

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv polyfenolů na signální dráhu Nrf2 v kůži**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                   |                                 |
|-------------------|---------------------------------|
| Autor:            | <b>Eva Svedková</b>             |
| Studijní program: | B0512A130008 Biochemie          |
| Studijní obor:    | Biochemie                       |
| Forma studia:     | Prezenční                       |
| Vedoucí práce:    | <b>Mgr. Alena Ryšavá, Ph.D.</b> |
| Rok:              | 2024                            |

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 4. 5. 2024

## Poděkování

Ráda bych poděkovala školitelce Mgr. Aleně Ryšavé, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, vstřícnou komunikaci, pečlivost a ochotu. Děkuji Ing. Aleně Rajnochové Svobodové, Ph.D. a doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D. za přípravu vzorků a rady týkající se práce. Můj dík patří Bc. Zuzaně Petrželkové za pomoc s homogenizací biologického materiálu a kolektivu Ústavu lékařské chemie a biochemie za poskytnutí příjemného pracovního prostředí. Dále děkuji MUDr. Bohumilu Zálešákovi, Ph.D. a Mgr. Ivetě Hatalové z Oddělení palstické chirurgie FN Olomouc za poskytnutí a odběr biologického materiálu. V neposlední řadě děkuji vnitřním grantům IGA\_LF\_2023\_017 a IGA\_LF\_2024\_011 za finanční prostředky.

## Bibliografická identifikace

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Eva Svedková                                  |
| Název práce             | Vliv polyfenolů na signální dráhu Nrf2 v kůži |
| Typ práce               | Bakalářská                                    |
| Pracoviště              | Ústav lékařské chemie a biochemie, LF, UP     |
| Vedoucí práce           | Mgr. Alena Ryšavá, Ph.D.                      |
| Rok obhajoby práce      | 2024  |

### Abstrakt

Flavonoidy ze skupiny polyfenolových látek se vyznačují zejména antioxidačními a protizánětlivými účinky. Přírodní polyfenolové látky, často využívané v dermatologii, mohou vykazovat prooxidační vlastnosti, které mohou převážit nad prospěšnými účinky a při dlouhodobé aplikaci na kůži vyvolat nežádoucí změny. Předmětem bakalářské práce bylo studium vlivu flavonoidů taxifolinu a kvercetin na hladinu vybraných proteinů, jejichž exprese je ovlivněna transkripčním faktorem Nrf2. Protein Nrf2 může být aktivován jako odezva na změnu redoxní rovnováhy v buňkách. Taxifolin a kvercetin byly opakovaně aplikovány na zdravou lidskou kůži *ex vivo* po dobu 7 dní. Účinky studovaných látek na hladinu vybraných proteinů byly analyzovány pomocí western blot techniky s imunodetekcí po 24, 72 a 168 h. Na hladinu transkripčního faktoru Nrf2 a katalasy měl taxifolin a kvercetin největší účinek při opakované aplikaci po 3 dnech, zatímco na hladinu glutathion *S*-transferasy M1 a hemoxygenasy-1 měly látky největší účinek po 7 dnech. Data z pilotních experimentů nepotvrdily riziko spojené s opakovanou aplikací taxifolinu a kvercetin. Výsledky budou ověřeny dalšími experimenty na lidské kůži *ex vivo*.

|               |   |
|---------------|---|
| Klíčová slova | Lidská kůže <i>ex vivo</i> , transkripční faktor Nrf2, hemoxygenasa-1, glutathion <i>S</i> -transferasa, katalasa, taxifolin, kvercetin |
| Počet stran   | 43  |
| Počet příloh  | 0   |
| Jazyk         | Český   |

## Bibliographical identification

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Eva Svedková   |
| Title                          | The effect of polyphenols on the Nrf2 signaling pathway in skin                            |
| Type of thesis                 | Bachelor   |
| Department                     | Department of Medical Chemistry and Biochemistry,<br>Faculty of Medicine and Dentistry, UP |
| Supervisor                     | Mgr. Alena Ryšavá, Ph.D.   |
| The year of presentation       | 2024   |

### Abstract

Flavonoids as a subgroup of polyphenols are characterized by antioxidant and anti-inflammatory effects. Natural polyphenols, often used in dermatology, may exhibit pro-oxidant properties that may outweigh the beneficial effects when repeatedly applied to the skin. The bachelor thesis was focused on the effects of flavonoids taxifolin and quercetin on the level of selected proteins driven by transcription factor Nrf2, which is activated in response to changes in redox balance in cells. Taxifolin and quercetin were repeatedly applied to healthy human skin *ex vivo* for 7 days. The effects of the studied compounds on the levels of Nrf2 and Nrf2-controlled proteins were analyzed by western blot with immunodetection after 24, 72 and 168 h. The level of Nrf2 and catalase was most influenced by taxifolin and quercetin after 3 days, whereas glutathione *S*-transferase M1 and heme oxygenase-1 were more affected after 7 days. The risk associated with repeated application of taxifolin and quercetin did not confirm and the results will be verified by further experiments on human skin *ex vivo*.

|                      |  |
|----------------------|--|
| Keywords             | Human skin <i>ex vivo</i> , transkriční faktor Nrf2, heme oxygenase-1, glutathione <i>S</i> -transferase, catalase, taxifolin, quercetin |
| Number of pages      | 43   |
| Number of appendices | 0  |
| Language             | Czech  |

## Obsah

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>ÚVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....                         | <b>2</b>  |
| 2.1      | Struktura a funkce lidské kůže .....                                   | 2         |
| 2.1.1    | Pokožka .....  | 3         |
| 2.1.2    | Bazální vrstva.....  | 4         |
| 2.1.3    | Ostnitá vrstva .....   | 4         |
| 2.1.4    | Granulární vrstva.....   | 5         |
| 2.1.5    | Světlá vrstva .....  | 5         |
| 2.1.6    | Rohová vrstva .....  | 5         |
| 2.1.7    | Škára.....   | 6         |
| 2.1.8    | Podkožní vazivo .....  | 6         |
| 2.2      | Signální dráha Nrf2 v kůži .....                                       | 7         |
| 2.2.1    | Transkripční faktor Nrf2 .....   | 7         |
| 2.2.2    | Vybrané regulační proteiny transkripčního faktoru Nrf2 .....           | 11        |
| 2.2.2.1  | Protein Keap1 .....  | 11        |
| 2.2.2.2  | Fyn kinasa .....   | 12        |
| 2.2.2.3  | Transkripční faktor Bach1 .....  | 12        |
| 2.2.3    | Vybrané antioxidační a detoxikační enzymy regulované proteinem Nrf2 .. | 13        |
| 2.2.3.1  | Glutathion <i>S</i> -transferasa .....                                 | 13        |
| 2.2.3.2  | Hemoxygenasa-1 .....   | 14        |
| 2.2.3.3  | Katalasa .....   | 14        |
| 2.3      | Polyfenolové látky v dermatologii .....                                | 15        |
| 2.3.1    | Kvercetin .....  | 16        |
| 2.3.2    | Taxifolin .....  | 18        |
| <b>3</b> | <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....                                       | <b>19</b> |
| 3.1      | Biologický materiál .....  | 19        |
| 3.2      | Testované látky, chemikálie, přístroje a vybavení.....                 | 19        |
| 3.2.1    | Testované látky.....   | 19        |
| 3.2.2    | Chemikálie .....   | 19        |
| 3.2.3    | Roztoky .....  | 20        |
| 3.2.4    | Přístroje .....  | 22        |
| 3.2.5    | Ostatní vybavení.....  | 22        |
| 3.3      | Metody a pracovní postupy .....  | 22        |
| 3.3.1    | Příprava a kultivace lidských kožních explantátů .....                 | 22        |
| 3.3.2    | Aplikace testovaných látek .....                                       | 23        |
| 3.3.3    | Příprava homogenátů kožních explantátů .....                           | 23        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.4    | Stanovení koncentrace proteinů v homogenátech.....                                 | 23        |
| 3.3.5    | Příprava vzorků pro elektroforézu a western blot.....                              | 24        |
| 3.3.6    | Elektroforetická separace proteinů.....  | 24        |
| 3.3.7    | Western blot .....   | 25        |
| 3.3.8    | Imunodetekce .....   | 25        |
| 3.3.9    | Zpracování dat a statistické vyhodnocení .....                                     | 26        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY .....</b>  | <b>27</b> |
| 4.1      | Vliv opakované aplikace taxifolinu a kvercetinu na kožní tkáň <i>ex vivo</i> ..... | 27        |
| 4.1.1    | Stanovení hladiny transkripčního faktoru Nrf2.....                                 | 28        |
| 4.1.2    | Stanovení hladiny glutathion <i>S</i> -transferasy M1 .....                        | 29        |
| 4.1.3    | Stanovení hladiny hemoxygenasy-1 .....   | 30        |
| 4.1.4    | Stanovení hladiny katalasy.....  | 31        |
| <b>5</b> | <b>DISKUZE .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>6</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURA .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>8</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>                                     | <b>43</b> |

## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo sepsat literární rešerši zaměřenou na:

- charakterizaci struktury a funkce lidské kůže
- popis signální dráhy řízené transkripčním faktorem Nrf2
- charakterizaci vybraných proteinů kontrolovaných proteinem Nrf2
- shrnutí aktuálních poznatků o studovaných flavonoidech, taxifolinu a kvercetin, se vztahem k aplikaci v dermatologii

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo:

- vyhodnotit vliv opakované aplikace taxifolinu a kvercetin na vybrané parametry v lidských kožních explantátech
- porovnat účinek obou látek, taxifolinu a kvercetin
- diskutovat možné riziko spojené s opakovanou aplikací studovaných látek
- osvojit si techniku western blot



# 1 ÚVOD

Kůže představuje bariéru, která chrání tělo před mechanickým, chemickým a fyzikálním poškozením (Ryšavá et al., 2020). Poškození kůže může být vnitřního či vnějšího původu, které v obou případech může vyvolat nadměrný oxidační stres v kožních buňkách a hovoříme tedy o předčasném stárnutí kůže. Zvýšená míra oxidačního stresu, díky hromadění reaktivních forem kyslíku a elektrofilů má v kůži za následek zvýšení rizika výskytu kožních onemocnění a snížení integrity nebo fyziologické funkce kůže (Kammeyer & Luiten, 2015).

Aby kožní buňky odolávaly širokému spektru oxidačních a chemických činitelů, vyvinuly si adaptivní obranný systém skládající se z cytoprotektivních genů, jejichž produkty zajišťují adaptaci na různé stresory. Tyto cytoprotektivní geny obsahují antioxidační responzivní element ARE, jehož prostřednictvím dochází k modulaci transkripce vazbou transkripčního faktoru bazické domény a leucinového zipu Nrf2 (Ulasov et al., 2022). Bazální hladiny Nrf2 v buňkách jsou obvykle nízké za nestresových podmínek, a to vlivem ubikvitinace a proteazomální degradace zprostředkované regulačním proteinem Keap1. Během oxidačního stresu reagují elektrofilové a reaktivní formy kyslíku s cysteinovými zbytky Keap1, což umožní proteinu Nrf2 oddisociovat od Keap1 a translokovat se z cytosolu do jádra. V důsledku translokace se Nrf2 hromadí v jádře a aktivuje expresi cytoprotektivních genů včetně hemoxygenasy-1, katalasy a glutathion *S*-transferasy (He et al., 2020).

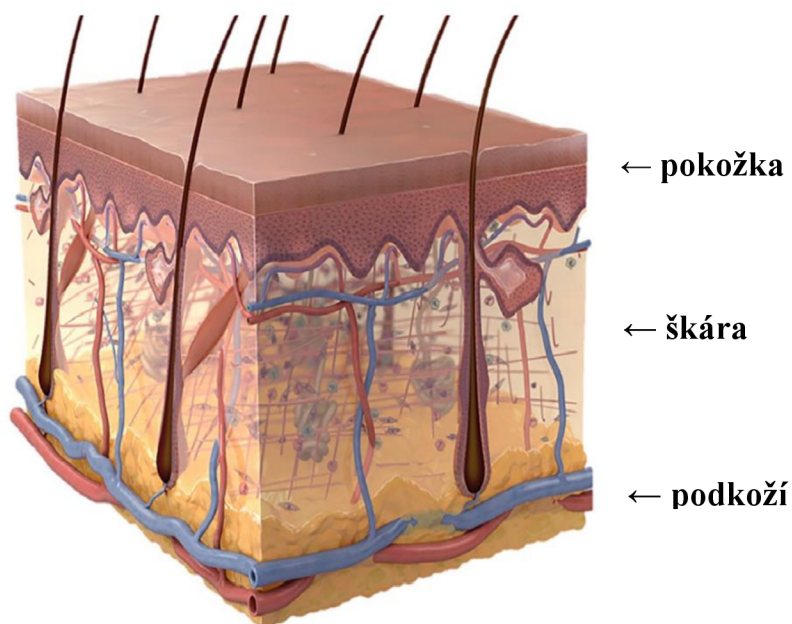
Pro podpoření ochranných mechanismů kožních buněk před oxidačním stresem přitahují stále větší pozornost přírodní flavonoidy ze skupiny polyfenolů. Flavonoidy jsou známé zejména pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti a staly se proto složkou několika dermatologických přípravků. Flavonoidy dokážou vázat kovy, vychytávat volné radikály nebo přispívat k posílení kožní bariéry. V některých případech je však jejich působení spojováno s prooxidační aktivitou (Procházková et al., 2011).

Bakalářská práce se zaměřuje na působení dvou vybraných flavonoidů, taxifolinu a kvercetinu, na hladinu proteinů signální dráhy transkripčního faktoru Nrf2. Kvercetin je flavonoid obsažený v různých druzích ovoce a zeleniny. Bylo zjištěno, že molekula kvercetinu má četné biologické účinky, mezi které patří antioxidační a protizánětlivé vlastnosti (Rajnochová Svobodová et al., 2022). Taxifolin, strukturně příbuzný flavonoid kvercetinu, je známý pro své silné antioxidační a antiradikálové vlastnosti. Taxifolin je ve větším množství obsažen v cibuli a ostropestřci (Míček et al., 2021).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Struktura a funkce lidské kůže

Celé lidské tělo je pokryto kůží, nejrozsáhlejším orgánem, který dosahuje plochy 1,2–2,3 m<sup>2</sup>. V závislosti na tělesné lokalizaci se kůže liší svou tloušťkou a obsahem přídatných kožních derivátů jako jsou vlasy, chlupy, kožní žlázy a nehty. Celková tloušťka kůže je až 4 mm. Její specifická stavba dovoluje kůži přizpůsobovat se pohybům těla nebo zvětšování objemu (otoky). Kůže je složena z pokožky, škáry a podkožního vaziva (Obr. 1). Jednotlivé vrstvy obsahují specifické buňky, které zajišťují potřebné funkce a vlastnosti kůže (Rajnochová Svobodová, 2012; Honari et al., 2017).

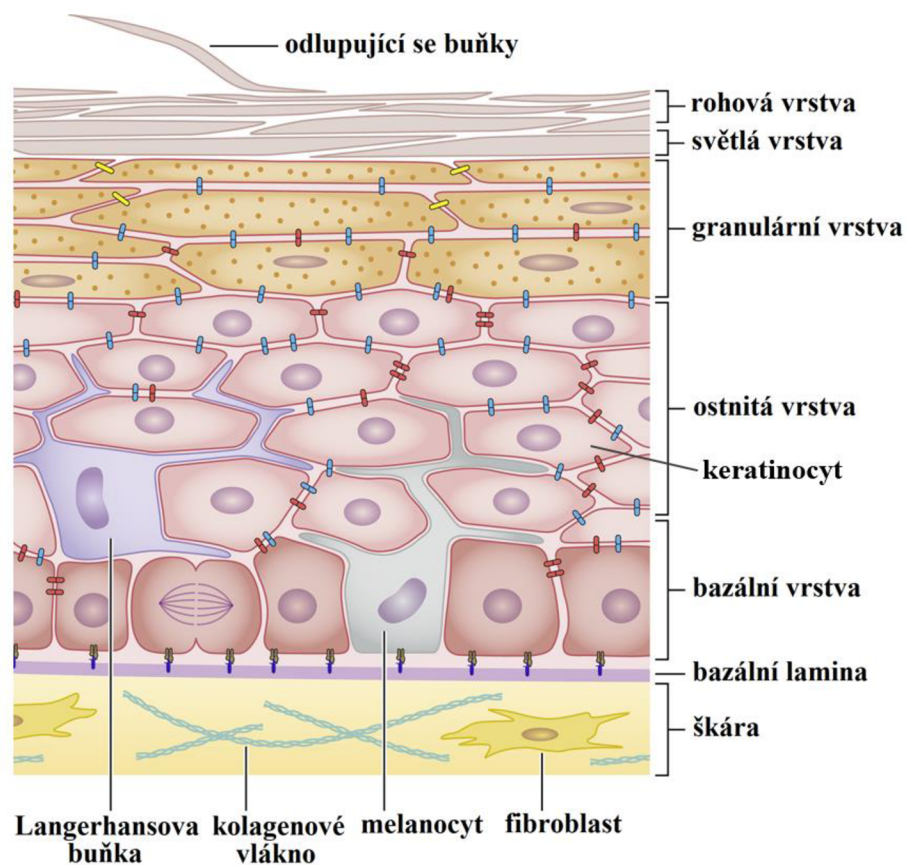


Obr. 1: Struktura lidské kůže. Upraveno podle Abdo et al., 2020.

### 2.1.1 Pokožka

Nejsvrchnější vrstvou kůže je pokožka (řec. epidermis), která přichází do přímého kontaktu s okolním prostředím. Díky obsahu lipidů (intracelulárně), ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin (extracelulárně), funguje pokožka jako bariéra propustnosti pro vodu. Důležitou funkcí pokožky je také tvorba antimikrobiální bariéry, protože je pokryta mírně kyselým filmem (pH 4–6), zároveň je chudá na určité živiny (organické látky) a umožňuje tak výskyt pouze některým druhům mikroorganismů (Ryšavá et al., 2021; de Szalay & Wertz, 2023). Pokožka neobsahuje cévy a je vyživována difúzí živin ze škály (viz kapitola 2.1.7). Kompletní obnova pokožky trvá průměrně 28 dní, délka regenerace je však proměnlivá podle věku a oblastí na těle (Rajnochová Svobodová, 2012).

Pokožka zahrnuje 4–5 vrstev buněk (Obr. 2) v závislosti na tělesné lokalizaci. Nejhlouběji uložená je bazální vrstva a dále směrem k povrchu je vrstva ostnitá, granulární, světlá a rohová (nejsvrchnější část pokožky). Vrstvy pokožky se navzájem liší morfologií nejhojněji zastoupených buněk, keratinocytů (Yousef et al., 2024).



Obr. 2: Vrstvy lidské pokožky. Upraveno podle Fuchs & Blau, 2020.

### 2.1.2 Bazální vrstva

Základní neboli bazální vrstva (lat. *stratum basale*) je nejnižší vrstva pokožky, kterou od škály odděluje bazální lamina. Bazální vrstva je tvořena jednou řadou bazofilních cylindrických nebo kubických keratinocytů s velkými jádry a tonofilamenty cytokeratinu. Přítomné buňky, nazývané jako bazální, můžeme také označit jako kmenové. Jsou mitoticky aktivní a neustále produkují nové keratinocyty, které jsou uspořádány kolmo na základní laminu (Kanitakis, 2001; Rajnochová Svobodová, 2012). Bazální keratinocyty mají schopnost zvýšit míru své replikace v období zánětu, nemoci nebo poranění. V bazální vrstvě se nachází i melanocyty, což jsou buňky s charakteristickými výběžky neboli dendrity pro kontaktování keratinocytů až za ostnitou vrstvou (Alabanna & Holmes IV, 2016). Melanocyty jsou zodpovědné za produkci pigmentu melaninu, a proto ovlivňují zbarvení kůže. Melanocyty dopravují pigment melanin do keratinocytů v podobě melaninových granulí, která se shromažďují kolem jádra a chrání DNA před škozením vlivem UV záření (Rajnochová Svobodová, 2012).

### 2.1.3 Ostnitá vrstva

Ostnitá vrstva (lat. *stratum spinosum*) je tvořena 5–10 řadami keratinocytů mnohoúhelníkového nebo mírně oploštělého tvaru, které mají tendenci se zvětšovat a zplošťovat ve směru k povrchu kůže. Přítomné keratinocyty obsahují takzvané ostny tvořené cytoplazmatickými výběžky. Ostny jsou vyplněny filamenti a desmosomy, kterými jsou v kontaktu s ostatními keratinocyty (Rajnochová Svobodová, 2012; Yousef et al., 2024). Tloušťka ostnité vrstvy, tedy i počet desmosomů a filament, je větší v oblastech těla, kde je kůže vystavena dlouhodobému tlaku a tření. Přítomné keratinocyty jsou rovněž mitoticky aktivní, ale v menší míře než v bazální vrstvě. V ostnité vrstvě se navíc nachází Langerhansovy buňky (LC), které mají hvězdicovitý tvar a laločnaté jádro. LC jsou mobilní dendritické buňky, které exprimují antigeny (Kanitakis, 2001; Yousef et al., 2024). Dalšími buňkami v ostnité vrstvě jsou Merkelovy buňky (MC), které mají funkci mechanoreceptorů, protože jsou úzce spjaty s filamenti kožních nervů a podílejí se na citlivosti kůže (Alabanna & Holmes, 2016).

#### **2.1.4 Granulární vrstva**

Tloušťka granulární vrstvy (lat. *stratum granulosum*) se pohybuje v rozmezí 1–2 mm (Barbieri et al., 2014). Granulární vrstva je složena ze 3–5 vrstev plochých mnohoúhelníkových keratinocytů, které zde začínají migrovat k povrchu kůže. Latinské pojmenování této vrstvy je podle silně bazofilních granulí obsažených v cytosolu keratinocytů. Granula jsou bohatá na protein keratohyalin, který je prekurzorem pro tvorbu keratinu (Rajnochová Svobodová, 2012). V granulární vrstvě dochází k postupné degradaci organel v keratinocytech (Losquadro, 2017). Keratinocyty v granulární vrstvě také uvolňují Odlandova tělíska (lamelární granula) a keratinozomy, které hrají roli při vytváření bariéry propustnosti pro vodu a usnadňují adhezi keratinocytů k rohové, případně světlé vrstvě (Barbieri et al., 2014).

#### **2.1.5 Světlá vrstva**

Na rohovou vrstvu v některých případech navazuje tenká a čirá vrstva, nazývaná jako světlá (lat. *stratum lucidum*). Tuto vrstvu tvoří dvě až tři řady extrémně oploštělých eosinofilních keratinocytů. Sousedící keratinocyty jsou opět spojeny desmozomy. Světlá vrstva je nejvýrazněji vyvinutá na dlaních a chodidlech. Úlohou světlé vrstvy je tvorba účinné kožní bariéry, která nepropouští vodu (Rajnochová Svobodová, 2012; Yousef et al., 2024).

#### **2.1.6 Rohová vrstva**

Rohová vrstva (lat. *stratum corneum*) je složena z keratinocytů, které jsou zcela zbaveny jader a organel. Přítomné keratinocyty se prodlužují a zplošťují a vytváří tak lamelární uspořádání buněk nazvaných korneocyty. Korneocyty jsou vyplněny nerozpustnými keratinovými proteiny, keratiny (Alabanna & Holmes, 2016). Po dokončení procesu keratinizace neboli rohovění (posun keratinocytů z bazální do rohové vrstvy za průběžného dozrávání keratinocytů až k buněčné smrti), korneocyty obsahují jen amorfní a fibrilární proteiny a silnější cytoplazmatické membrány. Korneocyty se vrství přibližně ve dvaceti řadách. Extracelulární matrix (ECM) je složena z lipidů (ceramidy tvoří až poloviční obsah mezibuněčné hmoty), cholesterolu (asi čtvrtina matrix) a volných mastných kyselin. Rohová vrstva má význam při propouštění látek přes kůži a při její obnově, neboť dochází k neustálé exfoliaci korneocytů z povrchu kůže. Na rozdíl od většiny vrstev pokožky a škáry, které spíše limitují prostup hydrofobních

látek, rohová vrstva zamezuje vstup látkám hydrofilním (Rajnochová Svobodová, 2012; Alabanna & Holmes, 2016).

### **2.1.7 Škára**

Prostřední vrstvou kůže je škára (řec. dermis), vrstva složená z vaziva, která zajišťuje zpevnění pokožky, její podporu a propojení s přilehlým podkožím. Tloušťka škáry se odvíjí od lokace na těle, pohybuje se okolo 1–4 mm (Kanitakis, 2001; Rajnochová Svobodová, 2012). Škára je vybavena sítí lymfatických a krevních cév, které zajišťují výživu a napomáhají správné termoregulaci těla. Ve škáře se nachází potní, mazové a pachové žlázy. Škára obsahuje vlasové folikuly, svazky buněk hladké svaloviny, nervy a nervová zakončení. K nervovým zakončením patří Meissnerova tělíska (receptory hmatu), Vater-Pacciniho tělíska (receptory tahu, tlaku a vibrací), Krauseho tělíska (receptory na chlad) a Ruffiniho tělíska (receptory na teplo) (Rajnochová Svobodová, 2012).

Ve škáře je možné rozlišit tenkou papilární vrstvu, která přiléhá na pokožku a má charakter pojivové tkáně. Pod papilární vrstvou je silnější retikulární vrstva, která obsahuje méně buněk a hustší pojivovou tkáň, díky přítomnosti kolagenových vláken (Yousef et al., 2024). V retikulární vrstvě je mezibuněčný prostor vyplněný vlákny proteoglykanů a glykoproteinů, mezi kterými se nachází žírné buňky a dendrocyty s imunologickou funkcí a zejména fibroblasty (Rajnochová Svobodová, 2012; Barbieri et al., 2014). Fibroblast je buňka protáhlého tvaru s oválným jádrem a velmi vyvinutým drsným endoplazmatickým retikulem. Díky němu fibroblasty syntetizují veškerá vlákna a složky ECM přítomné ve škáře, jako je například kolagen (Barbieri et al., 2014; Ryšavá et al., 2021). Fibroblasty hrají důležitou roli při hojení ran a regulaci proliferace keratinocytů (Rajnochová Svobodová, 2012; Barbieri et al., 2014).

### **2.1.8 Podkožní vazivo**

Podkožní vazivo (podkoží, řec. hypodermis) je nejhlubší vrstva kůže tvořená řídkým vazivem. Od škáry není podkožní vazivo jasně odděleno, zatímco od přilehlých orgánů je izolováno vazivovou blánou. K orgánům podkoží přiléhá volně, a proto se kůže může pohybovat (Rajnochová Svobodová, 2012).

Podkoží obsahuje adipocyty (tukové buňky), které poskytují izolaci před chladem, jsou zásobárnou energie a vitamínů rozpustných v tucích, a také fungují jako endokrinní orgán (Alabanna & Holmes, 2016). Specializované tukové buňky hromadí tuk, který ukládají mezi trámečky vaziva. Množství tuku je různé v závislosti na lokalizaci

(málo tuku se vyskytuje na nosu, ušních boltcích, očních víčkách) a výživě člověka (Rajnochová Svobodová, 2012).

## 2.2 Signální dráha Nrf2 v kůži

K potlačení škodlivých účinků exogenních činitelů si kožní buňky vyvinuly hierarchii sofistikovaných systémů složených ze senzoričtých a signalizačních mechanismů (Ryšavá et al., 2021). Jedná se o adaptivní ochranný systém skládající se z desítek cytoprotektivních genů, jejichž produkty zajišťují potlačení působení různých stresorů (Ulasov et al., 2022). Jednou z hlavních buněčných reakcí na působení činitelů s oxidačním charakterem je aktivace transkripčního faktoru Nrf2 (angl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2), který se váže na oblast DNA nazývanou antioxidační responzivní element (ARE) s následnou transkripcí genů zajišťujících ochranu buňky (Ryšavá et al., 2021; Ulasov et al., 2022).

### 2.2.1 Transkripční faktor Nrf2

Před oxidačním stresem chrání lidské kožní buňky, keratinocyty, fibroblasty i melanocyty, signální dráha aktivovaná transkripčním faktorem Nrf2 (Chen & Maltagliati, 2018).

Lidský protein Nrf2 tvoří 605 aminokyselin obsažených v sedmi funkčních doménách (Tu et al., 2019). Protein Nrf2 je kódován genem *NFE2L2* a patří do Cap'n'Collar (CNC) podrodiny transkripčních faktorů leucinového zipu (bZIP) (He et al., 2020). Do CNC podrodiny dále patří například transkripční faktory Nrf1 a Nrf3, pojmenované po proteinech vyskytujících se u rodu *Drosophila* a CNC homology 1 a 2 (Bach1 a Bach2) (Ahmad et al., 1998; Tonelli et al., 2018).

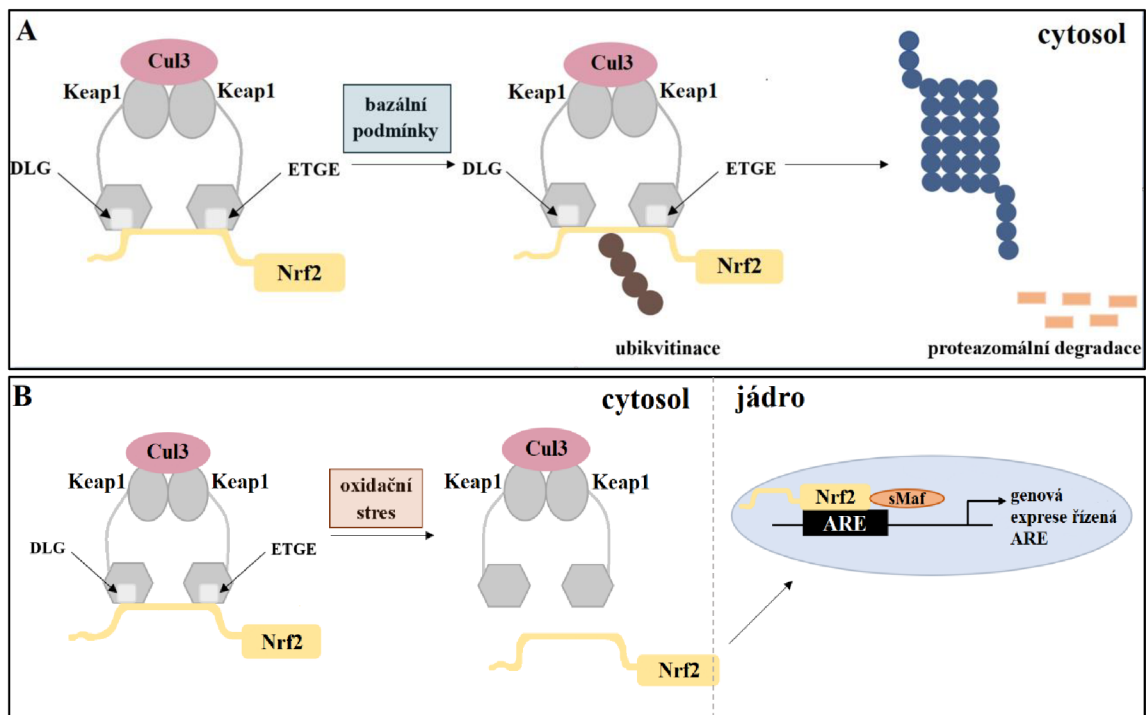
Nrf2 se skládá ze sedmi homologních domén Nrf2-ECH (Neh) s různými funkcemi pro kontrolu transkripční aktivity Nrf2 (He et al., 2020; Ryšavá et al., 2021). Doména Neh1 obsahuje oblast CNC-bZIP, která je nezbytná pro vazbu s DNA a asociaci Nrf2 s dimerizačními partnery či malými proteiny muskuloaponeurotického fibrosarkomu (sMaf) (Tonelli et al., 2018). Důležitou funkcí domény Neh1 je tvorba jaderného komplexu s enzymem *S*-ubikvitinyl-[E1 ubikvitin-aktivující]-L-cystein:[E2 ubikvitin-konjugující] ubikvitinyl transferasou (ubikvitin-konjugující enzym E2, EC 2.3.2.23) (Ahmed et al., 2017). bZIP v doméně Neh1 heterodimerizuje i s dalšími bZIP proteiny, aby rozpoznal oblast ARE pro aktivaci genové exprese (He et al., 2020; Ryšavá et al., 2021). Například heterodimer Bach1/Maf soutěží s heterodimerem Nrf2/Maf o vazbu na ARE, což vede k represi nebo aktivaci cílových genů za různých buněčných podmínek (Yu & Xiao, 2021). N-terminální doména Neh2 je vazebným

místem pro protein Kelch-like ECH-asociovaný protein 1 (Keap1), který inhibuje aktivitu proteinu Nrf2 (Ahmed et al., 2017; Tu et al., 2019). Keap1 se váže prostřednictvím sedm lysinových zbytků a stimuluje ubikvitinaci a následnou proteazomální degradaci Nrf2 (Tonelli et al., 2018). Domény Neh3, Neh4 a Neh5 interagují s intracelulárními koaktivátory a stimuluji transkripci cytoprotektivních genů jako je například protohem, NADPH-hemoprotein reduktasa: kyslík oxidoreduktasa (hemoxygenasa-1, HO-1, EC 1.14.14.18) (Ulasov et al., 2022; Esteras & Abramov, 2022). Absence C-terminální domény Neh3 ruší schopnost Nrf2 aktivovat genovou expresi zprostředkovanou ARE, přičemž zachovává neporušenou dimerizaci Nrf2 s Maf proteiny a schopnost vázat se na DNA (Ulasov et al., 2022). Doména Neh6 je oblast bohatá na serin a podílí se na negativní regulaci stability Nrf2 nezávisle na Keap1 prostřednictvím zvýšení ubikvitinace (Ryšavá et al., 2021; George et al., 2022). Doména Neh7 zprostředkovává interakci s retinoidním X receptorem alfa, který potlačuje aktivitu Nrf2 (He et al., 2020).

Aktivita a množství Nrf2 jsou přísně regulovány na transkripční, post-transkripční a post-translační úrovni (Tonelli et al., 2018). Nrf2 je produkován ve všech typech buněk a jeho bazální hladiny jsou obvykle nízké díky neustálé degradaci (He et al., 2020). Za nestresových podmínek je Nrf2 lokalizován v cytosolu a vytváří komplex s Keap1 (Ulasov et al., 2022). Na Keap1 se váže protein cullin3 (Cul3), vzniká funkční [E2 ubikvitin-konjugující]-S-ubikvitinyl-L-cystein:[Nrf2] ubikvitin transferasa (E3 ligasa, EC 2.3.2.27), která zprostředkovává ubikvitinaci Nrf2 a protein Nrf2 je následně degradován (Obr. 3A) (George et al., 2022). Za podmínek oxidačního stresu mohou být reaktivní SH-skupiny cysteinových zbytků Keap1 přímo oxidovány, což snižuje aktivitu ubikvitin E3 ligasy komplexu Keap1/Cul3 (inaktivace Keap1) a vede ke stabilizaci Nrf2, což má za následek translokaci Nrf2 do jádra (Obr. 3B) (Yamamoto et al., 2018). Protein Nrf2 je translokován z cytosolu do jádra pomocí cytosolického importinu, který je složen z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky (Ishii et al., 2023). Pro import Nrf2 do jádra jsou klíčové tři funkční motivy Nrf2, takzvané jaderné lokalizační signály (NLS) v doménách Neh1, Neh2 a Neh3. Podjednotka  $\alpha$  importinu rozpoznává a váže motivy NLS Nrf2 a podjednotka  $\beta$  zprostředkovává vazbu NLS na jadernou membránu, kde se vyskytuje energeticky závislá GTP fosfohydrolasa (GTPasa Ran, EC 3.6.5.2). Prostřednictvím GTPasy Ran následně Nrf2 prochází pórem jaderné membrány do jádra (Görlich et al., 1995). V jádře Nrf2 heterodimerizuje s jedním z malých proteinů Maf, komplex Nrf2/Maf se váže na ARE/EpRE (antioxidační nebo elektrofilní responzivní

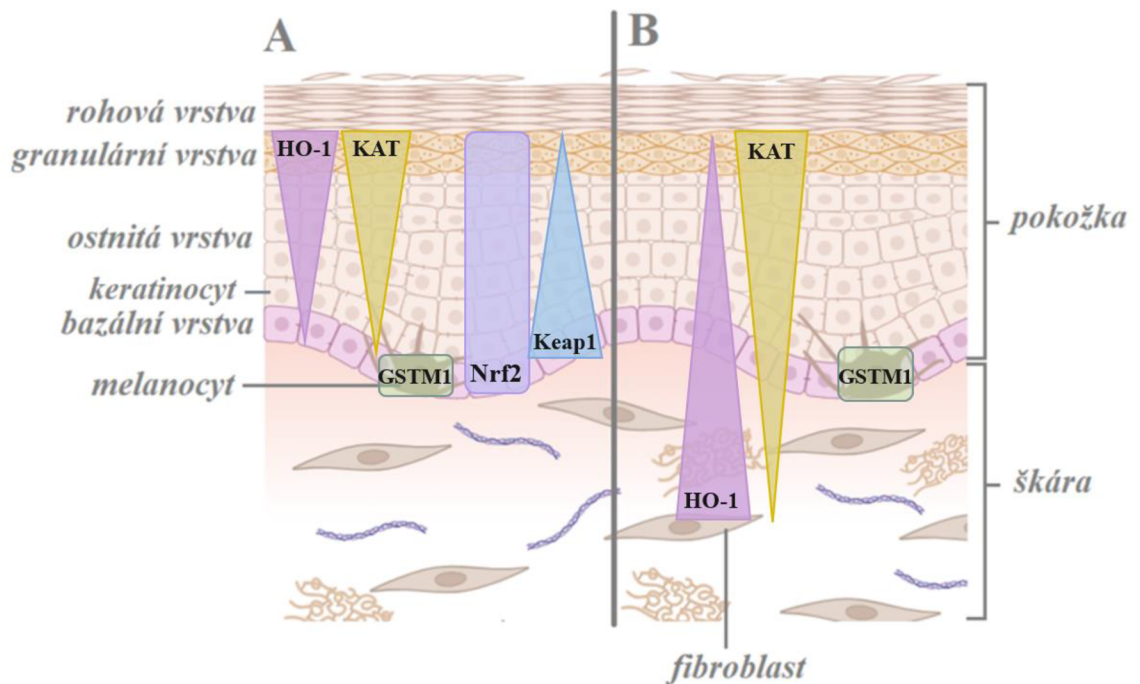


element) (Obr. 3B) a aktivuje expresi podřizovaných genů (kapitola 2.2.3) jako jsou NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NADPH dehydrogenasa 1, NQO1, EC 1.6.5.10), HO-1, peroxid vodíku:peroxid vodíku oxidoreduktasa (katalasa, KAT, EC 1.11.1.6), glutathion *S*-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) aj. (Obr. 3) (Yamamoto et al., 2018; Tonelli et al., 2018; Chen & Maltagliati, 2018).



Obr. 3: Regulace Nrf2 za bazálních podmínek a při oxidačním stresu v kožní buňce. Za bazálních podmínek (A) je Nrf2 prostřednictvím motivů DGL a ETGE navázán na regulační protein Keap1, což vede k ubikvitinaci zprostředkované Cul3 s následnou proteazomální degradací v cytosolu. Za podmínek oxidačního stresu (B) je protein Nrf2 stabilizován a translokují se z cytosolu do jádra, kde řídí expresi cílových genů.

Za bazálních podmínek je hladina exprese Nrf2 u jednotlivých buněk v kůži odlišná. U fibroblastů a melanocytů je přibližně dvakrát nižší než u keratinocytů (Ikehata & Yamamoto, 2018). V keratinocytech povrchových vrstev pokožky se vyskytuje vyšší hladina antioxidantních enzymů exprimovaných na základě aktivace Nrf2, protože přítomné keratinocyty jsou nejvíce vystavovány vnějším faktorům produkujícím ROS a ty mohou ovlivňovat proces stárnutí a diferenciaci keratinocytů (Gęgotek & Skrzydlewska, 2015). Z pohledu hlubších vrstev pokožky je syntéza Nrf2 od bazální ke granulární vrstvě rovnoměrná (Obr. 4) (Lee et al., 2014). Ve fibroblastech je aktivace Nrf2 klíčová v modulaci jejich diferenciaci, ochraně před fibrózou a při hojení ran (Gęgotek & Skrzydlewska, 2015).



Obr. 4: Hladiny proteinů regulovaných signální dráhou řízenou proteinem Nrf2 ve zdravé kůži (A) a kůži stárnoucí, vystavované oxidačnímu stresu (B). (A) Syntéza Nrf2 v pokožce zdravé kůže je od bazální ke granulární vrstvě stejná. Naproti tomu hladina proteinu Keap1 se snižuje směrem od bazální vrstvy pokožky k povrchu kůže, což má za následek vyšší míru translokace Nrf2 z cytosolu do jádra kvůli intenzivnějšímu vystavování vyšších vrstev pokožky oxidačnímu stresu. Zvýšená aktivace Nrf2 má pak za následek růst hladiny HO-1 a KAT se zvyšující se diferenciací keratinocytů v pokožce. Je vyznačena bazální hladina GSTM1 v melanocyту zdravé kůže. (B) Ve stárnoucí kůži opakovaně vystavované oxidačnímu stresu je enzym HO-1 ve větší míře exprimován v buňkách škóry (fibroblastech) ve srovnání s buňkami pokožky. Aktivita KAT se buňkách škóry snižuje a v buňkách pokožky narůstá. Po nahromadění ROS v buňce dochází ke zvýšení hladiny GSTM1 v melanocyту, což vede k jeho poškození. Upraveno podle Lorencini et al., 2014 v programu BioRender.com.

## 2.2.2 Vybrané regulační proteiny transkripčního faktoru Nrf2

Vzhledem k množství regulovaných procesů a podřízených genů je aktivita transkripčního faktoru Nrf2 regulována několika proteiny. Nejvýznamněji se uplatňuje Keap1, dále pak Bach1 a ATP:[Fyn]-L-tyrosin *O*-fosfotransferasa (Fyn kinasa, FynK, EC 2.7.10.2) (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

### 2.2.2.1 Protein Keap1

Lidský protein Keap1 tvoří 624 aminokyselin s bohatým výskytem cysteinu. Homodimerní Keap1 s povahou zinkového prstu je adaptérem pro komplex Cul3/RING-box 1 ubikvitin E3 ligasy (Tu et al., 2019; Esteras & Abramov, 2022). Keap1 byl identifikován jako Nrf2-vazebný protein prostřednictvím BTB domény v N-koncové oblasti, intervenující oblasti uprostřed a šesti Kelch proteinových motivů obsahující glycin v C-koncové oblasti (DGR) (George et al., 2022). Keap1 homodimerizuje prostřednictvím BTB domén během interakce s Cul3. Homodimerizace ponechává dvě Kelch domény volné a umožňuje interakci dvou molekul Keap1 s motivy DLG a ETGE náležící doméně Neh2 v Nrf2 (Obr. 3) (Chen & Maltagliati, 2018). Sekvence mezi motivy DLG a ETGE tvoří  $\alpha$ -šroubovici, ve které sedm lysinových zbytků na jedné straně šroubovice představují potenciální cíle pro ubikvitinaci. Nrf2 se tak váže ve správné orientaci a usnadňuje se ubikvitinace komplexem ubikvitin E3 ligasy závislé na Keap1 (Tonelli et al., 2018; Baird & Yamamoto, 2020).

Keap1 obsahuje vysoce reaktivní cysteinové zbytky, které působí jako senzory reagující na elektrofilní centra endogenních a exogenních ROS (Yu & Xiao, 2021). Působením oxidačních látek se motiv DLG v Nrf2 uvolňuje z domény DGR v Keap1, čímž zablokuje ubikvitinaci a degradaci Nrf2 (Bellezza et al., 2018). Za těchto stresových podmínek podléhají cysteinové zbytky kovalentní modifikaci, což umožní nově nasyntetizovanému Nrf2 obejít vazbu na Keap1, translokovat se do jádra a aktivovat genovou expresi závislou na ARE (Baird & Yamamoto, 2020). Nrf2 vazbou na ARE podpoří transkripci cytoprotektivních enzymů, včetně glutathionu (GSH), superoxid:superoxid oxidoreduktasy (superoxiddismutasy, SOD, EC 1.15.1.1), HO-1 a NQO1 (Li et al., 2022). Kromě regulace závislé na Keap1 může být Nrf2 fosforylován prostřednictvím UDP-glukosa:glykogen 4- $\alpha$ -D-glukosyltransferasy (kinasy glykogensynthasy 3, GSK-3 $\beta$ , EC 2.4.1.11) přes doménu Neh6 interakcí s proteinem  $\beta$ -TrCP, což vede k ubikvitinaci a následné proteazomální degradaci proteinu Nrf2 (Tu et al., 2019; Ryšavá et al., 2021).

Hladina proteinu Keap1 je nejvyšší v bazální a ostnitě vrstvě pokožky ve srovnání s vyššími vrstvami kůže. Z toho lze odvodit, že směrem k povrchu kůže roste míra translokace Nrf2 do jádra společně s diferenciací keratinocytů (Obr. 4A) (Lee et al., 2014).

Ve studii Wakabayashi et al. (2003) je popsána nepostradatelná role Keap1 s represorovou funkcí pro Nrf2. U myši s deficitem proteinu Keap1 byla pozorována nadměrná kumulace Nrf2 v jádrech keratinocytů, což vedlo k nadprodukcím cytoprotektivních enzymů a ovlivnění exprese diferenciacních genů, a to i bez vystavení keratinocytů oxidačnímu stresu. V důsledku nedostatku Keap1 v keratinocytech a korneocytech myši pokožky pozorovali abnormálně vysokou keratinizaci a kornifikaci v oblasti jícnu a předžaludku, což může vést ke vzniku obstrukce.

### **2.2.2.2 Fyn kinasa**

Enzym FynK patří do Src rodiny tyrosinkinás a ve srovnání s ostatními členy rodiny je exprimována ubikvitně. FynK se jako člen řady signálních drah účastní řízení široké škály procesů (Stephens et al., 2017). Mimo jiné působí FynK jako negativní regulátor Nrf2. V reakci na oxidační stres dochází k aktivaci enzymu GSK-3 $\beta$ , který fosforyluje FynK na threoninových zbytcích a fosforylovaná FynK je importována do jádra (Jain & Jaiswal, 2007). V jádře enzym fosforyluje Nrf2 v pozici tyrosinu 576, což stimuluje jaderný export transkripčního faktoru Nrf2 do cytosolu pomocí exportinu 1. V cytosolu je Nrf2 následně degradován proteazomem (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Culbreth et al., 2017; Ryšavá et al., 2021).

### **2.2.2.3 Transkripční faktor Bach1**

Protein Bach1 patří do rodiny transkripčních faktorů s motivem bZIP a reguluje kolísání hladin intracelulárního hemu (Silva-Palacios et al., 2018; Lignitto et al., 2019). Bach1 obsahuje 739 aminokyselin. V N-terminální oblasti proteinu Bach1 je lokalizovaná doména BTB/POZ, která funguje jako motiv pro interakci s proteiny, zatímco C-terminální doména bZIP se váže na DNA a zprostředkovává heterodimerizaci Bach1 s Maf proteinem (Zhang et al., 2018). Komplex Bach1/Maf působí jako transkripční represor proteinu Nrf2 a soutěží s heterodimerem Nrf2/Maf o vazebné místo ve stejném oblasti DNA (ARE) (Davudian et al., 2016; Silva-Palacios et al., 2018).

Bach1 obsahuje šest cystein-prolinových (CP) motivů. Při zvýšení hladiny hemu je protein Bach1 inaktivován interakcí se dvěma z CP motivů v blízkosti C-konce, přeruší se vazba proteinu Bach1 na DNA a dojde k indukci jeho exportu z jádra s následnou

ubikvitinací a proteazomální degradací. Jaderný export proteinu Bach1 může být spouštěn i kadmíem, které aktivuje cytoplazmaticky lokalizovaný signál umístěný na C-konci proteinu Bach1 (Zhang et al., 2018; Nishizawa et al., 2023). V reakci na oxidační stres se Nrf2 hromadí v jádře v důsledku inaktivace Keap1 a tehdy zvýšená hladina volného hemu podpoří degradaci proteinu Bach1 v proteazomu. Nrf2 následně dimerizuje s Maf a indukuje transkripci cílových genů včetně HO-1, která katabolizuje volný hem (Lignitto et al., 2019).

### **2.2.3 Vybrané antioxidační a detoxikační enzymy regulované proteinem Nrf2**

Protein Nrf2 reguluje expresi více než 500 cílových genů, které se podílí jak na metabolismu sacharidů, lipidů či hemu, tak na ochraně buněk a udržování redoxní rovnováhy (Ryšavá et al., 2021). Geny, jenž jsou řízené prostřednictvím proteinu Nrf2, obsahují ve svých promotorech sekvenci ARE (Chen & Maltagliati, 2018). Typickými příklady genů jsou HO-1, NQO1, KAT a GST a další enzymy metabolismu GSH (Chen & Maltagliati, 2018).

#### **2.2.3.1 Glutathion *S*-transferasa**

GST představují rodinu proteinů, které spadají do skupiny enzymů fáze II, které regulují toxické, mutagenní a neoplastické účinky karcinogenů katalýzou nukleofilní aromatické substituce, Michaelovy adice na  $\alpha$ - a  $\beta$ -nenasycené ketony nebo reakcí, při kterých dochází k otevírání epoxidových kruhů (Sheehan et al., 2001; Pool-Zobel et al., 2005). GST katalyzují redukci hydroperoxidů polynenasycených (linolových a arachidonových) mastných kyselin a fosfolipidů (Kalinina et al., 2014). GST používají při redukčních reakcích antioxidant GSH jako substrát za vzniku GSH konjugátu. Při zvýšení hladiny reaktivních elektrofilů se zvyšuje hladina GST zprostředkovaná aktivací transkripčního faktoru Nrf2 (Sau et al., 2010). Pokles bazální hladiny GSH může indikovat narušení buněčné redoxní rovnováhy a vyvolat změnu exprese redox-senzitivních genů GST (Kalinina et al., 2014).

Lidské cytosolární GST se dělí do sedmi tříd: Alfa, Mu, Pi, Omega, Theta, Zeta (Sau et al., 2010). GST jednotlivých tříd se od sebe liší velikostí a strukturou intronu/exonu (Townsend & Tew, 2003). Tato bakalářská práce je v experimentální části zaměřena na podjednotku M1 spadající do třídy Mu (GSTM1).

### 2.2.3.2 Hemoxygenasa-1

HO-1 je lokalizována v endoplazmatickém retikulu a zodpovídá za regulaci katabolismu hemu (Ulasov et al., 2022). HO-1 patří do rodiny proteinů teplotního šoku, protože je stimulována teplem, ale i mnoha dalšími podněty včetně UVA záření (Ryšavá et al., 2021). Poškození tkáně v důsledku působení ROS často způsobuje hemolýzu hemoproteinů, která má za následek akumulaci volného hemu (Chen & Maltagliati, 2018; Consoli et al., 2021). Degradace hemu má však za následek uvolnění  $Fe^{2+}$ , který se účastní Fentonovy reakce. Touto reakcí dochází k přeměně peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) na vysoce reaktivní hydroxylový radikál ( $OH\cdot$ ). Aby se zabránilo tvorbě  $OH\cdot$  ve spojení se zvýšenou expresí HO-1, Nrf2 indukuje expresi genů kódujících složky feritinového komplexu, který váže  $Fe^{3+}$  a ten se stává nedostupným pro Fentonovu reakci (Tonelli et al., 2018; Wang et al., 2022).

Při přeměně hemu pomocí HO-1 vzniká oxid uhelnatý (CO) a biliverdin (BV), který je poté redukován bilirubin:NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreduktasou (biliverdin reduktasou, EC 2.7.10.1) za účasti NADPH a molekulárního kyslíku. Výsledkem je produkce bilirubinu (BR) (Consoli et al., 2021). BV a BR jsou silné antioxidanty a přispívají k odstraňování ROS, zatímco CO má protizánětlivé a antiapoptotické účinky (Sherif, 2018). Zvýšenou expresí HO-1 prostřednictvím Nrf2 jsou regulovány další antioxidantní enzymy, jako je SOD, KAT a glutathion:peroxid vodíku oxidoreduktasa (glutathion peroxidasa EC 1.11.1.12). Tyto enzymy mohou rozkládat ROS v těle na vodu a molekulární kyslík či snižovat poškození vzniklé oxidačním stresem (Wang et al., 2022).

Bazální syntéza HO-1 v keratinocytech pokožky se zvyšuje s jejich rostoucí diferenciací a nejvyšší hladina HO-1 se nachází v granulózní vrstvě (Obr. 4A) (Numata et al., 2009). Po vystavení HO-1 lidské kůže oxidačnímu stresu dochází k aktivaci exprese HO-1 v dermálních fibroblastech a MC, zatímco v pokožce indukce syntézy HO-1 v reakci na ROS klesá (Obr. 4B) (Applegate et al., 1995; Ryšavá et al., 2020).

### 2.2.3.3 Katalasa

KAT je enzym nacházející se převážně v peroxizomech, který přeměňuje  $H_2O_2$  na vodu a kyslík.  $H_2O_2$  je pro buňky toxický, protože umožňuje tvořit další více reaktivní ROS, například hydroxylový radikál prostřednictvím Fentonovy reakce (viz kapitola 2.2.3.2) (Sies, 2017).

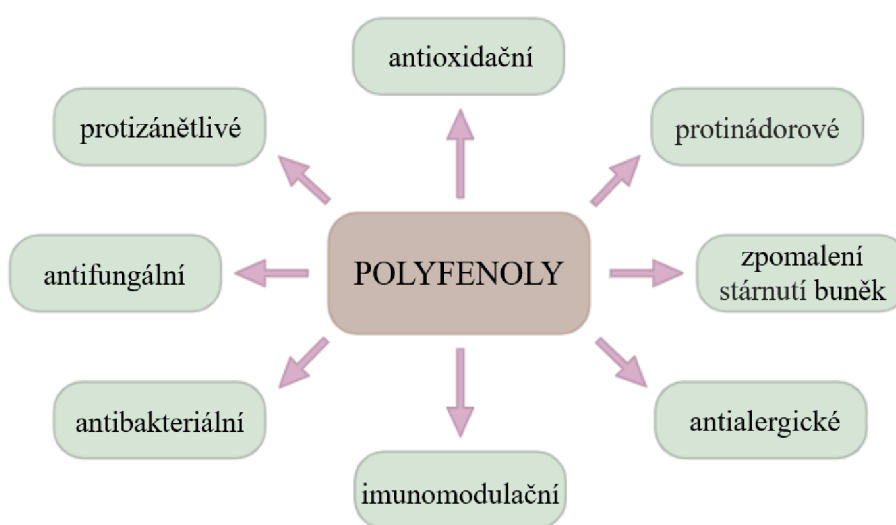
KAT se skládá ze čtyř identických podjednotek a každá podjednotka obsahuje čtyři odlišné domény a jednu prostetickou hemovou skupinu (Rinnerthaler et al., 2015).

Čtyři domény každé podjednotky KAT zahrnují N-koncové rameno, které obsahuje histidin (esenciální aminokyselinu pro katalasovou reakci); doménu  $\beta$ -barelu; spojovací doménu zahrnující tyrosinový zbytek, který váže hemovou skupinu a  $\alpha$ -helikální doménu pro vazbu NADPH (Glorieux & Calderon, 2017).

Hladina enzymu KAT ve zdravé kůži roste ve směru zvyšující se diferenciaci buněk v pokožce a je proto nejméně syntetizována v bazální vrstvě a nejvíce v povrchových vrstvách (Obr. 4A) (Piao et al., 2012). Během stárnutí kůže se aktivita KAT snižuje v oblasti škýry a v pokožce naopak roste z důvodu nadměrné produkce ROS (Obr. 4B) (Rinnerthaler et al., 2015).

### 2.3 Polyfenolové látky v dermatologii

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin hojně zastoupené v ovoci, zelenině, obilovinách a řadě dostupných nápojů. Příklady vysoce rozšířených nápojů bohatých na polyfenoly jsou víno, káva, kakao a čaj (Pérez-Jiménez et al., 2010). Polyfenoly jsou známé svými biologicky prospěšnými účinky pro člověka (Rajnochová Svobodová, 2012). Mají zejména protizánětlivé, antifungální, antialergické, antioxidační a protinádorové účinky (Obr. 5) (Donald et al., 2012). Silné antioxidační účinky polyfenolů souvisí s jejich schopností vyladit ROS a chelátovat vysoce redox-aktivní tranzitní kovy jako je  $\text{Fe}^{2+}$ , čímž brání ve Fentonově reakci a oxidačním poškození buněčných struktur (Phan et al., 2019). Z fyzikálně-chemických vlastností je významnou schopností polyfenolů absorbovat UV záření (Rajnochová Svobodová, 2012).



Obr. 5: Přehled účinků polyfenolových látek. Upraveno podle Cai et al., 2013.

Dosud bylo identifikováno přes 8 000 přírodních polyfenolových sloučenin charakteristických jedním strukturním znakem, kterým je aromatický kruh nesoucí alespoň dvě hydroxylové skupiny (Rajnochová Svobodová, 2012). Na základě povahy uhlíkatých skeletů jsou polyfenoly rozděleny do šesti kategorií: fenolové kyseliny a jejich deriváty, stílbeny, kurkuminoidy, lignany, taniny a flavonoidy (Phan et al., 2019). Flavonoidy jsou nejpočetnější skupinou polyfenolů. Jsou schopné vychytávat ROS přímým poskytnutím atomu vodíku. Antioxidační aktivita flavonoidů *in vitro* závisí na celkovém počtu i uspořádání hydroxylových skupin v základní struktuře. Flavonoidy rovněž působí jako induktory detoxikačních enzymů fáze II jako je například GST. Některé flavonoidy mají prooxidační vlastnosti, které však závisí na koncentraci látky (Procházková et al., 2011). Kvůli rostoucímu trendu nahrazování syntetických chemických látek přírodními sloučeninami, polyfenoly přitahují značnou pozornost pro jejich potenciální použití v dermatologických přípravcích (Rajnochová Svobodová et al., 2022). Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány a studovány dva flavonoidy, a to kvercetin a taxifolin.

### 2.3.1 Kvercetin

Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon, KV; Obr. 6) je jedním z nejrozšířenějších přírodních flavonoidů. KV je obsažen v běžně dostupné zelenině a ovoci (například v cibuli, listové zelenině, jablkách a citrusech), přičemž průměrný denní příjem je odhadován na 25 mg (Erden Inal et al., 2001; Anand David et al., 2016). KV se v rostlinách vyskytuje zejména ve formě glykosidu (Mukai et al., 2010).

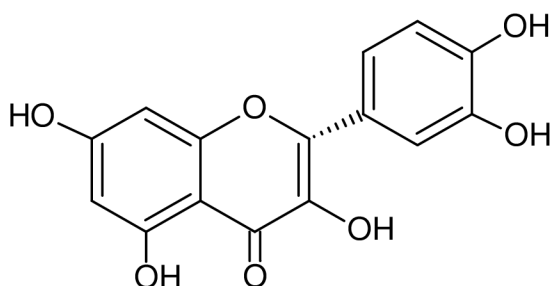
KV je žlutá krystalická látka špatně rozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v organických rozpouštědlech jako je ethanol nebo dimethylsulfoxid (DMSO). KV je syntetizován rostlinami metabolickou cestou vycházející z AMK fenylalaninu (Phe) a pro lidské tělo KV představuje esenciální flavonoid (lidské tělo si KV nedokáže samo syntetizovat) (Anand David et al., 2016; Singh et al., 2021).

Vedle dobře známých antioxidačních účinků KV popsali Lim & Kim (2007) schopnost KV inhibovat indukci matrix metaloproteinasy-1 (EC 3.4.24.7) v lidských dermálních fibroblastech, která přispívá k degradaci molekul kolagenu ve škáře. Schadich et al. (2016) popsali zvýšení hladiny transkripčního faktoru Nrf2 v buněčné linii keratinocytů HaCaT a fibroblastů BJ. KV má antioxidační vlastnosti a prostřednictvím vychytávání ROS snižuje oxidační stres vyvolaný například UVA zářením (Rajnochová Svobodová et al., 2022). KV také účinně inhibuje melanogenezi zprostředkovanou UVA zářením



v melanomových buňkách B16F10, což může být využito v potlačení hyperpigmentace kůže (Chaiprasongsuk et al., 2016).

Díky antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem se KV používá jako účinná složka kosmetických přípravků, a to buď jako čistá sloučenina, nebo rostlinný extrakt (ve směsi s jinými látkami). Některé studie však poukazují i na možný (foto)toxický účinek KV, který může souviset s jeho prooxidační aktivitou (Fahlman & Krol, 2009; Rajnochová Svobodová et al., 2022), což koreluje s rizikem převýšení ochranné schopnosti KV (Rajnochová Svobodová et al., 2022).



Obr. 6: Strukturální vzorec kvercetinu.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Biologický materiál

Vzorky kožní tkáň byly poskytnuty Oddělením Plastické a estetické chirurgie ve Fakultní nemocnici v Olomouci. Nadbytečná kůže byla odebrána z oblasti prsou zdravým dospělým ženám (18–60 let), které podstoupily redukční mammaplastiku v období roků 2021 až 2023 a podepsaly informovaný souhlas. Odběr a práce s lidskou kožní tkání byly provedeny se souhlasem a dle požadavků Etické komise Fakultní nemocnice v Olomouci a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (evidenční číslo 41/09).

### 3.2 Testované látky, chemikálie, přístroje a vybavení

#### 3.2.1 Testované látky

Taxifolin (TA; T4512; čistota  $\geq 90\%$ ), kvercetin (KV; Q4951;  $\geq 95\%$ ), DMSO a sulforafan (SFN; S6317;  $\geq 95\%$ ) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Sterilizace látek byla provedena pomocí UV záření v laminárním boxu. Následně byly TA, KV a SFN rozpuštěny v DMSO tak, aby koncentrace zásobního roztoku odpovídala  $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 3.2.2 Chemikálie

Primární protilátky: myší monoklonální anti-Nrf2 (EP1808Y) (Abcam, Velká Británie), persíran amonný (APS) (BioChemika Fluka, ČR), Trans-blot Turbo  $5\times$  Transfer Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA), primární protilátky: králičí monoklonální anti-GAPDH (D16H11) (Cell Signaling Technology, USA), projasňovací roztoky pro primární (A) a sekundární (B) protilátku SignalBoost<sup>TM</sup> Immunoreaction Enhancer kit (Calbiochem, USA), fetální hovězí sérum (FBS, HyCyclone<sup>TM</sup>) (Life Technologies s.r.o., ČR), směs akrylamidu a bisakrylamidu (40 %, v/v), dodecylsulfát sodný (SDS) (Merck s.r.o., ČR), methanol, isopropanol (Penta, ČR), fenoxypolyetoxyetanol (NP-40), tablety inhibitorů proteas (Roche Diagnostic, Německo), sušené odtučněné mléko (Samantha, ČR), luminol reagent ImmunoCruz<sup>TM</sup>, primární protilátky: králičí monoklonální anti-HO-1 (A-3, sc-13690), myší monoklonální anti-GSTM1 (1H4F2, sc-517262), myší monoklonální anti-KAT (H-9, sc-271803), myší monoklonální anti-Nrf2 (A-10, sc-365949),  $10\times$  Running Buffer, sekundární protilátky: kozí proti myší (sc-2005) a kozí proti králičí (sc-2004) konjugované s křenovou peroxidasou (HRP) (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), bovinní sérový albumin (BSA) (Serva, Německo), adenin, amfotericin B,

apotransferin, Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (DMEM) s obsahem glukosy 4,5 g/l a L-glutaminem, epidermální růstový faktor (EGF), hydrokortison, inzulin, kyselina octová, médium Ham F12 a směs živin pro médium Ham F12, NaCl, Ponceau S, stabilizovaný roztok penicilinu (10 000 U/ml) a streptomycinu (10 mg/ml), Tris-HCl, Tween-20<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, ČR), bromfenolová modř, dithiothreitol (DTT), ethanol (96%, v/v), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykol-bis(aminoether)-*N,N,N',N'*-tetraoctová kyselina (EGTA), fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), glycerol, glycin, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaF, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100 (Sigma-Aldrich nebo Lachner, ČR), BCA kit pro stanovení koncentrace proteinů, marker molekulové hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ČR).

### 3.2.3 Roztoky

*Roztoky pro kultivaci lidské kůže*

#### **Fosfátový pufr (PBS):**

Zásobní roztok PBS (10× ředěný): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,96 mmol·l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47 mmol·l<sup>-1</sup>), NaCl (137 mmol·l<sup>-1</sup>), KCl (2,68 mmol·l<sup>-1</sup>) a deionizovaná voda; pH 7,4; sterilizace autoklávem

Pracovní roztok PBS (1× ředěný): 10× zředěný zásobní roztok; sterilizace filtrací za použití 0,22μm filtru

**Roztok k odebrání a transportu kožní tkáně:** pracovní roztok PBS (1× ředěný) obohacený o antibiotika: amfotericin B (1,25 mg·ml<sup>-1</sup>), penicilin (500 U·ml<sup>-1</sup>), a streptomycin (500 mg·ml<sup>-1</sup>)

**Médium pro kultivaci kůže:** směs média DMEM a Ham F12 (3:1) s FBS (10 %; v/v), adenin (26,4 μg·ml<sup>-1</sup>), amfotericin B (0,25 μg·ml<sup>-1</sup>), EGF (1 ng·ml<sup>-1</sup>), hydrokortison (0,8 μg·ml<sup>-1</sup>), inzulin (0,12 U·ml<sup>-1</sup>), trijodtyronin (136 ng·ml<sup>-1</sup>) a apotransferin (0,25 μg·ml<sup>-1</sup>), směs živin pro médium Ham F12, stabilizovaný roztok penicilinu se streptomycinem (1 %; v/v)

**Experimentální médium:** médium DMEM, stabilizovaný roztok penicilinu se streptomycinem (1 %; v/v)

*Roztoky pro homogenizaci lidských kožních explantátů*

**Lyzační pufr:** Tris-HCl ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), NaCl ( $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), EGTA ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), EDTA ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), NaF ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), NP-40 (0,5 %), Triton X-100 (1 %), PMSF ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) rozpuštěný v ethanolu (96 %, v/v), 1 tableta inhibitorů proteas (Roche Diagnostics, Německo) na 50 ml lyzačního pufru; pH 7,4

*Roztoky pro stanovení proteinů*

**Roztok pro stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA):** směs činidel A a B smíchaných v poměru 50:1 (v/v) (Thermo Fisher Scientific, ČR)

**Standardní roztoky BSA:** 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,075; 0,0375; 0,01875  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v PBS

*Roztoky pro elektroforézu a western blot*

**4× ředěný separační pufr:** Tris-HCl ( $1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), pH 8,8

**4× ředěný zaostřovací pufr:** Tris-HCl ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), pH 6,8

**Migrační pufr:**

Zásobní roztok (10× ředěný): Running Buffer (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)

Pracovní roztok (1× ředěný): zásobní roztok (10× ředěný), deionizovaná voda

**10% roztok SDS:** SDS (10 %, m/v), deionizovaná voda

**10% roztok APS:** APS (10 %, m/v), deionizovaná voda

**Transferový (blotovací) pufr:**

Zásobní roztok (5× ředěný): Trans-Blot Turbo 5× Transfer Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA)

Pracovní roztok (1× ředěný): zásobní roztok (5× ředěný), ethanol (20 %, v/v), deionizovaná voda

**TBS pufr:**

Zásobní roztok (10× ředěný): Tris ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), NaCl (0,9 %, m/v), deionizovaná voda; pH 7,5

Pracovní roztok (1× ředěný): zásobní roztok (10× ředěný), deionizovaná voda

**TBS/T pufr:** pracovní roztok TBS, Tween-20 (0,1 %; v/v)

**5× vzorkový pufr:** zaostřovací pufr (10×), SDS ( $0,35 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), DTT ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), bromfenolová modř ( $0,746 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), glycerol (50 %, v/v), deionizovaná voda

*Roztoky pro imunodetekci*

**Ponceau S:** Ponceau S (0,1 %, m/v), kyselina octová (5 %, v/v), deionizovaná voda

**Blokovací pufr:** pracovní roztok TBS, Tween-20 (0,1 %; v/v)

**Blokovací pufr/BSA:** blokovací pufr, BSA (5 %, m/v)

**Blokovací pufr/mléko:** blokovací pufr, sušené odtučněné mléko (5 %, m/v)

**Luminol reagent:** směs činidel A a B smíchaných v poměru 1:1 (v/v)

### 3.2.4 Přístroje

Aparatura pro Mini Trans-Blot a zdroj napětí PowerPac Basic Power, aparatura pro SDS-PAGE elektroforézu Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell, transferový systém Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories, USA), třepačka ShakerRocker MR-12 (BioSan, Lotyšsko), centrifuga MiniSpin<sup>®</sup>, termomixér Comfort (Eppendorf, Německo), odsávací aparatura Aspiration Station (Gilson, USA), třepačka Duomax 1 030 (Heidolph, Německo), laboratorní homogenizátor Ultra-Turrax T 25 basic (IKA-Werke, Německo), laminární box MSC 9 (Jouan, Francie), laboratorní mikrolitrová centrifuga HERMLE Z 216 MK (LAB-MED s.r.o., ČR), Vortex Mixer (Labnet International, USA), ultrazvuková vodní lázeň PS 01000A s termostatem (NotusPowersonic, Slovensko), laboratorní váhy Laborator Sartorius typ 1205 MP8 (Sartalex, ČR), laboratorní váhy ACB 600 H (Schoeller instruments, ČR), spektrofotometr Infinite M200 Pro pro měření na mikrotitračních destičkách (Tecan, Rakousko), inkubátor Forma<sup>™</sup> Direct Heat, parní sterilizátor VARIOKLAVR (Thermo Scientific, USA), dokumentační systém Syngene G box Chemi XX6 (Avantor) (VWR International, USA).

### 3.2.5 Ostatní vybavení

Váleček (Bio-Rad Laboratories, USA), sterilní Petriho misky o průměru 10 cm, sterilní 6-jamkové kultivační desky, 96-jamkové mikrotitrační desky (Biotech, ČR), buničina, ubrousky (Dispolab, ČR), automatické pipety, jednorázové špičky, 1,5; 2; 10; 15ml Eppendorf zkumavky (Eppendorf, Německo), nůžky a pinzeta Extra Fine Graefe Forceps (Fine Science Tools, Heidelberg, Německo), 0,22µm filtr Millipore, polyvinylidendifluoridová membrána Immobilon<sup>®</sup>-P (Merck, ČR), gázy (Millipore, USA), filtrační papír Whatman (Whatman, USA).

## 3.3 Metody a pracovní postupy

### 3.3.1 Příprava a kultivace lidských kožních explantátů

Kůže byla během operace na operačním sále vložena do sterilního ledem chlazeného transportního roztoku (fosfátový pufr s antibiotiky), a poté byla v roztoku inkubována přibližně 1 h. Odebraná kožní tkáň byla následně třikrát promyta ve sterilním pracovním roztoku PBS v laminárním boxu. Kůže byla osušena a nastříhána na přibližně 1×1 cm

velké kousky, které byly následně naskládány do 6-jamkových kultivačních desek a ponechány na suchu 5 min, aby došlo k jejich přichycení na povrch desky. Poté byly kousky kůže zality nahřátým kultivačním kožním médiem pod jejich povrch. Inkubace fragmentů kůže probíhala ve zvlhčené atmosféře při 37 °C a za přítomnosti CO<sub>2</sub> (5 %, v/v) do druhého dne.

### 3.3.2 Aplikace testovaných látek

Zásobní roztoky TA a KV byly naředěny na výslednou koncentraci 5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  experimentálním médiem. SFN, který byl používán jako pozitivní kontrola byl naředěn na koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v DMSO a experimentálním médiu. Koncentrace DMSO v připravených roztocích odpovídala 0,5 % (v/v). Po odstranění kultivačního kožního média z desek byly na kožní explantáty nanесeny roztoky TA, KV a SFN v objemech 1,5 ml/jamku. Látky byly aplikovány paralelně na třech 6-jamkových deskách. Každá deska obsahovala TA a KV o dvou koncentracích (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a DMSO. Médium s látkami bylo měněno každých 24 h po dobu až 1 týdne. Experiment tak simuloval opakovanou několikadenní topickou aplikaci. Inkubace s látkami probíhala po dobu 24, 72 a 168 h při 37 °C. Po uplynutí příslušné doby inkubace bylo odstraněno médium a kožní explantáty byly opláchnuty sterilním PBS. Poté byly explantáty osušeny gázou a zamrazeny při -80 °C.

### 3.3.3 Příprava homogenátů kožních explantátů

**Princip:** Při mechanické homogenizaci kožních tkání mixérem dochází k rozrušení tkáně a uvolnění proteinů do lyzačního pufru. Z připravených homogenátů kůže se odstraní pevné součásti jako je vazivo pomocí centrifugace (Goldberg, 2008).

**Pracovní postup:** Vzorky kůže byly zváženy, nastříhány nůžkami na menší kousky a bylo k nim přidáno odpovídající množství vychlazeného lyzačního pufru, tak aby vznikl 10% homogenát (tj. na 0,1 g tkáně 1 ml pufru). Následně byly vzorky homogenizovány pomocí laboratorního mixéru. Homogenáty byly inkubovány (30 min na ledu) a centrifugovány (14 000 g; 20 min; 4 °C). Supernatant byl odpipetován do nových zkumavek a zamražen při -80 °C.

### 3.3.4 Stanovení koncentrace proteinů v homogenátech

**Princip:** Ke kvantifikaci proteinů ve vzorcích byla použita metoda využívající reakci s BCA. Reakcí peptidové vazby s CuSO<sub>4</sub> dochází k redukci iontů Cu<sup>II</sup> na Cu<sup>I</sup>. Sodná sůl BCA v alkalickém prostředí chelatuje vzniklé Cu<sup>I</sup> ionty a dochází ke vzniku zbarvení,

jehož intenzita je úměrná koncentraci obsažených proteinů. Intenzita zbarvení se měří při 562 nm (Olson, 2016).

**Pracovní postup:** Nejprve byla připravena kalibrační řada standardů BSA v pracovním roztoku PBS. Rozsah kalibrační řady činil 0,5–0,0078 mg·ml<sup>-1</sup>. Vzorky byly volně ponechány rozmraznout a poté byly naředěny 20× pracovním roztokem PBS. Standardy BSA a připravené vzorky byly napipetovány do 96-jamkové destičky v tripletech o objemu 10 µl/jamku. Jako blank byl použit pracovní roztok PBS. Činidlo pro stanovení bylo připraveno smícháním roztoku A (sodná sůl BCA v alkalickém prostředí) a B (CuSO<sub>4</sub>) v poměru 50:1 (dle instrukcí výrobce). Poté bylo 100 µl činidla napipetováno ke standardům a vzorkům. Po promíchání v termomixéru byly vzorky na destičce inkubovány (10 min; tma; 37 °C) a poté byla změřena absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí kalibrační křivky standardů v MS Excel.

### 3.3.5 Příprava vzorků pro elektroforézu a western blot

**Princip:** Pro SDS-PAGE elektroforézu je nutné připravit vzorky proteinů s nanášecím denaturačním vzorkovým pufrům. Jde o pufr obsahující zejména SDS pro udělení záporného náboje proteinům a methylenovou modř pro vizualizaci migrace proteinů v gelu při elektroforéze (Brunelle & Green, 2014).

**Pracovní postup:** Po stanovení koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byly vzorky naředěny vzorkovým pufrům v poměru 1:4 tak, aby daný obsah proteinu ve vzorku odpovídal 30 µg na jamku v gelu, kdy bylo odebráno 100 µl vzorku a k němu přidáno 25 µl vzorkového pufru. Následně byly vzorky denaturovány inkubací při 95 °C v termomixéru po dobu 5 min.

### 3.3.6 Elektroforetická separace proteinů

**Princip:** Metoda SDS-PAGE je elektroforéza provedená v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS. Proteiny jsou separovány na základě jejich molekulové hmotnosti. Po denuraci proteinů dochází k nekovalentnímu navázání SDS, který udělí molekulám proteinů celkový záporný náboj a záporně nabitě molekuly v gelu migrují ke kladné elektrodě (anodě) ve stejnosměrném elektrickém poli (Brunelle & Green, 2014).

**Pracovní postup:** Nejprve byly připraveny 10% polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm s 10 jamkami pro aplikaci vzorků. Pro diskontinuální elektroforézu bylo potřeba připravit gely ze dvou pufrů – separačního (dolního) a zaostřovacího (horního). Jako první byl připraven separační gel, který byl zalit vrstvou isopropanolu. Po zatuhnutí separačního gelu a odstranění isopropanolu byl připraven gel zaostřovací, který byl nalit



nad separační gel. Jamky pro nanesení vzorků byly vytvořeny pomocí hřebínku aplikovaného do zaostřovacího gelu.

Vzorky byly pozvolně rozmrazeny, zvortexovány a inkubovány při 37 °C v termobloku. Gely byly vloženy do elektroforetické aparatury, která byla naplněna migračním pufrem. Z gelů byly odstraněny hřebínky a do jamek byl postupně nanesen marker molekulové hmotnosti (5 µl) a jednotlivé vzorky ve vypočítaných objemech, tak aby bylo aplikováno 30 µg proteinů. Proud stejnosměrného napětí pro elektroforézu byl zvolen podle počtu gelů. Pro dva gely byl použit proud 20 mA v zaostřovacím gelu a 40 mA v separačním gelu.

### 3.3.7 Western blot

**Princip:** Metoda Western blot slouží k přenosu proteinů separovaných pomocí SDS-PAGE z gelu na odolnější PVDF membránu (Kurien & Scofield, 2006).

**Pracovní postup:** Membrány byly aktivovány methanolem a promyty transferovým pufrem. Pro přípravu takzvaně Blotovacího sendviče byly připraveny Watmenovy papíry a gázy, které byly namočené do transferového pufru. Sendvič pro přenos byl složen v následujícím pořadí: Watmenův papír – gázy – membrány – gely se separovanými proteiny – gázy – Watmenův papír. Z každé vrstvy byly odstraněny bubliny pomocí válečku. Sendvič byl uzavřen a vložen do přístroje Trans-Blot Turbo. Přenos proteinů na membránu probíhal 25 min při 15 °C s napětím 25 V a proudem 1 A.

Po přenosu byly membrány promyty v roztoku TBS/T. Vizualizace proteinů na membránách byla provedena pomocí jejich inkubace v roztoku barviva Ponceau S za mírného třepání po dobu 3 min. Nabarvené membrány byly usušeny a nastříhány na proužky podle velikosti cílového proteinu (dle markeru molekulové hmotnosti).

### 3.3.8 Imunodetekce

**Princip:** Detekce vybraných proteinů byla provedena za použití primární a sekundární protilátky. Primární protilátka je specifická vůči cílovému proteinu – antigenu a sekundární protilátka je specifická proti imunoglobulinům živočicha, ze kterého pochází primární protilátka. Sekundární protilátka obsahuje navázanou křenuvou peroxidasu, což je enzym, který rozkládá substrát používaný k detekci. Po specifické interakci antigen-protilátka je možné identifikovat cílový protein díky chemiluminiscenčnímu signálu, který je detekován autoradiografií (Ni et al., 2017).

**Pracovní postup:** Proužky membrán s jednotlivými proteiny byly hydratovány methanolem a promyty v TBS/T. Následně byly připraveny blokovací pufry – mléko nebo BSA (5 %, m/v) v TBS/T. Membrány umístěné v miskách na třepačce byly blokovány po dobu 2 h v příslušných blokovacích pufrech. Poté byly na membrány nanесeny specifické primární protilátky nařaděné v blokovacích pufrech (viz níže) a inkubace probíhala přes noc v chladu při 4 °C v uzavřených vlhčených komůrkách. Proteiny byly inkubovány s následujícími protilátkami s ředěním 1:1000 pro anti-GAPDH (37 kDa, mléko/TBS/T) nebo 1:500 pro anti-Nrf2 (100 nebo 61 kDa, projasňovací roztok), anti-GSTM1 (28 kDa, BSA/TBS/T), anti-KAT (64 kDa, BSA/TBS/T) a anti-HO-1 (32 kDa, BSA/TBS/T). Po inkubaci byly membrány promyty v TBS/T a byla nanесena sekundární protilátka v blokovacích pufrech o ředění 1:5000 v pufrech mléko/TBS/T (pro GAPDH), BSA/TBS/T (pro GSTM1, KAT a HO-1) a projasňovacím roztoku (pro Nrf2). Membrány byly inkubovány s příslušnou králičí nebo myší sekundární protilátkou (kapitola 3.2.2) po dobu 2 h při pokojové teplotě a později promyty v TBS/T. Pro detekci proteinů byl připraven substrát smícháním činidel A a B z detekčního kitu luminol reagent ImmunoCruz™ (luminol reagent ImmunoCruz™) v poměru 1:1. Substrát byl napipetován na membrány a chemiluminiscenční signál byl detekován pomocí systému Syngene G box Chemi XX6 (Avantor). Pro kvantifikaci proteinů byl použit Software pro denzitometrickou analýzu ImageJ (National Institutes of Health, USA).

### **3.3.9 Zpracování dat a statistické vyhodnocení**

Denzitometrická data získaná pro jednotlivé proteiny Nrf2, GSTM1, KAT, HO-1, a D-glyceraldehyd-3-fosfát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa (GAPDH, EC 1.2.1.13) z analýzy v programu ImageJ byla následně zpracována a hodnocena v programu MS Excel. Relativní hodnoty sledovaných proteinů byly normalizovány na hodnoty referenčního proteinu GAPDH. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako % negativní kontroly (DMSO). Získaná data jsou prezentována jako průměr ± SD. Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1. Pro statistické porovnání vzorků byl využit APA test s jednokrokovou ANOVOU. Test byl proveden ze tří nebo dvou nezávislých opakování na hladině významnosti ns 0,12; \*0,033; \*\*0,002; \*\*\*<0,001.

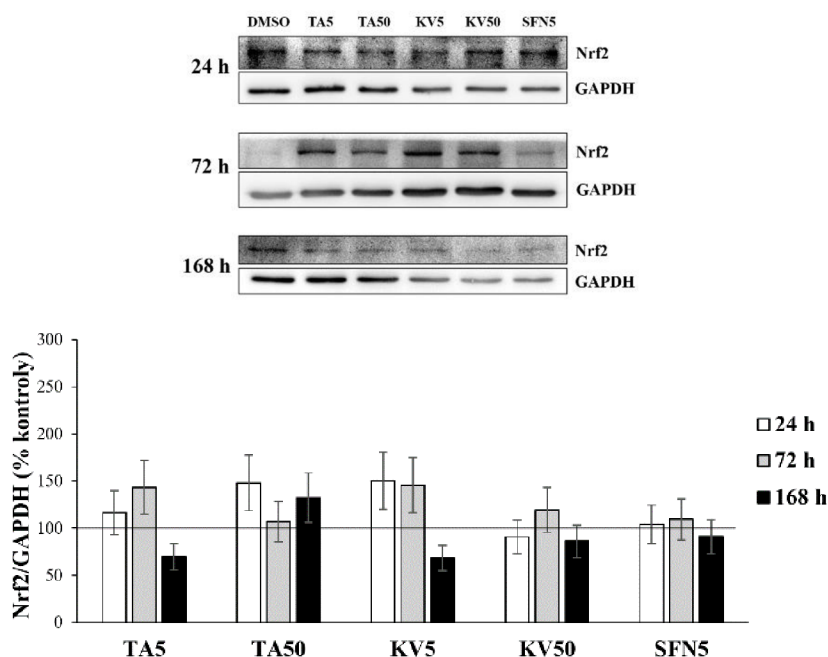
## **4 VÝSLEDKY**

### **4.1 Vliv opakované aplikace taxifolinu a kvercetinu na kožní tkáň *ex vivo***

Vzhledem k omezené živostnosti kožních explantátů, byla pro experiment zvolena maximální doba inkubace 7 dní, po kterou si tkáň zachovává viabilitu a další vlastnosti (Vostálová et al., 2019). Cílem experimentu bylo stanovit vliv vybraných polyfenolů na signální dráhu řízenou proteinem Nrf2, která má nejen důležité postavení v ochraně proti oxidačnímu stresu, ale také významně ovlivňuje fyziologické funkce kůže, zejména pokožku (Gęgotek & Skrzydlewska, 2015). Testované látky byly aplikovány na lidské kožní explantáty opakovaně každý den po dobu 7 dní. K posouzení účinku testovaných látek byly zvoleny cílové proteiny, jejichž exprese je kontrolována proteinem Nrf2 (Nrf2, GSTM1, HO-1, KAT) (Ryšavá et al., 2021).

### 4.1.1 Stanovení hladiny transkripčního faktoru Nrf2

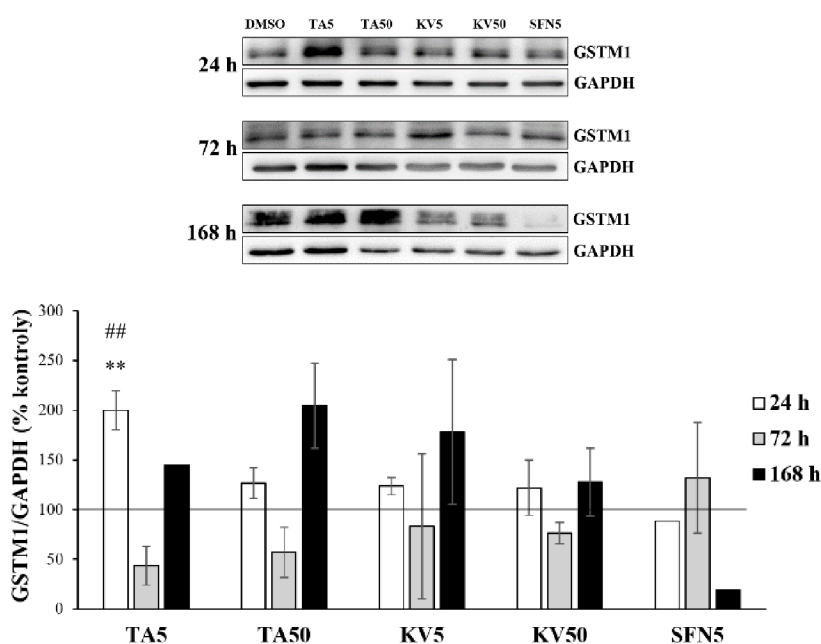
Vliv opakované aplikace flavonoidu TA a KV ve dvou zvolených koncentracích (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na hladinu transkripčního faktoru Nrf2 je znázorněn na Obr. 8. TA měl největší efekt na hladinu proteinu Nrf2 po 24h inkubaci v koncentraci 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 148 % negativní kontroly) – po 72 h v koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 143 % negativní kontroly). V případě 7-denní aplikace došlo ke snížení hladiny Nrf2 vlivem nižší koncentrace TA (~ 69 % negativní kontroly), ale k mírnému zvýšení vlivem vyšší koncentrace TA (~ 132 % negativní kontroly). U explantátů vystavených působení KV bylo patrné zvýšení proteinu Nrf2 u nižší testované koncentrace (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po 24 a 72 h ~ 145 a 155 % negativní kontroly. Po 7-denní aplikaci došlo naopak ke snížení hladiny Nrf2 proteinu na 68 % negativní kontroly u nižší koncentrace KV a na 86 % negativní kontroly u vyšší koncentrace KV. Vyšší koncentrace KV (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), stejně jako pozitivní kontrola SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) měly minimální vliv na hladinu proteinu Nrf2 v kožních explantátech ve všech sledovaných časových intervalech (Obr. 8).



Obr. 8: Efekt TA a KV na hladinu proteinu Nrf2 v lidských kožních explantátech. Hladina proteinu Nrf2 v kožních explantátech vystavených účinku TA a KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla stanovena pomocí Western blotu v časových intervalech 24, 72 a 168 h. SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) reprezentuje pozitivní kontrolu. Data byla normalizována na referenční protein GAPDH a vyjádřena jako % kontroly (explantáty vystavené působení DMSO (0,5 %; v/v)). Zobrazená data WB představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů (explantáty od 3 dárců). Výsledky v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická signifikance byla určena při  $p < 0,033$  (\*0,033; \*\*0,002; \*\*\* < 0,001). \* Signifikantní rozdíl od negativní kontroly (DMSO) a # signifikantní rozdíl od pozitivní kontroly (SFN).

### 4.1.2 Stanovení hladiny glutathion *S*-transferasy M1

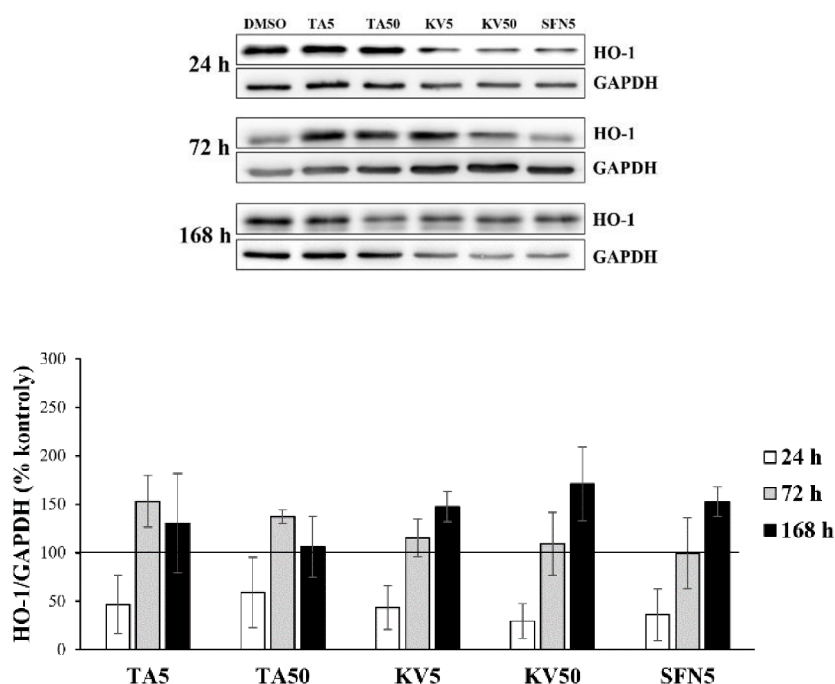
Vliv vybraných polyfenolů TA a KV na aktivaci enzymu GSTM1 je znázorněn na Obr. 9. U obou flavonoidů lze pozorovat stejný trend v účinku na hladinu GSTM1 v kožních explantátech. Nejprve TA a KV zvyšovaly hladiny GSTM1 po 24 h inkubaci; nejvyšší a signifikantní nárůst byl patrný po inkubaci s TA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 200 % negativní kontroly). Po 72 h aplikace došlo ke snížení hladiny u obou studovaných flavonoidů při obou koncentracích (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pokles byl výraznější u TA při 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 43 % negativní kontroly) a při 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 57 % negativní kontroly). V nejdelším časovém intervalu 168 h obě látky vyvolaly zvýšení hladiny proteinu, které bylo vyšší u TA při 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 204 % negativní kontroly) a KV při 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (~ 178 % negativní kontroly). V případě pozitivní kontroly SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byl pozorován opačný trend, kdy k mírnému nárůstu hladiny GSTM1 (~ 131 % negativní kontroly) došlo po 72 h a k poklesu po 24 a 168 h, přičemž v nejdelším časovém intervalu byl pokles velmi výrazný (~ 19 % negativní kontroly) (Obr. 9).



Obr. 9: Efekt TA a KV na hladinu proteinu GSTM1 v lidských kožních explantátech. Hladina proteinu GSTM1 v kožních explantátech vystavených účinku TA a KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla stanovena pomocí Western blotu v časových intervalech 24, 72 a 168 h. SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) reprezentuje pozitivní kontrolu. Data byla normalizována na referenční protein GAPDH a vyjádřena jako % kontroly (explantáty vystavené působení DMSO (0,5 %; v/v)). Zobrazená data WB představují reprezentativní výsledky ze dvou nezávislých experimentů (explantáty od 2 dárkyň). Výsledky v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze dvou nezávislých experimentů. Statistická signifikance byla určena při  $p < 0,033$  (\*0,033; \*\*0,002; \*\*\* < 0,001). \* Signifikantní rozdíl od negativní kontroly (DMSO) a # (signifikantní rozdíl od pozitivní kontroly (SFN)).

### 4.1.3 Stanovení hladiny hemoxygenasy-1

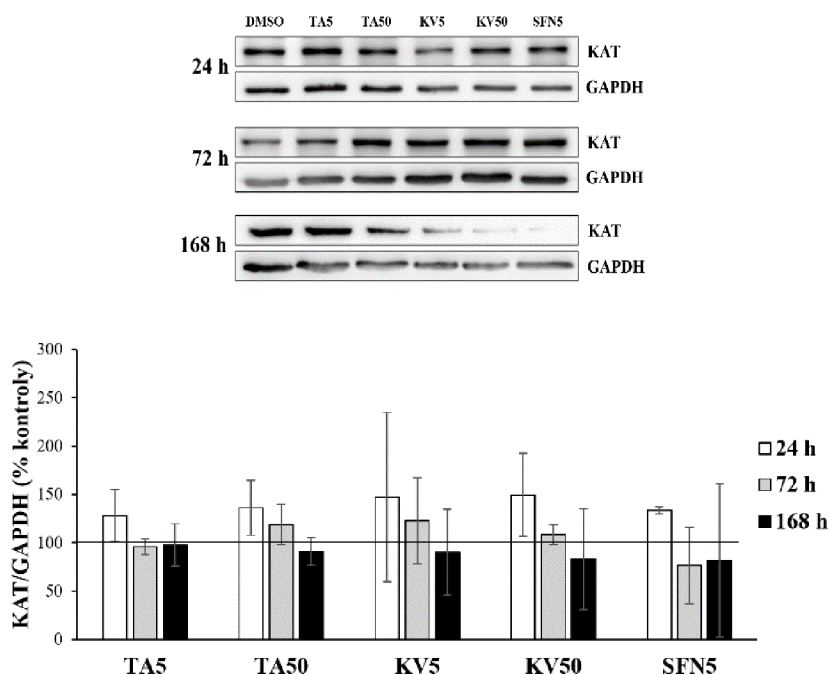
Ovlivnění hladiny HO-1 studovanými polyfenoly je znázorněno na Obr. 10. Z výsledků experimentů je zřejmé, že 24 h po aplikaci obou flavonoidů došlo k výraznému snížení hladiny proteinu HO-1 vůči kontrole (~ až 29 % negativní kontroly v případě 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KV). Obdobný efekt měl i SFN. Po 72 h aplikace došlo k nárůstu hladiny na úroveň negativní kontroly v případě KV i SFN, kdy u kožních explantátů vystavených působení TA byla hladina mírně zvýšená nad úroveň negativní kontroly u obou použitých koncentrací (~ 153 a 137 % negativní kontroly). Při nejdelší opakované aplikaci (168 h) KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zvyšoval hladinu HO-1 (~ 148 % a 171 % negativní kontroly). Stejný trend vykazoval i SFN (~ 153 % negativní kontroly) (Obr. 10).



Obr. 10: Efekt TA a KV na hladinu proteinu HO-1 v lidských kožních explantátech. Hladina proteinu HO-1 v kožních explantátech vystavených účinku TA a KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla stanovena pomocí Western blotu v časových intervalech 24, 72 a 168 h. SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) reprezentuje pozitivní kontrolu. Data byla normalizována na referenční protein GAPDH a vyjádřena jako % kontroly (explantáty vystavené působení DMSO (0,5 %; v/v)). Zobrazená data WB představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů (explantáty od 3 dárců). Výsledky v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická signifikance byla určena při  $p < 0,033$  (\*0,033; \*\*0,002; \*\*\*  $< 0,001$ ). \* Signifikantní rozdíl od negativní kontroly (DMSO) a # signifikantní rozdíl od pozitivní kontroly (SFN).

#### 4.1.4 Stanovení hladiny katalasy

Vliv testovaných flavonoidů na hladinu KAT je zobrazen na Obr. 11, kdy u TA i KV v obou použitých koncentracích je možné pozorovat stejný trend účinku na množství KAT v kožní tkáni *ex vivo*. Hladina KAT byla zvýšena po 24h inkubaci s TA, KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) až na 150 % negativní kontroly v případě koncentrovanějšího KV a i SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na hladinu 133 % negativní kontroly. V dalším časovém intervalu (72 h) hladina KAT klesala, v případě TA 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a KV 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla mírně zvýšená oproti negativní kontrole ( $\sim 119$  a 123 %) a u TA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a KV 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovala hladiny negativní kontroly. Po 168 h aplikaci byla hladina KAT srovnatelná s negativní kontrolou u explantátů vystavených působení TA, po aplikaci KV a SFN byla hladina proteinu nižší než v kontrolních tkáních ( $\sim 85$  % negativní kontroly) (Obr. 11).



Obr. 11: Efekt TA a KV na hladinu proteinu KAT v lidských kožních explantátech. Hladina proteinu KAT v kožních explantátech vystavených účinku TA a KV (5 a 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla stanovena pomocí Western blotu v časových intervalech 24, 72 a 168 h. SFN (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) reprezentuje pozitivní kontrolu. Data byla normalizována na referenční protein GAPDH a vyjádřena jako % kontroly (explantáty vystavené působení DMSO (0,5 %; v/v)). Zobrazená data WB představují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů (explantáty od 3 dárců). Výsledky v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická signifikance byla určena při  $p < 0,033$  (\*0,033; \*\*0,002; \*\*\*  $< 0,001$ ). \* Signifikantní rozdíl od negativní kontroly (DMSO) a # signifikantní rozdíl od pozitivní kontroly (SFN).

## 5 DISKUZE

Zdraví lidské kůže ovlivňuje řada faktorů. K poškození kožní tkáně, respektive kožních buněk (keratinocytů, fibroblastů a melanocytů), ale i složek ECM (kolagenu a elastinu), může přispívat oxidační stres (OS) vyvolaný nadměrnou produkcí ROS. Jednou ze strategií, které buňky využívají v boji proti OS, je aktivace transkripčního faktoru Nrf2. V důsledku zvýšené produkce ROS dochází k modifikaci redoxně citlivých molekul jako je například Keap1. Následkem oxidace sulfhydrylových skupin v proteinu Keap1 dochází k uvolnění Nrf2 z komplexu Nrf2/Keap1. Uvolněný protein Nrf2 se translokuje z cytosolu do jádra buňky, kde jako transkripční faktor aktivuje expresi cytoprotektivních, antioxidantních a detoxikačních proteinů (Ryšavá et al., 2020).

Jelikož lidská kůže poskytuje ochranu před působením environmentálních faktorů, nezbytnou pro život, je snahou odborníků z oblasti dermatologie a kosmetologie podporovat dlouhodobé zdraví kůže a chránit ji před poškozením vlivem vnějších faktorů. Z tohoto pohledu se v dermatologii jeví jako vhodné využití přírodních látek, které vykazují antioxidantní či protizánětlivé vlastnosti a podporují regeneraci kožní tkáně. Velkou skupinu fytochemikálií s těmito vlastnostmi představují polyfenoly. Mezi nejhojnější se vyskytující polyfenoly patří flavonoid KV. Tato molekula vykazuje široké spektrum biologických účinků například antioxidantních, antimikrobiálních, protizánětlivých aj., a proto je využívána nejen v dermatologii, což potvrzuje řada studií sledujících jeho účinky na kožní buňky a tkáň v *in vitro* i *in vivo* experimentech (de Lima Cherubim et al., 2020; Anand David et al., 2016; Casagrande et al., 2006; Rajnochová Svobodová et al., 2022). Podobně jako u KV, tak i u jeho derivátu TA bylo popsáno příznivé působení na kožní buňky (Liu et al., 2023).

TA, ale zejména KV jsou již prakticky využívány v dermatologických přípravcích, ať už pro běžnou péči (například toner od značky Mirra, <https://mirra.eu/>) nebo v přípravcích proti stárnutí nebo k ochraně proti účinkům UV záření (například krém od značky EltaMD, <https://www.dermstore.com/>). Vzhledem k tomu, že tyto přípravky jsou opakovaně a dlouhodobě aplikovány na kůži, je důležité ověřit bezpečnost složek přípravků. U KV byla popsána nestabilita, která je akcelerována UVA zářením. Z tohoto pohledu se jeví TA, který byl shledán (foto)stabilní, jako vhodnější pro dlouhodobé použití (Rajnochová Svobodová et al., 2017). U některých přírodních látek včetně KV (Zamanian et al., 2023) a TA (Liang et al., 2013; Kuang et al., 2017) byla popsána schopnost aktivovat signální dráhu řízenou transkripčním faktorem Nrf2. Bylo



ale rovněž popsáno, že dlouhodobá aktivace této signální dráhy farmakologicky nebo genetickým zásahem vyvolává řadu nežádoucích účinků v kožní tkáni, zejména v pokožce. Například u myši s opakovanou aplikací SFN a *tert*-butylhydrochinonu (2-krát denně, 10 dní) farmakologická aktivace Nrf2 vedla ke zhoršené deskvamaci kůže, křehkosti korneocytů, změnám v lipidové bariéře pokožky, zánětu a nadměrné expresi mitogenů, které vyvolaly hyperproliferaci keratinocytů, což se projevilo zesílením pokožky a hyperkeratózou (Schäfer et al., 2012). Z uvedených důvodů tato práce může přispět k posouzení vlivu opakované 7-denní aplikace vybraných polyfenolových látek TA a KV na lidské kožní explantáty. Jako pozitivní kontrola byl použit SFN, který po opakované aplikaci u myši vyvolal řadu nežádoucích změn (Schäfer et al., 2012).

Na modelu lidské kůže *ex vivo* opakovaná aplikace SFN nevedla ke zvýšení hladiny Nrf2 na rozdíl od dřívější studie provedené na myších (Schäfer et al., 2012). Tento rozdíl může souviset s podmínkami experimentu (*ex vivo* vs. *in vivo*), ale také s odlišnými vlastnostmi lidské a myši kůže. Vedle tloušťky pokožky (zejména rohové vrstvy), je to skutečnost, že v pokožce zdravé lidské kůže je hladina proteinu Nrf2 srovnatelná od bazální po granulózní vrstvu, zatímco v myši epidermis byl zjištěn gradient exprese a aktivity Nrf2 (Ryšavá et al., 2021). U studovaných flavonoidů byly změny v hladině Nrf2 malé (Obr. 8). Tomuto výsledku odpovídají také pouze mírné účinky TA a KV na vybrané proteiny řízené transkripčním faktorem Nrf2 (HO-1, KAT a GST). Na poslední jmenovaný protein byly účinky nejvyšší (Obr. 9). Podobně jako v našich experimentech aplikace TA na lidské fibroblasty jen mírně zvyšovala hladinu Nrf2 a měla minimální vliv na množství proteinu HO-1 i NQO1 (Ryšavá et. al., přípravený rukopis). Naproti tomu v jiné studii byl popsán výrazný efekt na translokaci proteinu Nrf2 do jádra při aplikaci KV a TA na lidské kožní fibroblasty a keratinocyty. U keratinocytů došlo ke zvýšení hladiny HO-1 i KAT. U fibroblastů bylo pozorováno zvýšení KAT po aplikaci KV, ale minimální vliv na HO-1 u obou flavonoidů (Rajnochová Svobodová et al., 2022).

Z dosud provedených experimentů se jeví efekt obou látek spíše mírný. Ale vzhledem k velké interindividuální variabilitě mezi dárkyněmi a malému počtu provedených experimentů ( $n = 3$ ) nelze zatím jednoznačně potvrdit nebo vyvrátit bezpečnost opakované aplikace KV a TA. Proto budou provedeny experimenty na explantátech od dalších dárkyň a studium bude rozšířeno o další proteiny, které se podílí na regulaci aktivity proteinu Nrf2 (například Keap1, Bach1, FynK), případně fosforylovanou formu proteinu Nrf2.

## 6 ZÁVĚR

TA a KV jsou pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti používány jako aktivní složky dermatologických přípravků, které při běžné péči opakovaně aplikujeme na pokožku. Kůže je současně vystavována různým stresorům způsobujícím OS v kožních buňkách. Některé studie naznačují, že polyfenolové látky mohou působit i prooxidačně, zejména ve vyšších koncentracích, a vyvolávat poškození kožních buněk či struktur. Z těchto důvodů byl studován účinek TA a KV na hladinu proteinu Nrf2, který je součástí buněčné signální dráhy reagující na redoxní změny, a dále na hladiny vybraných cílových proteinů (HO-1, KAT a GSTM1) této signální dráhy. Účinky obou flavonoidů byly sledovány v lidských kožních explantátech po 1-, 3- až 7-denní aplikaci. Z výsledků vyplynuly tyto závěry:

- Na hladinu proteinu Nrf2 měly TA a KV vliv již při aplikaci nižší testované koncentrace ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po 1 dni a při opakované aplikaci po 3 dnech. Při aplikaci po dobu 7 dní došlo ke snížení účinku flavonoidů ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na tento protein.
- Na protein GST měla opakovaná aplikace TA a KV ( $5$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) největší účinek po 7 dnech. Výjimkou bylo signifikantní zvýšení hladiny GST působením TA ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) již po 1 aplikaci (1 dni).
- Hladina proteinu HO-1 se zvýšila vlivem KV ( $5$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) po 7 dnech aplikace, na rozdíl od TA ( $5$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), který zvýšil hladinu proteinu HO-1 v kožních explantátech už po 3-denní aplikaci.
- Oba flavonoidy ( $5$  a  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zvýšily hladinu KAT nejvíce po 1 aplikaci a s opakováním aplikace se efekt látek snižoval.

Ze získaných pilotních výsledků není možné jednoznačně vyloučit ani potvrdit riziko spojené s opakovanou aplikací studovaných flavonoidů na lidskou kůži, zejména vzhledem k počtu opakování provedených experimentů. Pro stanovení rizika/bezpečnosti používání TA a KV v dermálních přípravcích bude potřeba opakovat experimenty na kožních tkáních od dalších dárkyň a doplnit studii o další proteiny, například regulační proteiny transkripčního faktoru Nrf2 jako je Keap1, Bach1 či FynK.

## 7 LITERATURA

- Abdo, J. M., Sopko, N. A., & Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Medicine*, 28, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>
- Ahmad, K. F., Engel, C. K., & Privé, G. G. (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12123–12128. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12123>
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Alabanna, M., & Holmes, H. J. I. (2016). *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (1st ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00850-7>
- Anand David, A., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Applegate, L. A., Noël, A., Vile, G., Frenk, E., & Tyrrell, R. M. (1995). Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. *Photochemistry and Photobiology*, 61(3), 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb03973.x>
- Baird, L., & Yamamoto, M. (2020). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13). <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
- Barbieri, J. S., Wanat, K., & Seykora, J. (2014). Skin: Basic Structure and Function. In *Pathobiology of Human Disease* (pp. 1134–1144). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2>
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(5), 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). *One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)* (pp. 151–159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., & Zhai, G. (2013). Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. *Current Medicinal Chemistry*, 20(20), 2572–2582. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990120>
- Casagrande, R., Georgetti, S. R., Verri, W. A., Dorta, D. J., dos Santos, A. C., & Fonseca, M. J. V. (2006). Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.01.006>
- Chaiprasongsuk, A., Onkoksoong, T., Pluemsamran, T., Limsaengurai, S., & Panich, U. (2016). Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses. *Redox Biology*, 8, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.006>
- Chen, Q. M., & Maltagliati, A. J. (2018). Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiological Genomics*, 50(2), 77–97. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00041.2017>

- Consoli, V., Sorrenti, V., Grosso, S., & Vanella, L. (2021). Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. *Biomolecules*, *11*(4), 589. <https://doi.org/10.3390/biom11040589>
- Culbreth, M., Zhang, Z., & Aschner, M. (2017). Methylmercury augments Nrf2 activity by downregulation of the Src family kinase Fyn. *NeuroToxicology*, *62*, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.07.028>
- Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., Samanta, A. K., & Roy, S. (2021). Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *142*, 112004. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112004>
- Davudian, S., Mansoori, B., Shajari, N., Mohammadi, A., & Baradaran, B. (2016). BACH1, the master regulator gene: A novel candidate target for cancer therapy. *Gene*, *588*(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.040>
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., & da Silva de Lucca, R. A. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *19*(1), 33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>
- de Szalay, S., & Wertz, P. W. (2023). Protective Barriers Provided by the Epidermis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3145. <https://doi.org/10.3390/ijms24043145>
- Diwakar, G., Rana, J., & Scholten, J. D. (2012). Inhibition of melanin production by a combination of Siberian larch and pomegranate fruit extracts. *Fitoterapia*, *83*(6), 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.06.004>
- Donald, G., Hertzner, K., & Eibl, G. (2012). Baicalein - An Intriguing Therapeutic Phytochemical in Pancreatic Cancer. *Current Drug Targets*, *13*(14), 1772–1776. <https://doi.org/10.2174/138945012804545470>
- Erden Inal, M., Kahraman, A., & Köken, T. (2001). Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clinical and Experimental Dermatology*, *26*(6), 536–539. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2001.00884.x>
- Esteras, N., & Abramov, A. Y. (2022). Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: Energy metabolism and beyond. *Free Radical Biology and Medicine*, *189*, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.013>
- Fahlman, B. M., & Krol, E. S. (2009). UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *97*(3), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.08.009>
- Fuchs, E., & Blau, H. M. (2020). Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 532–556. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.011>
- Gęgotek, A., Domingues, P., & Skrzydlewska, E. (2018). Proteins involved in the antioxidant and inflammatory response in rutin-treated human skin fibroblasts exposed to UVA or UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science*, *90*(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.02.002>
- Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2015). The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Archives of Dermatological Research*, *307*(5), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1554-2>
- George, M., Tharakan, M., Culberson, J., Reddy, A. P., & Reddy, P. H. (2022). Role of Nrf2 in aging, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, *82*, 101756. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101756>

- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- Goldberg, S. (2008). *Mechanical/Physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization* (pp. 3–22). [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_1)
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., & Laskey, R. A. (1995). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, 377(6546), 246–248. <https://doi.org/10.1038/377246a0>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- Honari, G., Andersen, R. M., & Maibach, H. (Eds.). (2017). *Sensitive Skin Syndrome*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315121048>
- Ikehata, H., & Yamamoto, M. (2018). Roles of the KEAP1-NRF2 system in mammalian skin exposed to UV radiation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 360, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.038>
- Ishii, T., Warabi, E., & Mann, G. E. (2023). Stress Activated MAP Kinases and Cyclin-Dependent Kinase 5 Mediate Nuclear Translocation of Nrf2 via Hsp90 $\alpha$ -Pin1-Dynein Motor Transport Machinery. *Antioxidants*, 12(2), 274. <https://doi.org/10.3390/antiox12020274>
- Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2007). GSK-3 $\beta$  Acts Upstream of Fyn Kinase in Regulation of Nuclear Export and Degradation of NF-E2 Related Factor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16502–16510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611336200>
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N., & Novichkova, M. D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
- Kammeyer, A., & Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001>
- Kanitakis, J. (2001). *John Libbey Eurotext - European Journal of Dermatology - Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. <https://www.researchgate.net/publication/11279803>
- Kuang, H., Tang, Z., Zhang, C., Wang, Z., Li, W., Yang, C., Wang, Q., Yang, B., & Kong, A.-N. (2017). Taxifolin Activates the Nrf2 Anti-Oxidative Stress Pathway in Mouse Skin Epidermal JB6 P+ Cells through Epigenetic Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1546. <https://doi.org/10.3390/ijms18071546>
- Kurien, B., & Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Lee, Y., Shin, J.-M., Jang, S., Choi, D.-K., Seo, M.-S., Kim, H.-R., Sohn, K.-C., Im, M., Seo, Y.-J., Lee, J.-H., & Kim, C.-D. (2014). Role of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in epidermal differentiation. *Archives of Dermatological Research*, 306(7), 677–682. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1470-x>

- Li, T., Geng, Z., Zhang, J., Xu, L., & Zhu, X. (2022). BP5 alleviates endotoxemia-induced acute lung injury by activating Nrf2 via dual regulation of the Keap1-Nrf2 interaction and the Akt (Ser473)/GSK3 $\beta$  (Ser9)/Fyn pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, *193*, 304–318. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.10.299>
- Liang, L., Gao, C., Luo, M., Wang, W., Zhao, C., Zu, Y., Efferth, T., & Fu, Y. (2013). Dihydroquercetin (DHQ) Induced HO-1 and NQO1 Expression against Oxidative Stress through the Nrf2-Dependent Antioxidant Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(11), 2755–2761. <https://doi.org/10.1021/jf304768p>
- Lignitto, L., LeBoeuf, S. E., Homer, H., Jiang, S., Askenazi, M., Karakousi, T. R., Pass, H. I., Bhutkar, A. J., Tsirigos, A., Ueberheide, B., Sayin, V. I., Papagiannakopoulos, T., & Pagano, M. (2019). Nrf2 Activation Promotes Lung Cancer Metastasis by Inhibiting the Degradation of Bach1. *Cell*, *178*(2), 316-329.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.003>
- Lim, H., & Kim, H. (2007). Inhibition of Mammalian Collagenase, Matrix Metalloproteinase-1, by Naturally-Occurring Flavonoids. *Planta Medica*, *73*(12), 1267–1274. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990220>
- Liu, Z., Qiu, D., Yang, T., Su, J., Liu, C., Su, X., Li, A., Sun, P., Li, J., Yan, L., Ding, C., & Zhang, S. (2023). Research Progress of Dihydroquercetin in the Treatment of Skin Diseases. *Molecules*, *28*(19), 6989. <https://doi.org/10.3390/molecules28196989>
- Lorencini, M., Brohem, C. A., Dieamant, G. C., Zanchin, N. I. T., & Maibach, H. I. (2014). Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews*, *15*, 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.002>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, *25*(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- Micek, I., Nawrot, J., Seraszek-Jaros, A., Jenerowicz, D., Schroeder, G., Spizewski, T., Suchan, A., Pawlaczyk, M., & Gornowicz-Porowska, J. (2021). Taxifolin as a Promising Ingredient of Cosmetics for Adult Skin. *Antioxidants*, *10*(10), 1625. <https://doi.org/10.3390/antiox10101625>
- Mukai, R., Nakao, R., Yamamoto, H., Nikawa, T., Takeda, E., & Terao, J. (2010). Quercetin Prevents Unloading-Derived Disused Muscle Atrophy by Attenuating the Induction of Ubiquitin Ligases in Tail-Suspension Mice. *Journal of Natural Products*, *73*(10), 1708–1710. <https://doi.org/10.1021/np100240y>
- Ni, D., Xu, P., & Gallagher, S. (2017). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Cell Biology*, *74*(1). <https://doi.org/10.1002/cpcb.18>
- Nishizawa, H., Yamanaka, M., & Igarashi, K. (2023). Ferroptosis: regulation by competition between NRF2 and BACH1 and propagation of the death signal. *The FEBS Journal*, *290*(7), 1688–1704. <https://doi.org/10.1111/febs.16382>
- Numata, I., Okuyama, R., Memezawa, A., Ito, Y., Takeda, K., Furuyama, K., Shibahara, S., & Aiba, S. (2009). Functional Expression of Heme Oxygenase-1 in Human Differentiated Epidermis and Its Regulation by Cytokines. *Journal of Investigative Dermatology*, *129*(11), 2594–2603. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.119>

- Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73(1). <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Pantouris, G., & Mowat, C. G. (2014). Antitumour agents as inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.037>
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4959–4969. <https://doi.org/10.1021/jf100128b>
- Phan, H., Samarat, K., Takamura, Y., Azo-Oussou, A., Nakazono, Y., & Vestergaard, M. (2019). Polyphenols Modulate Alzheimer's Amyloid Beta Aggregation in a Structure-Dependent Manner. *Nutrients*, 11(4), 756. <https://doi.org/10.3390/nu11040756>
- Piao, M. S., Park, J.-J., Choi, J.-Y., Lee, D.-H., Yun, S. J., Lee, J.-B., & Lee, S.-C. (2012). Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Archives of Dermatological Research*, 304(5), 387–395. <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1215-7>
- Pool-Zobel, B., Veeriah, S., & Böhmer, F.-D. (2005). Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens—focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1–2), 74–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.04.020>
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Rajnochová Svobodová, A. (2012). *Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence*. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Rajnochová Svobodová, A., Ryšavá, A., Čížková, K., Roubalová, L., Ulrichová, J., Vrba, J., Zálešák, B., & Vostálová, J. (2022). Effect of the flavonoids quercetin and taxifolin on UVA-induced damage to human primary skin keratinocytes and fibroblasts. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 21(1), 59–75. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00140-9>
- Rajnochová Svobodová, A., Ryšavá, A., Psotová, M., Kosina, P., Zálešák, B., Ulrichová, J., & Vostálová, J. (2017). The Phototoxic Potential of the Flavonoids, Taxifolin and Quercetin. *Photochemistry and Photobiology*, 93(5), 1240–1247. <https://doi.org/10.1111/php.12755>
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M., Trost, A., & Richter, K. (2015). Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules*, 5(2), 545–589. <https://doi.org/10.3390/biom5020545>
- Ryšavá, A., Čížková, K., Franková, J., Roubalová, L., Ulrichová, J., Vostálová, J., Vrba, J., Zálešák, B., & Rajnochová Svobodová, A. (2020). Effect of UVA radiation on the Nrf2 signalling pathway in human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 209, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111948>
- Ryšavá, A., Čížková, K., Valentová, K., Vostálová, J., Zálešák, B., Rajnochová Svobodová, A. Potential of silymarin and its polyphenols to affect Nrf2 signaling pathway in human skin cells in relation to their safety in dermal application. (přípravený rukopis).

- Ryšavá, A., Vostálová, J., & Rajnochová Svobodová, A. (2021). Effect of ultraviolet radiation on the Nrf2 signaling pathway in skin cells. *International Journal of Radiation Biology*, 97(10), 1383–1403. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1962566>
- Saito, S., Tanaka, M., Satoh-Asahara, N., Carare, R. O., & Ihara, M. (2021). Taxifolin: A Potential Therapeutic Agent for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643357>
- Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G., & Caccuri, A. M. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.012>
- Schäfer, M., Farwanah, H., Willrodt, A., Huebner, A. J., Sandhoff, K., Roop, D., Hohl, D., Bloch, W., & Werner, S. (2012). Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Molecular Medicine*, 4(5), 364–379. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200219>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Sherif, I. O. (2018). The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway. *International Immunopharmacology*, 61, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.007>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Zazueta, C., & Königsberg, M. (2018). Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing Research Reviews*, 47, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.06.003>
- Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A., & Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
- Stephens, G. S., You, J., Fu, C.-H., & Chin, J. (2017). Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity and Memory and Their Dysfunction in Alzheimer's Disease. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (pp. 65–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21126-7>
- Thuan, N. H., Shrestha, A., Trung, N. T., Tatipamula, V. B., Van Cuong, D., Canh, N. X., Van Giang, N., Kim, T., Sohng, J. K., & Dhakal, D. (2022). Advances in biochemistry and the biotechnological production of taxifolin and its derivatives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 848–861. <https://doi.org/10.1002/bab.2156>
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Topal, F., Nar, M., Gocer, H., Kalin, P., Kocyigit, U. M., Gülçin, İ., & Alwasel, S. H. (2016). Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(4), 674–683. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1057723>



- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q., & Sha, H. (2019). The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in-Chronic Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 637. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0513>
- Turck, D., Bresson, J., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K. I., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Neuhäuser-Berthold, M., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Vinceti, M., ... Van Loveren, H. (2017). Scientific Opinion on taxifolin-rich extract from Dahurian Larch (*Larix gmelinii*). *EFSA Journal*, 15(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4682>
- Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., & Sobolev, A. S. (2022). Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sciences*, 291, 120111. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120111>
- Verhoeven, M. E. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2099–2106. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf044>
- Vostálová, J., Galandáková, A., Zálešák, B., Lichnovská, R., Čížková, K., Ulrichová, J., & Rajnochová Svobodová, A. (2019). Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants. *Journal of Applied Toxicology*, 39(5), 773–782. <https://doi.org/10.1002/jat.3766>
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., Harada, T., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature Genetics*, 35(3), 238–245. <https://doi.org/10.1038/ng1248>
- Wang, L., Zhang, X., Xiong, X., Zhu, H., Chen, R., Zhang, S., Chen, G., & Jian, Z. (2022). Nrf2 Regulates Oxidative Stress and Its Role in Cerebral Ischemic Stroke. *Antioxidants*, 11(12), 2377. <https://doi.org/10.3390/antiox11122377>
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiological Reviews*, 98(3), 1169–1203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017>
- Yousef, H., Alhaji, M., & Sharma, S. (2024). *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls Publishing LLC.
- Yu, C., & Xiao, J.-H. (2021). The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/6635460>
- Zamanian, M. Y., Soltani, A., Khodarahmi, Z., Alameri, A. A., Alwan, A. M. R., Ramírez-Coronel, A. A., Obaid, R. F., Abosaooda, M., Heidari, M., Golmohammadi, M., & Anoush, M. (2023). Targeting Nrf2 signaling pathway by quercetin in the prevention and treatment of neurological disorders: An overview and update on new developments. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 37(6), 1050–1064. <https://doi.org/10.1111/fcp.12926>

- Zhang, J., Zheng, Y., Hong, B., Ma, L., Zhao, Y., Zhang, S., Sun, S., Ding, Q., Wang, Y., Liu, W., & Ding, C. (2022). Dihydroquercetin composite nanofibrous membrane prevents UVA radiation-mediated inflammation, apoptosis and oxidative stress by modulating MAPKs/Nrf2 signaling in human epidermal keratinocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113727. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113727>
- Zhang, X., Guo, J., Wei, X., Niu, C., Jia, M., Li, Q., & Meng, D. (2018). Bach1: Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/1347969>
- Mirra.eu. <https://mirra.eu/en/dry-skin/101-gel-toner-with-antioxidant-complex-and-rosewort-rhodiola-rosea.html> (23. 4. 2024).
- Dermstore. <https://www.dermstore.com/eltamd-uv-physical-broad-spectrum-spf41/11370298.html> (23. 4. 2024).

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

|               |   |
|---------------|---|
| ARE           | Antioxidační responzivní element                                      |
| Bach1         | Transkripční faktor patřící do CNC-podrodiny                          |
| Bach2         | Transkripční faktor patřící do CNC-podrodiny                          |
| BCA           | Bicinchoninová kyselina   |
| BR            | Biliverdin  |
| BTB           | Broad komplex, Tramtrack, Brick-a-brack                               |
| BV            | Bilirubin   |
| bZIP          | Strukturní motiv leucinového zipu                                     |
| CNC           | Podrodina transkripčních faktorů Cap'n'Collar                         |
| Cul3          | Ubikvitin E3 ligasa (cullin3)   |
| DGR           | Kelch doména na C-konci proteinu Keap1                                |
| DLG           | Motiv náležící doméně Neh2 v Nrf2 (pro vazbu Keap1)                   |
| DMEM          | Dulbeccem modifikované Eaglovo médium                                 |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid  |
| DTT           | Dithiothreitol  |
| ECM           | Extracelulární matrix   |
| EGTA          | Ethylenglykol-bis(aminoether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová kyselina |
| EGF           | Epidermální růstový faktor  |
| ETGE          | Motiv náležící doméně Neh2 v Nrf2 (pro vazbu Keap1)                   |
| FBS           | Fetální hovězí sérum  |
| FynK          | Fyn kinasa  |
| GAPDH         | Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa                                   |
| GSH           | Redukovaný glutathion   |
| GSK-3 $\beta$ | Kinasa glykogensynthasy 3   |
| GST           | Glutathion <i>S</i> -transferasa                                      |
| GSTM1         | Glutathion <i>S</i> -transferasa (podjednotka M1 třídy Mu)            |
| HO-1          | Hemoxygenasa-1  |
| KAT           | Katalasa  |
| Keap1         | Kelch-like ECH-asociovaný protein 1                                   |
| KV            | Kvercetin   |
| LC            | Langerhansovy buňky   |
| MC            | Merkelovy buňky   |
| Neh           | Homologní domény Nrf2-ECH   |
| Nrf           | Rodina jaderných transkripčních faktorů                               |
| NLS           | Jaderné lokalizační signály v doménách proteinu Nrf2                  |
| NQO1          | NAD(P)H chinonoxidoreduktasa 1  |
| OS            | Oxidační stres  |
| PBS           | Fosfátový pufr  |
| POZ           | Poxvirus zinkový prst   |
| RNS           | Reaktivní formy dusíku  |
| ROS           | Reaktivní formy kyslíku   |
| SFN           | Sulforafan  |
| sMaf          | Malé proteiny muskuloaponeurotického fibrosakromu                     |
| SOD           | Superoxiddismutasa  |
| $\beta$ -TrCP | Protein $\beta$ -transducinu z komplexu ubikvitinligasy E3            |
| TA            | Taxifolin   |
| WB            | Western blot  |