených vnitřních faktorů (vnitřní neboli intrinstické stárnutí) a zároveň je výrazně ovlivněno účinky okolního prostředí a životním stylem (vnější neboli extrinstické stárnutí) [24].

2.1 Vnitřní stárnutí

Vnitřní stárnutí probíhá jako výsledek více endogenních procesů spojených se stárnutím celého organismu, např. genetických, hormonálních či metabolických [25].

2.1.1 Genetické faktory

Buňky v organismu během stárnutí přirozeně podléhají senescenci, tedy ztrácejí schopnost se dále dělit. Během buněčného dělení se postupně zkracuje délka telomer – speciálních struktur tvořených krátkou, několikrát se opakující sekvencí deoxyribonukleové kyseliny (DNA) – TTAGGG nacházející se na koncích chromozomů. Telomery chrání chromozomy před degradací nukleázami a udržují jejich strukturální stabilitu. Při každém buněčném dělení se telomera na konci chromozomu zkrátí přibližně o 30–200 párů bází, což postupně vede k jejich kritickému zkrácení a následně k zástavě buněčného cyklu a senescenci [26].

Kromě zpomalení obnovy buněk způsobené zástavou buněčného cyklu v senescentních fibroblastech např. postupně dochází ke zvýšení exprese matrixových metaloproteináz (MMP), což spolu se sníženou expresí tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMPs) vede ke snížené obnově proteinových složek v extracelulární matrix, např. kolagenu [25–26].

2.1.2 Hormonální působení

Během stárnutí dochází v organismu ke snížení hladiny mnoha hormonů. Nejvýznamnější je pokles pohlavních steroidů, jako je estrogen a testosteron, ale i dalších hormonů, např. melatoninu, inzulínu, kortizolu nebo tyroxinu. Současně klesají i indukované hladiny některých signálních molekul, jako jsou cytokiny a chemokiny. Estrogenové receptory se nacházejí v keratinocytech, fibroblastech a dalších buňkách jak *epidermis*, tak i *dermis*, a proto je pokles hladiny pohlavních hormonů významný i pro fyziologii kůže [27].

Během menopauzy a po ní dochází ke ztenčení a atrofii *epidermis*, zejména v oblasti *stratum spinosum*. Vlivem zmenšené adheze mezi *epidermis* a *dermis* se mezi nimi snižuje přenos živin. Postupně se zkracuje životnost keratinocytů, což vede ke snížení epidermální obnovy až o 50 %. Nedostatek estrogenu postihuje také fibroblasty, a tím i komponenty extracelulární matrix. Kolagenní vlákna se stávají výrazně tenčími, fragmentovanými a dochází v nich k ukládání vápníku, což snižuje jejich mechanickou odolnost. Do pěti let od nástupu menopauzy průměrně poklesne množství kolagenu až o 30 %. Nedostatek estrogenu způsobuje redukci množství a fragmentaci elastických vláken. To se projeví snížením elasticity *dermis*, zvýšenou ochablostí kůže a tvorbou vrásek. Během menopauzy se dále snižuje činnost žláznatých adnex, zmenšuje se sekrece potu i kožního mazu. Dochází k útlumu melanogeneze, což má za následek blednutí kůže a menší schopnost ochrany proti UV záření. Deficitem estrogenu je rovněž negativně ovlivněna produkce kyseliny hyaluronové. To spolu s poruchou sekrece mazu a potu snižuje hydrataci *dermis* a její schopnost vázat vodu [28].

2.2 Vnější stárnutí

Faktory s jednoznačně exogenním původem jako je kouření, znečištěné životní prostředí, špatná výživa a zejména vliv slunečního záření jsou hlavními příčinami vnějšího, předčasného stárnutí kůže a z podstaty a definice mu lze do značné míry předcházet [29].

2.2.1 Fotostárnutí

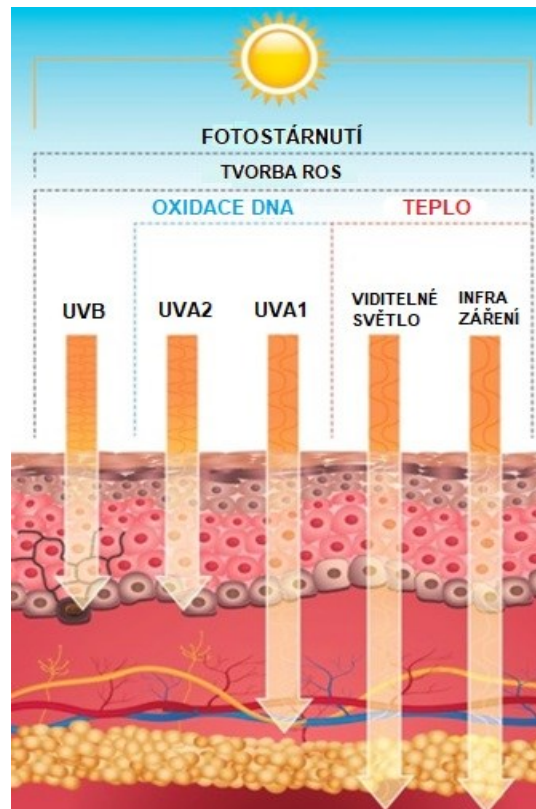
Přirozeně stárnoucí kůže je hladká, bez pigmentace a projevuje se ztenčením a ztrátou pružnosti. Naproti tomu kůže nadměrně vystavovaná slunečnímu záření vykazuje množství vrásek a pigmentových skvrn. Nejvýznamnější rozdíly mezi projevy přirozeného, vnitřního stárnutí a fotostárnutí kůže jsou popsány v Tab. 1. Náchylnost k fotostárnutí se však u každého jedince liší a je silně ovlivněna endogenními ochrannými systémy přítomnými v kůži, jako např. pigmentace v závislosti na fototypu jedince atd. [30].

Tabulka 1 Vliv vnitřního stárnutí a fotostárnutí na kůži, upraveno podle [26].

Projevy	Vnitřní stárnutí	Fotostárnutí
Klinické projevy	Suchá a ochablá kůže, jemné vrásky	Drsná, suchá a ztlustělá kůže, hluboké a silné vrásky
	Nezhoubný nádor (hemangiom, fibrom), seboroická keratóza	Nezhoubný nebo zhoubný nádor (dlaždicobuněčný karcinom, maligní melanom), solární keratóza
Histologické projevy	Ztenčení <i>epidermis</i> a <i>dermis</i> a snížení jejich adheze	Ztlustění <i>epidermis</i> a <i>dermis</i>
	Elastická vlákna jsou tenčí a méně početná	Degenerace elastických vláken a jejich abnormální ukládání
	Kolagenová vlákna se narovávají a ztrácejí strukturu	Degradace kolagenových vláken
	Redukce cév mezi tkáněmi	Cévy se rozšiřují a ohýbají a jejich stěny se zesilují
	Snížení počtu vlasových folikulů a žláz	Rozšíření vlasových folikulů a atrofie mazových žláz

Fotostárnutí kůže je vyvoláno nadměrnou expozicí slunečnímu záření. Spektrum slunečního světla se skládá z UV záření, viditelného světla a infračerveného záření. Na kůži dopadá většina tohoto spektra, viz Obr. 4. Ultrafialové záření tvoří 5 % celkového slunečního spektra a dělí se na tři skupiny: krátkovlnné UV záření (UVC, 100–280 nm), středněvlnné UV záření (UVB, 280–315 nm) a dlouhovlnné UV záření (UVA, 315–400 nm). Viditelné světlo (400–740 nm) tvoří 50 % celkového slunečního spektra a infračervené záření (760–1000 nm) představuje zbývajících 45 %.

Záření UVC vykazuje silnou mutagenitu, ale jeho dopad na zemský povrch blokuje ozonová vrstva. Záření UVB proniká k bazální vrstvě *epidermis*. Záření UVA se dělí na UVA2 (315–340 nm) a UVA1 (340–400 nm), které proniká hlouběji do kůže a dosahuje až do *dermis*. Určitá část viditelného světla a infračerveného záření dokáže proniknout až do *tela subcutanea*, viz Obr. 4 [30].



Obrázek 4 Spektrum slunečního světla a jeho dopad na kůži, upraveno podle [30]

Záření UVB vyvolává erytém a novotvorbu pigmentu. V kůži umožňuje tvorbu vitamínu D. Zároveň je však také mutagenem – v keratinocytech a melanocytech vyvolává formování thymidinových dimerů. Hromadění mutací se později může projevit vznikem aktinických keratóz, karcinomu nebo melanomu. Také UVA záření může vyvolat erytémovou a pigmentační odpověď, ale se 100–1000krát nižší efektivitou, než je tomu v případě UVB. Záření UVA se však významně podílí právě na předčasném stárnutí kůže, neboť je silným iniciátorem tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je např. superoxid nebo hydroxylový radikál, které jsou jinak přirozeným vedlejším produktem buněčného dýchání probíhajícího v mitochondriích. Vystavení buněk nadměrnému oxidačnímu stresu vede k vyčerpání enzymatické (glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza 2 – SOD2, kataláza atd.) a neenzymatické (vitamin E, vitamin C, glutathion atd.) antioxidační kapacity. Vznikající ROS například iniciují peroxidaci lipidů v plazmatických membránách či stimulují uvolňování prozánětlivých mediátorů. Vlivem ROS generovaných UV zářením dochází v dermálních fibroblastech prostřednictvím sekrece interleukinů 1 (IL-1) a 6 (IL-6) či aktivací c-Jun-N-terminální kinázy ke stimulaci exprese kolagenázy (MMP1), což postupně vede k celkovému poklesu množství kolagenu v *dermis* [27, 31–32].

Dlouho se mělo za to, že viditelná oblast slunečního spektra a infračervené záření mají na pokožku minimální vliv, kromě pocitu tepla, který infračervené záření vyvolává. Bylo však zjištěno, že v *dermis* vyvolávají produkci MMP, a tím negativně ovlivňují množství složek extracelulární matrix [30]. Studie [33] na lidských keratinocytech prokázaly, že modré světlo (380–500 nm) i infračervené záření indukují vznik ROS.

2.2.2 Kouření

Vztah mezi kouřením cigaret a stárnutím kůže je podložen jak epidemiologickými studiemi, tak mechanismy popsány *in vitro*. Pleť kuřáků se vyznačuje výrazným vrásněním obličeje, zejména v okolí úst a horního rtu a očí. V obličeji se často vyskytují četnější pigmentové léze. Cigaretový kouř obsahuje více než 3 000 různých škodlivých chemických látek, zejména nikotin, oxid uhelnatý, formaldehyd, kyselinu kyanovodíkovou, amoniak, rtuť, olovo, kadmium a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). Jedním z bezprostředních účinků vdechování kouře je snížení průtoku krve v mikrocirkulaci s maximálním účinkem po prvních dvou minutách po konzumaci, a to bez ohledu na koncentraci obsaženého nikotinu. Extrakt z cigaretového kouře zhoršuje růst a proliferaci fibroblastů a vede k dalším negativním efektům, jako je indukce exprese MMP. Kromě toho PAU prostřednictvím aryl hydrokarbonového receptoru (AhR) významně zvyšují i expresi transkripčního faktoru spojeného s melanogenezí (MITF – Melanocyte Inducing Transcription Factor), což vede k vyšší produkci melaninu. Na procesu stárnutí vyvolaném cigaretovým kouřem se podílí i poškození oxidačním stresem. Do jaké míry je změna biologických procesů a podpora stárnutí kůže způsobena přímou expozicí kůže nebo systémovou expozicí po vdechnutí není dosud plně objasněno [30, 34–35].

2.2.3 Znečištění ovzduší

Obdobně jako u cigaretového kouře mezi hlavní znečišťující látky z ovzduší působící na kůži patří PAU, těkavé organické sloučeniny, oxidy dusíku, těžké kovy a arsen. Tyto látky nejen že v kůži způsobují tvorbu ROS, a tím zvyšují oxidační stres, ale mnohé jsou i významnými mutageny. Dlouhodobé a opakované vystavení stresorům životního prostředí může narušit funkci kožní bariéry, což vede ke vzniku různých kožních onemocnění, jako je kontaktní či atopická dermatitida, psoriáza, akné nebo rakovina kůže. Zdrojem PAU jsou zbytky po spalování dřeva a uhlí, výfukové plyny automobilů, metalurgický průmysl, výroba plastů, pesticidů, barviv nebo cigaretový kouř. Bez ohledu na cestu vstupu do lidského těla

se nacházejí téměř ve všech vnitřních orgánech, zejména v plicích a trávicím traktu. Polycyklické aromatické uhlovodíky, absorbované na povrchu suspendovaných částic, se prostřednictvím cytochromu p450 (CYP1A1) pomocí aldo-keto reduktáz či epoxid hydroláz přeměňují na chininy a ROS, a proto se podílí i na předčasném stárnutí kůže. Typickým představitelem PAU je např. benzo[*a*]pyren (B(a)P) [36–38].

Další všudypřítomnou znečišťující látkou v městském prostředí je ozón. Jedná se o plynný oxidant, který se běžně vyskytuje ve stratosféře a troposféře, ale po interakci s UV zářením, uhlovodíky, těkavými organickými sloučeninami a oxidy dusíku tvoří hlavní aktivní složku fotochemického smogu. Jeho koncentrace v ovzduší se navíc v posledních letech neustále zvyšuje. Ozón vyvolává oxidační stres, a tím přispívá i k předčasnému stárnutí kůže [39–40].

2.2.4 Výživa

Také strava může podporovat mechanismy spojené s předčasným stárnutím kůže. Například nadměrná konzumace cukru a alkoholu spouští proces známý jako endogenní neenzymatická glykace, při kterém se cukr (např. glukóza, fruktóza) v krevním řečišti váže na bílkoviny, lipidy či nukleové kyseliny a vytváří škodlivé molekuly nazývané glykační produkty (AGEs – Advanced Glycation Endproducts). Jedná se heterogenní skupinu, do které patří např. karboxymethyllysin, pentozin, methylglyoxallysin dimer, vesperlysin, imidazolony atd. Tyto sloučeniny jednak modifikují výše uvedené makromolekuly a mění jejich fyzikální a chemické vlastnosti, a také mají účinky zprostředkované přes receptory, z nichž nejznámější je receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE – Receptor for Advanced Glycation Endproducts). Vazba AGEs na tento receptor aktivuje řady signálních cest včetně indukce oxidačního stresu, jenž je vyvolán zvýšenou tvorbou ROS a následnou aktivací nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), který stimuluje transkripci zánětlivých cytokinů. V kůži byla nalezena ložiska AGEs ve složkách extracelulární matrix, jako je např. fibronectin, elastin nebo kolagen, které následně nelze degradovat pomocí MMP. K exogenní glykaci dochází také při požití potravin obsahujících AGEs, vznikající působením vysokých teplot např. při pečení, grilování nebo smažení [30].

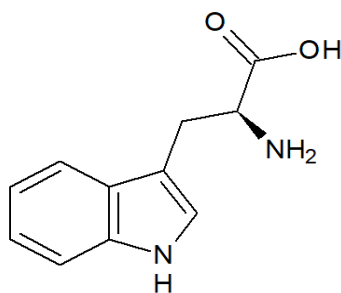
Naopak strava bohatá na antioxidanty může oddálit účinky stárnutí. V epidemiologické studii [41] byl vyšší příjem vitamínu C spojen s nižší pravděpodobností vzniku vrásek.

3 METABOLISMUS TRYPTOFANU

Tryptofan neboli 2-amino-3-[3-indoly] propionová kyselina patří mezi 20 základních, standardně kódovaných α -aminokyselin, tvořících primární strukturu bílkovin. Patří mezi nepolární aminokyseliny obsahující aromatickou heterocyklickou strukturu – indol, viz Obr. 5. Poprvé byl izolován z kaseinu, hlavního proteinu obsaženého v mléce. Tryptofan je důležitá aminokyselina, která hraje nespornou roli v několika fyziologických procesech, včetně funkce neuronů a imunity [7, 42–43].

Patří mezi esenciální aminokyseliny, tedy lidský organismus jej nedokáže sám syntetizovat a musí být přijímán potravou. Mezi zdroje s vysokým obsahem tryptofanu patří krůtí, kuřecí a vepřové maso, ryby, mléko, fazole, ořechy, vejce, banány, ovesné vločky a čokoláda. Světová zdravotnická organizace stanovila doporučený příjem tryptofanu na 4 mg/kg/den. Doposud nebyly zaznamenány žádné nepříznivé účinky jeho nadbytku ve stravě [43].

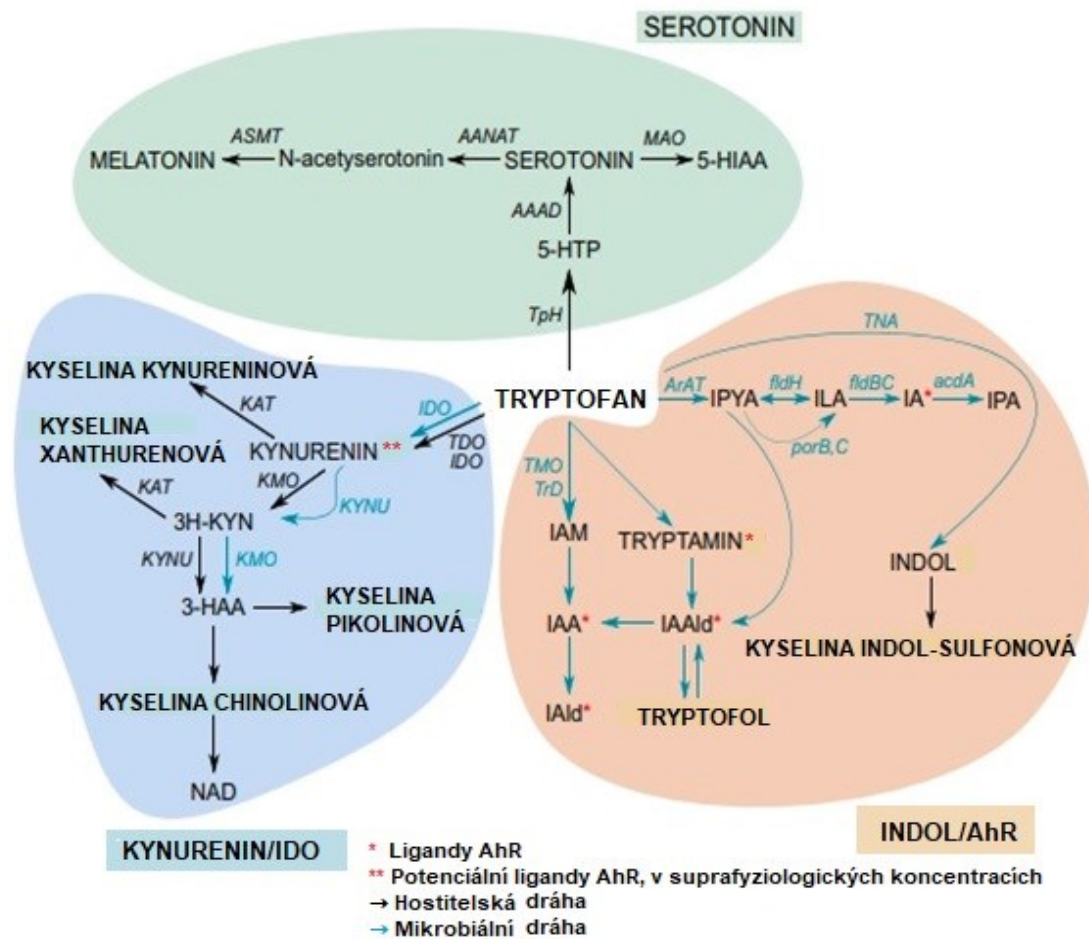
Studie [7, 44–47] v posledních letech prokázaly, že tryptofan je v lidském organismu metabolizován střevním a kožním mikrobiomem na zajímavé látky, mezi které patří i indolové deriváty. Tyto látky mají v těle mnoho prospěšných účinků, jako je např. podpora střevní homeostázy, a tím i imunitního systému. Mnohé jsou také ligandy pro AhR.



Obrázek 5 Strukturní vzorec tryptofanu [vlastní zdroj]

Metabolismus tryptofanu probíhá v organismu třemi hlavními cestami, viz Obr. 6 [7]:

- kynureninovou dráhou v imunitních i epitelálních buňkách prostřednictvím indoleamin-2,3-dioxygenázy 1 (IDO1),
- serotoninovou dráhou v enterochromafinních buňkách trávicího traktu prostřednictvím tryptofan-hydroxylázy 1 (Tph1),
- přímou přeměnou tryptofanu na indolové sloučeniny prostřednictvím střevní a kožní mikroflóry.



nikotinamidadenindinukleotidu a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu, jenž se v organismu podílejí na přenosu elektronů v oxidačně-redukčních reakcích [7].

3.2 Serotoninová dráha

K syntéze neurotransmiteru serotoninu (5-hydroxytryptaminu) dochází v mozku pomocí enzymu tryptofan-hydroxylázy 2 (TpH2). V centrální nervové soustavě působí serotonin jako klíčový neurotransmitter, který se podílí na modulaci kontroly emocí, příjmu potravy, spánku a zpracování bolesti. V epifýze je serotonin dále přeměňován na melatonin [7, 44–45].

Centrální serotonin však tvoří pouze malou část celkového serotoninu v těle, více než 90 % serotoninu je totiž produkováno ve střevě, a to zejména v enterochromafinních buňkách – specializovaném podtypu střevních epiteliálních buněk, prostřednictvím enzymu TpH1, který produkuje 5-hydroxytryptofan, jenž je dále metabolizován pomocí aromatické L-aminodekarboxylázové kyseliny (AAAD) právě na serotonin. Za normálních fyziologických podmínek nemůže periferní serotonin procházet hematoencefalickou bariérou, což dokazuje odlišné rezervoáry centrálního a periferního serotoninu. Periferní serotonin je důležitou signální molekulou, jenž se díky aktivaci jeho specifických receptorů podílí na celé řadě fyziologických funkcí v gastrointestinálním traktu. Ovlivňuje např. střevní peristaltiku, motilitu, sekreci, vazodilataci a absorpci živin [7, 44].

Hlavním aktérem produkce periferního serotoninu je střevní mikrobiota, avšak mechanismy, kterými k tomu dochází, dosud nejsou zcela objasněny. Předpokládá se, určitou roli hrají mastné kyseliny s krátkým uhlovodíkovým řetězcem, které vznikají jako hlavní metabolity bakteriální fermentace vlákniny a rezistentního škrobu v tlustém střevě a které stimulují expresi TpH1. Syntézu serotoninu mohou stimulovat i některé sekundární žlučové kyseliny, jako je deoxycholát vznikající mikrobiální biotransformací cholátu [7].

3.3 Indolová dráha

Přímý metabolismus tryptofanu zahrnuje jeho přeměnu pomocí střevní mikroflóry na několik molekul, jako je indol a jeho deriváty. Indol je mezidruhovou signální molekulou schopnou řídit aspekty bakteriální fyziologie, jako je rezistence vůči antibiotikům, sporulace a tvorba biofilmu. Mezi další metabolity tryptofanu patří např. neurotransmitter

tryptamin [7]. Příklady konkrétních metabolitů a jejich mikrobiálních producentů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tabulka 2 Druhy bakterií produkující metabolity tryptofanu, upraveno podle [46].

Metabolit	Producenti
Indol	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Clostridium limosum</i> , <i>Clostridium bifermentans</i> , <i>Clostridium malenomenatum</i> , <i>Clostridium lentoputrescens</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>Clostridium tetanomorphum</i> , <i>Clostridium ghoni</i> , <i>Clostridium sordellii</i> , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Peptostreptococcus asscharolyticus</i>
Indolaldehyd (IAld)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus murinus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>
IAA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides eggerthii</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , <i>Clostridium bartlettii</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium lituseburense</i> , <i>Clostridium paraputrificum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium putrefaciens</i> , <i>Clostridium saccharolyticum</i> , <i>Clostridium sticklandii</i> , <i>Clostridium subterminale</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Eubacterium hallii</i> , <i>Eubacterium cylindroides</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Peptostreptococcus asscharolyticus</i>
Kyselina indolpropionová (IPA)	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium caloritolerans</i> , <i>Clostridium paraputrificum</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Clostridium cadvareris</i> , <i>Peptostreptococcus asscharolyticus</i> , <i>Peptostreptococcus russellii</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus stomatis</i>
Kyselina indolakrylová (IA)	<i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Peptostreptococcus russellii</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus stomatis</i>
Tryptamin	<i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i>

Obdobně probíhá přímý metabolismus tryptofanu prostřednictvím kožní mikroflóry i v kůži. Oproti střevu je sice povrch kůže vysušeným a na živiny chudým prostředím, přesto se zde nachází velké množství aminokyselin včetně tryptofanu, a to především ve *stratum corneum* prostřednictvím rozkladu keratinu a odumřelých korneocytů. V kůži byl prokázán výskyt derivátů indolu jako např. IAA nebo IAld [47].

4 ARYL HYDROKARBONOVÝ RECEPTOR

Mezi nejčastější buněčné receptory některých mikrobiálních metabolitů tryptofanu, včetně IAA, v organismu patří AhR. Aryl hydrokarbonový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor patřící do rodiny Per-ARNT-Sim proteinů, který může být aktivován širokou skupinou ligandů, což jsou jak xenobiotika, tak i endogenní sloučeniny, a jejich spektrum sahá od environmentálních polutantů (např. B(a)P), polyhalogenovaných aromatických uhlovodíků (např. 2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxin – TCDD), přes endogenní deriváty aminokyselin, chemické látky v potravě, jako jsou indoly nebo glukosinoláty, až po přírodní látky, které se nacházejí v kvasinkách a bakteriích nebo dokonce v mořských houbách [48–51].

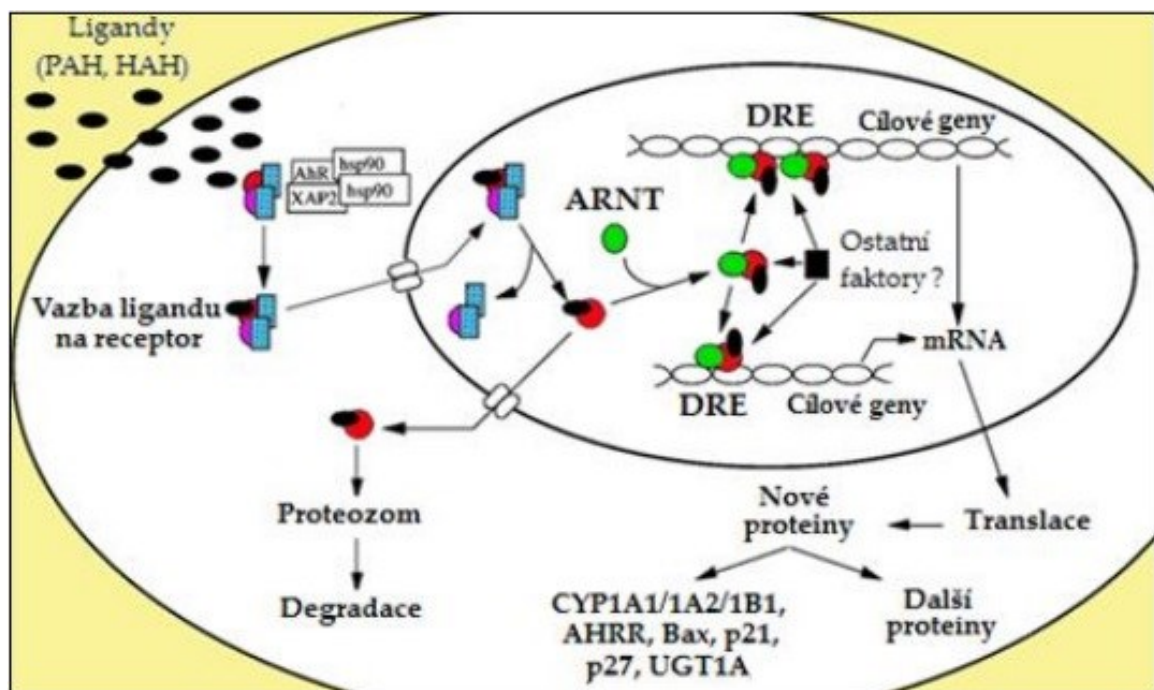
Historicky byl AhR většinou považován za klíčového prostředníka toxických, karcinogenních a mutagenních účinků polutantů z životního prostředí na organismus nebo tvorbu ROS, avšak po objevu funkcí zprostředkovaných AhR v různých buňkách a také po objevení netoxických ligandů AhR se tento názor začal měnit a např. studium myši s deficitem AhR odhalilo množství důležitých prospěšných funkcí spojených s jeho aktivací [52].

Aryl hydrokarbonový receptor se totiž ukazuje být významným regulátorem zajišťující střevní homeostázu mezi hostitelem a střevním mikrobiomem, důsledkem čehož se zvyšuje i funkčnost střevních imunitních buněk. Bylo prokázáno, že aktivace AhR posiluje funkci střevní epitelové bariéry udržováním integrity těsných buněčných spojů (zprostředkovaných proteiny jako např. kladiny nebo OCLN). Signalizace AhR je také potřebná pro udržení intraepiteliálních lymfocytů produkujících interleukin 22 (IL-22), jenž se ve sliznicích účastní procesu hojení ran a v buňkách střevního epitelu napomáhá produkci antimikrobiálních peptidů, což hraje významnou roli v obraně hostitele proti mikrobiálním patogenům. Aryl hydrokarbonový receptor se dále podílí na regulaci dalších typů imunitních buněk, jako jsou Th17 lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky nebo neutrofilů. Nedávno byly popsány i další funkce AhR, včetně kontroly vývoje jater a cév, krvevorbny, perinatálního růstu a proliferace kmenových buněk. Signalizace AhR je v současnosti považována za klíčovou součást imunitní odpovědi v bariérových orgánech jako je střevo, plíce i kůže, a má zásadní význam nejen pro střevní, ale i pro celkovou homeostázu organismu. Z toho důvodu je v současnosti signalizace AhR zkoumána pro svůj potenciál při léčbě zánětlivých, autoimunitních nebo dokonce i nádorových onemocnění [53–55].

Signalizace AhR může probíhat dvěma způsoby v závislosti na povaze a struktuře ligandu: kanonickou a nekanonickou signální dráhou popsanou v kap. 4.1–4.2 [52].

4.1 Kanonická signální dráha

V nepřítomnosti ligandu se AhR nachází v cytoplazmě jako součást chaperonového komplexu, který zahrnuje heat-shock protein Hsp90 spolu s ko-chaperonem p23 a proteinem XAP2 (hepatitis B virus X-associated protein) [50].



Obrázek 7 Schéma kanonické signální dráhy AhR [56]

Jak je znázorněno na Obr. 7, navázáním ligandu na AhR dojde k jeho konformační změně, která způsobí odhalení jaderné lokalizační sekvence na N-konci AhR, a následné translokaci celého komplexu do buněčného jádra. Aryl hydrokarbonový receptor se disociuje ze svého chaperonového komplexu AHR-Hsp90-p23-XAP2 a v jádře vytvoří heterodimer s jeho jaderným translokátorem (ARNT – Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). To vede k postupnému vytěsňování Hsp90 a dalších podjednotek z komplexu AhR a usnadnění další interakce dimeru AhR-ARNT a jeho přeměnu na vysoce afinitní formu vázající se na DNA, konkrétně na regulační oblasti řetězce svých cílových genů (např. CYP1A1). Cílové geny obsahují specifické sekvence AhRE (Aryl hydrocarbon receptor Responsive Element), známé také DRE (Dioxin Responsive Element) či XRE (Xenobiotics Responsive Element). Kromě fyziologické úlohy při detoxikaci polycyklických

aromatických sloučenin může však být aktivita enzymu CYP1A1 škodlivá, a to prostřednictvím tvorby mutagenních metabolitů nebo ROS. Enzym CYP1A1 se však podílí i na odbourávání fyziologických AhR ligandů, včetně IAA [55–59].

4.2 Nekanonická signální dráha

V důsledku molekulární interakce mezi aktivovaným AhR a jinými proteiny bylo obecně popsáno několik příkladů nekanonických signálních drah. Bylo například zjištěno, že v jádře se AhR spojuje s fosforylovanou formou retinoblastomového proteinu, což vede k zastavení růstu ve fázi G1/S buněčného cyklu [60]. Aryl hydrokarbonový receptor se také může navázat na transkripční faktor c-Maf, který je důležitý pro regulaci diferenciaci T-lymfocytů typu 1 [61]. Kromě toho byly popsány interakce AhR pro estrogenový receptor, b-catenin nebo NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor), což je klíčový transkripční faktor, který se podílí na regulaci antioxidantních enzymů, jako je SOD2 nebo hemooxygenáza 1 (HMOX1). Vazba ligandu na AhR také vyvolává alternativní účinky, jako je rychlé zvýšení nitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů, což vede k následným prozánětlivým reakcím zprostředkovaným c-src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase), cyklooxygenázou 2 a CCL1 (chemokine (C–C motive) ligand 1). Mnohé podrobnosti a fyziologický význam jsou však dosud stále neobjasněny [57].

4.3 Aryl hydrokarbonový receptor v kůži

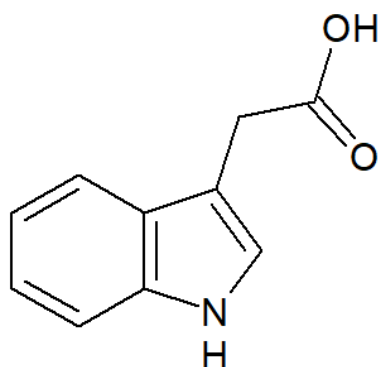
V *epidermis* je AhR exprimován v keratinocytech, Langerhansových buňkách nebo melanocytech. V *dermis* je AhR různou měrou exprimován ve fibroblastech, sebocytech, makrofázích, žírných buňkách, dendritických buňkách nebo T-lymfocytech.

Je prokázáno, že AhR hraje prostřednictvím přímé a nepřímé transkripční regulace prozánětlivých genů příznivou protizánětlivou roli jak při autoimunitním, tak při alergickém zánětu kůže. Na buněčné linii lidských keratinocytů bylo popsáno, že se důsledkem signalizace AhR zvyšuje genová exprese některých proteinů nezbytných pro správné fungování kožní bariéry, jako je např. filaggrin nebo lorikrin, a také se urychluje terminální diferenciaci keratinocytů, což má za následek rychlejší obnovu *epidermis*. Na modelu AhR deficitních myší byl popsán také jeho význam pro proliferaci melanocytů, a tím i pro pigmentaci. Na stejném modelu lokální nebo systémová aplikace jeho ligandů (např. TCDD) ukázala, že se signalizace AhR podílí na degranulaci a produkci cytokinů žírných buněk

a diferenciaci sebocytů. V keratinocytech se AhR podílí na stresové odpovědi na UV záření a jeho přítomnost snižuje prostřednictvím lokální imunosuprese erytém vyvolaný UV zářením. Poznatky o fyziologii AhR v kůži se v posledních letech nesmírně rozšířily a zdůraznily, že se AhR podílí na mnoha aspektech fyziologie kůže jako je detoxikace, buněčná homeostáza, pigmentace a kožní bariéra [62–66].

5 KYSELINA INDOL-3-OCTOVÁ

Kyselina indol-3-octová je bílá krystalická látka, citlivá na světlo, která patří mezi slabé kyseliny s hodnotou pK_a okolo 4,75. Je dobře rozpustná v ethanolu, methanolu a dimethylsulfoxidu (DMSO), hůře rozpustná v chloroformu a nerozpustná ve vodě. Molární hmotnost IAA je 175 g/mol a bod tání 165 °C. Strukturální vzorec IAA je znázorněn na Obr. 8.



Obrázek 8 Strukturální vzorec IAA
[vlastní zdroj]

Kyselina indol-3-octová je vůbec první objevený a zároveň jeden z nejčastěji se vyskytujících fytohormonů patřících do skupiny auxinů. K jejímu objevu vedla série pokusů Charlese Darwina již kolem roku 1880. V roce 1934 byla chemikem Köglem poprvé izolována z lidské moči a identifikována jako růstový stimulátor. V rostlinném materiálu byla poprvé objevena v roce 1946, kde působí jako růstový hormon, a nachází se především v mladých a rychle rostoucích stoncích a listech, do ostatních částí rostlin je následně transportována. Spolu s cytokininy jsou auxiny zodpovědné za stimulaci buněčného dělení, růst a buněčnou diferenciaci. Zajišťují větvení a tvorbu postranních kořenů. Kyselina indol-3-octová způsobuje prodlužování buněk, což hraje významnou roli v pohybových reakcích odrážejících pozici zdroje vnějšího podnětu, jako např. ohýbání nadzemních orgánů rostlin za světlem (fototropismus), ohyby kořenů během překonávání překážek ve směru gravitace (gravitotropismus) nebo růst rostliny v reakci na fyzický kontakt s pevným objektem (thigmotropismus) [67–69].

Kyselina indol-3-octová se však přirozeně nachází i v lidském organismu, kdy vzniká jako produkt mikrobiálního metabolismu tryptofanu popsaného v kap. 3. Na různých tkáních a modelech byla popsána řada jejích zajímavých účinků, které by mohly být relevantní i pro kůži. Většina z nich souvisí se skutečností, že IAA je ligandem pro AhR.

Vyhlídalová a kol. [51] ve studii na buněčné linii hepatocytů se stabilně transfekovaným reportérovým genem pro AhR podrobně charakterizovali efekt střevních mikrobiálních metabolitů tryptofanu (včetně IAA) a dospěli k závěru, že tyto metabolity v různé míře aktivují AhR, spouštějí jadernou translokaci AhR, indukují tvorbu heterodimeru AhR-ARNT a zvyšují vazbu AhR na promotor CYP1A1, čímž indukují jeho expresi. Tyto výsledky potvrzují schopnost IAA aktivovat AhR prostřednictvím kanonické signální dráhy.

V souvislosti s nekanonickou signální dráhou AhR byl na kmenových buňkách lidské zubní dřeně zkoumán ochranný účinek IAA vůči oxidačnímu stresu vyvolanému peroxidem vodíku. Vlivem IAA se totiž v kmenových buňkách zvýšila exprese NRF2, což je klíčový transkripční faktor, který zodpovědný za regulaci antioxidantních enzymů SOD2 a HMOX1. Za normálních podmínek je NRF2 vázán na Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap-1) a tento komplex se nachází v cytoplazmě. V podmínkách oxidačního stresu se NRF2 z Keap-1 uvolní a přemístí do jádra, kde rozpoznává element antioxidantní odpovědi (ARE – Antioxidant Response Element) a reguluje expresi antioxidantních enzymů. Dráha NRF2-ARE je pro ochranu před oxidačním stresem klíčová. Na základě této studie se dá předpokládat, že by IAA mohla prostřednictvím nekanonické signální dráhy AhR aktivovat dráhu NRF2-ARE i v kůži, což by mělo za následek ochranu před oxidativním poškozením ROS, které se významně podílí na předčasném stárnutí kůže [70].

Ve studii [71] prováděné na střevních epitelálních buňkách myši byla v důsledku aktivace AhR pomocí IAA inhibována signální dráha NF- κ B, čímž se snížila i exprese jeho následných cílů – prozánětlivých markerů IL-6, interleukinu 8 (IL-8) nebo faktoru nádorové nekrózy α (TNF α – Tumor Necrosis Factor α). Protizánětlivé účinky IAA byly také popsány ve studii [72] prováděné na buněčné linii myších makrofágů, kde po stimulaci zánětlivé odpovědi vyvolané lipopolysacharidem IAA významně zmírňovala expresi IL-1, IL-6, jakož i tvorbu ROS. V myších makrofázích, které byly ovlivněny IAA, byla v závislosti na její koncentraci zvýšená exprese antioxidantního enzymu HMOX1.

Stále více důkazů potvrzuje, že tryptofan a jeho mikrobiální metabolity ve střevech významně pomáhají udržovat rovnováhu mezi hostitelem a střevním mikrobiomem, což je nezbytné pro správné fungování imunitního systému. Tyto metabolity ve střevech ovlivňují různé fyziologické procesy, včetně rychlejší obnovy epitelu nebo snížení paracelulární permeability, a mohou přispívat nejen ke střevní, ale i k systémové homeostáze. Podrobné účinky IAA, které by potvrzovaly tyto poznatky, byly sledovány např. na modelech myši se

střevním zánětem. Zánětlivé cytokiny totiž narušují funkci střevní bariéry tím, že mění uspořádání proteinů těsného spojení, které je přitom hlavní složkou fyzické bariéry střevního epitelu. V této studii vedlo injekční peritoneální podání IAA v množství 50 mg/kg ve sliznici střev k vyšší expresi proteinů zajišťujících těsné buněčné spoje, jako je např. kladin 1, OCLN nebo *zonula occludens 1* známý také jako Tight junction protein 1 (TJP1). Tímto způsobem IAA posiluje střevní bariéru a mohla by takto působit i na bariérovou funkci v kůži [71].

Další účinky IAA byly popsány ve studii [73] prováděné na larvách háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), kde byl zkoumán vliv IAA na stres endoplazmatického retikula. Ten v buňkách nastává během nepříznivých podmínek vyvolaných různými faktory (genetické, enviromentální atd.). Během tohoto stavu dochází k narušení schopnosti buněk správně skládat proteiny, které se potom v endoplazmatickém retikulu hromadí. Bylo zjištěno, že IAA zvyšuje odolnost vůči stresu endoplazmatického retikula a posiluje odpověď na špatně složené proteiny, která spočívá v expresi mnoha genů zvyšujících velikost a funkci endoplazmatického retikula ve snaze obnovit jeho homeostázu.

5.1 Význam při léčbě kožních onemocnění

V souvislosti s kůží je IAA v současnosti zkoumána např. pro svůj potenciál při léčbě atopické dermatitidy. Jedná se o chronické neinfekční zánětlivé onemocnění, pro které je charakteristické silné svědění kůže. Mezi příčiny vzniku nebo zhoršení tohoto onemocnění patří přehnaně silná patologická imunitní odpověď na určitý alergen nebo změny v tvorbě lipidové vrstvy pokožky, která potom není schopna vázat vodu. Následkem toho je kožní bariéra narušená a umožňuje průnik různých alergenů. Atopickou dermatitidu mohou rovněž ovlivňovat střevní mikrobiální choroby, a to prostřednictvím aberantní imunitní odpovědi. Ve srovnání se zdravými jedinci byl u pacientů s atopickou dermatitidou nalezen rozdíl v diverzitě a složení střevní mikrobioty, kdy ubývá prospěšných střevních bakterií, jako jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, a přibývá patogenních mikroorganismů jako je *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* atd. Bylo zjištěno, že vlivem pozměněné střevní mikrobioty je u pacientů s ekzémem oslabena i metabolická dráha tryptofanu a jeho metabolitů, včetně IAA. Ty se přitom podílí na regulaci střevní imunity, a to prostřednictvím signalizace AhR, která hraje důležitou roli v imunitní odpovědi na bariérových místech, včetně kůže. Zároveň, bylo prokázáno, že u pacientů s atopickou dermatitidou je

metabolická dráha tryptofanu oslabena i v kožní mikrobiotě a výskyt IAA a dalších metabolitů je u nich v pokožce v porovnání se zdravými jedinci nižší. Na základě těchto poznatků se vliv metabolitů tryptofanu, včetně IAA, a signální dráha AhR zdá být pro léčbu atopického ekzému zajímavá [47, 74–75].

Nedávno byla IAA popsána také jako potencionální fotosenzibilizátor při fotodynamické terapii akné, seboroické dermatitidy či aktinických keratóz. Fotodynamická terapie obecně spočívá v reakci fotosenzibilizátoru se zdrojem světla o specifické vlnové délce závislé na daném fotosenzibilizátoru za přítomnosti kyslíku. Fotosenzibilizátor se po průniku do cílové buňky aktivuje v reakci na energii přijatou ze světelného zdroje a po reakci s kyslíkem produkuje cytotoxické látky, včetně ROS, které vyvolávají složité biochemické intracelulární kaskády vedoucí ke smrti buňky buď apoptózou, nebo nekrózou. Z různých vlnových délek viditelného světla aktivuje IAA nejúčinněji zelené světlo o vlnové délce 520 nm, které zároveň pro kůži není škodlivé. Léčba spočívá v aplikaci 0,015% lipozomálního gelu IAA na postižená místa, inkubaci po dobu 15 minut a následném ozáření zeleným světlem o vlnové délce 520 nm a intenzitě 9 J/m². Léčba akné touto metodou je účinná prostřednictvím antimikrobiálního působení na *Cutibacterium acnes* a účinku snižujícím tvorbu kožního mazu, jenž jsou považovány za jedny z hlavních patogenních faktorů způsobujících toto onemocnění. Za stejných podmínek lze IAA využít i při fotodynamické terapii seboroické dermatitidy, kdy dochází ke snížení tvorby kožního mazu a snížení výskytu kvasinky *Malassezia furfur*. Tato terapie rovněž vykazuje významnou krátkodobou účinnost při snižování průměrného počtu lézí aktinických keratóz [76–79].

V posledních době je IAA zkoumána i pro svůj potenciál v oblasti léčby kožního nádorového onemocnění maligního melanomu. Bylo totiž zjištěno, že IAA po ozáření UVB vlivem vzniklých volných radikálů snižuje životaschopnost buněk lidského melanomu a indukuje fragmentaci DNA, což je charakteristický znak apoptózy [80].

6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Kyselina indol-3-octová patří mezi nejčastěji se vyskytující fytohormony ze skupiny auxinů, zároveň je také metabolitem střevní a kožní mikroflóry [7, 47]. V současnosti je IAA zkoumána pro svůj potenciál v léčbě několika známých kožních onemocnění, jako je např. fotodynamická terapie akné [77] seboroické dermatitidy [78] a aktinických keratóz [79], či v léčbě zánětlivých kožních onemocnění jako je např. atopická dermatitida [47]. Vliv IAA na normální, zdravou kůži však dosud nebyl nikde popsán. Některé studie, prováděné na jiných tkáních a modelech, však naznačují řadu jejích zajímavých účinků, které by mohly fungovat i na kůži.

Kyselina indol-3-octová se například ve střevních buňkách podílí na aktivaci AhR, který je nezbytný pro správnou bariérovou funkci nejen střevního, ale i kožního epitelu [12, 51]. Kromě této klasické kanonické signální dráhy AhR IAA spouští také jeho další, nekanonickou signální dráhu, která vede k expresi genu NRF2. Tímto způsobem IAA podporuje endogenní antioxidační systém buněk, neboť NRF2 je zodpovědný za regulaci antioxidačních enzymů HMOX1 nebo SOD2 [70]. Další studie [73] například popisuje schopnost IAA snižovat stres endoplazmatického retikula posílením odpovědi na špatně složené proteiny. Díky těmto studiím se dá předpokládat, že by IAA ve zdravé kůži mohla zlepšovat kožní bariéru nebo odolnost proti oxidačnímu stresu, což je jedna z nejčastějších příčin stárnutí kůže.

7 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat literární rešerši se zaměřením na IAA jako metabolit tryptofanu produkovaný střevním a kožním mikrobiomem. Pozornost byla věnována charakterizaci jejího potenciálu v oblasti zlepšování kožní bariéry a odolnosti proti oxidačnímu stresu v procesu stárnutí kůže, které se ukazují být významné pro aplikace v kosmetologii a dermatologii.

V praktické části práce bylo cílem charakterizovat efekt IAA na kůži se zaměřením na aktivaci AhR receptoru, expresi složek těsných spojů a kožní bariéry a antioxidačních enzymů. Úkolem bylo také sledovat efekt IAA na experimentální modely vystavené UVA a UVB zářením, kterému je kůže denně vystavena a které patří mezi nejvýznamnější faktory přispívající k předčasnému stárnutí kůže. Jako experimentální model byly použity buněčné kultury a prasečí kožní explantáty. Pro sledování efektů byly využívány běžné metody molekulární biologie.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

8.1 Použité materiály a chemikálie

- Kyselina indol-3-octová; Sigma Aldrich (USA)
- Buněčná linie lidských keratinocytů HaCaT; Cell Lines Service, (Německo)
- Buněčná linie lidského hepatomu HepG2-LuciaTM AhR; InvivoGen (Francie)
- Čerstvé prasečí uši; Masoeko s.r.o. (Česká republika)
- Dubelcco's modified Eagle's medium; Biosera (Francie)
- Bovinní fetální sérum; Diagnostovum (Německo)
- Roztok L-glutaminu (200 mM); Capricorn Scientific (Německo)
- Roztok penicilinu (10 000 U·ml⁻¹) a streptomycinu (10 mg·ml⁻¹); Sigma Aldrich (USA)
- Eagle's minimum essential medium; ATCC (USA)
- Non-essential amino acids medium; Capricorn Scientific (Německo)
- D-glukóza; Sigma Aldrich (USA)
- Normocin (50 mg·ml⁻¹); InvivoGen (Francie)
- Zeocin (100 mg·ml⁻¹); InvivoGen (Francie)
- Dimethyldulfoxid pure; Lach-ner (Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Chlorid sodný p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Chlorid draselný p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Sterilní Trypsin/EDTA solution 10×; Sigma Aldrich (USA)
- Pufr CASYton; Omni Life Science (Německo)

- Dezinfekce pro ošetření ploch postřikem Guttar; MPD Plus s.r.o. (Česká republika)
- Diethyl pyrokarbonát; Sigma Aldrich (USA)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; Glentham Life Science (Velká Británie)
- Isopropanol; Sigma Aldrich (USA)
- Triton-X-100; Thermo Fisher Scientific (USA)
- Dezinfekce ve spreji Softasept N; B. Braun (Německo)
- Injekční voda; B. Braun (Německo)
- Lyzační pufr RLT; Qiagen (Německo)
- Rnase-Free Water; Qiagen (Německo)
- Pufr RW1; Qiagen (Německo)
- Promývací pufr RPE; Qiagen (Německo)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems (USA)
- Pufr TaqMan Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems (USA)
- Sondy PrimePCR™ Probe Assay Bio-Rad; Bio-rad spol. s r.o. (Česká republika)

Tabulka 3 Použité PrimePCR™ Probe Assays

Název	Unique Assay ID
CYP1A1, Human	qHsaCEP0058439
FLG2, Human	qHsaCIP0031118
IL-6, Human	qHsaCEP0051939
OCLN, Human	qHsaCEP0041012
RPL13A, Human	qHsaCEP0052324
SOD2, Human	qHsaCEP0039142
TJP1, Human	qHsaCIP0031627
CYP1A1, Pig	qSscCIP0026937
FLG2, Pig	qSscCEP0043559
IL-8, Pig	qSscCEP0036027
RPL13A, Pig	qSscCEP0038457
SOD2, Pig	qSscCEP0043531

- Sondy TaqMan™ Gene Expression Assay; Applied Biosystems (USA)

Tabulka 4 Použité TaqMan™ Gene Expression Assays

Název	Unique Assay ID
OCLN, Pig	Ss03373514_m1
TJP1, Pig	Ss03377507_u1

- Chloroform p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Ethanol 96%; Ing. Petr Švec–PENTA (Česká republika)
- Dodecylsírán sodný; Sigma Aldrich (USA)
- Triglycerid kyseliny kaprinové/kaprylové; ACE Trade (Česká republika)
- Glycerin bezvodý p.a.; Lach-ner (Česká republika)
- Agar; Merck (Německo)
- TRI Reagent; Sigma Aldrich (USA)
- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát; Sigma Aldrich (USA)
- QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia reagent; InvivoGen (Francie)
- AhR inhibitor CH–223191; InvivoGen (Francie)
- Benzo[*a*]pyren; Sigma Aldrich (USA)
- Trolox; Merck (Německo)
- 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl; Glentham Life Science (Velká Británie)

8.2 Použité přístroje a pomůcky

- Laminární box Mars Pro Cytosafe Class 2; LaboGene (Dánsko)
- Inkubátor IGO 150; Jouan (Francie)
- Analytické váhy Mettler Toledo ME204; Mettler Toledo (USA)
- Předvážky KERN EMB 200-3; Kern & Sohn (Německo)
- Zařízení pro měření koncentrace a viability buněk Cell Counter & Analyzer CASY; Omni Life Science (Německo)

- Stolní třepačka s použitím pro kultivační panely Orbi-Shaker XL; Benchmark Scientific (USA)
- Stolní mikroskop Nikon Eclipse Ts2; Nikon Instruments (USA)
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5702; Eppendorf (Rakousko)
- Multifunkční reader EnSight; Perkin Elmer (USA)
- UV lampa Oriel 69921 + 1000 W zdroj 66920; Oriel Instruments (USA)
- UV filtry UG5 (1 mm – tmavě modrý) a WG280 (2 mm – průhledný); Schott (Velká Británie)
- Měřicí přístroj pro intenzitu UV záření Photometer/Radiometer PMA2100V + UVA detektor a Erythema detektor (UVB); Solar Light Company (USA)
- Zařízení pro izolaci RNA QIA Cube; Qiagen (USA)
- Mikroobjemový UV-Vis spektrofotometr pro měření koncentrace RNA NanoDrop OneC; Thermo Fisher Scientific (USA)
- Vortex mixer BenchMixer V2; Benchmark Scientific (USA)
- Centrifuga Eppendorf Mini-spin; Eppendorf (Rakousko)
- Termocykler Biometra TOne 96 G; Analytik-Jena (Německo)
- Přístroj QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System + software QuantStudio 3/5 Real-Time PCR; Applied Biosystems (USA)
- Magnetická míchačka s ohřevem a teplotním čidlem Heidolph MR 3001 K; Heidolph Instruments (Německo)
- Homogenizátor Tissue Lyzer II; Qiagen (USA)
- Chlazená mikrocentrifuga Prism R C2500-R; Labnet (USA)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti2 E + zobrazovací software Nikon NIS-Elements; Nikon Instruments (USA)
- Autokláv Systec – VX150; Systec (Německo)
- Spotřební materiál do přístroje QIAcube, jenž je součástí RNeasy Mini QIAcube Kit (speciální špičky a minikolonky); Qiagen (USA)

- Speciální plast pro qRT-PCR reakce (stripy pro 8 vzorků o objemu 100 μ l, víčka na stripy pro 8 vzorků, adaptéry na stripy, mikrozkušavky Safe-Lock atd.); Applied Biosystems (USA) nebo Eppendorf (Rakousko)
- Franzovy difúzní komůrky; SES Analysysteme (Německo)
- Mikropipety a multikanálové pipety Eppendorf; Eppendorf (Rakousko)
- Běžné pomůcky a plast potřebný pro kultivaci buněk; Eppendorf (Rakousko) nebo TPP (Švýcarsko)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

9 METODIKA PRÁCE

Stěžejní metodou v praktické části bylo sledování vlivu IAA na expresi vybraných genů, podílejících se na bariérové funkci kůže, redukci ROS a dalších, v lidských keratinocytech a prasečí *epidermis* s využitím kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR). Ještě předtím však bylo potřeba u obou experimentálních modelů ověřit koncentraci IAA, která nemá vliv na viabilitu buněk. Pro detekci ROS v *epidermis* byla zvolena metoda fluorescenční mikroskopie, která využívá látky 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (DCFH-DA), antioxidační kapacita IAA potom byla stanovena na bezbuněčném modelu spektrofotometrickou metodou s použitím radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH).

9.1 Kultivace buněk

Pro charakterizaci vlivu IAA na kůži byla jako jeden z experimentálních modelů zvolena buněčná linie lidských imortalizovaných keratinocytů HaCaT. Pro stanovení vlivu IAA na aktivitu AhR byla používána buněčná linie lidského imortalizovaného karcinomu jater (hepatomu) HepG2-LuciaTMAhR (HepG2) [81–82].

9.1.1 Používané roztoky a média

- Sterilní roztok D-glukózy o koncentraci 400 mg·ml⁻¹

Pro přípravu tohoto roztoku bylo na předvážkách do skleněné lahve naváženo 80 g D-glukózy a toto množství bylo na magnetické míchačce rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Roztok byl následně v laminárním boxu pomocí injekční stříkačky a filtru s velikostí pórů 0,2 μm přefiltrován do sterilních plastových zkumavek po objemech 10 ml a uchováván v mrazicím boxu při -20 °C.

- Sterilní fosfátový pufr (PBS)

Pro přípravu sterilního PBS bylo na předvážkách do skleněné lahve naváženo 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,85 g Na₂HPO₄·12H₂O a 0,2 g KH₂PO₄. Tyto chemikálie byly poté na magnetické míchačce rozpuštěny v 1 l destilované vody a vzniklý roztok byl vysterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

- Sterilní roztok 0,05% kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) v PBS

Do skleněné lahve bylo na předvážkách naváženo 0,1 g EDTA, které bylo rozpuštěno na magnetické míchače v 200 ml PBS. Vzniklý roztok byl vysterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut a poté uchováván v lednici při 4 °C.

- Sterilní roztok Trypsin/EDTA 1×

Komerčně vyráběný sterilní roztok Trypsin/EDTA solution 10× o objemu 100 ml byl naředěn 900 ml sterilního PBS. Takto připravený roztok byl následně pomocí pipety rozdělen do sterilních zkumavek po objemech 10 ml a uchováván při -20 °C v mrazicím boxu. Práce probíhala asepticky v laminárním boxu.

- Sterilní kultivační medium pro keratinocyty HaCaT

Pro přípravu kultivačního media byly v laminárním boxu ve sterilní skleněné lahvi pomocí odměrného válce a automatické pipety smíchány komerčně vyráběné sterilní roztoky Dubelcco's modified Eagle's medium, Bovinní fetální sérum, L-glutamin a Penicilin/Streptomycin s připraveným sterilním roztokem D-glukózy o koncentraci 400 mg·ml⁻¹. Jednotlivý objem složek a jejich koncentrace ve výsledném mediu jsou uvedeny v Tab. 5. Medium bylo uchováváno v lednici při 4 °C.

Tabulka 5 Příprava kultivačního media pro HaCaT

Složka	Objem složky [ml]	Koncentrace složky v mediu
Dubelcco's modified Eagle's medium	435	87 %
Bovinní fetální sérum	50	10 %
D-glukóza	5	4 mg·ml ⁻¹
L-Glutamin	5	2 mM
Penicilin/Streptomycin	5	100 U·ml ⁻¹ /100 µg·ml ⁻¹

- Sterilní kultivační medium pro buňky HepG2

Pro přípravu media byly stejným způsobem jako u media pro keratinocyty HaCaT smíchány komerčně vyráběné sterilní roztoky Eagle's minimum essential medium, Bovinní fetální sérum, Non-essential amino acids medium, Penicilin/Streptomycin, Normocin a Zeocin. Objem a koncentrace složek a ve výsledném mediu jsou uvedeny v Tab. 6. Medium bylo rovněž uchováváno v lednici při 4 °C.

Tabulka 6 Příprava kultivačního media pro HepG2

Složka	Objem složky [ml]	Koncentrace složky v mediu
Eagle's minimum essential medium	435	87 %
Bovinní fetální sérum	50	10 %
Non-essential amino acids medium	5	1 %
Penicilin/Streptomycin	5	100 U·ml ⁻¹ /100 µg·ml ⁻¹
Normocin	1	100 µg·ml ⁻¹
Zeocin	0,5	100 µg·ml ⁻¹

9.1.2 Kultivace buněčné linie HaCaT

Buněčná linie keratinocytů HaCaT byla kultivována v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ a 97–99% humiditě. Veškerá práce probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu Mars Pro Cytosafe Class 2, který byl vždy předem vytřen dezinfekcí Guttar a vysvícen UV zářením minimálně po dobu 15 minut včetně veškerých pomůcek.

Buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích o ploše 75 cm² v 10 ml kultivačního media, které jim bylo každý 3. – 5. den měněno. V intervalu 5–10 dní byly buňky pasážovány. Při pasážování buněk bylo vždy nejprve odsáto staré kultivační medium. Monovrstva buněk byla následně krátce opláchnuta v 10 ml sterilního PBS. Po jeho odsátí byl přidán 1 ml 0,05% EDTA v PBS a buňky byly ponechány inkubovat po dobu 15 minut v inkubátoru při 37 °C. Po odsátí media EDTA v PBS byl přidán 1 ml roztoku Trypsin/EDTA 1×, vlivem čehož se buňky uvolnily ze dna nádoby, což bylo průběžně kontrolováno pod mikroskopem Nikon Eclipse Ts2. Následně bylo do lahve přidáno 9 ml kultivačního media a vzniklá suspenze buněk byla kvantitativně převedena do plastové centrifugační zkumavky. Z buněčné suspenze bylo odebráno 100 µl a přidáno do měřicí zkumavky obsahující 10 ml speciálního pufru CASYton za účelem stanovení celkového množství a viability buněk na přístroji Cell Counter & Analyzer CASY. Jedná se o vysoce přesný analyzátor buněčných kultur, ve kterém částice a buňky procházející póry definované velikosti generují odporový signál, který se liší podle jejich velikosti a vodivosti. Živé buňky s polarizovanou membránou generují signál vysokého odporu, zatímco umírající nebo mrtvé buňky vykazují mnohem nižší odpor díky své depolarizované nebo zcela narušené buněčné membráně [83].

Zbylá suspenze buněk byla stočena v centrifuze Eppendorf při 1200 ot./min po dobu 5 minut. Následně byl opatrně slit supernatant a peleta buněk na dně plastové zkumavky byla pomocí automatické pipety rozsuspendována v 1 ml kultivačního media. Dle potřeby a na základě výsledků z přístroje Cell Counter & Analyzer CASY bylo z této suspenze nasazeno potřebné množství buněk na novou kultivační lahev a doplněno 10 ml kultivačního media.

9.1.3 Kultivace buněčné linie HepG2

Postup při kultivaci buněk HepG2 byl téměř totožný jako u kultivace keratinocytů HaCaT. Buňky však byly kultivovány v mediu odlišného složení. Při pasážování buněk HepG2 byl také vynechán krok inkubace s 0,05% EDTA v PBS. K buňkám byl tedy po oplachu PBS přidán rovnou 1 ml roztoku Trypsin/EDTA 1×. Další postup již byl stejný s kultivací keratinocytů HaCaT.

9.2 Stanovení vlivu kyseliny indol-3-octové na viabilitu buněk

Pro ověření vlivu IAA na viabilitu buněk byl zvolen test využívající barvivo 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT). Živé buňky pomocí mitochondriálních dehydrogenáz metabolizují ve vodě rozpustné žluté MTT na nerozpustné fialové krystaly formazanu. Po jejich rozpuštění v solubilizačním roztoku se proměří absorbance vzniklých roztoků. Intenzita fialového zbarvení těchto roztoků je přímo úměrná metabolické aktivitě buněk [84].

9.2.1 Používané roztoky

- Roztok MTT o koncentraci 5 mg·ml⁻¹ PBS

Pro přípravu roztoku bylo na analytických vahách do plastové zkumavky naváženo 50 mg MTT s přesností na 0,1 mg. Toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 10 ml sterilního PBS. Vzniklý roztok byl následně skladován v lednici při 4 °C chráněn alobalem před vlivem světla.

- Solubilizační roztok

Pro přípravu 1 l solubilizačního roztoku bylo ve skleněné lahvi pomocí odměrného válce smícháno 450 ml isopropanolu, 450 ml DMSO a 100 ml Tritonu-X-100. Výsledný roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

- Zásobní roztok IAA o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DMSO

Pro přípravu zásobního roztoku IAA bylo na analytických vahách do plastové mikrozkušavky naváženo 100 mg IAA s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 1 ml DMSO. Vzniklý roztok byl uchováván zabalený v alobalu v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a bylo nutné jej při práci chránit před světlem.

- Roztok 0,1 mM B(a)P

Pro přípravu 0,1 M roztoku B(a)P bylo do plastové mikrozkušavky na analytických vahách naváženo 25,2 mg B(a)P s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 1 ml DMSO. Takto připravený roztok byl uchováván v mrazicím boxu při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. V případě potřeby byl v plastové mikrozkušavce z tohoto roztoku připraven roztok 0,1 mM B(a)P smícháním 2 μl roztoku 0,1 M B(a)P s 1998 μl kultivačního media pro HepG2.

- Roztok 0,1 mM CH-223191

Jedna komerčně dodávaná lahvička s CH-223191 obsahuje 10 mg. Toto množství bylo v laminárním boxu přímo v originální lahvičce rozpuštěno v 1 ml DMSO. Vzniklý 30 mM roztok byl uchováván při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ v lednici. V případě potřeby byl 0,1 mM roztok CH-223191 připraven v plastové mikrozkušavce smícháním 6,7 μl roztoku 30 mM CH-223191 s 1993,3 μl kultivačního media pro HepG2.

- Testovaný roztok IAA o koncentraci $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro keratinocyty HaCaT

Roztok IAA o koncentraci $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl pomocí automatické pipety připraven v plastové zkušavce smícháním 100 μl zásobního roztoku IAA o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DMSO s 9900 μl kultivačního media pro HaCaT. Následně byl tento roztok pomocí injekční stříkačky a filtru s velikostí pórů 0,2 μm přefiltrován do sterilní plastové zkušavky.

- Testované roztoky IAA o koncentraci $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,1% DMSO pro HepG2

Roztok IAA o koncentraci $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven v plastové zkušavce smícháním 10 μl zásobního roztoku IAA o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DMSO s 9990 μl kultivačního media pro buňky HepG2. Následně byl tento roztok pomocí injekční stříkačky a filtru s velikostí pórů 0,2 μm přefiltrován do čisté sterilní zkušavky.

Roztok 0,1% DMSO byl v laminárním boxu pomocí automatické pipety připraven v plastové zkušavce smícháním 5 μl DMSO s 4995 μl kultivačního media pro HepG2.

9.2.2 Vliv na viabilitu keratinocytů HaCaT

V rámci tohoto stanovení byly testovány roztoky IAA o koncentraci 10, 50, 100, 500 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako kontrola rozpouštědla bylo do experimentu zahrnut i 1% roztok DMSO. Nejdříve bylo pomocí multikanálové pipety na 96jamkový panel nasazeno množství 10 000 buněk na jamku. Buňky byly v potřebném množství odebrány ze suspenze zbylé po pasážování buněk (3 šarže) a k nim bylo přidáno příslušné množství kultivačního media tak, aby výsledný objem v každé jamce byl 200 μl . Z každé šarže byly buňky nasazeny do 28 jamek. Zbylé jamky byly ponechány bez buněk jako blank. Panel s buňkami byl poté inkubován po dobu 24 hodin při 37 °C. Poté bylo pomocí multikanálové pipety medium odsáto a buňky v jamkách byly ovlivněny testovanými roztoky o objemu 200 μl , vždy ve 4 opakováních.

Testované roztoky IAA o koncentraci 10, 50, 100 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 1% DMSO byly připraveny pomocí multikanálové pipety smícháním kultivačního media pro HaCaT s roztokem IAA o koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ přímo v jamkách 96jamkového panelu dle Tab. 7.

Tabulka 7 Příprava roztoků pro ovlivnění HaCaT v jamkách 96jamkového panelu

Roztok	Objem roztoku IAA 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [μl]	Objem kultivačního media [μl]
Kontrola (jamky s buňkami)	0	200
IAA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	2	198
IAA 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	10	190
IAA 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	20	180
IAA 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100	100
IAA 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	200	0
DMSO 1%	0	198 + 2 μl DMSO
Blank (jamky bez buněk)	0	200

Poté byl panel s buňkami opět ponechán kultivovat 24 hodin při 37 °C.

Po uplynutí této doby byl do všech jamek přidán roztok MTT o koncentraci 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS v množství 10 % původního objemu (tzn. 20 μl). Následně byl panel zabalen do alobalu a ponechán po dobu 2,5 hodin kultivovat při 37 °C. Poté se medium s MTT z panelu opatrně vykleplo a do všech jamek byl pomocí multikanálové pipety přidán solubilizační roztok o objemu 220 μl . Panel s buňkami byl následně ponechán třepat na třepačce Orbi-Shaker

XL po dobu 1,5 hodiny při 120 ot./min zabalený v alobalu. Ve vzniklých roztocích byla poté na multifunkčním readeru EnSight, viz Obr. 9, změřena absorbance při 570 a 690 nm. Viabilita buněk byla vyjádřena v procentech vůči neovlivněné kontrole (průměr alespoň ze 3 opakování \pm střední chyba průměru – SEM).



Obrázek 9 Multifunkční reader EnSight

9.2.3 Vliv na viabilitu buněk HepG2

Vliv IAA na viabilitu buněk byl sledován i na buněčné linii HepG2, která byla zvolena za účelem stanovení vlivu IAA na aktivaci signalizace AhR. Buňky HepG2 totiž obsahují transfekovaný reportérový gen Lucia inkorporovaný do genu pro AhR. Aktivitu luciferázy Lucia v supernatantu buněčné kultury lze sledovat pomocí fluorimetru za použití speciálního detekčního činidla QUANTI-Luc™ 4 Lucia/Gaussia a na základě intenzity fluorescenčního záření lze tímto způsobem aktivitu AhR kvantifikovat [82].

Testovány byly roztoky IAA o koncentraci 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro porovnání byl testován i roztok známého a silného ligandu AhR 1 μM B(a)P a oproti tomu i specifického antagonisty AhR 1 μM CH-223191 (chemicky 2-methyl-2H-pyrazol-3-karboxylová kyselina). Jako kontrola rozpouštědla byl do experimentu zahrnut i 0,1% roztok DMSO. Veškerá práce probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Nejdříve bylo pomocí multikanálové pipety na 96jamkový panel nasazeno množství 20 000 buněk na jamku stejným postupem, jenž byl popsán u keratinocytů HaCaT. Panel s buňkami byl poté inkubován po dobu 24 hodin při 37 °C.

Následně bylo medium odsáto a buňky v jamkách byly ovlivněny testovanými roztoky o objemu 200 μl , vždy ve 4 opakováních.

Roztoky IAA o koncentraci 10 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny smícháním kultivačního media pro buňky HepG2 a zásobního roztoku IAA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ přímo v jamkách 96jamkového panelu dle Tab. 8.

Rovněž roztok 1 μM B(a)P byl připraven pomocí multikanálové pipety přímo v jamkách 96jamkového panelu, a to smícháním 2 μl 0,1 mM roztoku B(a)P se 198 μl kultivačního media pro HepG2. Stejným způsobem byl připraven i roztok 1 μM roztok CH-223191.

Tabulka 8 Příprava roztoků pro ovlivnění HepG2 v jamkách 96jamkového panelu

Roztok	Objem roztoku IAA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [μl]	Objem kultivačního media [μl]
Kontrola (jamky s buňkami)	0	200
IAA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	20	180
IAA 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	100	100
IAA 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	200	0
Blank (jamky bez buněk)	0	200

Poté byl panel s buňkami opět ponechán kultivovat po dobu 24 hodin při 37 °C.

Následně byl do jamek 96jamkového panelu k buňkám přidán roztok MTT v množství 10 % původního objemu. Další pracovní postup byl stejný jako u keratinocytů HaCaT. Viabilita buněk byla vyjádřena v procentech vůči neovlivněné kontrole (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).

9.3 Vliv kyseliny indol-3-octové na aktivitu aryl hydrokarbonového receptoru

Během testu viability prováděném na buněčné linii HepG2 bylo 24 hodin po ovlivnění testovanými roztoky z jamek 96jamkového panelu odebráno 20 μl supernatantu buněk do bílého 96jamkového panelu vhodného k měření fluorescence. K supernatantu bylo přidáno 50 μl 20 \times zředěného QUANTI-Luc reagentu, jenž byl předem připraven v laminárním boxu v plastové zkumavce smícháním 0,5 ml reagentu s 9,5 ml destilované vody. Bezprostředně poté byla ve vzniklých roztocích proměřena intenzita fluorescence na multifunkčním readeru

EnSight. Aktivita AhR byla vyjádřena v procentech vůči neovlivněné kontrole (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).

9.4 Vliv kyseliny indol-3-octové na viabilitu prasečí *epidermis*

Jako další experimentální model pro stanovení vlivu IAA byla používána prasečí *epidermis* z kožních explantátů z důvodu značné podobnosti prasečí a lidské kůže. Prasečí *epidermis* byla získána z prasečích ušních boltců, kde se nachází podobné množství mazových žláz jako v lidské kůži v oblasti obličeje [85]. Na viabilitu *epidermis* byl rámci tohoto experimentu sledován vliv IAA o koncentraci 5 a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok dodecylsírany sodného (SDS) o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, který se často používá jako modelová látka pro navození zánětu. Jako kontrola rozpouštědla byl do experimentu zařazen i triglycerid kyseliny kaprinové/kaprylové.

9.4.1 Používané roztoky

- Testované roztoky IAA o koncentraci 5 a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a SDS o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Pro přípravu roztoku IAA o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo na analytických vahách do plastové zkumavky naváženo 30 mg IAA s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 3 ml triglyceridu.

Roztok IAA o koncentraci 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven v plastové mikrozkušavce smícháním 1 ml roztoku IAA o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ s 1 ml triglyceridu.

Roztok SDS o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven v plastové zkumavce navážením 30 mg SDS s přesností na 0,1 mg a rozpuštěním v 3 ml destilované vody.

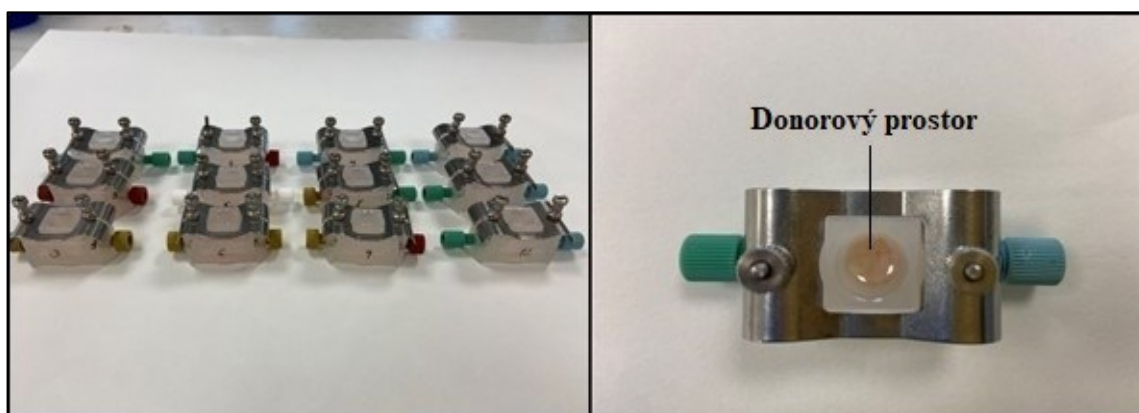
9.4.2 Pracovní postup

Čerstvé prasečí ušní boltce byly očištěny pod tekoucí vodou a oholeny. Poté bylo pomocí skalpele vykrojeno 15 kusů kožních explantátů o rozměrech cca 2×2 cm. Vybrány byly pouze vzorky bez jakýkoliv defektů. Všechny vzorky byly vyřezávány vždy na stejném místě boltce – uprostřed a směrem k vnitřní straně ucha. Vzorky byly poté inkubovány při 4 °C po dobu 2 hodin v kultivačním mediu pro keratinocyty HaCaT s vyšším obsahem antibiotik (500 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicilinu a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycinu), jenž bylo sterilně připraveno

v plastové zkumavce smícháním 19,2 ml kultivačního media pro keratinocyty HaCaT s 800 ml komerčně vyráběného roztoku Penicilinu/Streptomycinu.

Další práce již probíhala asepticky v laminárním boxu. Jednotlivé vzorky byly opláchnuty sterilním PBS a vloženy do Franzových cel, do jejichž akceptorového prostoru bylo předem napipetováno 320 μl kultivačního media pro HaCaT. Na povrch *epidermis* v donorových otvorech cel bylo v tripletech aplikováno vždy 500 μl testovaného roztoku, viz Obr. 10.

Vzorky v celách byly následně inkubovány ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 18 hodin. Poté byly vzorky opláchnuty PBS a *epidermis* byla od *dermis* oddělena pomocí tepelného šoku ponořením vzorku na 90 sekund do destilované vody o teplotě 60 °C. Odděleno bylo vždy pouze kolečko, které bylo vytlačeno donorovým prostorem Franzových cel. Jednotlivé vzorky *epidermis* byly poté vloženy do 24jamkového panelu. Do každé jamky bylo ke vzorkům přidáno 240 μl kultivačního media pro HaCaT a 60 μl roztoku MTT o koncentraci 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PBS. Vzorky byly následně ponechány inkubovat po dobu 3 hodin při 37 °C zabalené v alobalu. Poté bylo medium s MTT pomocí pipety opatrně odsáto tak, aby nebyly nasáty i vzorky *epidermis*, a místo něj byl ke vzorkům přidán 1 ml solubilizačního roztoku. Následně byly vzorky v 24jamkovém panelu 2 hodiny ponechány zabalené v alobalu třepat na třepačce Orbi-Shaker XL při 120 ot./min. Od každého vzorku po vytřepání, viz. Obr. 11, bylo poté 200 μl roztoku v tripletech přeneseno do 96jamkového panelu a multifunkčním readerem EnSight byla v roztocích změřena absorbance při 570 a 690 nm. Viabilita *epidermis* byla vyjádřena v procentech vůči neovlivněné kontrole (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).



Obrázek 10 Vzorky prasečích kožních explantátů ve Franzových celách



Obrázek 11 Vzorčky prasečí *epidermis* po vytřepání v solubilizačním roztoku

9.5 Vliv kyseliny indol-3-octové na expresi genů v keratinocytech HaCaT a v prasečí *epidermis*

Ke stanovení vlivu IAA na expresi vybraných genů v keratinocytech HaCaT a prasečí *epidermis* byla zvolena qRT-PCR, která je založena na detekci fluorescenčního signálu získávaného z množícího se (amplifikovaného) templátu (cDNA – komplementární DNA). Součástí pracovního procesu je nejprve izolace mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA), poté transkripce mRNA do cDNA a následně qRT-PCR. Cílová sekvence genů v cDNA byla v tomto případě detekována pomocí kombinace specifických primerů a fluorescenčně značené sondy. Sonda je na svém 5'konci fluorescenčně značena a na 3'konci nese zhášec. V případě, že jsou tyto dvě molekuly spojeny vláknem sondy blízko u sebe, zhášec absorbuje emitované světlo z fluorescenčního barviva a sondu nelze detekovat. Sonda hybridizuje v oblasti DNA amplifikované specifickou sadou primerů a během reakce polymeráza prodlužuje primer a syntetizuje výsledné vlákno směrem od 5' ke 3'. Vlivem toho degraduje hybridizovanou sondu, čímž uvolní fluorescenční barvivo od zhášec, a to vede k emisi fluorescenčního signálu [86].

9.5.1 Používané roztoky

- Voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem (DEPC voda)

Pro přípravu DEPC vody, bylo ve skleněné lahvi smícháno 50 μl diethyl pyrokarbonátu s 50 ml injekční vody. Vzniklý 0,1% roztok byl ponechán přes noc inkubovat v otevřené a alobalem překryté lahvi při 37 °C. Druhý den byl tento roztok vysterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut a poté uchováván v lednici při 4 °C. Výsledná DEPC voda neobsahuje ribonukleázy.

- 70% ethanol

Pro přípravu 1 litru 70% ethanolu bylo v laminárním boxu ve sterilní skleněné lahvi pomocí odměrného válce smícháno 729 ml 96% ethanolu a 271 ml DEPC vody.

- Testovaný roztok IAA o koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro keratinocyty HaCaT

Roztok IAA o koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven pomocí automatické pipety v plastové zkumavce smícháním 14 μl zásobního roztoku IAA o koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DMSO s 13 986 μl kultivačního media pro HaCaT. Následně byl tento roztok pomocí injekční stříkačky a filtru s velikostí pórů 0,2 μm přefiltrován do sterilní plastové zkumavky.

- Testované roztoky IAA o koncentraci 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro prasečí *epidermis*

Pro přípravu roztoku IAA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl do plastové zkumavky na analytických vahách navážen 1 mg IAA s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 10 ml triglyceridu.

Roztok IAA o koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven v plastové mikrozkušavce smícháním 100 μl roztoku IAA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s 900 μl triglyceridu.

9.5.2 Vliv na expresi genů v keratinocytech HaCaT

V rámci tohoto stanovení byla v keratinocytech HaCaT sledována změna genové exprese vlivem IAA u genů IL-6, OCLN, SOD2, CYP1A1, TJP1 a filaggrinu 2 (FLG2). Jako housekeeping gen byl použit RPL13A. Obecně jsou housekeeping geny charakteristické tím, že míra jejich exprese nebývá ovlivněna změnou stavu buňky ani ostatními okolnostmi, které jsou v experimentu sledovány [86]. V rámci této metody byl testován roztok IAA o koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro kontrolu rozpouštědla byl do experimentu zahrnut i 0,1% DMSO.

Na tři 6jamkové panely bylo pomocí automatické pipety nasazeno množství 300 000 keratinocytů HaCaT na jamku ze suspenze zbylé po pasážování buněk (3 šarže). Každá šarže byla nasazena na jiný panel. K tomu bylo přidáno příslušné množství kultivačního media tak, aby výsledný objem v každé jamce byl 2 ml. Buňky byly ponechány 48 hodin kultivovat při 37 °C.

Poté bylo ve všech jamkách pomocí automatické pipety odsáto medium a vyměněno za 1 ml sterilního PBS. Na polovinu jamek s buňkami bylo následně pomocí UV lampy Oriol a filtrů UG5 a WG280 aplikováno UVA a UVB záření o dávce 10 mJ/cm² UVB za cílem navození prozánětlivých procesů a oxidačního stresu. Před samotným ozářením buněk byl nejdříve proměřen skutečný výkon UV lampy pomocí přístroje Photometer/Radiometer PMA2100V s detektorem UVB záření, kdy byla naměřena hodnota 175 μW/cm² (s víčkem 6jamkového panelu). Pro výpočet doby ozáření byl použit vzorec (1).

$$t = \frac{1000 \cdot E}{P} \text{ [s]} \quad (1)$$

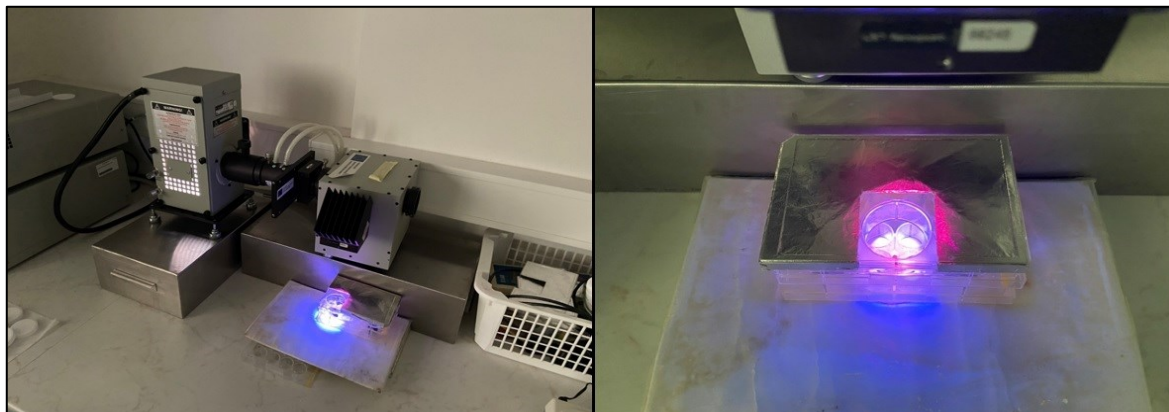
Kde:

t – doba vyjádřená v sekundách, po kterou je nutné daný objekt ozařovat,

E – požadovaná dávka záření v mJ/cm², která bude na objekt aplikována,

P – naměřený výkon UV zdroje v μW/cm², který byl naměřen přístrojem PMA2100 pomocí UVB detektoru ve stejné výšce a za stejných podmínek jako ozařovaný objekt.

Pro dosažení intenzity UVB záření 10 mJ/cm² byly buňky v 6jamkovém panelu s víčkem ozařovány po dobu 57 sekund. Ozařována byla vždy jen jedna jamka, ostatní byly mezitím zakryty alobalem, viz Obr. 12. Buňky po ozáření byly ponechány po dobu 10 minut kultivovat při 37 °C a poté byly ovlivněny 2 ml testovaných roztoků IAA a DMSO. Pro přípravu 0,1% DMSO bylo přímo v jamkách 6jamkového panelu smícháno 1998 μl kultivačního media pro HaCaT s 2 μl DMSO. Ke kontrolním roztokům byly přidány pouze 2 ml kultivačního media pro HaCaT. Po ovlivnění byly buňky ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 12 Ozáření buněk v 6jamkovém panelu UV zářením

Po uplynutí této doby bylo medium v jamkách odsáto a k buňkám byl přidán pufr RLT (součást izolačního kitu RNeasy Mini kit) pro lýzu buněk o objemu 350 μl , který byl ponechán minutu působit. Jednotlivé buněčné lyzáty byly poté pomocí automatické pipety sklizeny do mikrozkušavek Safe-Lock, jenž neobsahují ribonukleázy.

Izolace ribonukleové kyseliny (RNA) byla provedena na přístroji QIAcube, viz Obr. 13, do kterého byly předem doplněny pufr RW1, RPE a Rnase-free water, jenž jsou součástí RNeasy Mini Kit, a 70% ethanol. Pro izolaci byl použit protokol Animal tissues and cells-Standard.

Pomocí mikroobjemového UV-Vis spektrofotometru NanoDrop OneC, viz. Obr. 13, byla poté ve vzorcích změřena koncentrace RNA. Do přístroje bylo pomocí automatické pipety nadávkováno vždy 1,5 μl vzorku a změřena absorbance při vlnové délce 260–280 nm. Jako blank byla použita DEPC voda.

Optimální vstupní množství RNA, která byla používána jako templát pro přepis do cDNA, bylo 1–2 μg celkového množství RNA ve vzorku. Do zkumavky o objemu 200 μl byl napipetován objem vzorku RNA, vypočítaný pomocí vzorce (2), a k tomu byla doplněna DEPC voda tak, aby výsledný objem byl 14,2 μl .

$$V = \frac{1000}{c} [\mu\text{l}] \quad (2)$$

Kde:

c – koncentrace RNA ve vzorku v $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ naměřená pomocí mikroobjemového UV-Vis spektrofotometru NanoDrop OneC,

V – objem vzorku RNA, který je potřeba naředit DEPC vodou.

Vedle toho byl z reagensů, které jsou součástí komerčně vyráběného High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu, připraven mastermix v poměru uvedeném v Tab. 9, vždy v dostatečném množství pro všechny vzorky.

Tabulka 9 Příprava mastermixu pro jeden vzorek

Komponenta	Objem jedné reakce [μ l]
10x RT Buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
Celkový objem	5,8

Ke každému vzorku naředěné RNA bylo přidáno 5,8 μ l mastermixu, poté byly vzorky krátce promíchány pomocí vortexu a stočeny na centrifuze Eppendorf Mini-spin při 1200 ot./min po dobu 30 sekund. Reverzní transkripce, během níž se vzorky RNA přepsaly do cDNA, byla provedena v přístroji Termocykler, viz Obr. 14. Teplotní profil reakce je uveden v Tab. 10. Předpokládá se 100% účinnost reverzní transkripce, tudíž koncentrace cDNA se rovná koncentraci RNA vložené do reakce

Tabulka 10 Teplotní profil reverzní transkripce

Krok č.	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba vystavení teplotou [min]
1	37	60
2	95	5
3	4	do vypnutí programu

Jako templát pro qRT-PCR byly použity vzorky cDNA, které byly nejdříve 15 \times naředěny injekční vodou (42 μ l injekční vody + 3 μ l vzorku). Reakční směs byla připravena smícháním TaqMan Universal PCR Master Mixu se sondami PrimePCRTM Probe Assay – Human (IL-6, OCLN, SOD2, TJP1, CYP1A1, FLG2 a housekeeping RPL13A), viz Tab. 3, v poměru 10:1. Pro všechny vzorky bylo dostatečným množstvím smíchání vždy 260 μ l Mastermixu s 26 μ l každé sondy.

Poté byly připraveny jednotlivé vzorky pro qRT-PCR, a to smícháním 5,5 μ l reakční směsi s 4,5 μ l naředěného vzorku cDNA. Vzorky byly pomocí automatické pipety v duplikátech

naávkovány do speciálních stripů o objemu 100 μl a uzavřeny víčkem. Nakonec byly stripy vloženy do přístroje QuantStudio3, kde byly podrobeny qRT-PCR, jejíž teplotní profil je uveden v Tab. 11.

Tabulka 11 Teplotní profil qRT-PCR

Krok	Teplota [°C]	Trvání [s]	Opakování
1	95	1	40x
2	60	20	40x

Relativní exprese mRNA byla následně stanovena metodou delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) podle vzorce (3) a byla vyjádřena v násobcích neovlivněné UV⁺ kontroly (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).

$$R = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (3)$$

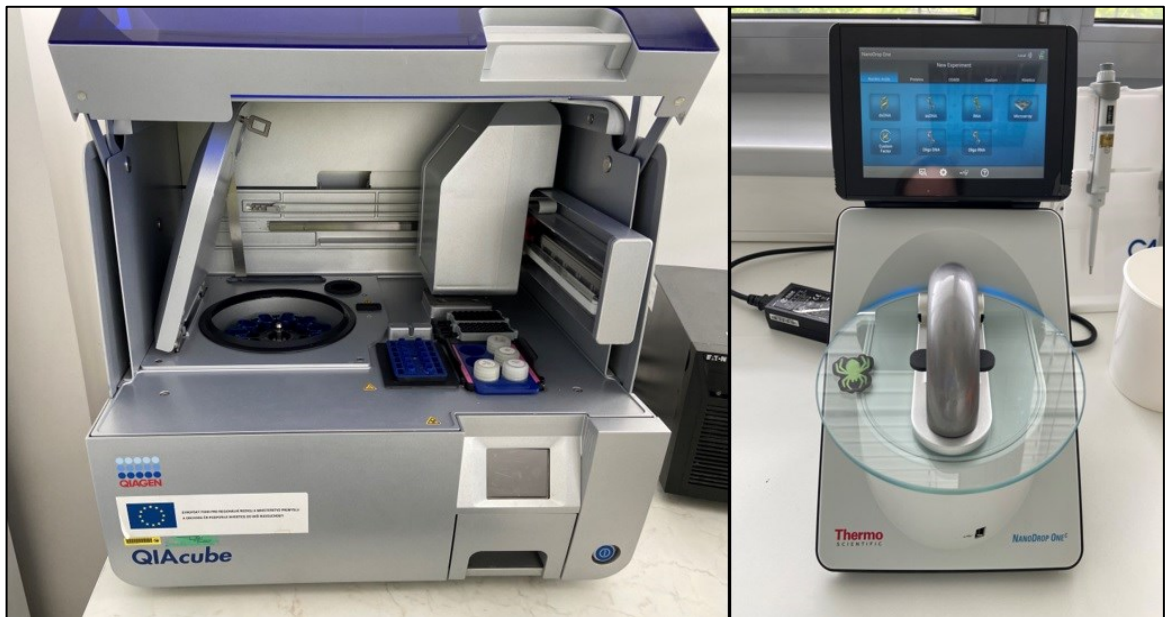
kde:

Ct – počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne prahové hodnoty,

R – (ratio) relativní změna exprese, neboli násobek změny exprese cílového genu mezi kontrolou a cílovým genem,

$\Delta\Delta\text{Ct}$ testovaného vzorku – rozdíl ΔCt testovaného vzorku a ΔCt kontrolního vzorku, jejichž hodnoty byly vypočítány pomocí vzorce (4) [87].

$$\Delta\text{Ct}_{\text{testovaného vzorku}} = \text{Ct}_{\text{cílového genu}} - \text{Ct}_{\text{housekeeping genu}} \quad (4)$$



Obrázek 13 Přístroje využívané pro izolaci RNA a měření její koncentrace ve vzorku (vlevo QIAcube, vpravo spektrofotometr NanoDrop OneC)

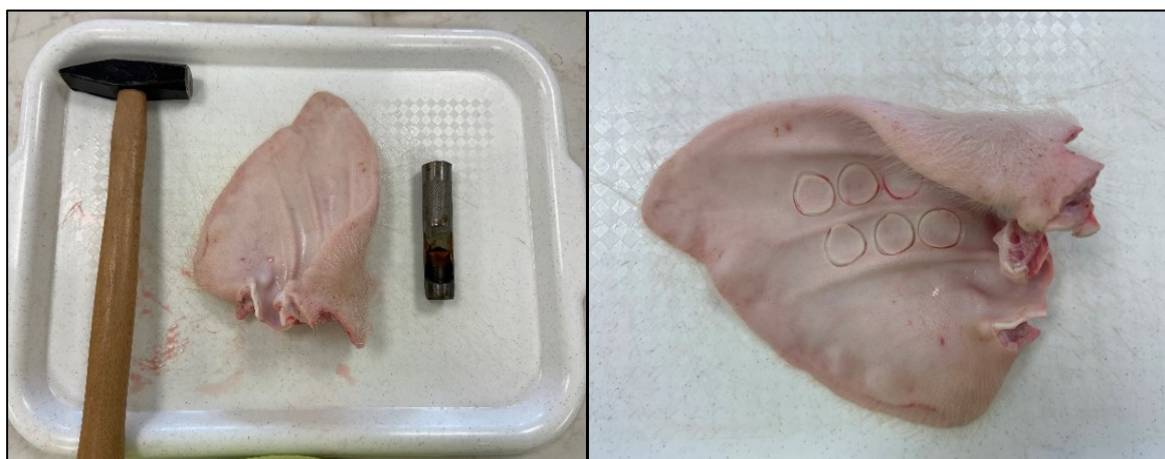


Obrázek 14 Přístroje používané pro reverzní transkripci a qRT-PCR (vlevo termocykler Biometra TOne 96 G, vpravo přístroj QuantStudio 3)

9.5.3 Vliv na expresi genů v prasečí *epidermis*

V prasečí *epidermis* byl pomocí qRT-PCR sledován vliv IAA na expresi genů IL-8, OCLN, SOD2, TJP1, CYP1A1 a FLG2. Jako referenční gen byl použit opět housekeeping gen RPL13A. Testovány byly roztoky IAA o koncentraci 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako kontrola rozpouštědla byl do experimentu zařazen triglycerid kyseliny kaprinové/kaprylové.

Čerstvé prasečí ušní boltce byly zpracovány stejným postupem popsaným v kap. 9.3. Poté se pomocí kovové raznice, kladívka a skalpelu vykrojily disky kůže o průměru 19 mm, viz Obr. 15, které byly inkubovány stejným postupem jako v předchozím experimentu.

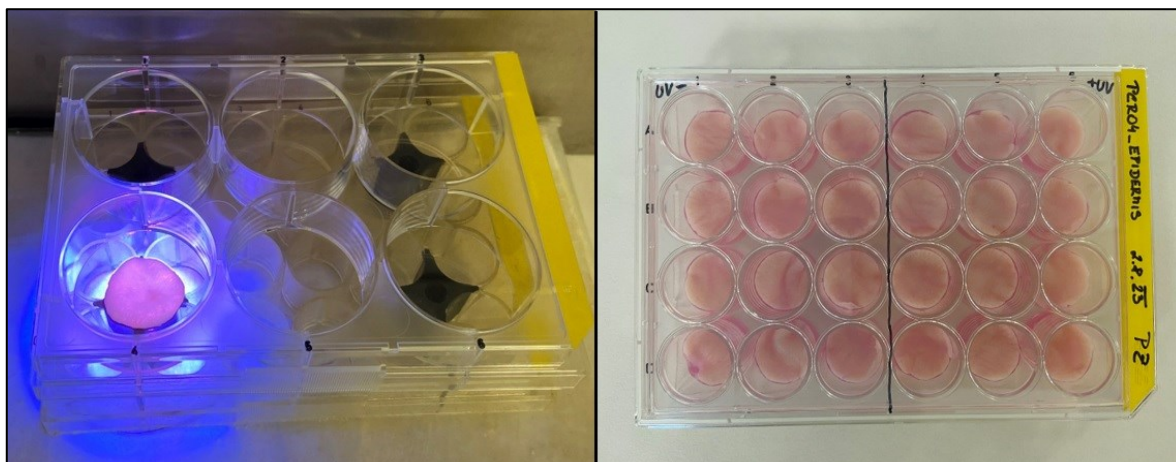


Obrázek 15 Oddělení prasečích kožních explantátů od ušních boltců pomocí kladívka a kovové raznice

Mezitím byl připraven 24jamkový panel s agarem. Do skleněné lahve bylo na předvážkách naváženo 0,25 g agarů a k tomu bylo přidáno 25 ml PBS. Na vodní lázni byl potom tento roztok krátce povařen do rozpuštění agarů. Po mírném zchladnutí bylo v laminárním boxu k roztoku přidáno 25 ml kultivačního media. Po důkladném promíchání byl roztok temperován v inkubátoru na teplotu 37 °C. Následně bylo do každé jamky v 24jamkovém panelu pomocí automatické pipety nadávkováno 0,5 ml tohoto roztoku. Připravené množství roztoku agarů vystačilo celkem na 4 panely, které byly následně skladovány v lednici při 4 °C.

Připravené vzorky prasečí kůže byly v laminárním boxu opláchnuty sterilním PBS a vloženy do 24jamkového panelu. Ještě předtím však byla polovina vzorků v 6jamkovém panelu pomocí UV lampy Oriol a filtrů UG5 a WG280 ozářena UV zářením o dávce 80 mJ/cm^2 UVB, viz Obr. 16. Po proměření skutečného výkonu lampy pomocí přístroje

Photometer/Radiometer PMA2100V s detektorem UVB záření byly jednotlivé vzorky kůže v 6jamkovém panelu bez víčka ozářovány po dobu 1 minuty a 46 sekund.



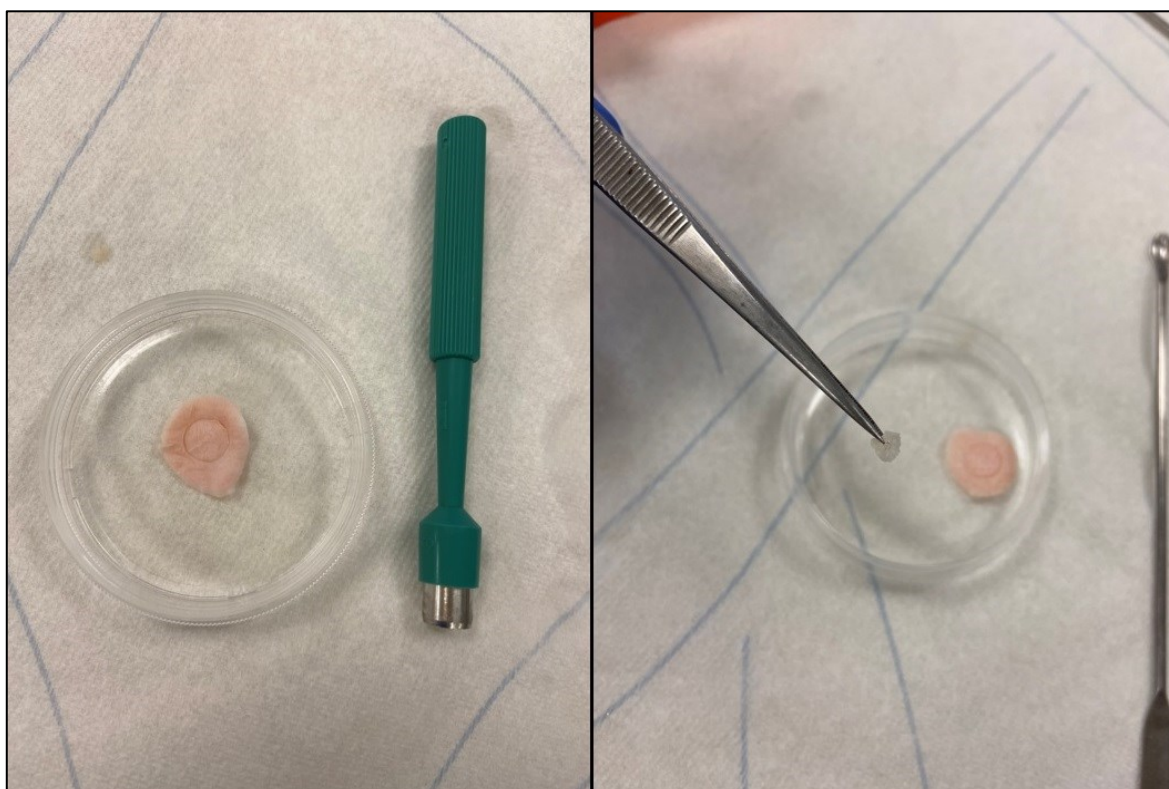
Obrázek 16 Příprava vzorků pro stanovení vlivu IAA na genovou expresi v prasečí *epidermis* (vlevo ozáření vzorku UV zářením, vpravo ovlivněné vzorky v 24jamkovém panelu s agarem)

Na kožní disky umístěné do 24jamkového panelu bylo poté, s výjimkou kontrolních vzorků, v tripletech aplikováno 100 μ l testovaných roztoků, viz Obr. 16. Vzorky byly následně ponechány 24 hodin inkubovat při 37 °C.

Poté byly vzorky opláchnuty PBS a pomocí metody tepelného šoku popsané v kap. 9.3, byla *epidermis* oddělena od *dermis*. K tomu byla použita jednorázová bioptická raznice a pinzeta, viz Obr. 17.

Jednotlivé vzorky *epidermis* byly vloženy do plastové mikrozkušavky Safe-Lock s 500 μ l Tri Reagentu. Ke každému vzorku byla přidána nerezová homogenizační kulička o průměru 3 mm, která byla předem vydezinfikována v 96% ethanolu. Poté byly vzorky ve zkumavkách po dobu 5 minut homogenizovány v přístroji Tissue Lyzer II při frekvenci 25 kHz. Následně byly v laminárním boxu ze zkumavek vyndány homogenizační kuličky a ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l chloroformu, vzorky byly krátce ručně promíchány a poté byly ponechány 3 minuty inkubovat při laboratorní teplotě. Nakonec byly vzorky stočeny pomocí chlazené mikrocentrifugy Prism-R C2500-R při 12 000 ot./min a 4 °C po dobu 25 minut. Díky tomu se vzorky rozdělily na 3 fáze: vrchní vodní fázi obsahující RNA, interfázi obsahující nečistoty, jako např. tuky nebo sacharidy a spodní, organickou fázi s rozpuštěnými proteiny a DNA.

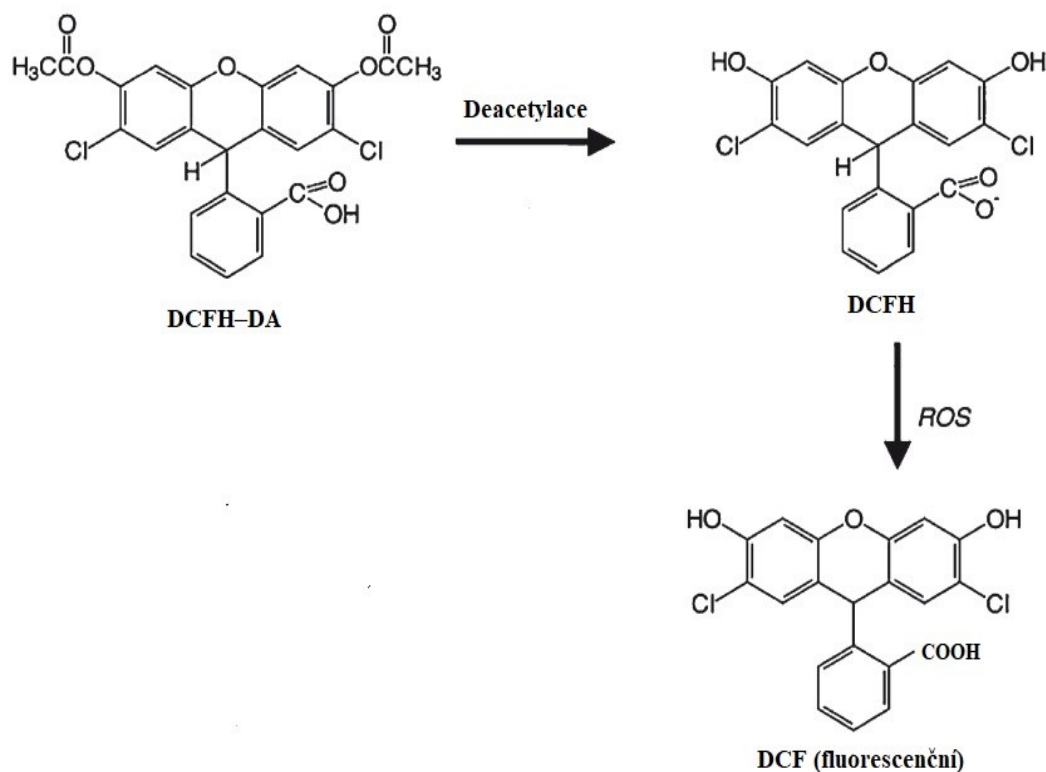
Z vrchní fáze bylo pomocí automatické pipety do čistých mikrozkušavek Safe-Lock odebráno 150 μl vzorku, ze kterých byla poté v přístroji QIAcube vyizolována RNA, stejným způsobem jako u keratinocytů HaCaT. Transkripce RNA do cDNA a následná qRT-PCR za použití sond PrimePCR™ Probe Assay – Pig a TaqMan™ Gene Expression Assay – Pig, viz Tab. 3 a 4, proběhla stejně jako v předchozím experimentu. Relativní exprese vypočítaná podle metody $\Delta\Delta\text{Ct}$ byla vyjádřena v násobcích exprese neovlivněné UV⁺ kontroly (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).



Obrázek 17 Oddělení *epidermis* od *dermis*

9.6 Vliv kyseliny indol-3-octové na tvorbu reaktivních forem kyslíku

K detekci ROS v prasečí *epidermis* cíleně vyvolanými UV zářením bylo použito fluorescenční barvivo DCFH-DA, jenž je lipofilní a snadno prochází pasivní difúzí buněčnou membránou, kde podléhá deacetylaci intracelulárními esterázami. Výsledný 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) reaguje s intracelulárním peroxidem vodíku nebo jinými ROS za vzniku vysoce fluorescenčního 2',7'-dichlorofluoresceinu (DCF) dle reakce, viz Obr. 18, který lze detekovat na fluorescenčním mikroskopu. V rámci tohoto stanovení byl v prasečí *epidermis* na tvorbu ROS testován vliv IAA o koncentraci 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [88].



Obrázek 18 Schéma reakce DCFH-DA vedoucí k fluorescenčnímu DCF, upraveno podle [89]

9.6.1 Používané roztoky

- Roztok 30 μM DCFH-DA

Pro přípravu tohoto roztoku bylo na analytických vahách do plastové zkumavky naváženo 4,9 mg DCFH-DA s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 10 ml DMSO. Výsledný roztok byl následně uchováván mrazícím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zabalený v alobalu. V případě potřeby byl tento roztok rozmražen a 300 μl bylo smícháno s 10 ml sterilního PBS. Roztok bylo po celou dobu práce nutné chránit před světlem.

- Roztok 50% glycerinu

Pro přípravu tohoto roztoku bylo do plastové zkumavky napipetováno 5 ml glycerinu a toto množství bylo pomocí vortexu smícháno s 5 ml destilované vody.

- Testované roztoky IAA o koncentraci 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Pro přípravu roztoku IAA o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl na analytických vahách do plastové zkumavky naváženo 1 mg IAA s přesností na 0,1 mg a rozpuštěn v 10 ml triglyceridu.

Roztok IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven v plastové zkumavce smícháním $300 \mu\text{l}$ roztoku IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s $2700 \mu\text{l}$ triglyceridu.

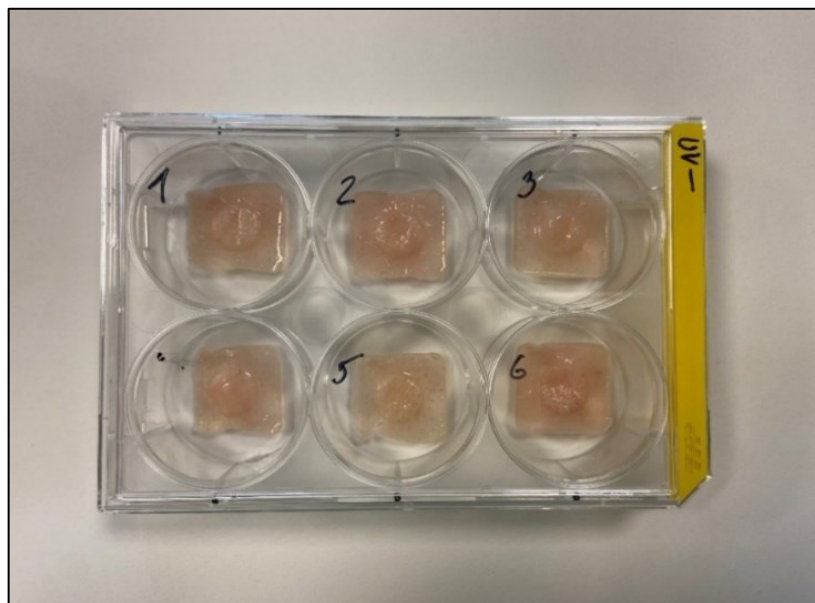
9.6.2 Pracovní postup

Osm kusů kožních explantátů o rozměru $2\times 2 \text{ cm}$ z prasečích ušních boltců bylo připraveno stejným postupem uvedeným v kap. 9.3. Vzorky byly poté umístěny do Franzových cel, do jejichž akceptorového prostoru bylo předem napipetováno $320 \mu\text{l}$ kultivačního media pro keratinocyty HaCaT. Na povrch vzorků do donorového prostoru cel bylo aplikováno v duplikátech vždy $500 \mu\text{l}$ testovaného vzorku IAA. Ke kontrolním vzorkům (UV^- a UV^+) bylo přidáno $500 \mu\text{l}$ triglyceridu kyseliny kaprinové/kaprylové.

Vzorky byly poté inkubovány ve vlhké komůrce po dobu 18 hodin při 37°C . Následně byly testované roztoky z donorového prostoru odstraněny, kůže byly opláchnuty sterilním PBS a do donorového prostoru Franzových cel bylo přidáno $500 \mu\text{l}$ roztoku $30 \mu\text{M}$ DCFH-DA. Vzorky byly poté ponechány 30 minut inkubovat při 37°C .

Po uplynutí této doby byly vzorky z cel vyjmuty, opláchnuty ve sterilním PBS, mírně osušeny netkanou textilií a umístěny do 6jamkových panelů, viz Obr. 19, a ponechány 1 hodinu schnout za laboratorní teploty. Šest z celkových osmi kusů vzorků bylo následně ozářeno UV zářením o dávce $80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ UVB pomocí UV lampy Oriol s filtry UG5 a WG280 stejným způsobem, jenž byl popsán v kap. 9.4.3. Vynechány byly 2 kusy vzorků, které byly ovlivněny pouze triglyceridem a tyto vzorky byly ponechány jako UV^- kontrola. Po ozáření byly vzorky opět přeneseny do 6jamkového panelu a ponechány ještě 10 minut inkubovat při 37°C .

Epidermis byla poté oddělena od *dermis* metodou tepelného šoku popsaným výše. Z jednotlivých vzorků *epidermis* byly připraveny preparáty v 50% glycerolu tak, aby *stratum corneum* přiléhalo k podložnímu sklíčku. Preparáty byly poté pozorovány pod inverzním fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse Ti2 E, viz Obr. 20, za použití objektivu se zvětšením $100\times$.



Obrázek 19 Vzorky ovlivněných prasečích kožních explantátů po vyndání z Franzových difúzních cel

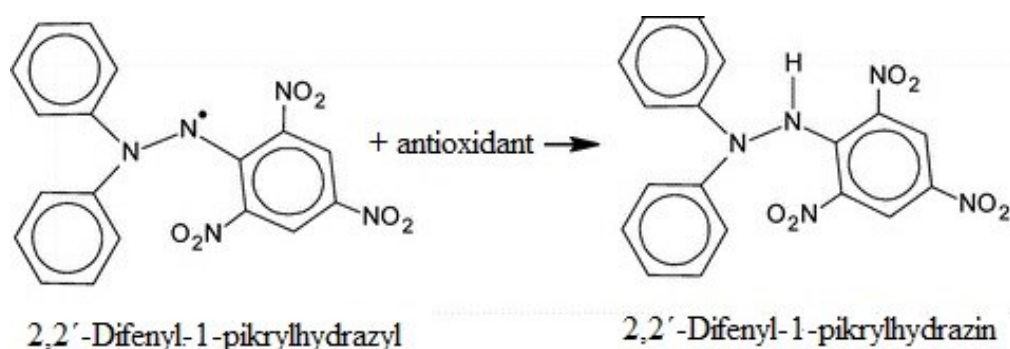


Obrázek 20 Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti2 E

9.7 Stanovení antioxidační aktivity kyseliny indol-3-octové pomocí 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu

Jednou ze základních metodik pro posouzení antioxidační kapacity čistých látek i různých směsných vzorků je považována metoda využívající DPPH. Jedná se o stabilní radikál se silným fialovým zbarvením a maximem absorpance kolem 515–520 nm. Při reakci s antioxidantem přijímá DPPH atom vodíku nebo elektron a dochází k redukci radikálu za vzniku 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazinu (DPPH-H) dle reakce viz Obr. 21, přičemž DPPH-H má žluté zbarvení. Čím silnější má látka antioxidační účinky, tím více molekul

DPPH je redukováno a odbarvení roztoku je intenzivnější. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Antioxidační kapacita testovaných látek může být vyjádřena např. v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Trolox (chemicky kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová), což je analog vitamínu E a silný antioxidant [90]. V rámci tohoto stanovení byla testována antioxidační aktivita roztoků IAA v rozmezí 57–11400 μM a porovnáována s roztoky Troloxu v rozmezí 6,25–400 μM .



Obrázek 21 Reakce DPPH s antioxidantem za vzniku redukovaného DPPH-H, upraveno podle [91]

9.7.1 Používané roztoky

- Roztok DPPH o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Pro přípravu tohoto roztoku bylo na analytických vahách do odměrné baňky o objemu 50 ml naváženo 5 mg DPPH s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo doplněno 96% ethanolem po rysku. Do baňky bylo vloženo magnetické míchadlo a baňka byla uzavřena zátkou. Roztok byl ponechán míchat na magnetické míchačce po dobu 2 hodin při 150 ot./min zabalený v alobalu. Výsledný roztok byl určen k okamžité spotřebě a bylo nutné jej chránit před světlem.

- Kalibrační řada Troloxu

Zásobní roztok 400 μM Troloxu byl připraven v odměrné baňce o objemu 25 ml, do které bylo na analytických vahách naváženo 2,5 mg Troloxu s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo doplněno 96% ethanolem po rysku. Do baňky bylo vloženo magnetické míchadlo a baňka byla uzavřena zátkou. Roztok byl ponechán míchat na magnetickém míchadle po dobu 30 minut do úplného rozpuštění. Kalibrační řada Troloxu byla připravena dvojkovým ředěním. V plastové mikrozkuhavce bylo vždy smícháno 500 μl koncentrovanějšího roztoku Troloxu s 500 μl 96% ethanolu. Tímto způsobem byly připraveny roztoky 6,25;

12,5; 25; 50; 100 a 200 μM Troloxu. Pro důkladnou homogenizaci byly všechny roztoky krátce promíchány pomocí vortexu.

- Testované roztoky IAA

Pro přípravu roztoku 11400 μM IAA byly do plastové mikrozkušavky na analytických vahách naváženy 2 mg IAA s přesností na 0,1 mg a toto množství bylo pomocí vortexu rozpuštěno v 1 ml 96% ethanolu. Další roztoky byly připraveny v plastové mikrozkušavce smícháním koncentrovanějšího roztoku IAA s 96% ethanolu dle Tab. 12.

Tabulka 12 Příprava koncentrační řady roztoků IAA

Připravovaný roztok	Množství ředěného roztoku	Objem 96% ethanolu k naředění [μl]
5700 μM IAA	500 μl 11400 μM IAA	500
2850 μM IAA	500 μl 5700 μM IAA	500
1140 μM IAA	400 μl 2850 μM IAA	600
570 μM IAA	500 μl 1140 μM IAA	500
285 μM IAA	500 μl 570 μM IAA	500
142,5 μM IAA	500 μl 285 μM IAA	500
57 μM IAA	400 μl 142,5 μM IAA	600

9.7.2 Pracovní postup

Do 96jambkového panelu bylo pomocí automatické pipety v tripletech nadávkováno 100 μl všech roztoků kalibrační řady Troloxu a všech testovaných roztoků IAA. Jako blank byl použit 96% ethanol. Na multifunkčním readeru EnSight byla následně proměřena absorbance roztoků bez přídavku DPPH při vlnové délce 517 nm. Poté bylo do všech jamek s roztoky pomocí multikanálové pipety přidáno 100 μl roztoku DPPH a po 15 minutách od přídavku DPPH byla opět proměřena absorbance při stejné vlnové délce. Z naměřených hodnot absorbancí kalibrační řady Troloxu byla sestrojena kalibrační přímka, z jejíž rovnice byla vypočítána antioxidační aktivita IAA v ekvivalentním množství Troloxu (průměr alespoň ze 3 opakování \pm SEM).

10 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Veškerá naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, USA). Všechny výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm SEM.

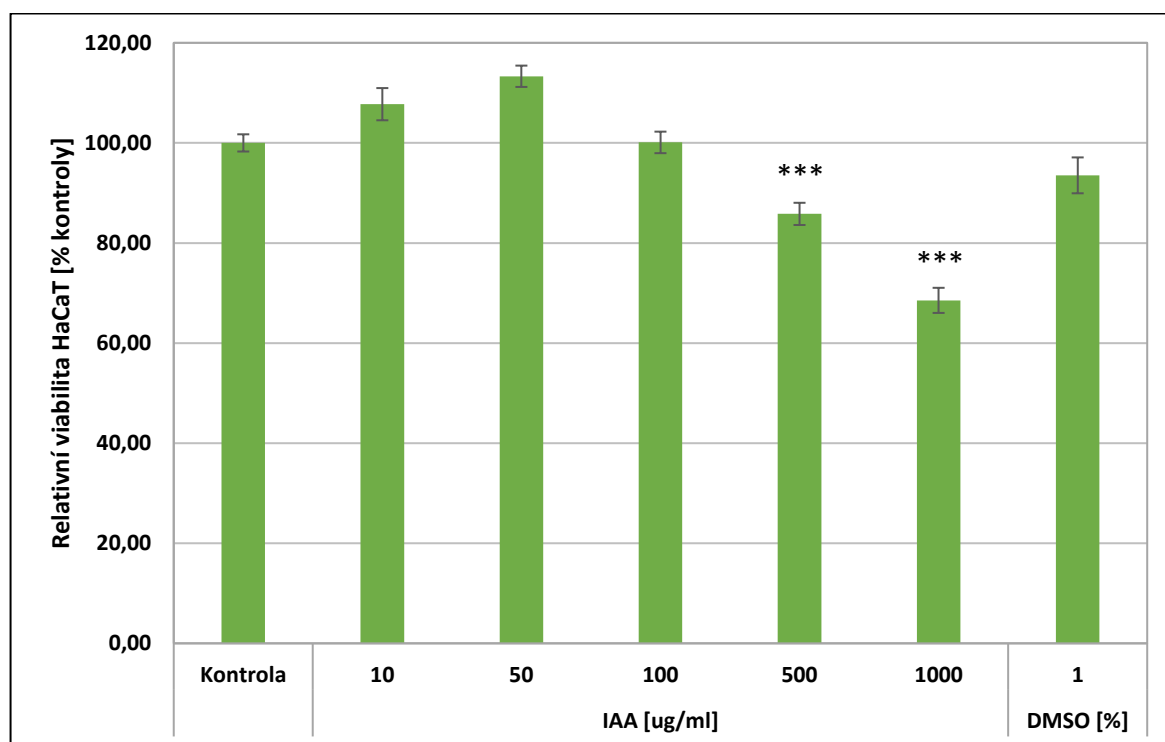
Pro porovnání sledovaných parametrů s kontrolou byl používán oboustranný párový t-test. Rozdíly byly považovány za statisticky významné na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a v grafech byly označeny: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Všechny experimenty zahrnovaly minimálně tři nezávislá opakování.

11 VÝSLEDKY A DISKUZE

11.1 Vliv kyseliny indol-3-octové na viabilitu buněk

Tato diplomová práce se zabývala vlivem IAA na kůži se zaměřením na produkci složek kožní bariéry a antioxidantních enzymů za využití *in vitro* metod. Jako jeden z experimentálních modelů byla zvolena buněčná linie lidských keratinocytů HaCaT. Keratinocyty jsou základní složkou *epidermis* a její rohová vrstva – *stratum corneum* je z hlediska bariérové funkce klíčová.

Nejprve bylo nutné nalézt koncentraci IAA, která nebude ovlivňovat viabilitu těchto buněk a bude vhodná pro další používání. Vzhledem k tomu, že se aminokyselina tryptofan a jeho mikrobiální metabolity včetně IAA běžně nacházejí v kůži (vlivem rozkladu keratinu a odumřelých keratinocytů), nebyl zde předpoklad, že by IAA měla být pro keratinocyty HaCaT silně cytotoxická. V současnosti však neexistuje studie, která by se zabývala přesným množstvím IAA v kůži běžné populace. V rámci stanovení vlivu IAA na viabilitu keratinocytů HaCaT pomocí MTT byly testovány roztoky IAA v rozmezí koncentrací 10–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a také rozpouštědlo 1% DMSO.

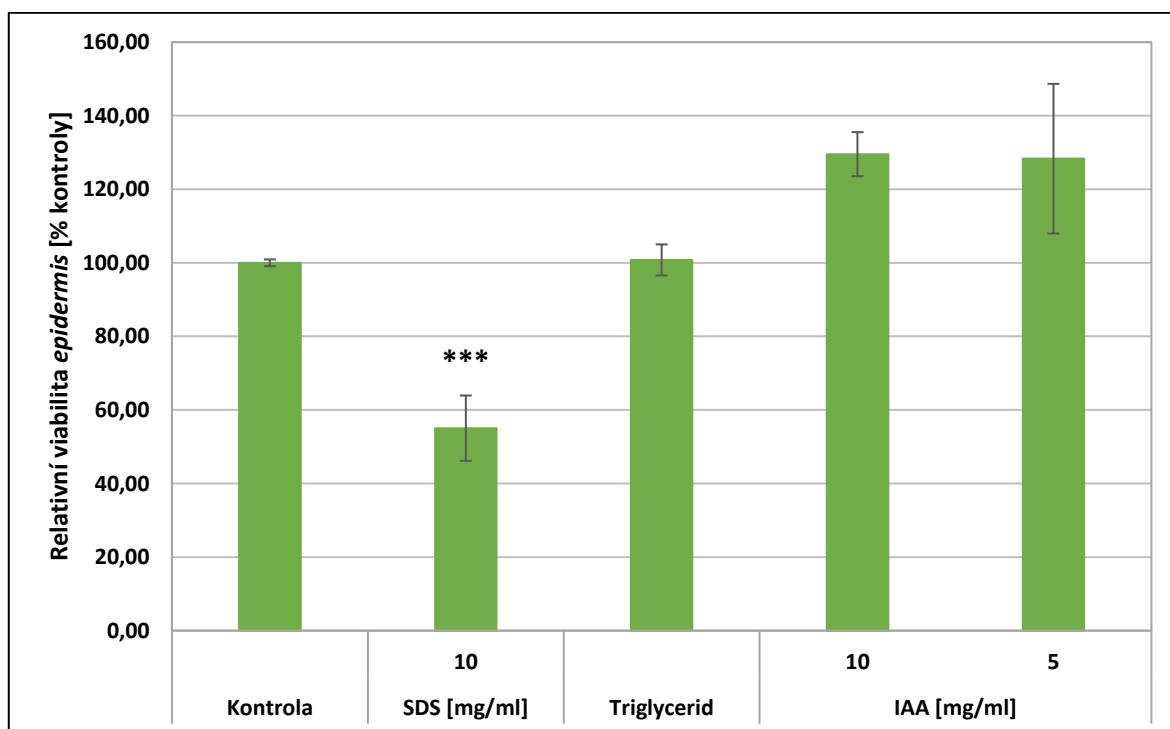


Obrázek 22 Vliv IAA na viabilitu keratinocytů HaCaT vyjádřený v procentech kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Výsledky zobrazené v sloupcovém grafu na Obr. 22 ukazují, že oproti kontrole se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně snížila viabilita keratinocytů HaCaT až u koncentrací roztoků IAA 500 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($p < 0,001$). V případě koncentrace IAA 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se viabilita keratinocytů HaCaT oproti kontrole snížila o 15 % a v případě koncentrace 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ o 32 %. Ostatní testované koncentrace IAA 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ však pokles viability buněk nezpůsobily a jsou zcela na úrovni s kontrolou (100 % nebo dokonce více). Rozpouštědlo DMSO o koncentraci 1 % na viabilitu keratinocytů HaCaT rovněž nemělo statisticky významný vliv.

Jako další experimentální model byla používána prasečí *epidermis* získaná z kůže prasečích ušních boltců. I u tohoto experimentálního modelu byl nejdříve ověřen vliv IAA na viabilitu pomocí MTT. Sledován byl vliv IAA o koncentraci 5 a 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok SDS o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Povrchově aktivní látka SDS je totiž ve studiích často využívána jako modelová látka pro podráždění kůže nebo navození zánětu.

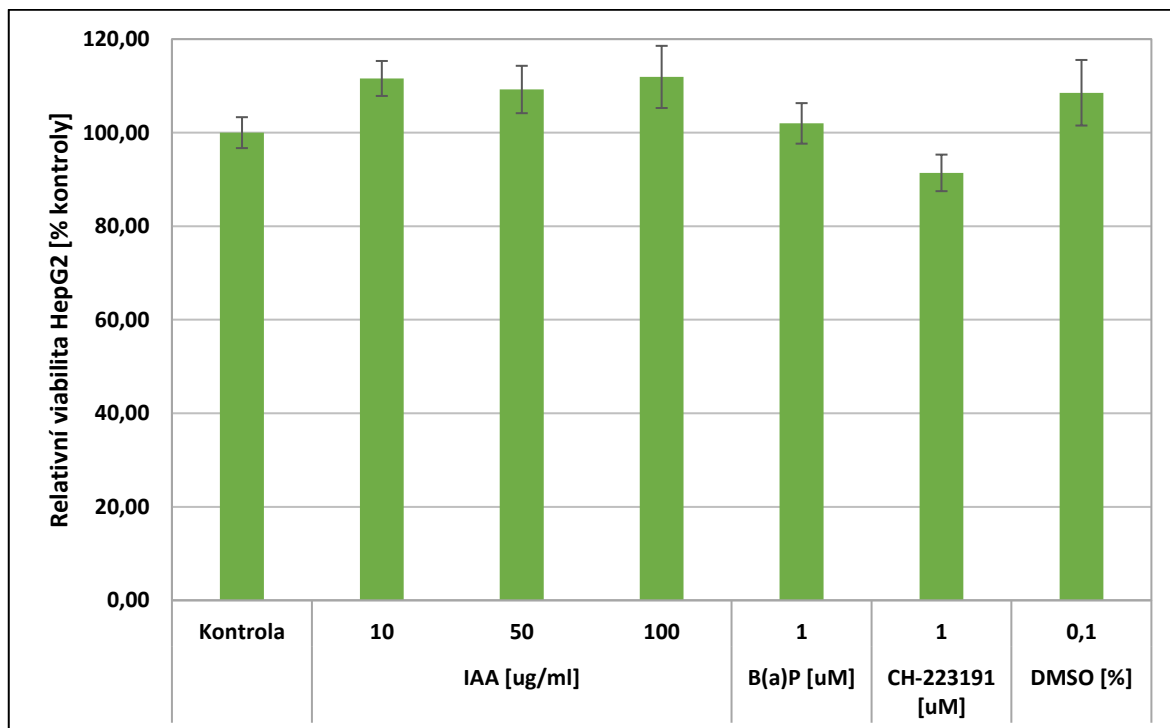
Výsledky jsou znázorněny na Obr. 23. Z grafu je patrné, že SDS skutečně významně snížil viabilitu *epidermis* ($p < 0,001$), a to téměř polovinu (o 45 %). I během samotné práce byla manipulace se vzorky *epidermis* ovlivněnými právě SDS obtížná, jednotlivé vzorky byly oproti ostatním výrazně tenčí a špatně se oddělovaly od *dermis*. Roztoky IAA však snížení viability *epidermis* ani v jedné z testovaných koncentrací nezpůsobily, naopak viabilitu *epidermis* mírně podpořily. V případě roztoku IAA o koncentraci 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vycházela relativní viabilita buněk v procentech kontroly 128 % a v případě roztoku IAA 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla výsledná hodnota 130 %. Ovlivnění *epidermis* samotným rozpouštědlem triglyceridem nemělo na viabilitu buněk žádný vliv vzhledem k výsledku 101 %, který je téměř totožný s kontrolou.



Obrázek 23 Vliv IAA na viabilitu prasečí *epidermis* vyjádřený v procentech kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Jako poslední experimentální model, na kterém byl sledován vliv IAA, byla používána buněčná linie lidského hepatomu HepG2–Lucia™ AhR. Tato linie byla zvolena z důvodu sledování vlivu IAA na aktivaci AhR v závislosti na její koncentraci. Testovány byly roztoky IAA v rozmezí $10\text{--}100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro porovnání byl testován i roztok známého agonisty AhR B(a)P v koncentraci $1\ \mu\text{M}$ a oproti tomu i silného antagonisty CH–223191, taktéž v koncentraci $1\ \mu\text{M}$. Jako poslední bylo testováno rozpouštědlo 0,1% DMSO.

I u tohoto experimentálního modelu byl ověřen vliv IAA a dalších testovaných látek na viabilitu pomocí MTT, jehož výsledky jsou zobrazeny na Obr. 24. Z grafu je patrné, že ani jeden z testovaných roztoků statisticky významně viabilitu buněk HepG2 nesnížil. Viabilita buněk ovlivněných všemi testovanými koncentracemi IAA byla procentuálně mírně vyšší, než kontrola. Konkrétně viabilita buněk ovlivněných IAA o koncentraci $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovala hodnotu 112 % kontroly, IAA o koncentraci $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 110 % kontroly a IAA o koncentraci $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazovala hodnotu 112 % kontroly. Nejvyšší pokles viability byl zaznamenán u roztoku inhibitoru AhR $1\ \mu\text{M}$ CH–223191, a to o necelých 9 % ve srovnání s kontrolou, avšak na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ tento pokles nebyl statisticky významný.



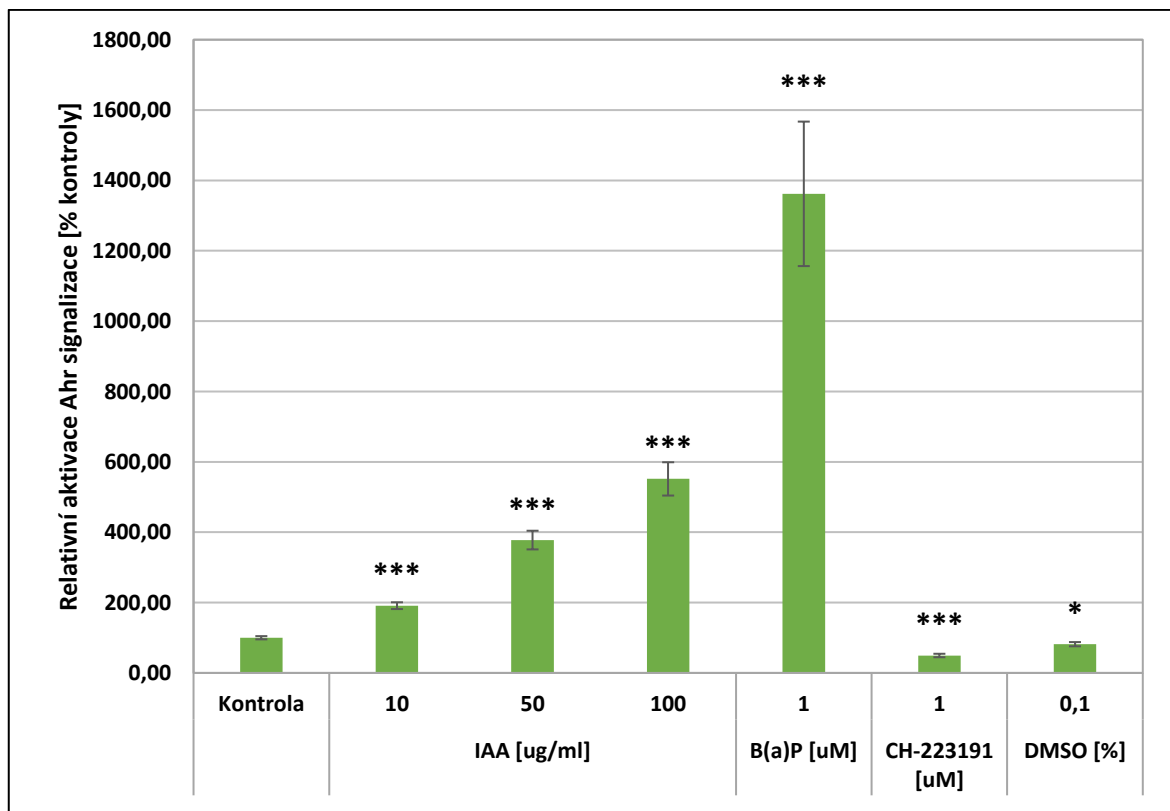
Obrázek 24 Vliv IAA na viabilitu buněčné linie HepG2 vyjádřený v procentech kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

11.2 Vliv kyseliny indol-3-octové na aktivaci aryl hydrokarbonového receptoru

Během testu viability byla na buněčné linii HepG2 v supernatantu buněk 24 hodin po ovlivnění měřena aktivita AhR. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 25. Nejvyšší aktivita AhR byla detekována u skupiny buněk ovlivněných roztokem B(a)P, což však bylo očekáváno, neboť jak již bylo řečeno, B(a)P je známým a silným ligandem AhR. Aktivita AhR se vlivem B(a)P oproti kontrole zvýšila o 1262 %. Naopak pokles aktivity AhR byl taktéž očekávaně zaznamenán u inhibitoru a antagonisty AhR CH-223191, kdy aktivita AhR vlivem tohoto inhibitoru poklesla ve srovnání s kontrolou o více než 50 %.

V literatuře [51] jsou tryptofan a jeho metabolity popisovány spíše jako ligandy AhR, které způsobují v porovnání s polutanty životního prostředí (jako je právě B(a)P nebo TCDD) slabou aktivaci AhR, přesto je uvedeno mnoho zajímavých účinků, které souvisí právě s aktivací signalizace AhR. V tomto testu byl měřen vliv IAA na aktivaci AhR v rozmezí koncentrací 10–100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Všechny testované roztoky IAA způsobily statisticky významné zvýšení aktivity AhR ($p < 0,001$). Konkrétní hodnota relativní aktivity AhR signalizace je u roztoku IAA o koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 191 % kontroly, u roztoku IAA

o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je to 378 % kontroly a u roztoku IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je to 552 % kontroly. Poznatky uvedené v odborné literatuře [7, 51], že IAA je ligandem AhR, byly potvrzeny i v rámci tohoto stanovení. Samotné rozpouštědlo DMSO o koncentraci 0,1 % způsobilo statisticky významný pokles aktivace AhR ($p < 0,05$) o necelých 19 % oproti kontrole.



Obrázek 25 Kvantifikace relativní aktivace AhR v supernatantech buněk HepG2 odebraných 24 hodin po ovlivnění vyjádřená v procentech kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

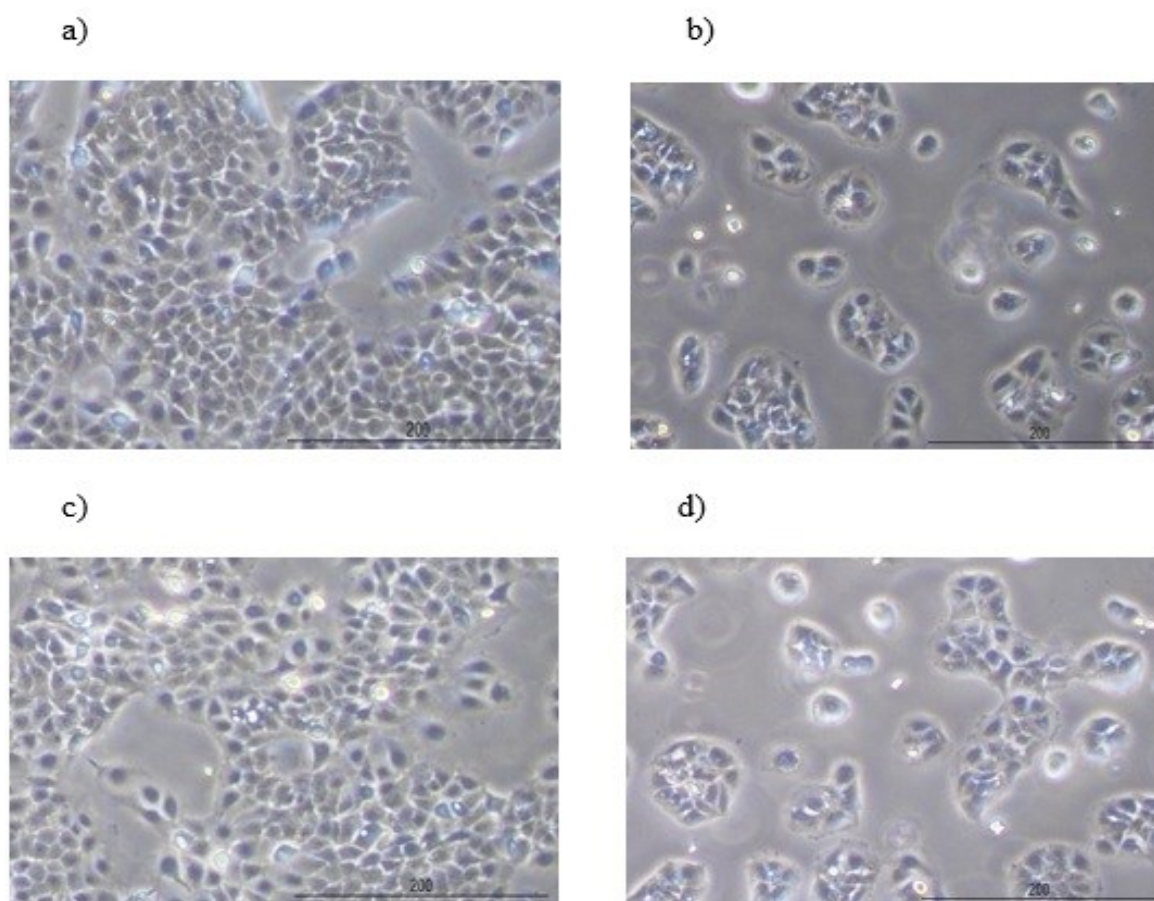
11.3 Vliv kyseliny indol-3-octové na expresi vybraných genů

Stěžejní částí diplomové práce bylo sledování vlivu IAA na expresi genů kódujících proteiny podílející se na správném fungování kožní bariéry a expresi antioxidantních enzymů metodou qRT-PCR. Testy byly prováděny na dvou experimentálních modelech – buněčné linii lidských keratinocytů HaCaT a prasečí *epidermis*. Polovina vzorků byla vždy za cílem navození zánětlivých stavů a oxidačního stresu vystavena UV záření.

11.3.1 Vliv na genovou expresi v keratinocytech HaCaT

Pomocí qRT-PCR byla v keratinocytech HaCaT ovlivněných IAA sledována změna genové exprese u genů IL-6, FLG2, OCLN, TJP1, SOD2 a CYP1A1 v porovnání s kontrolními vzorky. Jako referenční gen byl použitý housekeeping gen RPL13A.

Ilustrační snímky buněčné monovrstvy pořízené 24 hodin po ozáření UV zářením a aplikaci testovaných látek jsou shrnuty v Obr. 26 a je evidentní, že oproti buňkám, které ozářeny nebyly, bylo množství ozářených buněk daleko menší. Mezi kontrolními vzorky a vzorky buněk ovlivněnými roztokem IAA naopak nebyl výrazný rozdíl v celkovém množství.



Obrázek 26 Mikroskopické snímky keratinocytů HaCaT během metody qRT-PCR 24 hodin po ovlivnění a ozáření buněk UV zářením; a) UV⁻ kontrola, b) UV⁺ kontrola, c) UV⁻ IAA, d) UV⁺ IAA (zvětšení 10×)

Interleukin 6 je jeden z prozánětlivých markerů. V tomto případě byla zánětlivá reakce v buňkách vyvolána UV zářením. Předpokladem bylo, že by IAA mohla působit protizánětlivě a hladiny IL-6 v keratinocytech snižovat, což bylo popsáno i v několika studiích [70–71]. V tomto experimentu byla hodnota genové exprese prozánětlivého

markeru IL-6 vztažena vůči UV⁺ kontrole (hodnota 1), viz Obr. 27. Naopak exprese IL-6 v neozářených buňkách byla oproti ozářené kontrole byla výrazně nižší (0,22), což potvrdilo funkčnost modelu. U buněk ozářených UV zářením a ovlivněných IAA pak byla hodnota genové exprese IL-6 o téměř polovinu nižší (0,56) než u kontrolního ozářeného vzorku, takže IAA v keratinocytech zmírnila prozánětlivou reakci vyvolanou UV zářením a tento výsledek byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Jako další byla sledována změna genové exprese FLG2, viz Obr. 27. Filaggrin je nezbytným proteinem podílejícím se na vzniku kožní bariéry a epidermální diferenciaci keratinocytů, viz kap. 1. Snížené hladiny filaggrinu v *epidermis* jsou popisovány během některých chronických či zánětlivých kožních onemocnění spojených s narušenou bariérovou funkcí kůže, jako je např. atopická dermatitida [92]. Zatímco UV záření nemělo významný vliv na hladinu exprese FLG2, IAA vyvolala statisticky významný nárůst exprese FLG2 jak u neozářených buněk (2krát; $p < 0,01$), tak i buněk ozářených UV zářením (1,7krát; $p < 0,01$). Stejný efekt v keratinocytech je popsán v odborné literatuře v souvislosti s aktivací AhR receptoru [63, 92]. S ohledem na výsledky v literatuře a také průkaz aktivace AhR signalizace v HepG2 po inkubaci s IAA, lze uvažovat, že IAA zvyšuje expresi FLG2 právě tímto způsobem prostřednictvím AhR receptoru. Podporou exprese FLG2 by IAA mohla přispívat ke správné bariérové funkci kůže.

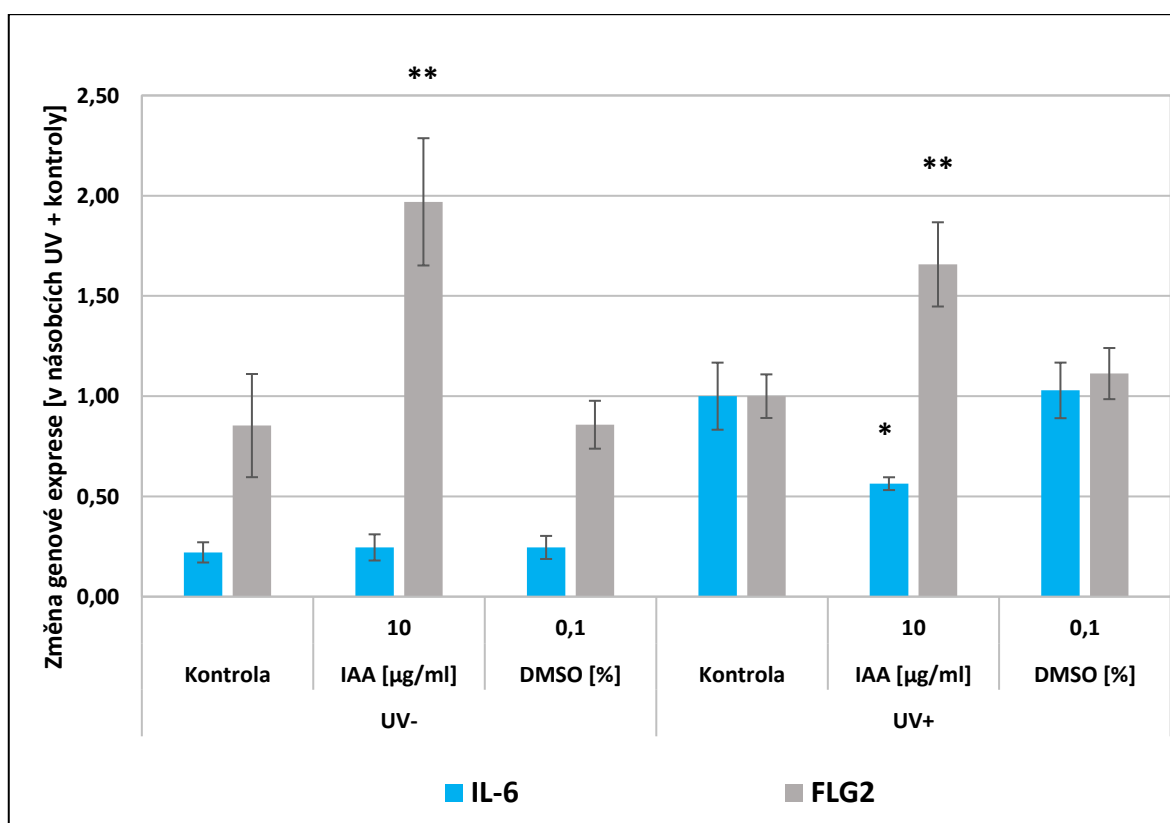
Další proteiny podílející se na správné funkci kožní bariéry jsou OCLN a TJP1. Ty jsou součástí těsných buněčných spojů v *epidermis* a jsou nezbytné pro její integritu a zajištění správné paracelulární permeability [12–19]. V případě keratinocytů neozářených UV zářením, viz Obr. 28, se exprese genů proteinů těsných spojů po inkubaci s IAA významně zvýšila. U OCLN to bylo 1,7krát a u TJP1 to bylo 1,8krát. Oba výsledky jsou statisticky významné ($p < 0,05$). Podobné účinky byly v souvislosti s IAA popsány i v buňkách střevního epitelu, kde tryptofan a jeho metabolity zvýšením exprese proteinů pro těsné buněčné spojení posilovaly střevní bariéru, její integritu a odolnost vůči různým patogenům [71]. Zdá se tedy, že by IAA posílením těsných buněčných spojů v *epidermis*, mohla obdobným způsobem podpořit bariérovou funkci i v kůži.

Jako další byla sledována exprese antioxidantního enzymu SOD2, viz Obr. 28, která se vlivem IAA rovněž statisticky významně zvýšila ($p < 0,05$), a to 1,5krát oproti kontrole. To je ostatně v souladu i se studií, která se zabývá ochranným účinkem IAA proti ROS

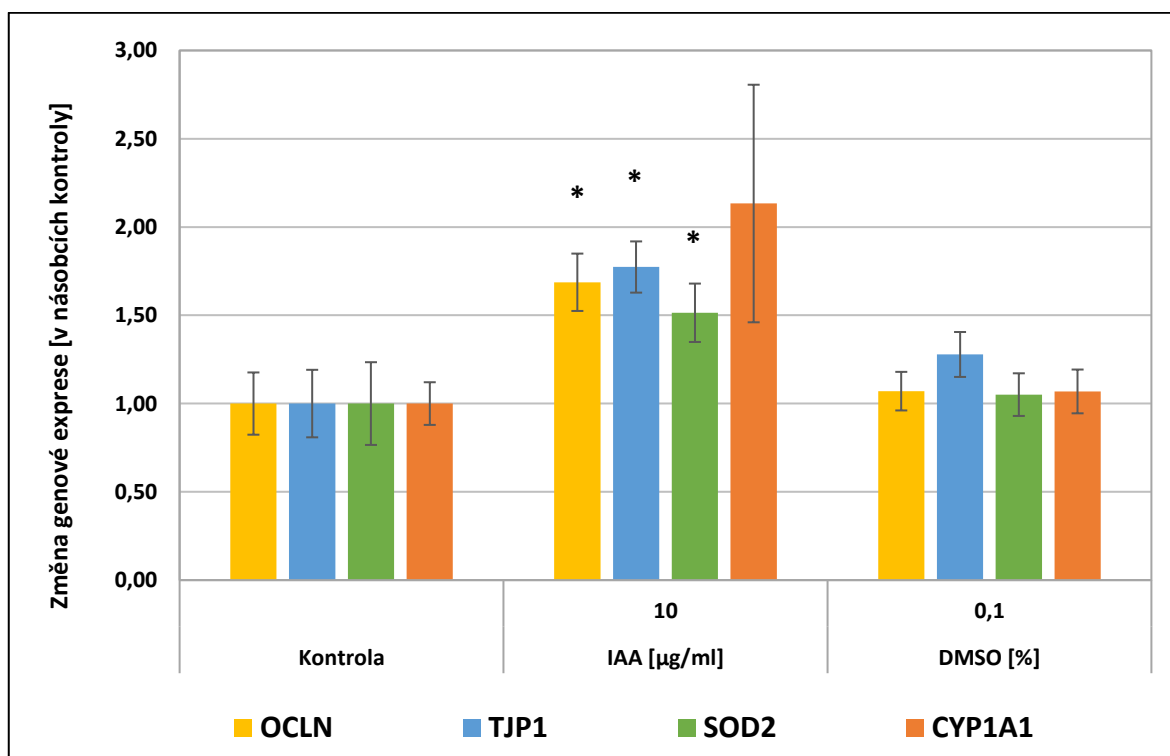
v kmenových buňkách lidské zubní dřevě, kde IAA zvyšovala expresi NRF2 a jemu podřízených genů SOD2 nebo HMOX1 [70].

Keratinocyty obecně exprimují AhR ve vysoké míře. Během qRT-PCR byla proto také sledována změna genové exprese u CYP1A1, jenž je indukován prostřednictvím kanonické signální dráhy AhR, ať už během metabolismu různých xenobiotik, nebo i vlivem různých fyziologických ligandů, jako je právě IAA, což již bylo v rámci této diplomové práce ostatně potvrzeno při metodě prováděné na buněčné linii HepG2. Z výsledků qRT-PCR vyplývá, že vlivem IAA se exprese CYP1A1 zvýšila více než dvojnásobně (2,1krát), což bylo pravděpodobně právě způsobené aktivací AhR.

Rozpuštědlo 0,1% DMSO expresi všech těchto sledovaných genů statisticky významně neovlivnilo – jejich exprese měla podobné hodnoty jako kontrolní vzorky.



Obrázek 27 Vliv IAA na expresi IL-6 a FLG2 v keratinocytech HaCaT ozářených i neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích UV⁺ kontroly (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)



Obrázek 28 Vliv IAA na expresi OCLN, TJP1, SOD2 a CYP1A1 v keratinocytech HaCaT neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

11.3.2 Vliv na genovou expresi v prasečí *epidermis*

Jako další experimentální model pro sledování vlivu IAA na genovou expresi byla použita prasečí *epidermis*, ve které byla v porovnání s kontrolními vzorky sledována změna genové exprese vlivem IAA u genů IL-8, FLG2, OCLN, TJP1, SOD2 a CYP1A1. Jako housekeeping byl opět použit RPL13A.

Ultrafialové záření vyvolalo v *epidermis* téměř dvojnásobnou expresi prozánětlivého markeru IL-8, viz Obr.29, ve srovnání s neozářenou kontrolou, což značí, že stejně jako u keratinocytů, i v *epidermis* byla vlivem UV záření navozena zánětlivá reakce. Kyselina indol-3-octová však prokázala schopnost snížit tuto expresi o polovinu (0,52 v případě $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 0,44 v případě $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ IAA), což jsou hodnoty na úrovni neozářené kontroly (0,53). Oba výsledky byly statisticky významné ($p < 0,01$). Zajímavé je, že IAA snížila i expresi IL-8 v *epidermis* nevystavené UV zářením. U IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se genová exprese IL-8 snížila oproti UV kontrole téměř o polovinu (z 0,53 násobku exprese na 0,29). V případě vyšší testované koncentrace byla tato hodnota ještě nižší (z 0,53 násobku exprese na 0,23). I v tomto případě byly oba výsledky statisticky významné ($p < 0,01$).

Podobné protizánětlivé účinky IAA byly během stejné metody prokázány i u keratinocytů HaCaT a jsou v souladu i s některými odbornými studii zabývajícími se protizánětlivými účinky IAA [70–71].

V případě genové exprese FLG2, viz Obr. 29, byl patrný pokles u UV ozářené *epidermis*. Avšak aplikace IAA vedla jak u ozářených, tak i u neozářených vzorků *epidermis* k významnému nárůstu exprese tohoto genu, což odpovídá jak výsledkům na keratinocytech, tak i výsledkům dalších studií [63, 92], které jsou diskutovány v souvislosti s aktivací AhR. Konkrétně u neozářené *epidermis* byla hladina genové exprese u kontroly 2,12krát vyšší než u UV ozářené kontroly. Vlivem IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se navíc tato hodnota více než dvojnásobně zvýšila (tedy na 4,35krát) a vlivem IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se tato hodnota zvýšila dokonce na 5,36krát. Oba výsledky byly statisticky významné ($p < 0,05$). U ozářených vzorků se genová exprese FLG2 vlivem IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oproti UV⁺ kontrole zvýšila 1,6krát a v případě IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ téměř dvojnásobně (1,9krát), což téměř vrátilo expresi na hladinu neozářené kontroly. Tento výsledek byl statisticky potvrzen jako významný ($p < 0,05$). Získané výsledky naznačují, že IAA má potenciál výrazně zlepšit bariérovou funkci jak u nenarušené, tak i u podrážděné pokožky.

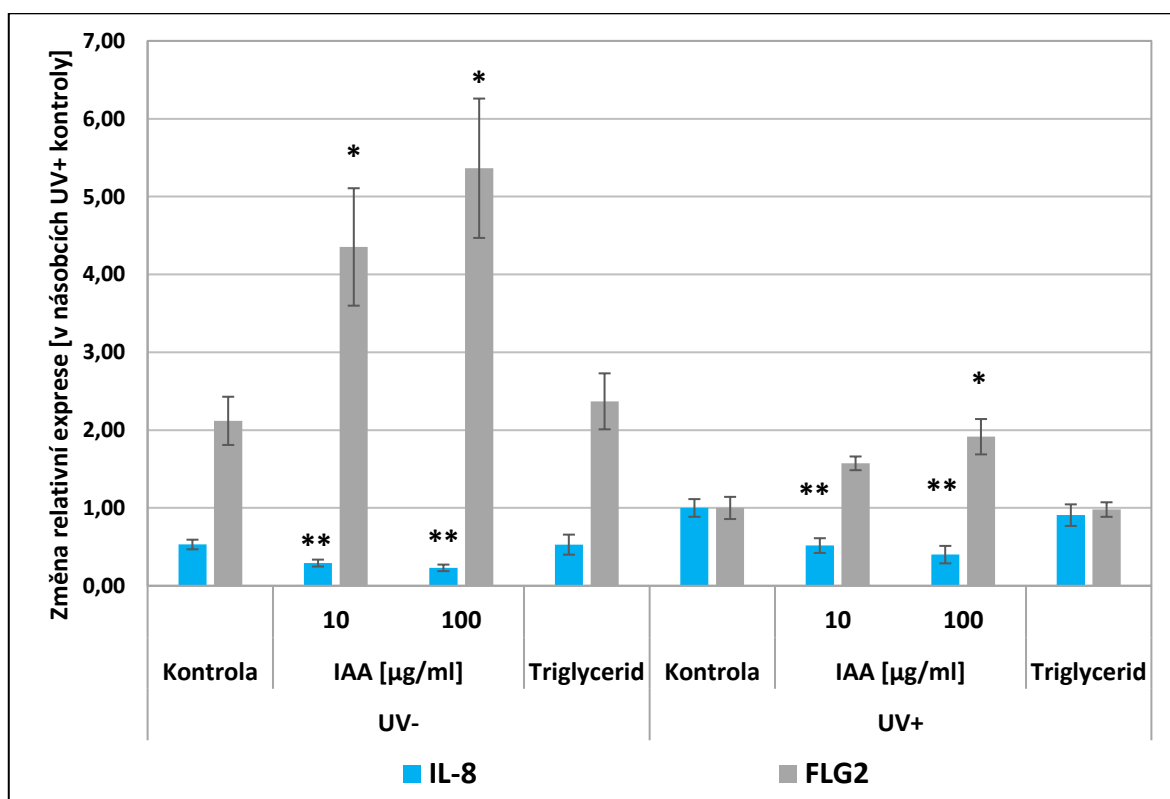
U proteinů těsných spojů OCLN a TJP1 se také jejich genová exprese zvyšovala v závislosti na koncentraci IAA, viz Obr. 30. Přestože zde nebyl (kromě vlivu IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na expresi TJP1) prokázán statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolními vzorky, je zde pozorován u vzorků ovlivněných IAA rostoucí trend exprese všech sledovaných genů v závislosti na koncentraci IAA. V případě IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se genová exprese OCLN v porovnání s kontrolou zvýšila 1,3krát a u TJP1 1,2krát. V případě koncentrace IAA $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se exprese u OCLN zvýšila 1,4krát a u TJP1 rovněž 1,4krát, zde však byl i potvrzen statisticky významný rozdíl oproti kontrolním vzorkům ($p < 0,05$). Podobné účinky IAA na proteiny těsných spojů byly popsány i v odborné literatuře [71] a byly prokázány i během této metody u keratinocytů HaCaT.

V případě antioxidantního enzymu SOD2 byl opět pozorován rostoucí trend jeho exprese v závislosti na koncentraci IAA, viz Obr. 30, ačkoliv se ve srovnání s kontrolním vzorkem nepodařilo prokázat statisticky významný rozdíl. U IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se genová exprese SOD2 oproti kontrolnímu vzorku zvýšila 1,5krát a u IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dokonce 1,9krát. Opět byly podobné účinky IAA pozorovány u keratinocytů

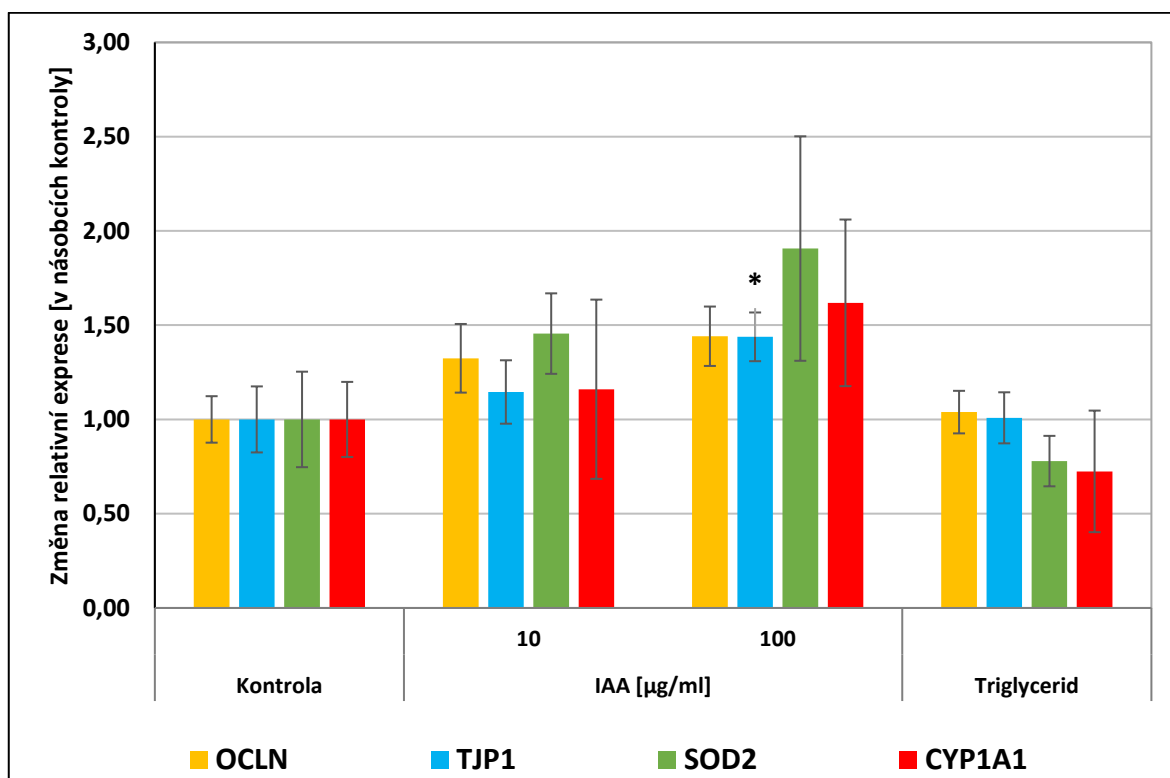
HaCaT a podobné účinky byly popsány i ve studiích na kmenových buňkách lidské zubní dřevě [70] nebo na buněčné linii myších makrofágů [72].

I genová exprese CYP1A1, viz Obr. 30, se vlivem IAA zvyšovala, u IAA o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to bylo 1,2krát a u IAA o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to bylo 1,6krát. Výsledky vycházejí obdobně jako u předchozího experimentálního modelu – keratinocytů HaCaT.

Ani v tomto případě nemělo rozpouštědlo DMSO na expresi těchto genů významný vliv a hodnoty expresí pozorovaných genů byly téměř totožné s kontrolou.



Obrázek 29 Vliv IAA na expresi IL-8 a FLG2 ve vzorcích prasečí *epidermis* ozářených i neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



Obrázek 30 Vliv IAA na expresi OCLN, TJP1, FLG2 a CYP1A1 ve vzorcích prasečí *epidermis*, které nebyly ozářeny UV zářením, vyjádřený v násobcích kontroly (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

11.4 Antioxidační účinky kyseliny indol-3-octové

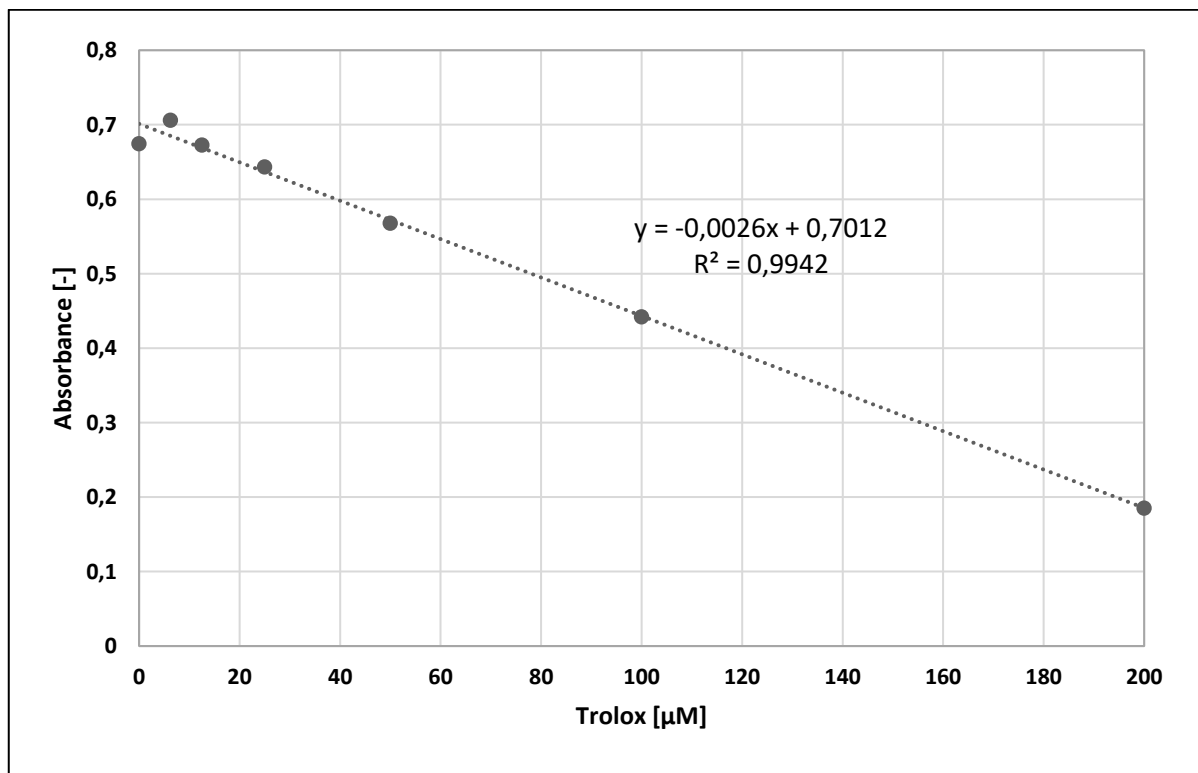
Kromě průkazu schopnosti IAA podpořit endogenní antioxidační systém v buňkách zvýšením exprese SOD2 pomocí qRT-PCR, byla testována i přímá antioxidační aktivita IAA metodou využívající stabilní radikál DPPH. Kalibrační křivka antioxidační kapacity Troloxu je zobrazena na Obr. 31. Z její rovnice přímky bylo dosažením absorbance IAA následně vždy vypočítáno její ekvivalentní množství dle vzorce (5).

$$c = \frac{A - 0,7012}{(-0,0026)} [\mu M] \quad (5)$$

Kde:

c – koncentrace IAA v jednotkách μM v ekvivalentním množství standartu Troloxu,

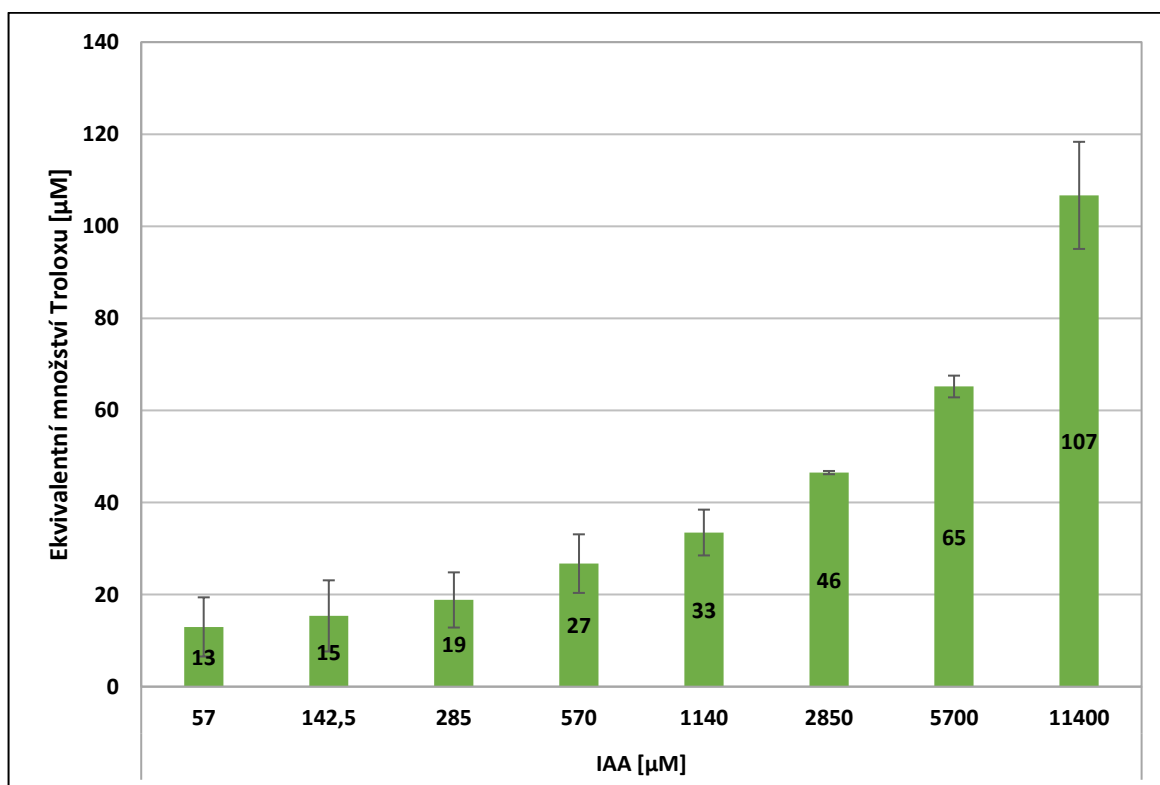
A – absorbance v jednotlivých roztocích IAA naměřená při vlnové délce 517 nm po 15 minutách reakce s DPPH.



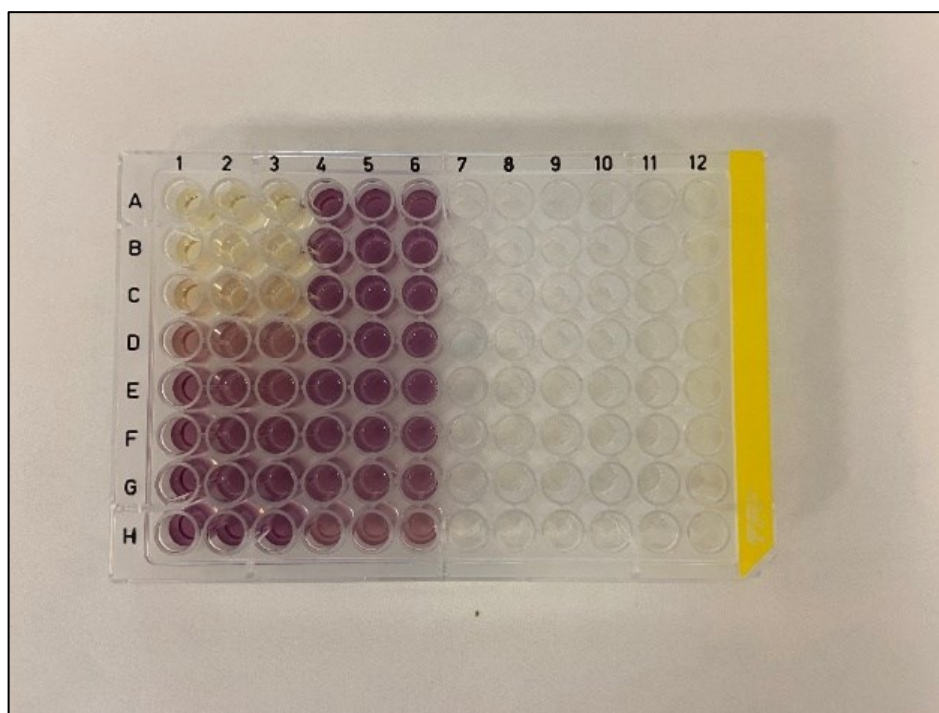
Obrázek 31 Závislost koncentrace Troloxu na absorbanci při vlnové délce 517 nm

Na Obr. 32 je zobrazen graf znázorňující antioxidační účinky IAA v porovnání se standardem Trolox. Na první pohled je patrné, že IAA na základě výsledků této metody má prokazatelné antioxidační účinky, i když slabší, než je tomu v případě roztoků Troloxu. U nejkonzentrovanejších roztoků IAA bylo ostatně v jamkách 96jamkového panelu po 15 minutách reakce okem pozorovatelné mírné zesvětlení roztoků. U nejkonzentrovanejších roztoků Troloxu bylo možno zpozorovat úplné odbarvení roztoku DPPH, což lze ostatně vidět i na Obr. 33. Z grafu na Obr. 32 je patrné, že antioxidační účinky IAA stoupají spolu s její rostoucí koncentrací v roztoku, avšak nelineárně.

Přímá antioxidační aktivita IAA v rozmezí koncentrací 0,01–5 mM pomocí testu využívající DPPH byla popsána i v odborné literatuře [93]. Její antioxidační aktivita zde nebyla porovnávána s Troloxem, ale s derivátem IAA – kyselinou 2-methyl-indol-3-octovou. I v této studii byly antioxidační účinky IAA v porovnání s jejím derivátem popisovány jako slabší, přesto však byly průkazné.

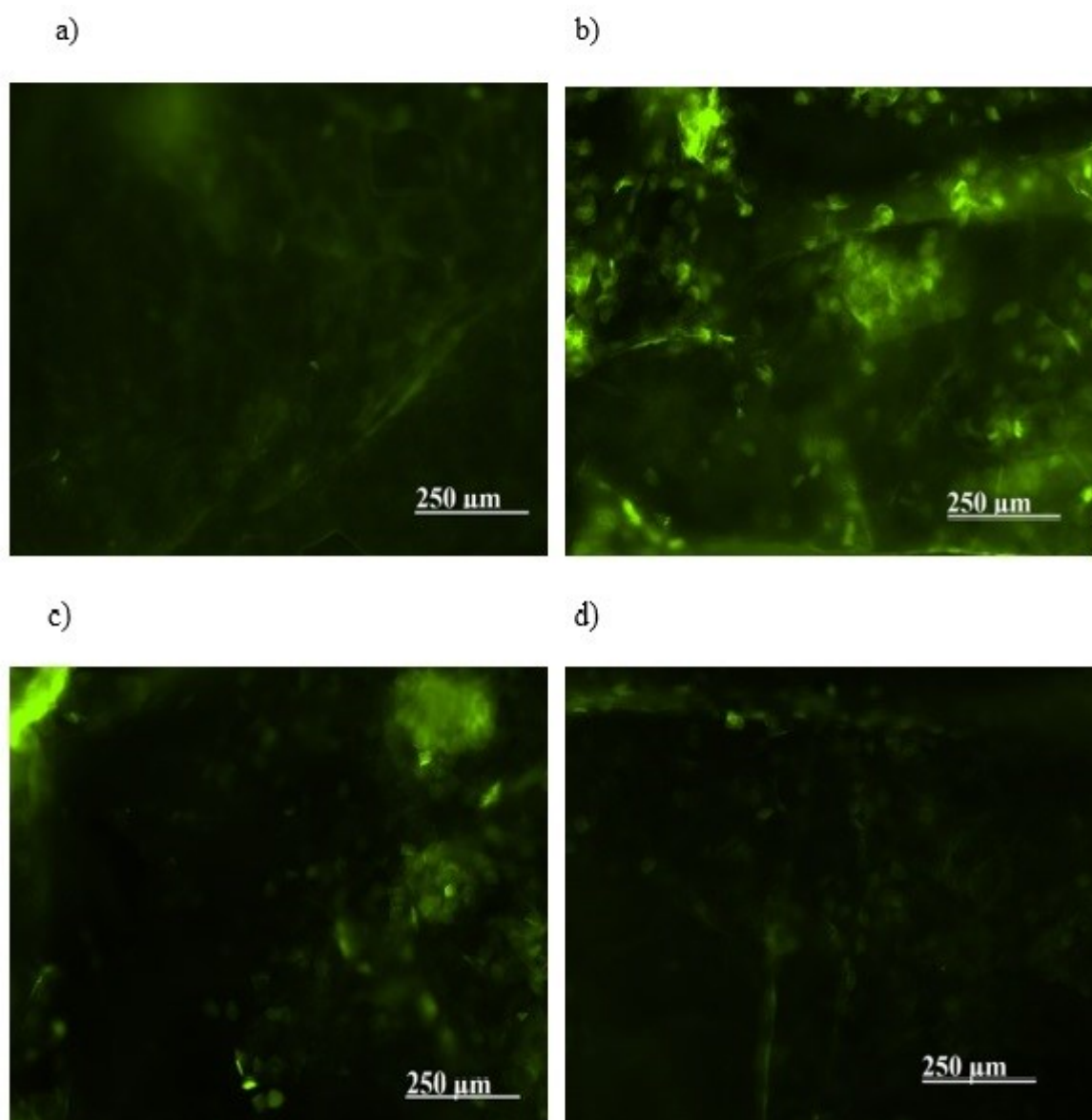


Obrázek 32 Antioxidační účinky testovaných roztoků IAA vyjádřené v ekvivalentním množství standartu Troloxu



Obrázek 33 Roztoky DPPH po 15 minutách reakce s roztoky Troloxu (sloupce 1–3) a roztoky IAA (sloupce 4–6)

Poslední metodou, která se zabývala schopností IAA chránit *epidermis* před volnými radikály, byla metoda fluorescenční mikroskopie, která využívá DCFH-DA. Tato molekula proniká do buněk, kde je metabolizována na DCFH. Ultrafialové záření ve vzorcích indukovalo vznik ROS, které přeměnily DCFH na jeho vysoce fluorescenční formu – DCF. V těchto vzorcích byl následně pomocí fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 100× pozorován fluorescenční signál DCF v buňkách.



Obrázek 34 Sledování ROS vyvolaných UV zářením v prasečí *epidermis* pomocí metody fluorescenční mikroskopie využívající DCFH-DA; a) UV⁻ kontrola; b) UV⁺ kontrola; c) UV⁺ IAA 10 µg·ml⁻¹; d) UV⁺ IAA 100 µg·ml⁻¹ (zvětšení 100×)

Na Obr. 34 se nacházejí snímky z fluorescenčního mikroskopu, které zobrazují (a) kontrolní vzorek, který nebyl ozářený UV zářením (UV⁻ kontrola), (b) kontrolní vzorek, který byl ozářený UV zářením (UV⁺ kontrola), a také vzorky které byly ozářeny UV zářením a ovlivněny roztoky IAA ((c) UV⁺ IAA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a (d) UV⁺ IAA 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Na snímku (a) lze pozorovat buňky prasečí *epidermis* ve vzorku UV⁻ kontroly, kde je viditelná velmi slabá intenzita fluorescenčního záření, což značí nízkou koncentraci ROS v buňkách. Na snímku (b) je zobrazen vzorek UV⁺ kontroly a v porovnání se snímek (a) je na první pohled patrný rozdíl v intenzitě fluorescenčního záření. Na snímku (b) se vyskytuje poměrně velké množství fluorescenčně zářících korneocytů, v nichž je přítomný DCF vlivem ROS vyvolaných UV zářením. Na snímcích (c) a (d) lze potom vidět vzorky, které byly ovlivněny roztoky IAA o koncentraci 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a následně vystaveny UV záření. Na snímku (c) je zobrazen vzorek *epidermis*, jenž byl ovlivněn slabším roztokem IAA (UV⁺ IAA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). I na něm lze vidět určité množství fluorescenčně zářících korneocytů, a tedy přítomných ROS v buňkách, ale v porovnání s UV⁺ kontrolou je jejich množství nižší. Na snímku (d) je potom zobrazen vzorek ovlivněný koncentrovanějším roztokem IAA (UV⁺ IAA 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kde je viditelný pokles fluorescenčního záření, a tím pádem i nižší výskyt ROS v korneocytech. Skutečná intenzita fluorescenčního záření na jednotlivých snímcích však nebyla kvantifikována a hodnocení snímků je pouze subjektivní.

Vliv IAA na sníženou tvorbu ROS byl ostatně popsán i ve studii [94] na jaterní tkáni myši se stearózou (ztukovatění jater), která byla záměrně vyvolána vysokým obsahem tuků v krmivu. Myši, kterým byla podávána potrava s vysokým obsahem tuku měly mnohem vyšší hladiny ROS v jaterní tkáni, než myši s normální potravou. Injekční podávání IAA (množství 50 mg/kg) však hladiny ROS ve ztučnělé jaterní tkáni myši významně snižovalo.

Díky této metodě byly podobné účinky IAA na tvorbu ROS záměrně vyvolanými UV zářením pozorovány i v prasečí *epidermis*.

ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem IAA na kůži. Kyselina indol-3-octová je známý fytohormon ze skupiny auxinů, zároveň se běžně vyskytuje i v lidském organismu jako výsledek mikrobiálního metabolismu tryptofanu probíhajícího ve střevech, a jak se později zjistilo, i v kůži. V literatuře je hojně diskutována souvislost tryptofanu a jeho metabolitů s udržováním homeostázy mezi hostitelem a jeho střevním mikrobiomem, jenž je nezbytný pro správné fungování imunitního systému, ale i udržení celkové homeostázy organismu, což souvisí s tím, že mnohé metabolity tryptofanu včetně IAA jsou ligandy pro AhR. Aryl hydrokarbonový receptor byl v minulosti považován především za prostředníka škodlivých účinků látek spojených se znečištěným životním prostředím, jako je např. B(a)P nebo TCDD. V současnosti je však AhR považován za klíčový receptor, který hraje důležitou roli v imunitní odpovědi na bariérových místech, jako je střevo i kůže. Zajímavé účinky IAA byly popsány na mnoha tkáních a modelech a naznačují, že by IAA prostřednictvím AhR mohla v kůži zlepšovat kožní bariéru nebo odolnost proti oxidačnímu stresu, jenž se významně podílí na předčasném stárnutí kůže. Vliv IAA na zdravou kůži však dosud nebyl nikde popsán, a proto se tato diplomová práce zabývala charakterizací jejího efektu na produkci složek kožní bariéry nebo antioxidantních enzymů za využití *in vitro* metod molekulární biologie.

Účinky IAA byly sledovány na několika experimentálních modelech, především na buněčné linii lidských keratinocytů HaCaT a prasečí *epidermis*. Pomocí metody qRT-PCR bylo zjištěno, že IAA v keratinocytech i v *epidermis* zvyšuje expresi genů kódujících složky kožní bariéry jako je OCLN, TJP1 nebo FLG2, které jsou součástí těsných spojů keratinocytů v *epidermis* nebo se podílí na epidermální diferenciaci. Dále bylo prokázáno, že IAA podporuje endogenní antioxidantní systém keratinocytů i *epidermis*, a to zvyšováním exprese antioxidantního enzymu SOD2.

V rámci této diplomové práce byl rovněž zkoumán vliv IAA na aktivaci AhR receptoru. Schopnost IAA aktivovat AhR byla potvrzena jednak během qRT-PCR metody pomocí sledování genové exprese CYP1A1, kdy se vlivem IAA se exprese tohoto genu zvyšovala v keratinocytech HaCaT i v prasečí *epidermis*, tak i na buněčné linii HepG2, která obsahuje reportérový gen, pomocí něhož lze aktivitu AhR detekovat a kvantifikovat v supernatantu těchto buněk. Aktivita AhR se vlivem IAA v buňkách HepG2 zvyšovala spolu s její rostoucí koncentrací.

Navíc byly prokázány i protizánětlivé účinky IAA, kdy se u buněk poškozených UV zářením vlivem IAA snižovala exprese prozánětlivých markerů IL-6 v keratinocytech HaCaT a IL-8 v prasečí *epidermis*. Všechny výše uvedené efekty již byly popsány na jiných tkáních nebo modelech, buď přímo v souvislosti s IAA, nebo s AhR, a pomocí této diplomové práce byly potvrzeny i v kůži.

Kromě pozitivního efektu IAA na expresi sledovaných genů byla v rámci této diplomové práce ověřena i antioxidační kapacita IAA jak v bezbuněčném modelu, tak i v prasečí *epidermis*.

Kyselina indol-3-octová produkovaná komenzálními mikroorganismy by tedy mohla být potenciálně zajímavou surovinou v kosmetických přípravcích. Bylo prokázáno, že pomáhá podporovat bariérovou funkci nebo je účinná proti oxidačnímu stresu, a tím i předčasnému stárnutí kůže. Uvedené benefity patří v současnosti k stěžejním strategickým cílům v kosmetické péči.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. 2. vyd. Praha: Galén. 2013. ISBN 978-80-7262-898-8. Dostupné z:
- [2] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada. 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [3] BERGEROVÁ, Yvonne, BRYCHTA, Pavel a STANEK, Jan J. (ed.). *Estetická plastická chirurgie a korektivní dermatologie*. Praha: Grada. 2014. ISBN 978-80-247-0795-2.
- [4] DRAELOS, Zoe Diana a THAMAN, Lauren A. (ed.). *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. Online. CRC Press. 2005. ISBN 9781420020854. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/9781420020854>. [cit. 2024-04-18].
- [5] BRUUSGAARD-MOURITSEN, Maria A.; JOHANSEN, Jeanne D.; ZACHARIAE, Claus; KIRKEBY, Christel S. a GARVEY, Lene H. Natural ingredients in cosmetic products—A suggestion for a screening series for skin allergy. Online. *Contact Dermatitis*. 2020, vol. 83, no. 4, s. 251-270. ISSN 0105-1873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cod.13550>. [cit. 2024-04-18].
- [6] BISSETT, Donald L. Common cosmeceuticals. Online. *Clinics in Dermatology*. 2009, vol. 27, no. 5, s. 435-445. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.006>. [cit. 2024-04-18].
- [7] AGUS, Allison; PLANCHAIS, Julien a SOKOL, Harry. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. Online. *Cell Host & Microbe*. 2018, vol. 23, no. 6, s. 716-724. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>. [cit. 2023-12-29].
- [8] MATTHEWS, Leigh. *Anatomy of the skin*. Online. Naturally healthy skin. 2023. Dostupné z: <https://naturallyhealthyskin.org>. [cit. 2023-10-28].
- [9] STARICCO, Renato J. a PINKUS, Hermann. Quantitative and Qualitative Data on the Pigment Cells of Adult Human Epidermis. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 1957, vol. 28, no. 1, s. 33-45. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.1957.4>. [cit. 2024-03-21].

- [10] MARTÍNEK, Jindřich a VACEK, Zdeněk. *Histologický atlas*. Praha: Grada. 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
- [11] RESL, Vladimír; FREI, Jiří a KROCOVÁ, Jitka. *Základní přehled dermatovenerologie*. 1. vyd. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni. 2021. ISBN 978-80-261-0904-4.
- [12] UBEROI, Aayushi; BARTOW-MCKENNEY, Casey; ZHENG, Qi; FLOWERS, Laurice; CAMPBELL, Amy et al. Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. Online. *Cell Host & Microbe*. 2021, vol. 29, no. 8, s. 1235-1248. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.011>. [cit. 2023-11-02].
- [13] RAWLINGS, A. V. a HARDING, C. R. Moisturization and skin barrier function. Online. *Dermatologic Therapy*. 2004, vol. 17, no. 1, s. 43-48. ISSN 1396-0296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x>. [cit. 2023-11-20].
- [14] Z., Plzáková. Vývoj kůže a její bariérová funkce. Online. *Česko-slovenská dermatologie*. 2021, roč. 96, č. 4, s. 163-178. ISSN 1805-448X. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2021-4-11/vyvoj-kuze-a-jeji-barierova-funkce-128289>. [cit. 2023-11-21].
- [15] KNOX, Sophie a O'BOYLE, Niamh M. Skin lipids in health and disease: A review. Online. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2021, vol. 236, s. 1-14. ISSN 00093084. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055>. [cit. 2023-11-26].
- [16] NGUYEN, Alan V. a SOULIKA, Athena M. The Dynamics of the Skin's Immune System. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, vol. 20, no. 8. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>. [cit. 2023-11-21].
- [17] SCHMID-WENDTNER, M.-H. a KORTING, H.C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. Online. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006, vol. 19, no. 6, s. 296-302. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000094670>. [cit. 2024-03-22].
- [18] SAPRA, Bharti; JINDAL, Manish a TIWARY, Ashok K. Tight junctions in skin: new perspectives. Online. *Therapeutic Delivery*. 2012, vol. 3, no. 11, s. 1297-1327. ISSN 2041-5990. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/tde.12.118>. [cit. 2023-11-26].

- [19] NIESSEN, Carien M. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007, vol. 127, no. 11, s. 2525-2532. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>. [cit. 2023-11-26].
- [20] RICHTER, Kathrin a WOHLRAB, Johannes. Einfluss von Konservierungsmitteln in Topika auf die kutane Mikrobiota. Online. *Die Dermatologie*. 2023, vol. 74, no. 3, s. 171-181. ISSN 2731-7005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00105-023-05112-x>. [cit. 2024-04-18].
- [21] MAULENOVÁ CHRPOVÁ, Tereza. Mikrobiom a probiotika v kontextu dermatologie. Online. *Dermatologie pro praxi*. 2022, roč. 16, č. 1, s. 22-27. ISSN 1803-5337. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2022/01/04.pdf>. [cit. 2024-04-08].
- [22] CHEN, Y. Erin; FISCHBACH, Michael A. a BELKAID, Yasmine. Skin microbiota–host interactions. Online. *Nature*. 2018, vol. 553, no. 7689, s. 427-436. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature25177>. [cit. 2024-04-19].
- [23] MATZENAUER, Martina. Kolagen a jeho využití v dermatologii. Online. *Dermatologie pro praxi*. 2022, roč. 16, č. 3, s. 171-174. ISSN 18022960. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/der.2022.035>. [cit. 2023-10-28].
- [24] RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, Lucie. Stárnutí kůže a péče o ni. Online. *Medicína pro praxi*. 2012, roč. 9, č. 6-7, s. 293-296. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/06/09.pdf>. [cit. 2023-12-23].
- [25] BONTÉ, Frédéric; GIRARD, Dorothée; ARCHAMBAULT, Jean-Christophe a DESMOULIÈRE, Alexis. Skin Changes During Ageing. Online. In: HARRIS, J. Robin a KOROLCHUK, Viktor I. (ed.). *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science*. Subcellular Biochemistry. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 249-280. ISBN 978-981-13-3680-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_10. [cit. 2023-12-23].
- [26] GU, Yanpei; HAN, Jianxin; JIANG, Chunpeng a ZHANG, Ying. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. Online. *Ageing Research Reviews*. 2020, vol. 59. ISSN 15681637. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101036>. [cit. 2023-12-23].

- [27] PUIZINA-IVIĆ, Neira. Skin aging. Online. *Acta Dermatovenerol Alp Pannoika Adriat.* 2008, vol. 17, no. 2, s. 47-54. ISSN 1318-4458. Dostupné z: <https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/thejournalhub/10.15570/archive/acta-apa-08-2/1.pdf>. [cit. 2023-12-23]
- [28] LITVIK, Radek. Hormonální stárnutí kůže. Online. *Dermatologie pro praxi.* 2008, roč. 2, č. 5-6, s. 226-229. ISSN 18022960. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2008/05/04.pdf> [cit. 2023-12-23].
- [29] BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. Online. *The Journal of Pathology.* 2007, vol. 211, no. 2, s. 241-251. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/path.2098>. [cit. 2023-12-23].
- [30] KRUTMANN, Jean; BOULOC, Anne; SORE, Gabrielle; BERNARD, Bruno A. a PASSERON, Thierry. The skin aging exposome. Online. *Journal of Dermatological Science.* 2017, vol. 85, no. 3, s. 152-161. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.09.015>. [cit. 2023-12-23].
- [31] ETTLER, Karel. Účinky UV záření a fotoprotekce. Online. *Medicina pro praxi,* 2007, roč. 4, č. 6, s. 273-275. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/06/09.pdf>. [cit. 2023-12-23].
- [32] MASAKI, Hitoshi. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. Online. *Journal of Dermatological Science.* 2010, vol. 58, no. 2, s. 85-90. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.03.003>. [cit. 2023-12-23].
- [33] LIEBMANN, Joerg; BORN, Matthias a KOLB-BACHOFEN, Victoria. Blue-Light Irradiation Regulates Proliferation and Differentiation in Human Skin Cells. Online. *Journal of Investigative Dermatology.* 2010, vol. 130, no. 1, s. 259-269. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2009.194>. [cit. 2023-12-23].
- [34] YIN, Lei; MORITA, Akimichi a TSUJI, Takuo. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Online. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.* 2001, vol. 17, no. 4, s. 178-183. ISSN 0905-4383. Dostupné z: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0781.2001.170407.x>. [cit. 2023-12-23].

- [35] NAKAMURA, Motoki; UEDA, Yukiko; HAYASHI, Mai; KATO, Hiroshi; FURUHASHI, Takuya et al. Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. Online. *Experimental Dermatology*. 2013, vol. 22, no. 8, s. 556-558. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/exd.12170>. [cit. 2023-12-23].
- [36] HALLIWELL, B a CROSS, C E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Online. *Environmental Health Perspectives*. 1994, vol. 102, no. suppl 10, s. 5-12. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s105>. [cit. 2024-03-23].
- [37] MENICHINI, E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. Online. *The Science of The Total Environment*. 1992, vol. 116, no. 1-2, s. 109-135. ISSN 00489697. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90368-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90368-3). [cit. 2023-12-25].
- [38] MILLER, Kimberly P. a RAMOS, Kenneth S. IMPACT OF CELLULAR METABOLISM ON THE BIOLOGICAL EFFECTS OF BENZO[A]PYRENE AND RELATED HYDROCARBONS. Online. *Drug Metabolism Reviews*. 2001, vol. 33, no. 1, s. 1-35. ISSN 0360-2532. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/DMR-100000138>. [cit. 2024-05-07].
- [39] VALACCHI, Giuseppe; STICOZZI, Claudia; BELMONTE, Giuseppe; CERVELLATI, Franco; DEMAUDE, Julien et al. Vitamin C Compound Mixtures Prevent Ozone-Induced Oxidative Damage in Human Keratinocytes as Initial Assessment of Pollution Protection. Online. *PLOS ONE*. 2015, vol. 10, no. 8. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131097>. [cit. 2023-12-25].
- [40] HE, Q. C.; TAVAKKOL, A.; WIETecha, K.; BEGUM-GAFUR, R.; ANSARI, S. A. et al. Effects of environmentally realistic levels of ozone on stratum corneum function. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006, vol. 28, no. 5, s. 349-357. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00347.x>. [cit. 2023-12-25].
- [41] COSGROVE, Maeve C; FRANCO, Oscar H; GRANGER, Stewart P; MURRAY, Peter G a MAYES, Andrew E. Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among

- middle-aged American women. Online. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, vol. 86, no. 4, s. 1225-1231. ISSN 00029165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.4.1225>. [cit. 2023-12-25].
- [42] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia. 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [43] DAVIDSON, Majid; RASHIDI, Niloufar; NURGALI, Kulmira a APOSTOLOPOULOS, Vasso. The Role of Tryptophan Metabolites in Neuropsychiatric Disorders. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, vol. 23, no. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23179968>. [cit. 2023-12-29].
- [44] GAO, Kan; MU, Chun-long; FARZI, Aitak a ZHU, Wei-yun. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. Online. *Advances in Nutrition*. 2020, vol. 11, no. 3, s. 709-723. ISSN 21618313. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/advances/nmz127>. [cit. 2024-01-02].
- [45] BENEŠ, Luděk a WILHELM, Zdeněk. Melatonin. Online. *Praktické lékařství*. 2016, roč. 12, č. 2e, s. 10-18. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2016/89/03.pdf>. [cit. 2024-01-02].
- [46] ROAGER, Henrik M. a LICHT, Tine R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. Online. *Nature Communications*. 2018, vol. 9, no. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05470-4>. [cit. 2024-01-02].
- [47] YU, Jinlei; LUO, Yang; ZHU, Zhenlai; ZHOU, Yufeng; SUN, Licheng et al. A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. Online. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019, vol. 143, no. 6, s. 2108-2119. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.036>. [cit. 2023-11-02].
- [48] DENISON, Michael S. a NAGY, Scott R. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. Online. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003, vol. 43, no. 1, s. 309-334. ISSN 0362-1642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>. [cit. 2023-11-27].

- [49] FRERICKS, Markus; MEISSNER, Marc a ESSER, Charlotte. Microarray analysis of the AHR system: Tissue-specific flexibility in signal and target genes. Online. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007, vol. 220, no. 3, s. 320-332. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.014>. [cit. 2023-11-27].
- [50] DENISON, Michael S.; SOSHILOV, Anatoly A.; HE, Guochun; DEGROOT, Danica E. a ZHAO, Bin. Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. Online. *Toxicological Sciences*. 2011, vol. 124, no. 1, s. 1-22. ISSN 1096-6080. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr218>. [cit. 2023-11-27].
- [51] VYHLÍDALOVÁ, Barbora; KRASULOVÁ, Kristýna; PEČINKOVÁ, Petra; MARCALÍKOVÁ, Adéla; VRZAL, Radim et al. Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, vol. 21, no. 7. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21072614>. [cit. 2023-11-29].
- [52] STOCKINGER, Brigitta; SHAH, Kathleen a WINCENT, Emma. AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021, vol. 18, no. 8, s. 559-570. ISSN 1759-5045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00430-8>. [cit. 2023-11-29].
- [53] CERVANTES-BARRAGAN, Luisa a COLONNA, Marco. AHR signaling in the development and function of intestinal immune cells and beyond. Online. *Seminars in Immunopathology*. 2018, vol. 40, no. 4, s. 371-377. ISSN 1863-2297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0694-9>. [cit. 2024-03-24].
- [54] BOULE, Lisbeth A.; BURKE, Catherine G.; JIN, Guang-Bi a LAWRENCE, B. Paige. Aryl hydrocarbon receptor signaling modulates antiviral immune responses: ligand metabolism rather than chemical source is the stronger predictor of outcome. Online. *Scientific Reports*. 2018, vol. 8, no. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20197-4>. [cit. 2024-03-24].
- [55] YU, Min; WANG, Qimeng; MA, Yuanhang; LI, Liangzi; YU, Kun et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. Online. *International Journal of Biological*

- Sciences*. 2018, vol. 14, no. 1, s. 69-77. ISSN 1449-2288. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/ijbs.22259>. [cit. 2024-03-24].
- [56] ŠEDA, Václav. *Modulace signalizace Ah receptoru v epiteliálních buněčných modelech*. Online, diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2013. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/x4emq/Diplomova_prace_Vaclav_Seda.pdf. [cit. 2024-03-24].
- [57] ESSER, Charlotte; RANNUG, Agneta a MA, Qiang. The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. Online. *Pharmacological Reviews*. 2015, vol. 67, no. 2, s. 259-279. ISSN 0031-6997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/pr.114.009001>. [cit. 2023-11-27].
- [58] BEISCHLAG, Timothy V.; MORALES, J. Luis; HOLLINGSHEAD, Brett D. a PERDEW, Gary H. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. Online. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2008, vol. 18, no. 3, s. 207-250. ISSN 1045-4403. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v18.i3.20>. [cit. 2023-11-27].
- [59] LAMAS, Bruno; RICHARD, Mathias L; LEDUCQ, Valentin; PHAM, Hang-Phuong; MICHEL, Marie-Laure et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. Online. *Nature Medicine*. 2016, vol. 22, no. 6, s. 598-605. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nm.4102>. [cit. 2024-02-21].
- [60] LEVINE-FRIDMAN, Aviva; CHEN, Li a ELFERINK, Cornelis J. Cytochrome P4501A1 Promotes G 1 Phase Cell Cycle Progression by Controlling Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. Online. *Molecular Pharmacology*. 2004, vol. 65, no. 2, s. 461-469. ISSN 0026-895X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.461>. [cit. 2023-11-28].
- [61] APETOH, Lionel; QUINTANA, Francisco J; POT, Caroline; JOLLER, Nicole; XIAO, Sheng et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. Online. *Nature Immunology*. 2010, vol. 11, no. 9, s. 854-861. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ni.1912>. [cit. 2023-11-28].
- [62] ESSER, Charlotte; BARGEN, Imke; WEIGHARDT, Heike; HAARMANN-STEMMANN, Thomas a KRUTMANN, Jean. Functions of the aryl hydrocarbon

- receptor in the skin. Online. *Seminars in Immunopathology*. 2013, vol. 35, no. 6, s. 677-691. ISSN 1863-2297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0394-4>. [cit. 2023-12-01].
- [63] FURUE, Masutaka; TSUJI, Gaku; MITOMA, Chikage; NAKAHARA, Takeshi; CHIBA, Takahito et al. Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. Online. *Journal of Dermatological Science*. 2015, vol. 80, no. 2, s. 83-88. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.07.011>. [cit. 2024-03-24].
- [64] JUX, Bettina; KADOW, Stephanie; LUECKE, Sandra; RANNUG, Agneta; KRUTMANN, Jean et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation–Induced Skin Tanning. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011, vol. 131, no. 1, s. 203-210. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2010.269>. [cit. 2023-12-01].
- [65] SIBILANO, Riccardo; FROSSI, Barbara; CALVARUSO, Marco; DANELLI, Luca; BETTO, Elena et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Acute and Late Mast Cell Responses. Online. *The Journal of Immunology*. 2012, vol. 189, no. 1, s. 120-127. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200009>. [cit. 2023-12-01].
- [66] NAVID, Fatemeh; BRUHS, Anika; SCHULLER, Winfried; FRITSCHKE, Ellen; KRUTMANN, Jean et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Involved in UVR-Induced Immunosuppression. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, vol. 133, no. 12, s. 2763-2770. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.221>. [cit. 2023-12-01].
- [67] LUŠTINEC, Jiří a ŽÁRSKÝ, Viktor. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum. 2003. ISBN 80-246-0563-5.
- [68] SEIDLOVÁ, Frideta. Fytohormony: Jak s rostlinami cvičí hormony. Online. *Vesmír*. 2008, roč. 87, č. 8, s. 12-17. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2008/cislo-8/fytohormony.html>. [cit. 2024-02-19].
- [69] PAVLOVÁ, Libuše. *Fyziologie rostlin*. Praha: Karolinum. 2005. ISBN 80-246-0985-1.

- [70] KIM, Daehwan; KIM, Hyewon; KIM, Kichul a ROH, Sangho. The Protective Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) on H₂O₂ -Damaged Human Dental Pulp Stem Cells Is Mediated by the AKT Pathway and Involves Increased Expression of the Transcription Factor Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) and Its Downstream Target Heme Oxygenase 1 (HO-1). Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, vol. 2017, no. 1-11. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/8639485>. [cit. 2024-02-20].
- [71] SHEN, Jun; YANG, Lianjun; YOU, Ke; CHEN, Tao; SU, Zhihai et al. Indole-3-Acetic Acid Alters Intestinal Microbiota and Alleviates Ankylosing Spondylitis in Mice. Online. *Frontiers in Immunology*. 2022, vol. 13. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.762580>. [cit. 2024-04-08].
- [72] JI, Yun; YIN, Wenzhen; LIANG, Yuan; SUN, Lijun; YIN, Yue et al. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activity of Indole-3-Acetic Acid Involves Induction of HO-1 and Neutralization of Free Radicals in RAW264.7 Cells. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, vol. 21, no. 5. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21051579>. [cit. 2024-03-26].
- [73] BHOI, Anupam; PALLADINO, Francesca a FABRIZIO, Paola. Auxin confers protection against ER stress in *Caenorhabditis elegans*. Online. *Biology Open*. 2021, vol. 10, no. 2. ISSN 2046-6390. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/bio.057992>. [cit. 2023-11-02].
- [74] SROKA-TOMASZEWSKA, Jowita a TRZECIAK, Magdalena. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, vol. 22, no. 8. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22084130>. [cit. 2024-02-24].
- [75] FANG, Zhifeng; PAN, Tong; LI, Lingzhi; WANG, Hongchao; ZHU, Jinlin et al. *Bifidobacterium longum* mediated tryptophan metabolism to improve atopic dermatitis via the gut-skin axis. Online. *Gut Microbes*. 2022, vol. 14, no. 1. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2044723>. [cit. 2024-02-24].
- [76] HUH, Sun Young; NA, Jung-Im; HUH, Chang-Hun a PARK, Kyoung-Chan. The Effect of Photodynamic Therapy Using Indole-3-Acetic Acid and Green Light on Acne

- Vulgaris. Online. *Annals of Dermatology*. 2012, vol. 24, no. 1. ISSN 1013-9087. Dostupné z: <https://doi.org/10.5021/ad.2012.24.1.56>. [cit. 2024-02-23].
- [77] NA, Jung-Im; KIM, So-Young; KIM, Jeong-Hye; YOUN, Sang-Woong; HUH, Chang-Hun et al. Indole-3-acetic acid: A potential new photosensitizer for photodynamic therapy of acne vulgaris. Online. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011, vol. 43, no. 3, s. 200-205. ISSN 0196-8092. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/lsm.21029>. [cit. 2023-11-02].
- [78] KWON, S.H.; JEONG, M.Y.; PARK, K.C.; YOUN, S.W.; HUH, C.H. et al. A new therapeutic option for facial seborrhoeic dermatitis: indole-3-acetic acid photodynamic therapy. Online. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2014, vol. 28, no. 1, s. 94-99. ISSN 0926-9959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jdv.12070>. [cit. 2023-11-02].
- [79] GRANDI, Vieri; BALDI, Irene; CAPPUGI, Pietro; MORI, Moira a PIMPINELLI, Nicola. Indole 3-acetic acid-photodynamic therapy in the treatment of multiple actinic keratoses: A proof of concept pilot study. Online. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017, vol. 16, s. 17-22. ISSN 15721000. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.08.006>. [cit. 2024-02-23].
- [80] KWON, Nyoun Soo; JEONG, Yun-Mi; JEONG, Hyo-Soon; KIM, Myo-Kyoung; MIN, Young Sil et al. UVB-irradiated indole-3-acetic acid induces apoptosis via caspase activation. Online. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2017, vol. 42, no. 2, s. 223-228. ISSN 1303-829X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0241>. [cit. 2024-02-24].
- [81] WILSON, Van G. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. Online. In: TURKSEN, Kursad (ed.). *Epidermal Cells*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2014, s. 33-41. ISBN 978-1-4939-1223-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/7651_2013_42. [cit. 2024-03-01].
- [82] INVIVOGEN. *AhR Reporter Cells*. Online. 2022. Dostupné z: <https://www.invivogen.com/hepg2-lucia-ahr>. [cit. 2024-03-12].
- [83] CAMBRIDGE BIOSCIENCE. *CASY cell counter*. Online. 2023. Dostupné z: <https://www.bioscience.co.uk/cpl/casy-cell-counter>. [cit. 2024-03-20].

- [84] KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan a UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Online. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018, vol. 2018, no. 6. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>. [cit. 2024-03-01].
- [85] RIGG, Pauline Carole a BARRY, Brian William. Shed Snake Skin and Hairless Mouse Skin as Model Membranes for Human Skin During Permeation Studies. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000, vol. 94, no. 2, s. 235-240. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12874561>. [cit. 2024-03-31].
- [86] HOLLAND, P M; ABRAMSON, R D; WATSON, R a GELFAND, D H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, vol. 88, no. 16, s. 7276-7280. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>. [cit. 2024-03-28].
- [87] SCHMITTGEN, Thomas D a LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Online. *Nature Protocols*. 2008, vol. 3, no. 6, s. 1101-1108. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>. [cit. 2024-03-29].
- [88] AFRI, Michal; FRIMER, Aryeh A. a COHEN, Yael. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Online. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2004, vol. 131, no. 1, s. 123-133. ISSN 00093084. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.006>. [cit. 2024-03-15].
- [89] ERUSLANOV, Evgeniy a KUSMARTSEV, Sergei. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. Online. In: ARMSTRONG, Donald (ed.). *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, s. 57-72. ISBN 978-1-60761-410-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4. [cit. 2024-03-27].
- [90] BALIYAN, Siddartha; MUKHERJEE, Riya; PRIYADARSHINI, Anjali; VIBHUTI, Arpana; GUPTA, Archana et al. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>. [cit. 2024-03-17].

- [91] PYRZYNSKA, Krystyna a PEKAL, Anna. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. Online. *Analytical Methods*. 2013, vol. 5, no. 17. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c3ay40367j>. [cit. 2024-03-27].
- [92] ALWAN, Wisam a DI MEGLIO, Paola. Guardians of the barrier: Microbiota engage AHR in keratinocytes to maintain skin homeostasis. Online. *Cell Host & Microbe*. 2021, vol. 29, no. 8, s. 1213-1216. ISSN 19313128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.07.007>. [cit. 2024-04-21]
- [93] SALOPEK-SONDI, Branka; PILJAC-ŽEGARAC, Jasenka; MAGNUS, Volker a KOPJAR, Nevenka. Free radical-scavenging activity and DNA damaging potential of auxins IAA and 2-methyl-IAA evaluated in human neutrophils by the alkaline comet assay. Online. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2010, vol. 24, no. 3, s. 165-173. ISSN 1095-6670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbt.20323>. [cit. 2024-05-02].
- [94] JI, Yun; GAO, Yuan; CHEN, Hong; YIN, Yue a ZHANG, Weizhen. Indole-3-Acetic Acid Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice via Attenuation of Hepatic Lipogenesis, and Oxidative and Inflammatory Stress. Online. *Nutrients*. 2019, vol. 11, no. 9. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu11092062>. [cit. 2024-04-26].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance v roztocích
AAAD	Aromatická L-aminodekarboxylázová kyselina
AGEs	Produkty pokročilé glykace
AhR	Aryl hydrokarbonový receptor
AhRE	Prvky reagující na aryl uhlovodíkové receptory
ARE	Element antioxidační odpovědi
ARNT	Jaderný translokátor aryl hydrokarbonového receptoru
B(a)P	Benzo[<i>a</i>]pyren
c	Koncentrace
CCL1	Chemokinový ligand 1 motivu CC
cDNA	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
cm	Centimetr, jednotka délky
cm ²	Centimetr čtvereční, jednotka obsahu
c-Maf	Transkripční faktor
CO ₂	Oxid uhličitý
C-src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
Ct	Počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne prahové hodnoty
CYP1A1	Gen pro cytochrom P450
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DCFH	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
DEPC voda	Voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem bez nukleáz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina

DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH-H	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazin
DRE	Prvky reagující na dioxiny
E	Požadovaná dávka záření
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FLG2	Filaggrin 2
g	Gram, jednotka hmotnosti
GPR35	G protein-coupled receptor 35
G1/S	Přechod buňky z období růstu do fáze replikace DNA
HaCaT	Buněčná linie lidských immortalizovaných keratinocytů
HepG2	Buněčná linie lidského immortalizovaného hepatomu
HMOX1	Hemoxygenáza 1
Hsp90	Heat-shock protein
IA	Kyselina indolakrylová
IAA	Kyselina indol-3-octová
IAld	Indol-3-aldehyd
IDO1	Indoleamin-2,3-dioxygenáza 1
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-22	Interleukin 22
IPA	Kyselina indol-3-propionová
J	Joule, jednotka práce a energie
JAMs	Adhezivní molekuly tvořící spoje
KCl	Chlorid draselný

Keap-1	Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1
kg	Kilogram, jednotka hmotnosti
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
l	Litr, jednotka objemu
M	Mol, jednotka látkového množství
m^2	Metr čtvereční, jednotka obsahu
mg	Miligram, jednotka hmotnosti
min	Minuta, jednotka času
MITF	Transkripční faktor spojený s melanogenezí
mJ	Milijoule, jednotka práce a energie
ml	Mililitr, jednotka objemu
mm	Milimetr, jednotka délky
mM	Milimol, jednotka látkového množství
mm^2	Milimetr čtvereční, jednotka obsahu
MMP	Matrix metaloproteinázy
MMP1	Matrix metaloproteináza 1 (kolagenáza)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MTT	Barvivo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NaCl	Chlorid sodný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát
NF- κ B	Nukleární faktor kappa B
ng	Nanogram, jednotka hmotnosti
nm	Nanometr, jednotka délky
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor
OCLN	Okludin

ot./min	Otáčky za minutu
p	Statistický ukazatel náhodnosti výsledku
P	Výkon
p23	Protein, ko-chaperon
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	Fosfátový pufr
Per-ARNT-Sim	Proteinová doména
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
pKa	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
qRT-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
R	Ratio
RAGE	Receptor pro pokročilé glykační produkty
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPL13A	Referenční housekeeping gen
s	Sekunda, jednotka času
SDS	Dodecylsírán sodný
SEM	Střední chyba průměru
SOD2	Superoxid dismutáza 2
t	Čas
TCDD	2,3,7,8-tetrachlórdibenzodioxin
TDO	Tryptofan-2,3-dioxygenáza
TIMPs	Tkáňové inhibitory metaloproteináz
TJP1	Tight junction protein 1
TNF α	Faktor nádorové nekrózy

TpH1	Tryptofan-hydroxyláza 1
TpH2	Tryptofan-hydroxyláza 2
TTAGGG	Sekvence dusíkatých bází telomery
UV	Ultrafialové záření
UV ⁻	Vzorky neozářené ultrafialovým zářením
UV ⁺	Vzorky ozářené ultrafialovým zářením
UVA	Krátkovlnné ultrafialové záření
UVB	Středněvlnné ultrafialové záření
UVC	Dlouhovlnné ultrafialové záření
V	Objem
XAP2	Hepatitis B virus X-associated protein
XRE	Prvky reagující na xenobiotika
α	Hladina významnosti
$\Delta\Delta Ct$	Metoda pro stanovení relativního množství mRNA
μg	Mikrogram, jednotka hmotnosti
μl	Mikrolitr, jednotka objemu
μm	Mikrometr, jednotka délky
μM	Mikromol, jednotka látkového množství
μW	Mikrowatt, jednotka výkonu
%	Procento
$^{\circ}C$	Stupeň Celsia, jednotka teploty

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Průřez lidskou kůží.....	11
Obrázek 2 Struktura <i>epidermis</i>	12
Obrázek 3 Složky kožní bariéry v <i>epidermis</i>	15
Obrázek 4 Spektrum slunečního světla a jeho dopad na kůži.....	21
Obrázek 5 Strukturní vzorec tryptofanu	24
Obrázek 6 Metabolismus tryptofanu.....	25
Obrázek 7 Schéma kanonické signální dráhy AhR	29
Obrázek 8 Strukturní vzorec IAA	32
Obrázek 9 Multifunkční reader EnSight.....	50
Obrázek 10 Vzorky prasečích kožních explantátů ve Franzových celách.....	53
Obrázek 11 Vzorky prasečí <i>epidermis</i> po vytřepání v solubilizačním roztoku	54
Obrázek 12 Ozáření buněk v 6jamkovém panelu UV zářením	57
Obrázek 13 Přístroje využívané pro izolaci RNA a měření její koncentrace ve vzorku (vlevo QIAcube, vpravo spektrofotometr NanoDrop OneC).....	60
Obrázek 14 Přístroje používané pro reverzní transkripci a qRT-PCR (vlevo termocykler Biometra TOne 96 G, vpravo přístroj QuantStudio 3)	60
Obrázek 15 Oddělení prasečích kožních explantátů od ušních boltců pomocí kladívka a kovové raznice	61
Obrázek 16 Příprava vzorků pro stanovení vlivu IAA na genovou expresi v prasečí <i>epidermis</i> (vlevo ozáření vzorku UV zářením, vpravo ovlivněné vzorky v 24jamkovém panelu s agarem)	62
Obrázek 17 Oddělení <i>epidermis</i> od <i>dermis</i>	63
Obrázek 18 Schéma reakce DCFH-DA vedoucí k fluorescenčnímu DCF	64
Obrázek 19 Vzorky ovlivněných prasečích kožních explantátů po vyndání z Franzových difúzních cel.....	66
Obrázek 20 Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti2 E.....	66
Obrázek 21 Reakce DPPH s antioxidantem za vzniku redukováného DPPH-H.....	67
Obrázek 22 Vliv IAA na viabilitu keratinocytů HaCaT vyjádřený v procentech kontroly .	70
Obrázek 23 Vliv IAA na viabilitu prasečí <i>epidermis</i> vyjádřený v procentech kontroly	72
Obrázek 24 Vliv IAA na viabilitu buněčné linie HepG2 vyjádřený v procentech kontroly	73
Obrázek 25 Kvantifikace relativní aktivity AhR v supernatantech buněk HepG2 odebraných 24 hodin po ovlivnění vyjádřená v procentech kontroly	74
Obrázek 26 Mikroskopické snímky keratinocytů HaCaT během metody qRT-PCR 24 hodin po ovlivnění a ozáření buněk UV zářením	75

Obrázek 27 Vliv IAA na expresi IL-6 a FLG2 v keratinocytech HaCaT ozářených i neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích UV ⁺ kontroly.....	77
Obrázek 28 Vliv IAA na expresi OCLN, TJP1, SOD2 a CYP1A1 v keratinocytech HaCaT neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích kontroly	78
Obrázek 29 Vliv IAA na expresi IL-8 a FLG2 ve vzorcích prasečí <i>epidermis</i> ozářených i neozářených UV zářením vyjádřený v násobcích kontroly	80
Obrázek 30 Vliv IAA na expresi OCLN, TJP1, FLG2 a CYP1A1 ve vzorcích prasečí <i>epidermis</i> , které nebyly ozářeny UV zářením, vyjádřený v násobcích kontroly	81
Obrázek 31 Závislost koncentrace Troloxu na absorbanci při vlnové délce 517 nm.....	82
Obrázek 32 Antioxidační účinky testovaných roztoků IAA vyjádřené v ekvivalentním množství standartu Troloxu	83
Obrázek 33 Roztoky DPPH po 15 minutách reakce s roztoky Troloxu	83
Obrázek 34 Sledování ROS vyvolaných UV zářením v prasečí <i>epidermis</i> pomocí metody fluorescenční mikroskopie využívající DCFH-DA	84

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vliv vnitřního stárnutí a fotostárnutí na kůži.....	20
Tabulka 2 Druhy bakterií produkující metabolity tryptofanu.....	27
Tabulka 3 Použité PrimePCR™ Probe Assays.....	40
Tabulka 4 Použité TaqMan™ Gene Expression Assays	41
Tabulka 5 Příprava kultivačního media pro HaCaT	45
Tabulka 6 Příprava kultivačního media pro HepG2	46
Tabulka 7 Příprava roztoků pro ovlivnění HaCaT v jamkách 96jamkového panelu.....	49
Tabulka 8 Příprava roztoků pro ovlivnění HepG2 v jamkách 96jamkového panelu.....	51
Tabulka 9 Příprava mastermixu pro jeden vzorek	58
Tabulka 10 Teplotní profil reverzní transkripce	58
Tabulka 11 Teplotní profil qRT-PCR.....	59
Tabulka 12 Příprava koncentrační řady roztoků IAA.....	68

