

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2022**

**Zuzana Petrželková**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fotoprotektivní účinky přírodních látek a jejich  
derivátů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Zuzana Petrželková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Jitka Vostálová Ph.D.</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 .....

### Poděkování

Předně bych ráda poděkovala paní doc. RNDr. Jitce Vostálové Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále děkuji paní prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. a panu prof. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph. D. za možnost vypracovat experimentální část práce na Ústavu lékařské chemie a biochemie a za finanční podporu grantu IGA\_LF\_2022\_025. V neposlední řadě děkuji doc. Mgr. Lucii Plíhalové, Ph.D. za poskytnuté látky k testování.



## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Petrželková
Název práce	Fotoprotektivní účinky přírodních látek a jejich derivátů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Vostálová Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Cytokinin kinetin je známý svými příznivými účinky na kůži. U kinetinu bylo zjištěno, že je schopen chránit kožní buňky před účinkem UVA a UVB záření. Tato bakalářská práce je zaměřena na rozšíření znalostí o UVB fotoprotektivních účincích kinetinu a jeho derivátů. Jako experimentální model byla použita buněčná linie lidských keratinocytů HaCaT. Účinky studovaných látek byly sledovány měřením hladiny interleukinu-6 a aktivity laktátdehydrogenasy v médiu a stanovením aktivity kaspasy-3 v buňkách. Kinetin a jeho deriváty byly schopny snížit poškození vyvolané působením UVB záření. Ochranný účinek byl pozorován především snížením apoptózy (snížení aktivity kaspasy-3). Žádná z testovaných látek neměla výrazně lepší účinek než samotný kinetin.

Klíčová slova	UVB záření, interleukin 6, caspase-3, laktátdehydrogenasa, linie keratinocytů HaCaT
Počet stran	39
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Zuzana Petrželková
Title	Photoprotective effects of natural compounds and their derivatives
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry
Supervisor	doc.RNDr. Jitka Vostálová Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

Cytokinin kinetin is known for its beneficial effects on the skin. Kinetin has been found to protect skin cells from the adverse effect of UVA and UVB radiation. This bachelor thesis is focused on expanding the knowledge about UVB photoprotective effects of cytokinin kinetin and its derivatives. As an experimental model a human keratinocytes cell line HaCaT was used. The effects of studied substances were monitored by measuring interleukin-6 level and lactate dehydrogenase activity in the medium and caspase-3 activity in the cells. Kinetin and its derivatives were able to reduce the UVB radiation induced damage. Their protective effect was observed mainly on reduction of apoptosis (caspase-3 activity decrease). None of the tested substances had a significantly higher effect than kinetin.

Keywords	UVB radiation, interleukin 6, caspase-3, lactate dehydrogenase, keratinocyte line HaCaT
Number of pages	39
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>2</b>
2.1 Stavba lidské kůže .....	2
2.1.1 Pokožka (epidermis) .....	2
2.1.1.1 Bazální vrstva ( <i>stratum basale</i> ) .....	3
2.1.1.2 Ostnitá vrstva ( <i>stratum spinosum</i> ) .....	3
2.1.1.3 Zrnitá vrstva ( <i>stratum granulosum</i> ) .....	4
2.1.1.4 Světlá vrstva ( <i>stratum lucidum</i> ) .....	4
2.1.1.5 Rohová vrstva ( <i>stratum corneum</i> ).....	4
2.1.2 Škára (dermis).....	5
2.1.3 Podkožní vazivo (hypodermis) .....	5
2.2 Sluneční záření .....	5
2.2.1 Infračervené záření .....	6
2.2.2 Viditelné záření .....	6
2.2.3 UV záření .....	6
2.2.3.1 UVC záření.....	7
2.2.3.2 UVB záření.....	7
2.2.3.3 UVA záření .....	8
2.3 Funkce kůže a endogenní ochranné systémy v kůži .....	8
2.3.1 Pigmentace kůže .....	8
2.3.1.1 Melanin a jeho biogeneze.....	9
2.3.1.2 Transport melaninů z melanocytů do keratinocytů .....	9
2.3.1.3 Melaniny v keratinocytech .....	9
2.3.2 Zesílení rohové vrstvy pokožky .....	10
2.3.3 Apoptosa keratinocytů .....	10
2.3.4 Antioxidační systém kůže .....	11
2.4 Strategie ochrany kůže před působením slunečního záření .....	11
2.4.1 Stínění a ochranný oděv.....	12
2.4.2 UV filtry (sunscreens).....	12
2.4.2.1 Opalovací krémy .....	13
2.4.2.2 Zvýšení pigmentace .....	13
2.4.2.3 Aplikace antioxidantů .....	14
2.5 Přírodní látky ve fotoprotekci .....	14
2.5.1 Cytokininy a jejich deriváty .....	15
2.5.1.1 Kinetin a jeho deriváty .....	16
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>19</b>
3.1 Biologický materiál .....	19
Testované látky .....	19
3.2 Přístroje, chemikálie, roztoky, ostatní materiál .....	19
3.2.1 Přístroje.....	19
3.2.2 Ostatní vybavení .....	20
3.2.3 Chemikálie.....	20
3.2.4 Roztoky .....	20
3.3 Metody a pracovní postup .....	22
3.3.1 Práce s buněčnou linií lidských keratinocytů HaCaT .....	22
3.3.1.1 Příprava HaCaT pro experiment .....	22
3.3.1.2 Aplikace látek a ozařování UVB zářením.....	23
3.3.1.3 Lýze buněk .....	24

3.3.2	Stanovení laktátdehydrogenasy v médiu .....	24
3.3.2.1	Postup stanovení LDH .....	24
3.3.3	Stanovení hladiny IL-6 v médiu metodou ELISA .....	25
3.3.3.1	Postup stanovení IL-6 pomocí Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development kit .....	25
3.3.4	Stanovení aktivity kaspasy-3 v buněčných lyzátech .....	26
3.3.4.1	Postup stanovení aktivity kaspasy-3 .....	26
3.3.5	Stanovení bílkovin .....	26
3.3.5.1	Postup stanovení bílkovin .....	27
3.3.6	Statistická analýza .....	27
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>28</b>
4.1	Stanovení LDH v médiu .....	28
4.2	Stanovení aktivity kaspasy-3 .....	29
4.3	Stanovení hladiny IL-6 v médiu .....	30
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>39</b>

## **Cíle práce**

1. Vypracovat literární rešerši týkající se
  - a) stavby a fyziologie kůže,
  - b) vlivu UV záření, především UVB na kožní buňky,
  - c) endogenních ochranných systémů v kůži,
  - d) strategií ochrany kůže před působením slunečního záření,
  - e) přírodních látek ve fotoprotekci,
  - f) cytokininů a jejich derivátů.
2. Zjistit UVB fotoprotektivní vlastnosti cytokininů a jejich derivátů na linii keratinocytů HaCaT měřením
  - a) aktivity laktátdehydrogenasy uvolněné do média jako markeru nekrosy,
  - b) aktivity kaspasy-3 jako markeru apoptosy,
  - c) hladiny interleukin 6 jako protizánětlivého účinku.

# 1 ÚVOD

Kůže je první obrannou linií, která chrání organismus před působením vnějšího prostředí. Sluneční světlo patří mezi důležité faktory ovlivňující fyziologické děje nejen v kůži. (Rajnochová Svobodová, 2012)

Jednou z hlavních složek slunečního záření je ultrafialové záření (UV). UV záření, které přijde do styku s kůží, se dělí na UVB a UVA složku. I když UVB záření tvoří jen minoritní část (asi 1-5 %), je zodpovědné za přímé poškození biomolekul v kožních buňkách. UVB záření je absorbováno aromatickými sloučeninami včetně bází nukleových kyselin. Toto záření je zodpovědné za vznik mutací, a tedy i vznik rakoviny kůže. UVB záření vyvolává také produkci reaktivních forem kyslíku a tím se podílí na rozvoji oxidačního stresu. (D’Orazio et al., 2013)

Kůže je vybavena velmi sofistikovaným endogenním ochranným systémem (pigmentace, zesílení rohové vrstvy kůže, antioxidační a reparační enzymy, aj.), který je schopen vyhledávat, opravovat či odstraňovat poškozené biomolekuly, případně odstraňovat poškozené buňky pomocí apoptosy. Díky tomu je kůže schopna se chránit před negativním působením slunečního záření. (Rajnochová Svobodová, 2012) Kapacita tohoto ochranného systému kůže může být překročena. Dochází k hromadění poškozených biomolekul a buněk v tkáni, což vede k rozvoji závažných onemocnění.

V posledních letech byl zaznamenán nárůst výskytu kožního onemocnění spojený s vyšší dávkou UVB záření, která dopadá na zemský povrch v důsledku úbytku ozonové vrstvy. Ale i nárazovým pobytem osob na slunci, kdy kůže není adaptovaná na tuto situaci a její přirozený ochranný systém není schopen eliminovat nežádoucí účinky záření. (Cavinato & Jansen-Dürr, 2017; Pehalova et al., 2021)

Proto se vyvíjejí nové strategie exogenní ochrany kůže, které by ochránily a minimalizovaly následky po nadměrné expozici slunečním zářením. Jednou z možností je vývoj textilií, které sníží průchod slunečního záření oděvem, či hledání látek, které se využijí jako UV filtry v opalovacích krémech. (Ettler, 2004)

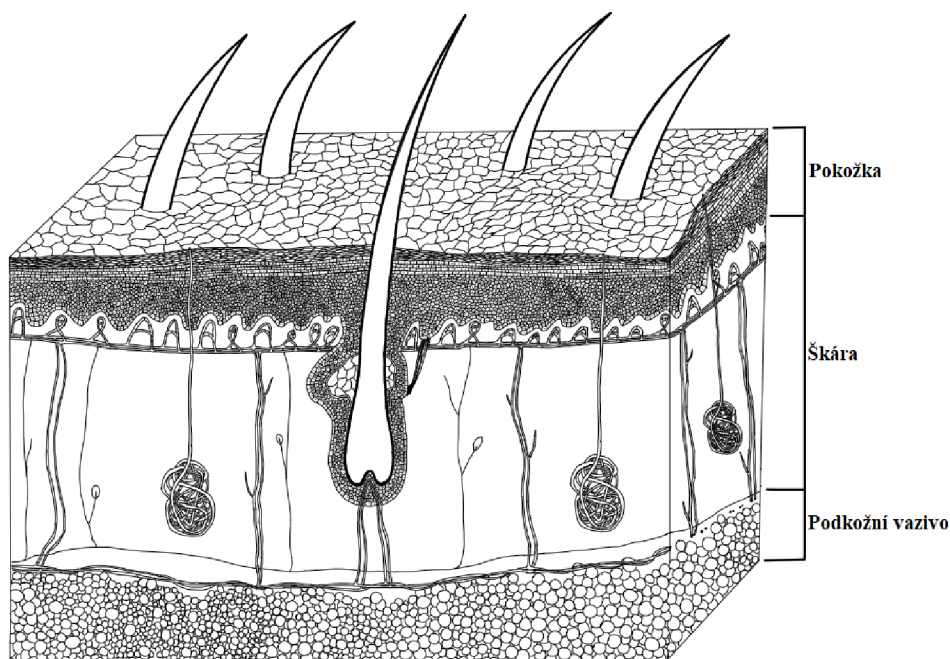
V rostlinné říši nacházíme celou řadu molekul, které mají schopnost chránit rostliny před působením UV záření. Takovéto látky s ochrannými vlastnostmi jsou poté základem pro přípravu derivátů, které by měly ještě lepší ochranné vlastnosti. Takovou molekulou může být i rostlinný hormon kinetin, který je znám pro své příznivé antisenescenční účinky na kožní tkáň a bylo u něj zjištěno, že má UVA i UVB protektivní účinky. (Hönig et al., 2018; Kadlecová et al., 2019)

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stavba lidské kůže

Největším orgánem lidského těla je kůže. Pokrývá celý vnější povrch těla. Má průměrnou tloušťku 0,1 – 4 mm. (Rajnochová Svobodová, 2012) V dospělosti může mít rozměr v průměru od 1,5 do 2 m<sup>2</sup> a podílí se tak v průměru na 15–20 % celkové tělesné hmotnosti. (Mescher, 2018)

Kůže je složená ze tří hlavních vrstev, kterými jsou pokožka, škára a podkožní vazivo. Tyto vrstvy jsou složeny ze specifických buněk v závislosti na jejich funkci (viz obr. 1).



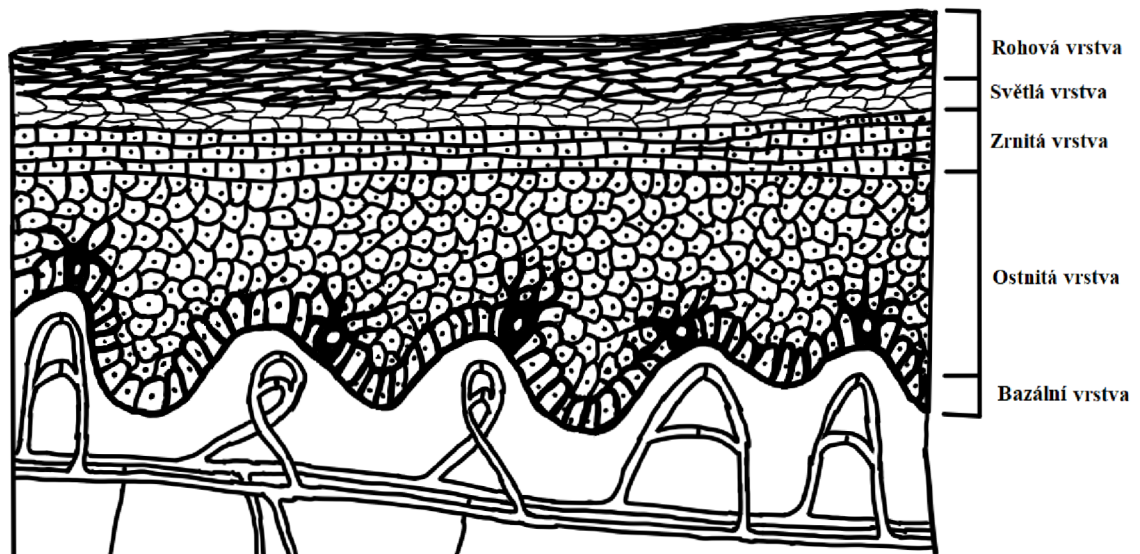
Obr. 1 Stavba kůže

#### 2.1.1 Pokožka (epidermis)

Pokožka je vrchní vrstvou kůže. Má průměrnou tloušťku 0,1 – 0,15 mm. Skládá se převážně z vrstevnatého dlaždicového rohovějícího epitelu. Hlavními buňkami jsou keratinocyty, dále se zde nachází melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. (Rajnochová Svobodová, 2012)

Keratinocyty se postupně přesouvají z vnitřních vrstev pokožky směrem na povrch pokožky (korneocyty), kde jsou v kontaktu s vnějším prostředím. Keratinocyty se v průběhu keratinizace mění (složení, metabolická aktivita) na korneocyty. (Murphrey et al., 2021) Celý proces trvá asi 30 dní. (Bragulla et al., 2009) Pokožka neobsahuje cévy a výživa je obstarána difúzí molekul ze škáry přes bazální membránu (Rajnochová Svobodová, 2012).

Keratinocyty vytváří v pokožce pět charakteristických vrstev (*stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*). Jednotlivé vrstvy keratinocytů se liší obsahem a typem proteinů (keratinu), lipidů a vody, tvarem a mitotickou aktivitou. (Rajnochová Svobodová, 2012)



Obr. 2 Vrstvy pokožky

### 2.1.1.1 Bazální vrstva (*stratum basale*)

*Stratum basale* je tvořena jednou vrstvou buněk kubického až sloupcovitého tvaru, které jsou navzájem propojeny desmosomy. Jedná se o nejspodnější vrstvu spojující škáru a pokožku. Od škáry je oddělena bazální membránou, k níž jsou tyto buňky připojeny hemidesmosomy. S vrstvou keratinocytů (*stratum spinosum*) jsou buňky bazální vrstvy spojeny desmosomy. (Mescher, 2018; Yousef et al., 2021)

Keratinocyty bazální vrstvy jsou mitoticky aktivní progenitorové buňky. Jejich dělením vznikají buňky *stratum spinosum*. (Murphrey et al., 2021) Pro keratinocyty bazální vrstvy je typická produkce keratinu 5 a 14. (Colombo et al., 2017) Společně s keratinocyty jsou v této vrstvě přítomny melanocyty, které produkují pigment melanin. Melanin je transportován melanosomy do bazálních keratinocytů a chrání jejich DNA před poškozením. (Rajnochová Svobodová, 2012; Moreiras et al., 2021)

### 2.1.1.2 Ostnitá vrstva (*stratum spinosum*)

Tato vrstva je nad vrstvou bazální. Je složena z 5-10 vrstev buněk kubického, polygonálního a nepravidelného polyedrického tvaru. Keratinocyty v této vrstvě mají stále schopnost se mitoticky dělit. Jednotlivé vrstvy buněk drží pohromadě desmosomy, což zajišťuje velkou pevnost a mechanickou odolnost. (Mescher, 2018; Yousef et al.,



2021) Keratinocyty, které již ukončily proces diferenciaci, produkují keratin 1 a 10. (Colombo et al., 2017)

Oproti bazální vrstvě je tato vrstva obohacena i o Langerhansovy a Merkelovy buňky. V extracelulárním prostoru koluje tzv. tkáňový mok, který vyživuje přítomné buňky a odvádí látky odpadní. U tlustého typu pokožky (kůže chodidel) má tato vrstva více vrstev těchto buněk. (Mescher, 2018; Yousef et al., 2021)

### **2.1.1.3 Zrnitá vrstva (*stratum granulosum*)**

Zrnitá vrstva je složena ze 3-5 vrstev buněk zploštělého polyedrického tvaru, které prochází prvotními fázemi diferenciaci. Cytoplasma přítomných keratinocytů obsahuje bazofilní keratohyalonová a lamelární granula, které jsou pro tyto buňky charakteristické. Konkrétně u keratohyalonových granulí se jedná o tělíska obsahující prekurzor keratinu (keratohyalin). (Mescher, 2018; Rajnochová Svobodová, 2012)

Lamelární granula jsou tělíska ovoidního tvaru, která mají ve svém obsahu lipidy a glykolipidy. Tyto látky jsou keratinocyty přenášeny do extracelulárního prostoru, kde vyplňují mezibuněčný prostor a zajišťují soudržnost této vrstvy. (Mescher, 2018; Rajnochová Svobodová, 2012; Murphrey et al., 2021)

### **2.1.1.4 Světlá vrstva (*stratum lucidum*)**

Světlá vrstva je tenká, skládající se z 2-3 vrstev velmi plochých mrtvých buněk, které nemají zřetelné jádro ani organely. Buňky převážně obsahují hustou síť filament, např. eleidin. Eleidin je protein vznikající z keratohyalinu, který je v korneocytech přeměňován na keratin. Tato vrstva je přítomna v tlustém typu pokožky. (Yousef et al., 2021)

### **2.1.1.5 Rohová vrstva (*stratum corneum*)**

Nejvyšší vrstvou pokožky je rohová vrstva, která je vystavena přímému kontaktu s okolím. Tato vrstva je první obrannou bariérou těla, tvoří rozhraní mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu. (Mescher, 2018)

Tato vrstva je složena přibližně z 15-20 vrstev plochých korneocytů, což jsou bezjaderné keratinocyty, které prošly konečnou fází diferenciaci. Jejich cytoplasma je velice bohatá na keratinová vlákna. Mezibuněčný prostor je lipidového charakteru. Tyto lipidy významně napomáhají mechanické odolnosti kůže a jsou zapojeny do ochranných mechanismů těla. Korneocyty se neustále odlupují z povrchu rohové vrstvy. *Stratum*

*corneum* se dělí na dvě části, na *stratum conjunctum*, což je spodní vrstva, a *stratum disjunctum*, což je horní odlupující se vrstva. (Murphrey et al., 2021)

*Stratum corneum* může být dvojího typu, a to tlustého a tenkého. Hlavní rozdíl spočívá v umístění na těle, kdy se tlustý typ vyskytuje v mechanicky více namáhaných částech těla (např. dlaně, chodidla), kdežto tenký typ pokrývá zbytek těla. (Mescher, 2018)

### **2.1.2 Škára (dermis)**

Škára je střední vrstvou kůže. Škára spojuje pokožku s podkožním vazivem. Je složena z kolagenního vaziva. Tato vrstva je prostoupena velkým množstvím krevních a lymfatických cév zajišťujících výživu pokožky přes bazální membránu a obsahuje nervová zakončení.

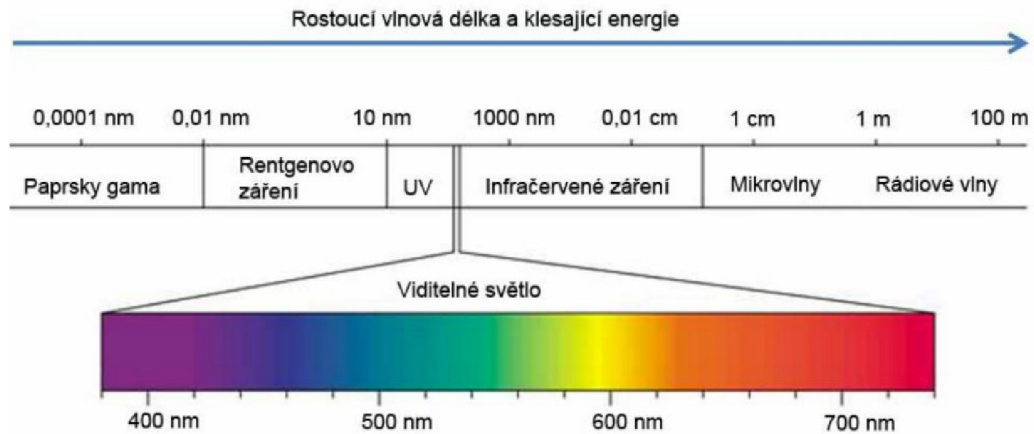
Skládá se ze dvou vrstev (*s. papillare* a *s. reticulare*). *S. papillare* (povrchová vrstva) je uložena pod epidermis a vybíhá do ní v podobě papil. Je tvořena řídkým kolagenním vazivem s elastickými vlákny a malým množstvím buněk (leukocyty, fibroblasty). Druhá, spodnější vrstva, se nazývá retikulární. Oproti povrchové vrstvě je mnohem širší, obsahuje mnohem vyšší množství neuspořádaného hustého vaziva (kolagenní a elastická vlákna) s podstatně menším počtem buněk. Škára obsahuje i tukové buňky, jelikož volně přechází do podkožního vaziva. (Mescher, 2018)

### **2.1.3 Podkožní vazivo (hypodermis)**

Podkožní vazivo je nejhlubší vrstvou kůže. Mezi její hlavní složky patří tukové buňky (adipocyty) a řídké kolagenní vazivo. (Mescher, 2018) Tuk má zásobní funkci, je v něm uložena energie, je to izolant a chrání tkáň uloženou pod kůží. Obsah tuku se liší podle lokality na těle. Také se zde nachází vitamíny rozpustné v tucích. Tato vrstva obsahuje receptory tlaku a hmatu. (Rajnochová Svobodová, 2012)

## **2.2 Sluneční záření**

Sluneční záření je elektromagnetické záření dopadající na naši planetu. Jeho spektrum se dělí podle vlnových délek od nejkratší po nejdelší: gama, rentgenové, ultrafialové (UV), viditelné (VIS) a infračervené (IR). Konečným zářením, které dopadne na zemský povrch, a tudíž i na lidskou kůži, je pouze část UV záření, pak VIS a nakonec IR, jelikož atmosféra nepropustí záření o kratší vlnové délce než 294 nm. (Rajnochová Svobodová, 2012)



Obr. 3 – Elektromagnetické záření (Baráková et al., 2015)

### 2.2.1 Infračervené záření

IR záření má vlnovou délku v rozmezí 760-3000 nm a zaujímá 45 % dopadajícího záření. IR záření je schopno prostoupit každou jednotlivou vrstvou kůže a způsobit její přehřátí. Tím dochází ke zvýšení vibrací a rotací molekul. Je jedním z faktorů kožního stárnutí. (Ettler, 2004; Rajnochová Svobodová, 2012)

### 2.2.2 Viditelné záření

VIS záření je tvořeno zářením o vlnových délkách v intervalu 400-760 nm a tvoří 50 % dopadajícího slunečního záření na zemský povrch. (Ettler, 2004)

Má významný vliv na průběh fotosyntézy u rostlin a celkově na běh životních funkcí většiny organismů. Obdobně, jako IR záření, prostupuje VIS všemi vrstvami kůže, kde je pohlcováno přítomnými chromofory (bilirubin, melanin, riboflavin, hemoglobin). Z patologického hlediska bylo zjištěno, že tyto fotony podporují tvorbu radikálů, což vede k oxidačnímu poškození biomolekul (nukleové kyseliny a nenasycené mastné kyseliny). (Rajnochová Svobodová, 2012)

### 2.2.3 UV záření

Další složkou elektromagnetického spektra je UV záření. Podle hodnoty vlnových délek se dělí na UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) a UVA (315-400 nm). Tyto druhy UV záření odlišně ovlivňují fyziologické procesy ve všech organismech, ale také přispívají ke karcinogenezi, jen odlišným mechanismem. (D'Orazio et al., 2013)

V zemské atmosféře jsou přítomny látky, které fungují jako selektivní filtry (hlavně O<sub>3</sub>, O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O). Tyto látky jsou schopny absorbovat téměř všechno UVC a většinu UVB

záření, proto sluneční energie dopadající na zemský povrch po průchodu atmosférou obsahuje 90–95 % UVA a 5 – 10 % UVB. (D’Orazio et al., 2013; Mohania et al., 2017)

### **2.2.3.1 UVC záření**

Jak už bylo řečeno, veškeré UVC záření bývá pohlceno zemskou atmosférou. Toto záření působí nejtoxičtěji na vše živé v porovnání s UVB a UVA zářením. UVC záření působí jako silný mutagen a může způsobit i rakovinu (Mohania et al., 2017)

### **2.2.3.2 UVB záření**

UVB záření je nejškodlivější součástí slunečního záření dopadající na lidskou kůži. V poslední době je jeho obsah mnohem větší v důsledku ztenčování ozónové vrstvy v atmosféře. Záření prostupuje všemi vrstvami pokožky až do horní části šikry, kde je absorbováno především bázemi DNA, ale také aromatickými aminokyselinami i jinými chromofory, což způsobuje tzv. přímé poškození biomolekul kožní tkáně. (Cavinato & Jansen-Dürr, 2017)

Současně, při vystavení kůže UVB záření, dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), což vede k oxidačnímu stresu. UVB záření stimuluje zánětlivou reakci, vyvolává produkci cytokinů, vazoaktivních a neuroaktivních mediátorů. To se projeví zčervenáním, otokem a zvýšenou bolestivostí v místě dlouhodobé expozice kůže slunečnímu záření, dojde k tzv. spálení pokožky a rozvoji zánětlivé reakce. (Zhao et al., 2021)

Poškozené biomolekuly především DNA jsou opravovány reparačními enzymatickými systémy. Zvýšená expozice kůže UVB záření je spojená se zvýšenou tvorbou a akumulací poškozených biomolekul. To vede také k aktivaci apoptosy v keratinocytech a odstranění poškozených buněk. Všechny tyto faktory vedou k předčasnému stárnutí kůže, tzv. „photoaging“ a podílí se na vzniku rakoviny kůže (D’Orazio et al., 2013)

Přes všechny negativní vlivy můžeme pozorovat i pozitivní účinky tohoto elektromagnetického záření, mezi které patří například zvýšení produkce a akumulace melaninu v kůži, který ji chrání před dalším poškozením UV zářením, (D’Orazio et al., 2013) a účast v přeměně provitaminu D (7-dehydrocholesterol) na vitamin D3. (Šíma & Turek, 2015)

### **2.2.3.3 UVA záření**

Oproti UVB záření prostupuje UVA záření kůži přes pokožku, škaru a může projít až k podkožnímu vazivu, čímž ovlivňuje nejen keratinocyty, ale také fibroblasty a endoteliální buňky. Na rozdíl od UVB záření nemá UVA záření tak vysokou energii, aby bylo schopné poškozovat molekuly přímo. UVA záření reaguje s chromofory, které předají získanou energii na kyslík a dochází k produkci ROS. Hlavní mechanismem toxického účinku UVA záření je produkce ROS, ale i RNS. Jak ROS, tak RNS mohou oxidačně poškozovat DNA, bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny a další molekuly. Také aktivuje metaloproteinasy, které štěpí komponenty extracelulární matrix (kolagen a elastin). UVA záření ovlivňuje pigmentaci, je zodpovědné za předčasné stárnutí kůže a rozvoj rakoviny kůže (Svobodová et al. 2010, Rajnochová Svobodová, 2012; D’Orazio et al., 2013)

## **2.3 Funkce kůže a endogenní ochranné systémy v kůži**

Jednou z hlavních funkcí kůže je ochrana těla před působení vnějších vlivům. Vytváří bariéru před průnikem nejen slunečního záření, ale i mikroorganismů, které kolonizují povrch kůže (ať již jsou složkou fyziologické či patogenní mikroflóry) a brání průniku cizorodých látek (smog, cigaretový kouř, složky přípravků osobní hygieny, prací prostředky, produkty mikroorganismů). (Moreiras et al., 2021)

Kůže se podílí na udržování tělesné teploty a homeostázy vody v těle. Nezbytnou součástí je i pigmentový systém, který je také zodpovědný nejen za barevnou různorodost kožních znaků, ale i ochranu organismu jako celku. (Moreiras et al., 2021)

Na ochraně kůže před účinky vnějšího prostředí se podílí tzv. endogenní ochranné systémy. Mezi tyto ochranné systémy patří pigment melanin, keratinizace, nízká a vysokomolekulární antioxidanty.

### **2.3.1 Pigmentace kůže**

Jedním z endogenních systémů v kůži je pigmentace. Za pigmentaci kůže jsou zodpovědné melanocyty. Tyto buňky jsou přítomny v bazální vrstvě epidermis a mají mnoho výběžků (dentrítů). Jsou uloženy mezi keratinocyty, se kterými nejsou propojeny desmosomy, jsou však ukotveny k bazální lamině pomocí hemidesmosomů. Melanocyty produkují ochranný pigment melanin. Jedna buňka může svými dentrity ovlivňovat až 40 okolních keratinocytů v bazální a ostnitě vrstvě. Pigmentace kůže je výsledkem tří mechanismů – biogeneze melaninu v melanocytech, přenos molekul melaninu

do keratinocytů a jeho následným skladování v buňkách. Melanin se hromadí nad jádru keratinocytů, kde chrání jejich genetický materiál před poškozením UV zářením. (Moreiras et al., 2021; Svobodová et al., 2010)

### **2.3.1.1 Melanin a jeho biogeneze**

Melanin patří do skupiny biopolymerů. Je to kožní pigment. Řadí se do první obranné linie proti poškození UV zářením. V podstatě dokáže blokovat vstup UV záření do hlubších vrstev kůže tím, že ho absorbuje a tuto energii převádí na méně toxické teplo. (Mohania et al., 2017) Syntéza melaninu probíhá v melanosomech. Jsou to speciální organely melanocytů podobné lysosomům. (Moreiras et al., 2021)

Syntéza melaninu začíná přeměnou aminokyseliny tyrosinu na dihydroxyfenylalanin (DOPA) a následně na dopachinon za účasti kyslíku působením L-tyrosin,L-DOPA:kyslík oxidoreduktasy (tyrosinasa, EC 1.14.18.1) (měď obsahující enzym). DOPA je dále přeměňován za vzniku dalších meziproductů (5,6-dihydroxyindol, dopachrom a indol-5,6-chinon) na melanin. (Mohania et al., 2017)

### **2.3.1.2 Transport melaninů z melanocytů do keratinocytů**

Melanosomy se po melanocytech pohybují z perinukleární části buňky dvoustupňovým kooperačním systémem, který je závislý na mikrotubulech a na kinesinu 2. Melanosom je přenesen k periférii melanocytu, konkrétněji do dentritového prostoru, kde se přichytí k aktinovému cytoskeletu. (Moreiras et al., 2021)

Doposud nebyl zcela popsán přenos melaninu do keratinocytů. Jedním z možných mechanismů je exocytosa melanosomů z melanocytů a následná fagocytosa keratinocytu. Po splynutí membrány melanosomu s cytoplasmatickou membránou melanocytu a následném uvolnění obsahu melanosomu do extracelulárního prostoru, dochází k jeho fagocytose sousedními keratinocyty. (Moreiras et al., 2021)

### **2.3.1.3 Melaniny v keratinocytech**

V keratinocytech je melanin skladován v organelách podobných lysosomům tzv. melano-kerasomech. Tyto dosud málo popsané organely mají jistou podobnost s lysosomy. Avšak nedávné studie potvrdily, že jsou specializované pro uchování melaninu v keratinocytech a neobsahují autofagické a typicky kyselé markery. Melano-kerasomy jsou uloženy v okolí jádra keratinocytů pomocí mikrotubulů a aktinové sítě, kde tvoří

tzv. nadjadernou čepičku „parasol“. Svou polohou jsou schopny chránit DNA dělicích se keratinocytů před účinky UV záření (Moreiras et al., 2021)

### **2.3.2 Zesílení rohové vrstvy pokožky**

UV záření má významný vliv na stimulaci mitotického dělení u dermis i epidermis. Po ovlivnění pokožky zářením dojde ke zvýšené syntéze DNA, RNA a proteinů. Zvýšená proliferace a diferenciacie keratinocytů vede k ztluštění pokožky, včetně rohové vrstvy. Takto zesílená epidermis a rohová vrstva lépe chrání kůži před účinky elektromagnetického záření. Dochází k odrazu slunečního záření, omezuje se jeho pronikání do hlubších vrstev kůže a dochází k snížení rizika poškození DNA intenzivně se dělicích buněk. (Svobodová et al., 2010; Rajnochová Svobodová, 2012)

### **2.3.3 Apoptosa keratinocytů**

Další součástí endogenních ochranných systémů kůže je apoptosa tzv. programovaná buněčná smrt poškozených keratinocytů, díky které dochází ke snížení rizika vzniku rakoviny kůže. V keratinocytech, poškozených UV zářením, dochází k aktivaci, jak vnitřní (narušení rovnováhy mezi pro – a antiapoptotickými faktory), tak vnější cesty (aktivace receptorů smrti) buněčné smrti. Při poškození DNA keratinocytů a mitochondrií se z mitochondrií uvolní cytochrom c a dále dojde k aktivaci dalších proapoptických faktorů. To má za následek tvorbu apoptosomu a následné aktivaci kaspasy-3 (EC 3.4.22.56), kaspasy 7 (EC 3.4.22.60) a kaspasy 9 (EC 3.4.22.62). Poškozené keratinocyty uvolňují do okolí velké množství molekul, které mohou vyvolat imunitní reakci (autoantigenů) a zánětlivých cytokinů. Tyto molekuly jsou rozpoznávány Langerhansovými buňkami nebo bílými krvinkami. To vede k jejich aktivaci, rozvoji zánětlivé reakce a odstranění poškozených buněk fagocytosou. (Mohania et al., 2017)

Nejsou-li poškozené buňky eliminovány, může se z těchto buněk vyvinout malignita, která je většinou spojena s mutacemi v genu pro jaderný protein p53. Dá se tedy říct, že apoptosa je úniková cesta proti vzniku rakoviny. (Mohania et al., 2017) Poškození DNA vede k aktivaci transkripčního faktoru p53, což vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi a zvýšení aktivity cyklin dependentních kinas. Poškozené buňky tak mohou v této době provést opravu poškozené DNA, nebo dochází k odstranění velmi poškozených buněk apoptosou. (Svobodová et al., 2006)

### **2.3.4 Antioxidační systém kůže**

Lidská kůže disponuje vlastním propracovaným endogenním antioxidačním systémem (EAS), který eliminuje radikály, prooxidanty a oxidačně modifikované molekuly. EAS je tvořen vysokomolekulárními a nízkomolekulárními antioxidanty, které spolu kooperují při odstraňování prooxidantů a radikálů vznikajících v kůži po působení slunečního záření.

Mezi významné vysokomolekulární antioxidanty s enzymatickou aktivitou patří superoxid-dismutasa (superoxid:superoxid oxidoreduktasa, SOD, EC 1.15.1.1), glutathionperoxidasa (glutathion:peroxid vodíku oxidoreduktasa, GPx, EC 1.11.1.9), glutathion-S-transferasa (RX:glutathion R-transferasa, GST, EC 2.5.1.18), glutathionreduktasa (glutathion:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa, GSR, EC 1.8.1.7), thioredoxinreduktasa (thioredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasa, TxR, EC 1.8.1.9) a katalasa (peroxid vodíku:peroxid vodíku oxidoreduktasa, KAT, EC 1.11.1.6).

Neenzymatické antioxidanty dělíme na nízko a vysokomolekulární. Mezi vysokomolekulární antioxidanty s neenzymatickou aktivitou patří transferin, feritin, ceruloplasmin, thioredoxin, albumin aj. Mezi nízkomolekulární antioxidanty patří glutathion, ubichinon, kyseliny močové, kyselina lipová, vitaminy C a E, karotenoidy a polyfenoly. (Chen et al., 2012; Svobodová et al., 2006; Svobodová et al., 2010)

### **2.4 Strategie ochrany kůže před působením slunečního záření**

Vzhledem ke zvyšujícímu se množství UV záření pronikajícího atmosférou vlivem ztenčující se ozonové vrstvy a také vzhledem ke zvýšené expozici kůže slunečnímu záření spojené s nárazovým, anebo dlouhodobým pobytem osob na slunci, není schopen přirozený obranný systém kůže eliminovat nežádoucí účinky v tkáni. To vede k zvýšenému výskytu rakoviny kůže.

Tuto skutečnost potvrzují závěry studie, která proběhla v České republice. Ve sledovaném období 2009–2018 došlo k průměrnému ročnímu nárůstu rakoviny kůže u žen o 3,3 % a u mužů o 4,0 %. Hned po infarktu myokardu je v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí nádorové onemocnění. V případech rakoviny tlustého střeva, ledvin a slinivky břišní je v České republice dokonce nejvyšší počet diagnostikovaných pacientů s těmito chorobami v Evropě. Výskyt rakoviny kůže je z výše uvedených nižší, ale určitě není zanedbatelný. (Pehalova et al., 2021)



Proto jsou hledány možnosti, jak tento nežádoucí trend snížit. V případě rakoviny kůže se zaměříme na zvýšení informovanosti obyvatel o nežádoucích účincích slunečního záření a vývoji nových postupů ochrany kůže, které by tento nežádoucí trend změnily.

### **2.4.1 Stínění a ochranný oděv**

Jeden z nejefektivnějších a nejúčinnějších způsobů, jak omezit množství záření dopadající na kůži, je omezit pobyt na slunci především v poledních hodinách (10–15 hod) a eliminovat vystavení kůže přímému působení slunečního záření nošením oděvu, klobouku či šátku, brýlí, používání slunečniců a objektů vytvářejících stín.

Přírozenou a nejméně zatěžující strategií fotoprotekce je nošení oděvu. Zde je hlavním úskalím požadavek spotřebitele na materiál, ze kterého je oděv vyroben, protože by v letním období neměl zahřívat tělo. Navíc materiál musí odpovídat módním trendům a hlavně chránit před UV zářením. Využívanými materiály pro letní oděvy jsou bavlna, viskosa, umělé hedvábí, len, polyester a různé jejich kombinace. Jejich schopnost snižovat průnik záření, a tak poškození kůže, závisí na hustotě tkaniny. Polyester má nejlepší ochranné vlastnosti. Výrobci v současné době mohou udávat u svých výrobků, jakou mají ochranu vůči UV záření. Pokud je bavlna, nebo viskosa, nebělená, poskytuje vyšší fotoprotekci než bělená, a to díky přítomnosti přírodních pigmentů. Obecně platí čím tmavší barva, tím materiál skýtá lepší ochranu proti účinkům slunečního záření. (Ettler, 2004)

### **2.4.2 UV filtry (sunscreens)**

UV filtry jsou chemické látky, které mají schopnost omezovat koncentraci fotonů dopadajících na pokožku a tím snižovat negativní účinky UV záření. Podle mechanismu působení se dělí na fyzikální a chemické.

Princip fyzikálních UV filtrů (tzv. blokátory) spočívá v zabránění přímého dopadu slunečního světla na kůži. Podle velikosti jsou schopny rozptylovat, odrážet, nebo absorbovat UV, VIS i IR záření. Z chemického hlediska to jsou anorganické látky nerozpustné ve vodě. Mezi fyzikální filtry patří např.  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{FeO}_2$  a  $\text{MgSiO}_2$ .

Chemické UV filtry (tzv. absorbéry) jsou organické látky schopné pohlcovat UV fotony. Molekuly absorbující fotony přejdou do excitovaného stavu. Následně molekula může přijatou energii vyzařovat ve formě tepla, emitovat formou fluorescence, nebo ji předat do vazebných struktur, čímž dojde ke změně molekulární struktury. Mezi chemické UV filtry patří například aminobenzoáty, benzofenony, salicyláty, deriváty

kafru a deriváty kyseliny skořicové. Tyto látky jsou schopny různě efektivně absorbovat fotony v UVB, UVA nebo v obou vlnových pásmech. (Rajnochová Svobodová, 2012)

### 2.4.2.1 Opalovací krémy

Opalovací krémy jsou komerční výrobky využívané spotřebiteli při vystavování kůže slunečnímu záření. Opalovací krémy se aplikují lokálně. Jsou to většinou směsi filtrů, které absorbují nebo rozptylují UV světlo, dopadající na kůži. Účinnost závisí na tloušťce, technice aplikace, odolnosti proti otěru a ponoření do vody. Opalovací přípravky by měly být aplikovány opakovaně během pobytu na slunci. (Diffey, 2009)

První přípravky, sloužící ke snížení účinku slunce na lidskou pokožku, byly používány již v roce 4000 př. n. l. v Egyptě. Avšak spíše, než k ochraně, bylo jejich hlavním účelem snížení pigmentace pokožky, jelikož se v té době bledá kůže považovala za atraktivnější. Pro tyto přípravky se používaly výtažky z rýže, jasmínu a lupiny, což jsou složky, které se využívají v kosmetickém průmyslu i dnes. Na začátku 19. století se začalo s hledáním látek, které by zabránily spálení pokožky. V roce 1891 vznikl první chemický opalovací krém v historii. Jeho hlavní složkou byl okyselený chinin sulfát. (Ma & Yoo, 2021)

Opalovací krémy využívané dnes obsahují fyzikální a chemické UV filtry. Nejčastěji využívanými fyzikálními UV filtry jsou oxid zinečnatý a titaničitý. Mezi chemické UV filtry absorbující UVA záření jsou zařazeny například methylantranilát, avobenzon a ecamsule (3,3'-(1,4-fenylenedimethylen)bis(7,7-dimethyl-2-oxobicyklo-[2.2.1]heptan-1-methansulfonová kyselina a její soli). Mezi látky absorbující UVB záření patří například *p*-aminobenzoová kyselina (PABA), padimate O (2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát) a trolamin salicylát. Sloučeniny schopné absorbovat oba typy UV záření (UVA i UVB) jsou 2-ethylhexyl-4-(dimethylamino)benzoát (sulisobenzon, benzofenon-4), ensulizole (2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina a její draselná, sodná nebo triethanolaminová sůl) a octisalate (2-ethylhexyl-salicylát). (Fivenson et al., 2021; Rajnochová Svobodová, 2012)

Po opalování je doporučeno aplikovat poopalovací krémy, které obsahují hydratující složky a podporují regeneraci kůže (vrací kůži přirozenou pružnost). (Ma & Yoo, 2021)

### 2.4.2.2 Zvýšení pigmentace

Součástí endogenního ochranného systému kůže je pigmentace vyvolaná slunečním zářením. Pro posílení tohoto systému se využívá synteticky připravený melanin, který se aplikuje na kůži a vstupuje až do 10. vrstvy buněk rohové vrstvy. Pro zachování

hnědého zbarvení je potřeba melanin používat opakovaně v pravidelných intervalech 2-3 dny, jelikož při obnově kůže dochází k odlupování nejsvrchnější vrstvy keratinocytů (korneocytů). (Rajnochová Svobodová, 2012)

### **2.4.2.3 Aplikace antioxidantů**

V kapitole 2.2 je uvedeno, že UVA záření má schopnost vytvářet ROS, které poškozují biomolekuly a urychlují přirozené stárnutí kůže, tzv. photoaging.

Enzymatické a neenzymatické složky EAS spolu kooperují a při překročení jejich kapacity (schopnosti eliminovat ROS), v důsledku vysoké dávky slunečního záření na pokožku, dochází k oxidačnímu stresu. Proto se také přidávají součásti EAS, především nízkomolekulární antioxidanty a jejich směsi (vitamin C, A a E a jejich syntetické deriváty, selen aj.) do opalovacích krémů a produktů péče o pleť. V současné době je velmi populární přidávat do těchto přípravků také rostlinné antioxidanty např. polyfenoly zeleného čaje či ostropestřce mariánského. (Chen et al., 2012; Rajnochová Svobodová, 2012)

Další možností je využití látek (např. isothiokynát sulforafan obsažený v brokolici) či extraktů (kurkumin z kurkumy) aktivujících signální dráhu Keap1/Nrf2/ARE, která kontroluje expresi antioxidantních enzymů (GST, GPx, aj.). (Gęgotek et al., 2015; Ryšavá et al., 2021)

## **2.5 Přírodní látky ve fotoprotekci**

Látky přijímané potravou mají neodmyslitelný vliv na zdravotní stav organismu. Stejně tak složky stravy mohou významně formovat strukturu, vlastnosti a celkovou kvalitu kůže. Potraviny rostlinného původu jsou důležitou součástí lidské výživy. Konzumací ovoce, zeleniny, bylin, obilovin, čaje, kaka a dalších rostlinných produktů se do organismu dostává široká škála primárních i sekundárních metabolitů, přirozeně se vyskytujících sloučenin různého strukturního charakteru. Jedná se např. o karotenoidy, vitaminy, fenolové látky atp.

Fenolové látky obsahují ve své molekulární struktuře fenol. Dělí se dále na fenolové kyseliny, flavonoidy a vysokomolekulární polyfenoly. V závislosti na molekulárním složení flavonoidů a fenolových kyselin se odvíjí jejich schopnost reagovat s ROS, RNS a vázat ionty přechodných kovů (Cu, Fe), čímž snižují riziko tvorby ROS tzv. Fentonovou reakcí. Mnozí zástupci z těchto dvou skupin jsou dokonce lepšími antioxidanty, než jsou

vitamin C a E. To znamená, že jsou prospěšní při prevenci vzniku ROS vznikajících působením UV záření na pokožku. (Nichols & Katiyar, 2010; Heinrich et al., 2011)

Polyfenoly jsou velice rozšířenou skupinou látek rostlinných produktů. Jedná se převážně o žluté, červené nebo fialové pigmenty. Díky tomu jsou schopny při lokální aplikaci absorbovat UV záření a zabránit tak jeho průniku do kůže. Konkrétněji se do skupiny polyfenolů řadí látky jako katechin, genistein, resveratrol a proanthokyanidiny. Po jejich konzumaci mají protizánětlivé, imunomodulační a antioxidační vlastnosti, čímž se řadí mezi zajímavou skupinu sloučenin v prevenci různých kožních onemocnění. (Heinrich et al, 2011)

Dalšími látkami s fotoprotektivními vlastnostmi jsou vitaminy A a B<sub>3</sub>. Vitamin A (retinol) s jeho esterifikovanou formou, která vznikla esterifikací retinolu s volnými mastnými kyselinami, jsou ve značném množství skladovány v játrech, dermis a epidermis. Obě formy mají schopnost absorbovat vlnové záření v rozmezí 300 až 350 nm. V kůži spolupracují i s dalšími chromofory, které absorbují záření. (Antille et al., 2003) Fotoprotektivní účinek vitamínu B<sub>3</sub> neboli nikotinamidu (amidu kyseliny nikotinové) je založen na ochraně proti imunosupresi a inhibici vývoje rakoviny kůže vyvolané UV zářením, má protizánětlivý a antimikrobiální účinek. Nikotinamid ale také zesvětluje pokožku reversibilní blokadou přenosu melanosomů z melanocytů do keratinocytů (odstraňování pigmentových skvrn) (Wohlrab & Kreft, 2014)

Poměrně novou skupinou přírodních látek s fotoprotektivními vlastnostmi jsou cytokininy.

### **2.5.1 Cytokininy a jejich deriváty**

Cytokininy byly objeveny v polovině dvacátého století. Jsou, spolu s auxiny a gibbereliny, rostlinnými hormony – fytohormony. Jejich účinek je rozmanitý, podílejí se na regulaci dělení buněk, vývoji rostliny, růstu a diferenciaci. Ovlivňují tvorbu chloroplastů a vývoj cév, stimulují syntézu fotosyntetických barviv, zpomalují stárnutí listů, regulují jejich postavení na nedřevnatém stonku a zvětšují jejich plochu. Dále snižují apikální dominanci, čímž podporují větvení nadzemních částí rostlin. (Procházka, 1998)

Z chemického hlediska se jedná převážně o N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu. Podle typu postranního řetězce jsou dále řazeny na isoprenoidní a aromatické. Mezi isoprenoidní patří trans-zeatin [trans-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin], cis-zeatin a N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin. Do skupiny cytokininů s aromatickým postranním

řetězcem patří například 6-benzyladenin a kinetin (K, 6-furfuryladenin). (Procházka, 1998; Hönig et al., 2018)

### 2.5.1.1 Kinetin a jeho deriváty

Kinetin (K) byl prvním objeveným cytokininem. Jeho název byl odvozen od schopnosti stimulovat buněčné dělení v různých rostlinných tkáních. (Kadlecová et al., 2019) Byl izolován z DNA autoklávovaného spermatu sledě obecného. Původně byl považován za syntetickou látku, ale nedávné studie identifikovaly K v rostlinných i v živočišných buňkách. Byl nalezen i v lidské moči. Výrazně větší množství K bylo nalezeno v moči pacientů s rakovinou, kdy vzniká z oxidačně poškozené DNA, která je opravována reparačními enzymy. K je produkt vznikající oxidací deoxyribosy za vzniku furfuralu, což vede ke vzniku N<sup>6</sup>-furfuryladeninu. K je tedy první známý stabilní produkt sekundárního poškození DNA. (Barciszewski et al., 2007; Kieber & Schaller, 2018)

Účinek K se liší podle typu buněk. Všeobecně je považován za látku zpomalující stárnutí rostlinných i živočišných buněk a prodlužuje délku života hmyzu. U K bylo zjištěno, že ovlivňuje buněčný cyklus, a reparačních enzymů (Barciszewski et al., 2007).

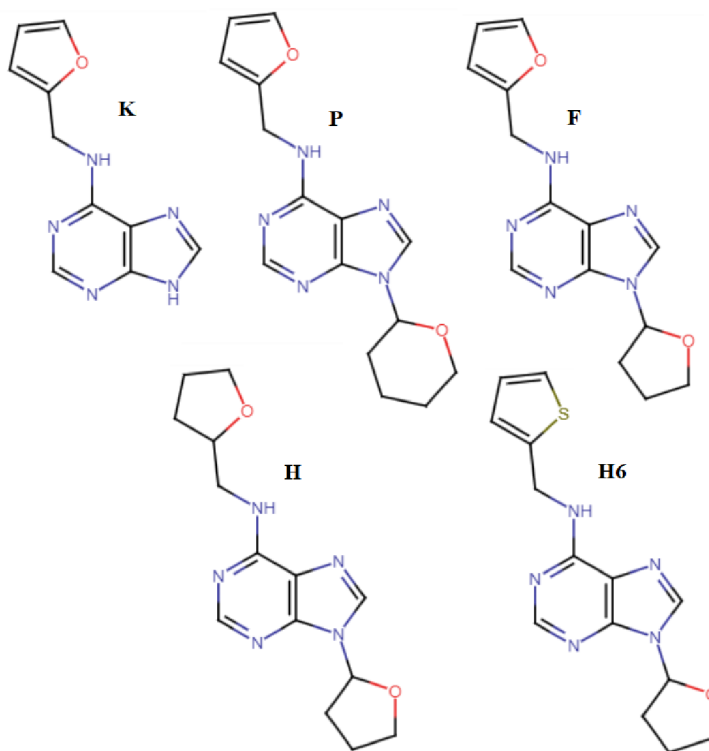
K a jeho derivát 6-benzyladenin vykazovali antioxidační vlastnosti, ovlivňovali aktivitu antioxidačních enzymů (KAT, GSR, GPx), hladinu redukovaného glutathionu a produktů lipoperoxidace v kožních fibroblastech *in vitro*. (Jabłońska-Trypuć et al., 2016) V *in vivo* studii provedené na bezsrstých psech, nebyl po stodenní topické aplikaci K pozorován žádný vedlejší účinek na kůži, naopak bylo pozorováno zlepšení struktury kůže, zpomalení jejího stárnutí a snížení hyperpigmentace. (Kimura & Doi, 2004) U K bylo zjištěno, že u potkanů, kterým byla aplikována podkožně G-galaktosa, docházelo nejen ke zpomalení stárnutí, ale K také příznivě působil na lymfocyty sleziny. U lymfocytů bylo pozorováno snížení jejich apoptosy, stimulace proliferace a taktéž snížení hladiny interleukinu 6 (IL-6). (Li et al., 2014)

V současné době se K využívá v kosmetických a dermatologických přípravcích. Tyto přípravky jsou doporučovány ke zpomalení přirozeného stárnutí a stárnutí akcelerovaného slunečním zářením. (Wanitphakdeedecha et al., 2015)

Díky těmto příznivým účinkům K na kůži byly a jsou syntetizovány jeho nové deriváty, které by mohly být efektivnější. Jedním z takových derivátů je nyní již komerčně využívaný pyratin (6-furfurylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)-9H-purin). (Kadlecová et al., 2019)

Dalším derivátem je *trans*-zeatin. *Trans*-zeatin podobně ovlivňoval stárnutí fibroblastů jako K a taktéž byla u něj prokázána schopnost potlačit nežádoucí účinky vyvolané na lidských fibroblatech ozářených UVB zářením. (Yang et al., 2009) U cytokininu *para*-topolinu izolovaného z listů topolu (*Populus robusta*) bylo zjištěno, že prodlužuje dobu života hád'átka obecného. (Kadlecová et al., 2019)

V roce 2018 olomoucká skupina vědců připravila sérii dalších derivátů K, které vykazovaly UVA a UVB protektivní vlastnosti na lidských kožních fibroblastech a linii keratinocytů HaCaT. Mezi testovanými látkami byl K a derivát 6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin (H6). Fotoprotektivní účinky byly zjištěny pouze testem buněčné živostnosti (inkorporace neutrální červeně do lysosomů živých buněk). (Hönig et al., 2018)



Obr. 4 Strukturální vzorce K a jeho derivátů

Toto zjištění nás vedlo k detailnějšímu ověření UVB ochranných vlastností K a H6 změřením aktivace kaspasy-3 a extracelulární hladiny IL-6 v buněčné linii keratinocytů (HaCaT) vystavené působení UVB záření. Vedle K a H6 byly studovány možné ochranné vlastnosti u dalších derivátů: 6-furfurylamino-9-(2-tetrahydropyran-2-yl)purin (P), 6-furfurylamino-9-(2-tetrahydrofuran-2-yl)purin (F) a 6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin (H). Struktury studovaných látek viz obr 4. U těchto látek K, P, F, H a H6 byla popsána schopnost zvyšovat translokaci

Nrf2 do jądra a modulovat hladinu proteinu hemoxygenasy 1 (EC 1.14.14.18) v lidských dermálních fibroblastech ozářených UVA zářením. (Ryšavá, 2021)

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Biologický materiál**

K experimentům byla použita buněčná linie spontánně transformovaných lidských epitelálních buněk z dospělé kůže, immortalizované lidské keratinocyty (HaCaT). Tyto buňky jsou nesmrtelné se zachovalou schopností epidermální diferenciace a s expresí hlavních specifických markerů charakteristických pro jednotlivé fáze diferenciace. (Boukamp et al., 1988)

HaCaT byly dodány firmou CLS Cell Lines Service GmbH Eppenheim, Německo.

### **Testované látky**

K (6-furfurylaminopurin) byl dodán firmou Merck (ČR). Testované látky byly syntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Příprava 6-furfurylamin-9-(2-tetrahydropyran-2-yl)purinu (P) a 6-furfurylamin-9-(2-tetrahydrofuran-2-yl)purinu (F) byla publikována v článku Szüčová et al., 2009 a syntéza (6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamin)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purinu (H) a 6-(thiofen-2-ylmethylamin)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purinu (H6) v práci Höniga et al., 2018. Zásobní roztoky testovaných látek připraveny v dimethylsulfoxidu (DMSO, 99%, v/v) a následně naředěny na potřebnou koncentraci pro experimenty v kultivačním médiu. Výsledná koncentrace v DMSO v médiu nepřesáhla 0,5 % (v/v).

### **3.2 Přístroje, chemikálie, roztoky, ostatní materiál**

#### **3.2.1 Přístroje**

Fotometr Infinite M200 pro měření 96-jamkových mikrotitračních destiček od firmy Tecan (Švýcarsko) využívající softwaru I-control<sup>TM</sup> nebo Magellan<sup>TM</sup>; centrifuga MiniSpin<sup>®</sup> od firmy Eppendorf (Německo); chlazená centrifuga Jouan BR4i od firmy Jouan (Francie); odsávačka Gilson Safe Aspiration Station od firmy Gilson (USA); CO<sub>2</sub> inkubátoru od firmy Trigon Plus (ČR); laminární box Jouan MSC 9 Standard od firmy Jouan (Francie); inverzního mikroskop CK-40 firmy Olympus (ČR); vortex Mixer VX-200 od firmy Labnet International (USA); termomixér Comfort s různými nástavci od firmy Eppendorf (ČR); lednička s mrazničkou na -20 °C Elektrolux (Švédsko); hlubokomrazicí box VX 380 od firmy Tecan (Švýcarsko); solární simulátor SOL-500



s UV absorpčním filtrem H2 a UVB detektor od firmy Dr. Hönle UV technology (Německo); systém Direct-Q®3 UV na přípravu deionizované vody od firmy Millipore (USA); pH-metr inoLab pH Level 1 s elektrodou SenTix41 od firmy WTW (Německo);

### 3.2.2 Ostatní vybavení

Plastové mikrozkušavky, automatické pipety různých rozsahů a jednorázové špičky různých objemů od firmy Eppendorf (Německo); sterilní kultivační láhve, 6-jamkové kultivační desky, jednorázové sterilní pipety, centrifugační zkumavky, filtry pro přípravu sterilních roztoků od firmy Biotech (ČR); sterilní škrabky od firmy Biologix Research Company (USA); nesterilní 96-jamkové desky, zkumavky, Bürkerova komůrka, ubrousky a buničina od firmy Dispolab (ČR)

### 3.2.3 Chemikálie

Chemikálie od firmy Merck (ČR): dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), Dulbecco's Modified Eagles médium (DMEM), dimethylsulfoxid (DMSO, 99%, v/v), dithiotreitol (DTT), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), fetální bovinní sérum (FBS), trypsin-EDTA (0,25%, m/v), redukovaný nikotinamidadeninindinukleotid (NADH), N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), trypanová modř (0,4%, v/v), roztok penicilinu (PNC,  $10\ 000\ \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), substrát pro stanovení aktivity kaspasy-3 (Caspase-3 Substrate II, Fluorogenic, Ac-DEVD-AMC), inhibitor pro stanovení aktivity kaspasy-3 (Caspase-3 Inhibitor I, Ac-DEVD-CHO) a streptomycinu (STR,  $10\ \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), koktejl inhibitorů proteas cOmplete™ a Triton X-100. Chemikálie od firmy Lach-Ner (ČR): ethanol (EtOH, 96%, v/v), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %, v/v) a dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Chemikálie od firmy Serva (Německo): hovězí sérový albumin (BSA) a Coomassie Brilliant Blue G-250. Firma PeproTech® (ČR): ELISA kit pro stanovení lidského IL-6 (Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development kit).

### 3.2.4 Roztoky

**Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS 10krát):**  $137\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaCl;  $2,68\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl;  $8,96\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,47\ \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH = 7,4;

**Ředěný fosfátový pufr (PBS):** 50 ml PBS 10krát a 450 ml deionizované vody ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )

**Růstové médium:** 500 ml Dubelcco's Modified Egel's medium – high glucose, 50 ml FBS (10 %, v/v), 5 ml směsi streptomycinu (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>) a penicilinu (100 U·ml<sup>-1</sup>)

**Kultivační médium:** 500 ml Dubelcco's Modified Egel's medium – high glucose, 5 ml směsi streptomycinu (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>) a penicilinu (100 U·ml<sup>-1</sup>)

**Roztok PBS k ozařování:** 50 ml PBS 10krát, 450 ml deionizované vody, 0,5 g glukosy

**Roztok PBS s EDTA:** 0,05% (m/v) EDTA v PBS

**Roztok trypsin-EDTA:** 0,25 % (m/v) trypsinu a 0,02 % (m/v) EDTA

**Pufr pro stanovení aktivity laktátdehydrogenasy:** 50 mmol·l<sup>-1</sup> fosfátový pufr (pH 7,5) s 1,22 mmol·l<sup>-1</sup> pyruvátém sodným (0,1342 g·l<sup>-1</sup>) a NADH (0,326 g·l<sup>-1</sup>)

**Lyzační roztok:** 50 mM HEPES, pH 7,4; 0,5% Triton X-100, tableta cOmplete, 5 mmol·l<sup>-1</sup> DDT. DDT se přidává do roztoku před použitím.

**Reakční pufr pro stanovení aktivity kaspasy-3:** 20 mmol·l<sup>-1</sup> HEPES, pH 7,1, 2 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, tableta cOmplete, 5 mmol·l<sup>-1</sup> DDT. DDT se přidává do roztoku před použitím.

**Zásobní roztok substrátu pro kaspasu-3:** 10 mmol·l<sup>-1</sup> Ac-DEVD-AMC v DMSO

**Zásobní roztok inhibitoru pro kaspasu-3:** 2 mmol·l<sup>-1</sup> Ac-DEVD-CHO v DMSO

**Potahovací protilátka:** 51 µg králičí protilátky Anti-Human IL-6 s 0,5 mg D-manitolu se rozpustí v 0,51 ml sterilní vody na koncentraci u 100 µg·ml<sup>-1</sup>

**Detekční protilátka:** 101 µg biotinylované kozí protilátka proti Anti-Human IL-6 s 2,2 mg BSA a 11 mg D-manitolu se rozpustí v 1,01 ml sterilního PBS obsahujícího 0,1 % (m/v) BSA na koncentraci roztoku 100 µg·ml<sup>-1</sup>

**Standardní roztok lidského IL-6:** 1 µg rekombinantní lidský IL-6, s 2,2 mg BSA a s 11 mg D-manitolu se rozpustí v 1 ml sterilní vody na koncentraci 1 µg·l<sup>-1</sup>

**Roztok konjugátu avidinu s křenuvou peroxidasou (konjugát Avidin-HRP)**

**Promývací pufr:** 0,05% (v/v) Tween-20 v PBS

**Blokovací pufr:** 1% (m/v) BSA v sterilním PBS

**Ředící roztok:** 0,05% (v/v) Tween-20, 0,1% (m/v) BSA v sterilní PBS

**Roztok 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny (ABTS) substrátu pro ELISU**

**Standardní roztoky BSA v PBS:** 0,0625 – 1,0 mg·ml<sup>-1</sup>

**Roztok pro stanovení bílkovin pomocí Bradfordovy metody (Bradfordovo činidlo):** 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250; 50 ml etanolu (96%, v/v); 100 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%, v/v) se doplní do 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

### **3.3 Metody a pracovní postup**

#### **3.3.1 Práce s buněčnou linií lidských keratinocytů HaCaT**

Linie HaCaT je dlouhodobě uložena v tekutém dusíku (-190 °C). Po vyjmutí z tekutého dusíku byly buňky rozmrazeny a okamžitě přeneseny do růstového média ve sterilní kultivační lahvi (plocha 25 cm<sup>2</sup>). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře obohacené o CO<sub>2</sub> (5 %, v/v). Po vytvoření monovrstvy buněk bylo růstové médium vylito a buňky byly 10 min inkubovány v PBS s EDTA (37 °C, inkubátor). Roztok byl vylit z kultivační lahve a bylo aplikováno 0,5 ml trypsin-EDTA. Lahev s buňkami byla uložena na 10 min do inkubátoru (37 °C). Uvolňování buněk bylo průběžně kontrolováno mikroskopicky. Po jejich uvolnění od dna lahve bylo přidáno 5-10 ml růstového média. Buněčná suspenze byla přenesena do kultivační lahve o ploše 25 cm<sup>2</sup>. HaCaT mohly být použity pro experimenty minimálně šest až sedm pasáží od rozmrazení. Během kultivace bylo médium měněno dvakrát týdně.

##### **3.3.1.1 Příprava HaCaT pro experiment**

Aby bylo pro experiment připraveno dostatečné množství buněk, byly HaCaT kultivovány v několika kultivačních lahvích o ploše 75 cm<sup>2</sup>. Buňky byly uvolněny z kultivačních lahví po 10 min inkubaci v PBS s EDTA (37 °C, inkubátor) a následným působením trypsinu (1 ml). Ostatní kroky byly stejné, viz. 3.3.1 Práce s buněčnou linií lidských keratinocytů HaCaT.

Buněčná suspenze HaCaT byla připravena spojením suspenzí buněk z několika kultivačních lahví. Buněčná suspenze byla centrifugována při 150 x g a pelet buněk byl resuspendován v růstovém médiu. Počet buněk v suspenzi byl zjištěn počítáním v Bürkerově komůrce. Pro rozlišení živých a mrtvých buněk byly buňky před počítáním barveny trypanovou modří (0,4 %, m/v). Trypanová modř prostupuje přes cytoplasmatickou membránu poškozených buněk, které se zbarví modře. Živé buňky nejsou obarveny, mají světlou barvu při pozorování v mikroskopu.

Na Bürkerovu komůrku se položí krycí sklo a mezi skla se nanese suspenze buněk připravena smícháním roztoku trypanové modří a suspenze buněk v poměru 9:1. Komůrka se vloží na mikroskop a po zaostření se při zvětšení 100x počítá počet buněk ve velkých čtvercích ohraničených trojitými čarami. Spočítá se počet buněk vždy ve třech těchto čtvercích na jedné straně komůrky a pak ve třech čtvercích na druhé straně komůrky. Pak se vypočítá průměrný počet buněk v tomto čtverci. Plocha tohoto čtverce

je  $1 \text{ mm}^2$  a jeho hloubka je  $0,1 \text{ mm}$ , tzn. že objem je  $0,1 \text{ mm}^3$ . Počet buněk v  $1 \text{ ml}$  je tedy: průměrný počet buněk v jednom čtverci ohraničeného trojitými čarami  $\cdot 10\,000 \cdot$  ředění (10krát).

Buňky pro experiment byly vysévány v růstovém médiu na sterilní 6-jamkové desky v objemu  $1,5 \text{ ml}$  tak, aby koncentrace byla  $100\,000$  buněk na  $1 \text{ cm}^2$ . Plocha 6-jamkové desky je  $9,6 \text{ cm}^2$ , to tedy znamená, že buňky byly naředěny na koncentraci  $640\,000$  buněk na  $1 \text{ ml}$  a poté bylo aplikováno po  $1,5 \text{ ml}$  suspenze do jednotlivých jamek na kultivační desce. Desky s buňkami byly vloženy do inkubátoru ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$  s atmosférou obohacenou o  $\text{CO}_2$   $5\%$ , v/v) do následujícího dne.

### 3.3.1.2 Aplikace látek a ozařování UVB zářením

Zásobní roztoky K a jeho derivátů (F, H, P, H6) byly naředěny kultivačním médiem na výslednou koncentraci  $1, 5$  a  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; koncentrace DMSO v připravených roztocích byla  $0,5 \%$  (v/v).

Roztoky testovaných látek v objemu  $1,5 \text{ ml}$  byly nanášeny do dvou jamek 6-jamkové desky s narostlými buňkami, tedy na jedné 6-jamkové desce byla jedna studovaná látka ve třech koncentracích.

Pro každou látku byly připraveny dvě desky. Dále byly připraveny dvě 6-jamkové desky, kde bylo na buňky aplikováno kultivační médium s  $0,5\%$  (v/v) DMSO; jedna deska byla použita jako pozitivní kontrola, byla vystavena působení UVB záření a druhá jako negativní kontrola, tedy nebyla ozařována.

Po hodinové inkubaci buněk s testovanými látkami v inkubátoru při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a atmosféře obohacené o  $5 \%$   $\text{CO}_2$  bylo médium odstraněno. Buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS a poté bylo k buňkám napipetováno  $1,5 \text{ ml}$  roztoku PBS k ozařování. Takto byly připraveny dvě 6-jamkové desky.

Jedna deska s buňkami byla vložena pod UVB lampu a buňky byly vystaveny dávce UVB záření o hodnotě  $150 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Druhá paralelní deska byla během ozařování vložena do inkubátoru.

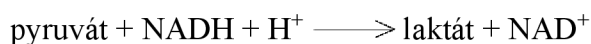
Po ozáření byl roztok PBS k ozařování odsán z buněk a do každé jamky bylo aplikováno po  $1,5 \text{ ml}$  kultivačního média. Desky s buňkami byly vloženy na  $4$  hod do inkubátoru. Poté bylo odebráno médium pro stanovení hladiny IL-6 a laktátdehydrogenasy a buňky byly lyzovány pro stanovení aktivity kaspasy-3.

### 3.3.1.3 Lýze buněk

Buňky byly opláchnuty vychlazeným roztokem PBS (~ 10 °C). Roztok PBS byl odsán a na buňky bylo aplikováno 50 µl lyzačního roztoku. Kultivační desky byly položeny na 5 min na chlazený panel. Buňky byly seškrábnuty škrabkou z povrchu misky 6-jamkové desky. Lyzát buněk byl přenesen do Eppendorf zkumavky. Lyzáty byly zamrazeny a použity posléze ke stanovení aktivity kaspasy-3.

### 3.3.2 Stanovení laktátdehydrogenasy v médiu

S-laktát:NAD<sup>+</sup> oxidoreduktasa (laktátdehydrogenasa, LDH, EC 1.1.1.27.) je enzym katalyzující redukci pyruvátu na laktát za přítomnosti NADH podle rovnice na obr. 5. Při nekrose dochází k uvolnění tohoto enzymu do extracelulárního prostoru (média) a je považován za marker nekrosy. (Chan et al., 2013) Množství LDH v médiu lze zjistit z měření úbytku NADH v reakční směsi v čase spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. Míra poklesu absorbance při 340 nm je přímo úměrná aktivitě přítomné LDH.



Obr. 5 Rovnice redukce pyruvátu na laktát

#### 3.3.2.1 Postup stanovení LDH

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 µl média. Každý vzorek byl pipetován v tripletech. Ke každému vzorku bylo přidáno 150 µl pufru pro stanovení aktivity LDH. Takto připravená destička byla vložena do spektrofotometru a byla měřena změna absorbance za minutu ( $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ ) při 340 nm po dobu 3 min.

Aktivita LDH ( $\text{nkat} \cdot \text{l}^{-1}$ ) byla vypočítána dle vzorce:

$$\text{aktivita LDH } (\text{nkat} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ředění} \cdot 1\,000\,000\,000}{\text{absorpční koeficient} \cdot \text{délka optické dráhy} \cdot 60}$$

Molární absorpční koeficient NADH  $6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; délka optické dráhy 0,9375 cm; ředění 2

### **3.3.3 Stanovení hladiny IL-6 v médiu metodou ELISA**

IL-6 je jedním z cytokinů, který je tvořen buňkami jako nespecifická obranná reakce na působení fyzikálních a chemických faktorů, nebo při infekci. (Racek & Rajdl, 2021) UVB záření, jako fyzikální faktor, zvyšuje tvorbu IL-6 v HaCaT. (Shibata et al., 2010)

Stanovení hladiny IL-6 se provádělo ELISA metodou, což je kvantitativní analytická metoda. Tato metoda se využívá ke stanovení hormonů, vitaminů, léčiv, peptidů, případně proteinů. Metoda je založena na specifické interakci mezi antigenem (analytem) a protilátkou. Vzniklý komplex protilátky antigenu se detekuje reakcí s protilátkou vůči tomuto komplexu, na kterou je navázán enzym (enzymový konjugát). Množství navázaného enzymového konjugátu se zjišťuje přidávkem specifického substrátu. To se projeví barevnou změnou, kterou měříme pomocí spektrofotometru.

#### **3.3.3.1 Postup stanovení IL-6 pomocí Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development kit**

Stanovení hladiny IL-6 bylo provedeno dle firemního návodu. Do jamek 96- jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku potahovací protilátky (vůči lidskému IL-6) v PBS o koncentraci 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . 96-jamková mikrotitrační destička byla překryta fólií. Po inkubaci přes noc při pokojové teplotě byl obsah jamek vylit a jednotlivé jamky byly 4x promyty 300  $\mu\text{l}$  promývacího pufru. Roztok z jamek byl vylit a zbytek roztoku odstraněn oklepáním destičky o buničinu. Potom bylo aplikováno 300  $\mu\text{l}$  blokovacího pufru do každé jamky a destička byla opět pokryta fólií a inkubována 1 hod při pokojové teplotě. Potom byla fólie odstraněna, blokovací pufr vylit a každá jamka byla promyta 4x promývacím pufrem. Roztok z jamek byl odstraněn (oklepáním destičky o buničinu). Mikrotitrační destička byla připravena pro stanovení.

Pro stanovení byla připravena sada standardních roztoků IL-6 za použití ředícího roztoku (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,325; 0,25; 0,1625; 0,125; 0,0645; a 0,035  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Standardní roztoky a vzorky byly aplikovány do jamek potažené 96-jamkové mikrotitrační destičky po 100  $\mu\text{l}$  v dubletech. Po nanesení roztoků byla deska potažena fólií a inkubována při pokojové teplotě 2 hodiny. Po inkubaci byla fólie z desky odstraněna. Obsah jamek byl vylit. Jamky 96-jamkové mikrotitrační destičky byly 4x promyty promývacím roztokem. Poté byla aplikována detekční protilátka (1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{l}$  na jamku) a následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Během inkubace byla destička pokryta fólií. Po odstranění fólie byl roztok detekční protilátky

vylit a jamky destičky byly 4x promyty promývacím pufrem. Roztok konjugátu Avidin-HRP byl naředěn ředícím roztokem v poměru 1:2000 a do jamek bylo napipetováno po 100  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku a následovala inkubace 30 minut při pokojové teplotě. Obsah jamek byl vylit a jamky destičky byly 4x promyty promývacím pufrem. Poté bylo do každé jamky napipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku ABTS (substrát pro HRP). Barevná změna roztoků byla měřena při vlnové délce 405 nm a 650 nm. Z hodnot absorbancí standardů a jejich koncentrací byl vytvořen kalibrační graf, který byl použit k zjištění koncentrace IL-6 ve vzorcích.

### **3.3.4 Stanovení aktivity kaspasy-3 v buněčných lyzátech**

Kaspasa-3 (EC 3.4.22.56) patří do skupiny endoproteas s cysteinem a kyselinou asparagovou (kaspasy) v aktivním místě. Tento enzym patří mezi klíčové mediátory procesu apoptozy. (Asadi et al., 2021) K zjištění aktivity kaspasy-3 byl použit substrát, který je přeměňován na fluorescenční produkt. (Ochu et al. 1998)

#### **3.3.4.1 Postup stanovení aktivity kaspasy-3**

Do reakčního pufu pro stanovení aktivity kaspasy-3 (995  $\mu\text{l}$ ) bylo pipetováno 5  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku substrátu pro kaspasu-3, výsledná koncentrace substrátu Ac-DEVD-AMC byla 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následně byla připravena reakční směs s inhibítorem obsahující 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  substrátu Ac-DEVD-AMC a 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  inhibitoru Ac-DEVD-CHO. Buněčné lyzáty byly centrifugovány 10 minut při 4 °C při 12 000 x g. Poté byly 4  $\mu\text{l}$  supernatantu pipetovány v dubletu do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. K jednomu alikvotu supernatantu bylo napipetováno 80  $\mu\text{l}$  reakční směsi se substrátem a k druhému alikvotu 80  $\mu\text{l}$  reakční směsi s inhibítorem. Poté byla destička se vzorky vložena do termobloku a inkubována při 37 °C po dobu 60 minut za stálého míchání. Po uplynutí inkubace byla změřena fluorescence (excitační vlnová délka 380 nm a emisní vlnová délka 450 nm). Hodnota fluorescence byla vztažena k obsahu proteinů v lyzátu.

### **3.3.5 Stanovení bílkovin**

Pro stanovení koncentrace bílkovin v buněčných lyzátech byla použita Bradfordova metoda. Barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 interaguje s postranními řetězci aromatických (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) a bazických aminokyselin (lysin, arginin, histidin) proteinu, což se projeví změnou barvy při 595 nm. Změna barvy je přímo úměrná koncentraci proteinů. (Bradford & Marion; 1976)

### **3.3.5.1 Postup stanovení bílkovin**

Nejprve byly připraveny roztoky hovězího sérového albuminu s koncentracemi 0,0625 až 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Vzorky (buněčné lyzáty) byly 10x zředěny roztokem PBS. Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo v tripletu pipetováno po 10 µl ředěného vzorku a 10 µl standardních roztoků. Následně bylo k vzorkům a standardům napipetováno 0,2 ml Bradfordova činidla. Obsah jamek byl promíchán a jejich absorbance byla naměřena po 5 min při 595 nm.

### **3.3.6 Statistická analýza**

Prezentovaná data jsou průměrem ± S.D. ze čtyř nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův test. Statistická signifikance je vyjádřena na hladině  $p = 0.05$ .

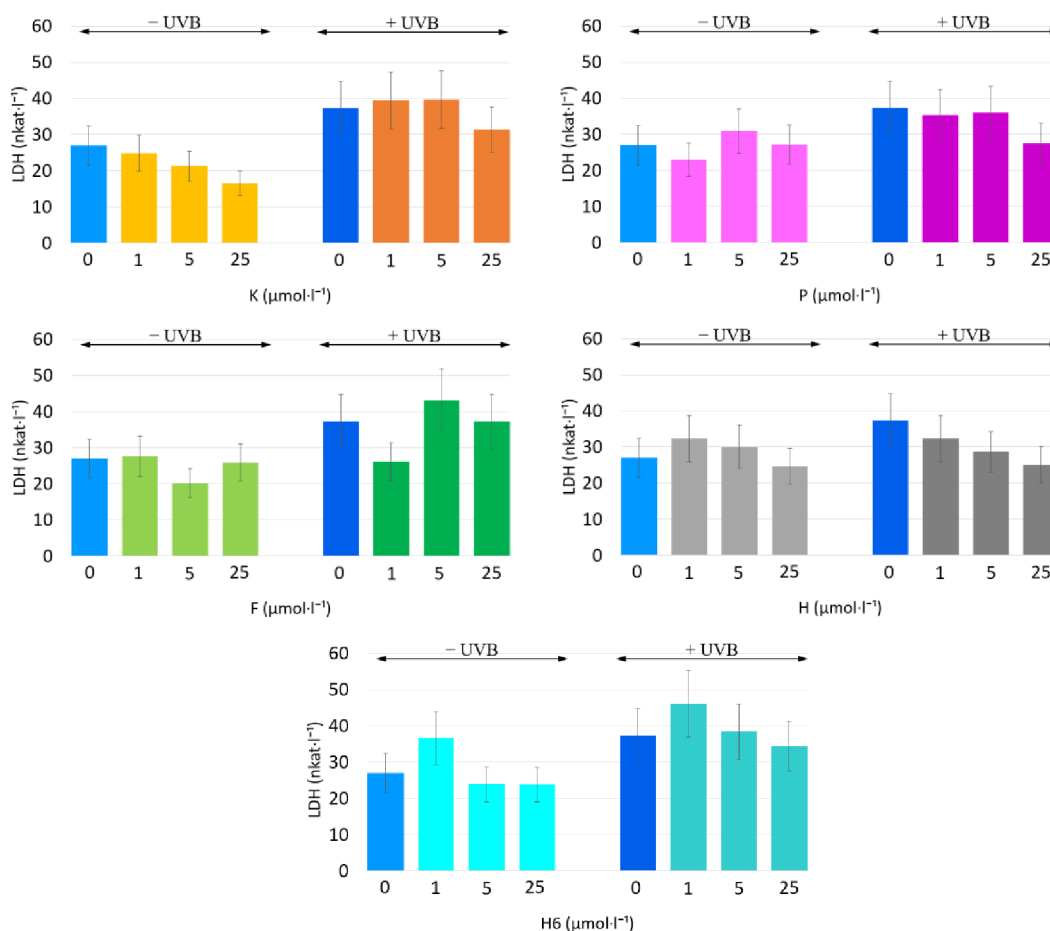


## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

O kinetinu je známo, že má příznivé účinky na lidský organismus. Mimo jiné je schopen zpomalit přirozené stárnutí kůže a má UVA a UVB ochranné vlastnosti. Tato bakalářská práce je zaměřena na zjištění mechanismu UVB protektivního účinku K a jeho derivátů (P, F, H a H6). (Hönig et al., 2018; Kadlecová et al., 2019; Wanitphakdeedecha et al. 2015)

### 4.1 Stanovení LDH v médiu

Stanovení aktivity LDH v médiu se využívá k zjištění míry poškození buněk, tedy k zjištění toxického potenciálu testovaných látek. Výrazné zvýšení aktivity LDH, uvolněné z poškozených buněk do média, je považováno za marker toxicity a jako ukazatel probíhající nekrosy buněk. (Chan et al., 2013)



Obr. 6 Vliv K a jeho derivátů na aktivitu extracelulární LDH v buněčné linii HaCaT ozářených UVB zářením. Buňky byly inkubovány 1 hodinu s testovanými látkami (1, 5 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a poté ozářeny UVB zářením ( $150\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Aktivita LDH byla měřena v médiu 4 hod po ozáření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.D ze 4 nezávislých experimentů (použity buňky v různých pasážích).

Samotné látky nebyly toxické ve studovaném rozmezí koncentrací (1, 5 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pouze u K došlo ke koncentračně závislému poklesu aktivity LDH (viz obr. 6), což by mohlo souviset se schopností K stabilizovat buněčnou membránu, a tak snižovat bazální hladinu LDH v médiu (množství LDH uvolněné do média při přirozené regeneraci buněk).

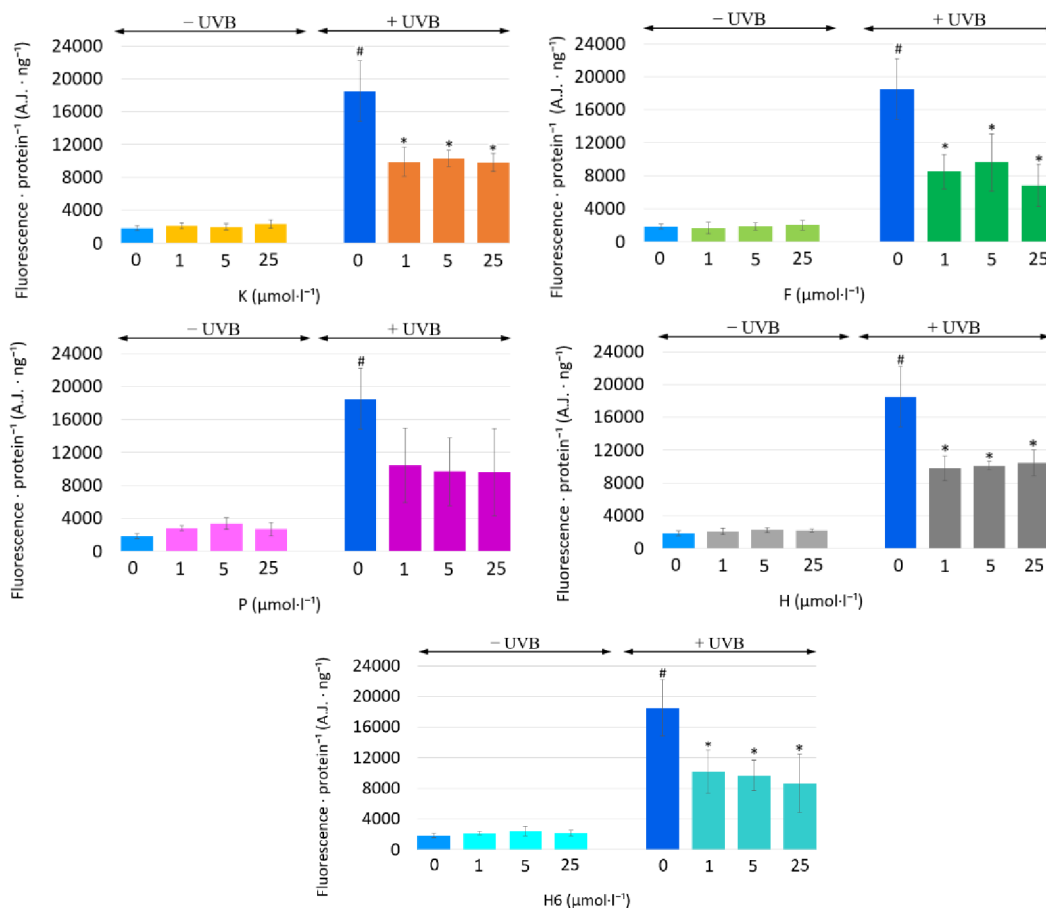
Cílem experimentálního uspořádání bylo vyvolat apoptosu v HaCaT působením UVB záření. Při zvolené dávce 150  $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  UVB záření došlo ke zvýšení hladiny extracelulární LDH asi o polovinu (obr. 6). Takové navýšení aktivity LDH v médiu ukazuje, že nedošlo k nekrose. Pokud by došlo k nekrose HaCaT, tedy k poškození buněčné membrány, byla by aktivita LDH přibližně desetkrát vyšší, viz naše dřívější nepublikované výsledky. I když bylo poškození HaCaT UVB zářením nízké (aktivita extracelulární LDH), překvapivě jednodinová preinkubace buněk s látkami K, P a H při nejvyšší použité koncentraci (25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) snižovala buněčné poškození způsobené UVB zářením. U látky H byl pozorovaný ochranný efekt koncentračně závislý. Ochranný efekt nebyl pozorován u látek H6 a F při žádné použité koncentraci (viz obr. 6).

## 4.2 Stanovení aktivity kaspasy-3

UVB-záření vyvolává v kožních buňkách apoptosu doprovázenou aktivací kaspasy-3. (Xu et al., 2010). K zjištění aktivace kaspasy-3 je možné měřit množství aktivního enzymu nebo přímo aktivitu. Aktivita kaspasy-3 byla měřena s použitím substrátu, který byl štěpen za vzniku fluorescenčního produktu. (Ochu et al., 1998)

Aplikace samotných látek na buňky nijak zásadně nepřispívala ke zvýšení aktivity kaspasy-3. Pouze u P byly hodnoty mírně nesignifikantně zvýšeny. Nejvyšší aktivita kaspasy-3 byla nalezena při koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Použitá dávka UVB záření 150  $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  signifikantně zvýšila aktivitu kaspasy-3. To zjištění odpovídá literatuře, kde jsou používány podobné dávky UVB záření např. 200  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . (Vostálová et al., 2010)

Jednodinová inkubace HaCaT s testovanými látkami před expozicí UVB záření vedla ke snížení aktivace kaspasy-3. Mimo látku P byl ochranný účinek látek pozorován u všech látek při všech použitých koncentracích (1, 5 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Tento efekt nebyl koncentračně závislý. Nejvýraznější efekt byl pozorován u látky F při nejvyšší použité koncentraci 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , při použité koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl efekt nižší, ale stále výrazný.



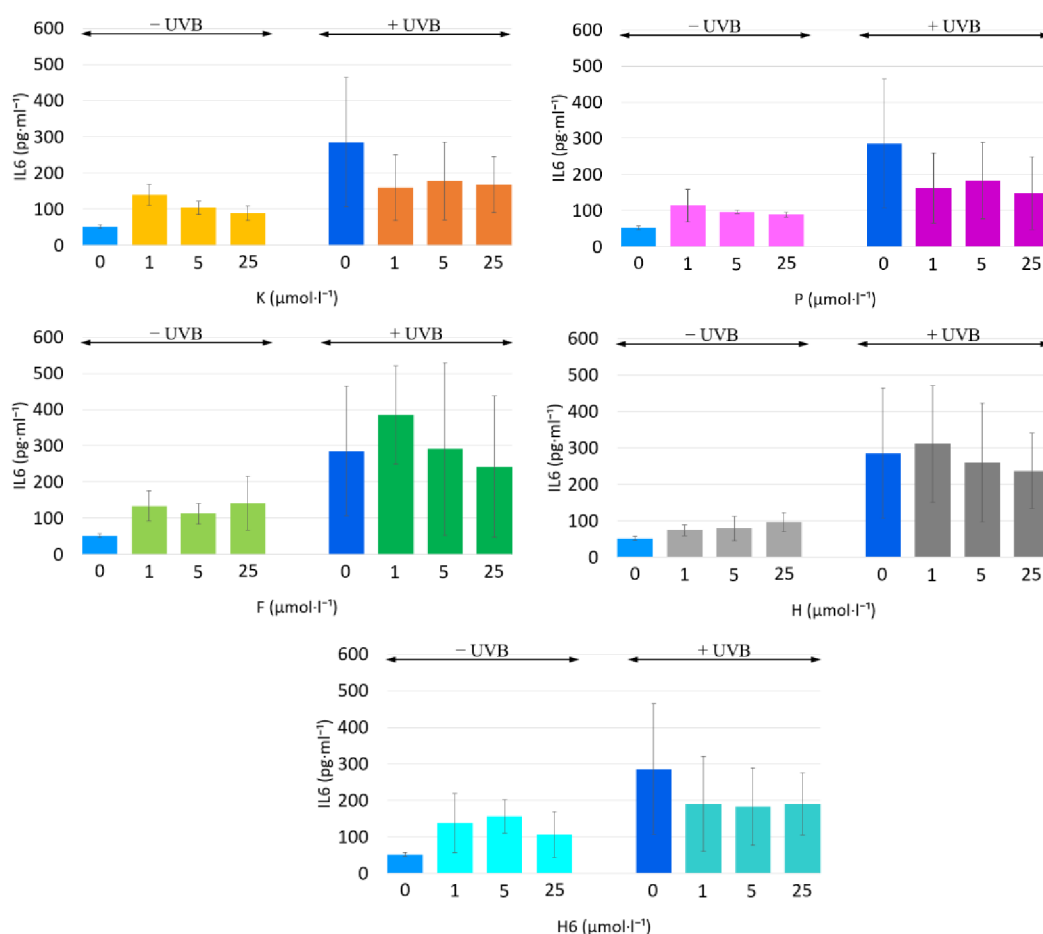
Obr. 7 Vliv K a jeho derivátů na aktivitu kaspasy-3 v buněčné linii HaCaT ozářených UVB zářením. Buňky byly inkubovány 1 hodinu s testovanými látkami (1, 5 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a poté ozářeny UVB zářením ( $150\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Aktivita kaspasy-3 byla měřena v buněčných lyzátech, které byly připraveny 4 hod po ozáření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.D ze 4 nezávislých experimentů (buňky v různých pasážích). # hodnota je signifikantně odlišná od kontroly (neozářených buněk) na hladině  $p=0,05$ ; \* hodnota je signifikantně odlišná od pozitivní kontroly (ozářených buněk) na hladině  $p=0,05$ .

### 4.3 Stanovení hladiny IL-6 v médiu

K byl schopen snížit zánětlivou reakci u potkanů po aplikaci galaktosy. Tento protizánětlivý efekt byl sledován měřením hladiny IL-6. (Li et al., 2014) Po expozici kůže UVB záření dochází k aktivaci zánětu, tedy i zvýšením hladiny IL-6. (Zhao et al., 2021) Jednou z možností, jak zjistit fotoprotektivní účinky zkoumaných látek, je stanovení hladiny zánětlivých mediátorů jako je IL 6 v médiu buněk.

Z výsledků je patrné, že všechny studované látky nesignifikantně zvyšují hladinu IL-6. UVB záření zvyšovalo produkci IL-6 ( $285,319\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v porovnání s kontrolou ( $51,969\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bylo toto navýšení nesignifikantní, protože zde byl vysoký rozptyl hodnot mezi jednotlivými experimenty.

I když získané výsledky díky vysokému rozptylu (rozdíly mezi jednotlivými měřeními) je možné sledovat u K, P a H ve všech použitých koncentracích ochranný efekt vůči zánětu vyvolanému UVB záření.



Obr. 8 Vliv K a jeho derivátů na extracelulární hladinu IL-6 v buněčné linii HaCaT ozářených UVB zářením. Buňky byly inkubovány 1 hodinu s testovanými látkami (1, 5 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a poté ozářeny UVB zářením ( $150\text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Hladina IL-6 byla měřena 4 hodiny po ozáření. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.D ze 4 nezávislých experimentů (buňky v různých pasážích).

O fotoprotektivních vlastnostech K a jeho derivátů doposud bylo zveřejněno minimum informací. V pilotní studii Hönig et al. byl studován UVA a UVB ochranný efekt K, H6 a dalších derivátů na normálních lidských fibroblastech (NHDF) a HaCaT stanovením viability. (Hönig et al., 2018)

Naše pozorování rozšiřuje tyto znalosti o UVB ochranných vlastnostech i dalších derivátů P, F a H. I když v našem experimentálním uspořádání byla životaschopnost buněk měřená jako aktivita extracelulární LDH minimálně modulována UVB zářením, stále lze pozorovat, že dochází ke snížení nežádoucího účinku UVB záření na HaCaT.

U dalšího cytokininu trans-zeatinu, který byl studován, byly popsány UVB ochranné vlastnosti na NHDF. (Yang et al., 2009) *Trans*-zeatin byl schopen snížit pokles viability

po účinku UVB záření a dále snížit expresi metaloproteinasy 1 (EC 3.4.24.80). Metaloproteinasa 1 je enzym, který štěpí proteiny extracelulární matrix, což vysvětluje příznivý efekt *trans*-zeatinu na zpomalení fyziologického procesu a předčasného stárnutí. Na NHDF ozářených UVA zářením byl prokázán příznivý efekt K a jeho derivátu na jiný enzym ze skupiny metaloproteinasa fibroblastovou elastasu (EC 3.4.21.11). Tato zjištění by mohla vysvětlit příznivé účinky i u ostatních cytokininů, které se používají v dermatologických preparátech pro zpomalení stárnutí kůže. Dále bylo zjištěno, že K a jeho deriváty ovlivňují translokaci Nrf2 do jádra, čímž zvyšují antioxidační kapacitu kožních buněk. (Ryšavá, 2021)

## 5 ZÁVĚR

Výsledky prezentované v této bakalářské práci rozšiřují informace o studovaných látkách K, jeho derivátech (F, P, H a H6) a jejich schopnosti snížit poškození buněk vyvolané UVB zářením. I když žádná z testovaných látek nevykazovala výrazně lepší vlastnosti než původní cytokinin K, jeví se tyto deriváty jako možné aktivní součásti přípravků na ochranu kůže před působením slunečního záření. Díky schopnosti modulovat produkci IL-6 a aktivitu kaspasy-3 by mohly být součástí dermatologických přípravků s regeneračním účinkem. Tyto látky rozšiřují rozsáhlou skupinu látek, které se využívají jako filtry v ochraně kůže před UVB složkou slunečního záření. I když se některé cytokininy používají v dermatologických přípravcích, mechanismus jejich účinku není znám a je stále předmětem studia.

## 6 LITERATURA

- Antille, C., Tran, C., Sorg, O., Carraux, P., Didierjean, L., & Saurat, J. -H. (2003). Vitamin A Exerts a Photoprotective Action in Skin by Absorbing Ultraviolet B Radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(5), 1163-1167. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12519.x>
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2021). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10.1002/bab.2233. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
- Baráková, M., Sysel, S., Kaňa, T., & Kadeřábek, Z. (2015). *Maturitní matričky pro seminář z fyziky ve 4. ročníku: 24. Elektromagnetické vlnění*. Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace. Retrieved May 6, 2022, from <https://www.gymkren.cz/wp-content/uploads/24.-Elektromagnetick%C3%A9-kmit%C3%A1n%C3%AD-a-vln%C4%9Bn%C3%AD.pdf>
- Barciszewski, J., Massino, F., & Clark, B. F. C. (2007). Kinetin—A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 182-192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.024>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214(4), 516-559. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>
- Cavinato, M., & Jansen-Dürr, P. (2017). Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Experimental Gerontology*, 94, 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.009>
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., et al. (2017). HaCaT Cells as a

- Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
- Diffey, B. (2009). Sunscreens: expectation and realization. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 25(5), 233-236. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2009.00459.x>
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- Ettler, K. (2004). Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového záření. Triton. ISBN 80-7254-463-2.
- Fivenson, D., Sabzevari, N., Qiblawi, S., Blitz, J., Norton, B. B., & Norton, S. A. (2021). Sunscreens: UV filters to protect us. *International Journal of Women's Dermatology*, 7(1), 45-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.08.008>
- 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>
- Heinrich, U., Moore, C. E., De Spirt, S., Tronnier, H., & Stahl, W. (2011). Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation, and modulate skin properties of women. *The Journal of Nutrition*, 141(6), 1202–1208. <https://doi.org/10.3945/jn.110.136465>
- Hönic, M., Plíhalová, L., Spíchal, L., Grúz, J., Kadlecová, A., Voller, J., Svobodová, A. R., Vostálová, J., Ulrichová, J., Doležal, K., et al. (2018). New cytokinin derivatives possess UVA and UVB photoprotective effect on human skin cells and prevent oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 946-957. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.043>
- Chan, F. K. -M., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. In A. L. Snow & M. J. Lenardo (Eds.), *Immune Homeostasis* (pp. 65-70). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7)
- Chen, L., Hu, J. Y., & Wang, S. Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5), 1013-1024. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.02.009>



- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M. & Czerpak, R. (2016). N6-benzyladenine and kinetin influence antioxidative stress parameters in human skin fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry* 413, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2642-5>
- Kadlecová, A., Maková, B., Artal-Sanz, M., Strnad, M., & Voller, J. (2019). The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. *Ageing Research Reviews*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100958>
- Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4). <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Kimura T, Doi K. (2004). Depigmentation and rejuvenation effects of kinetin on the aged skin of hairless descendants of Mexican hairless dogs. *Rejuvenation Res*, 7(1):32-9. <https://doi.org/10.1089/154916804323105062>
- Li, M., Ouyang, W., Wu, X., Zheng, Y., Wei, Y., & An, L. (2014). Kinetin inhibits apoptosis of aging spleen cells induced by D-galactose in rats. *Journal of Veterinary Science*, 15(3). <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.3.353>
- Ma, Y., & Yoo, J. (2021). History of sunscreen: An updated view. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 20(4), 1044-1049. <https://doi.org/10.1111/jocd.14004>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueirovy základy histologie*. Galén. ISBN 978-80-7492-324-1.
- Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S. K., & Shah, D. (2017). Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. In S. I. Ahmad (Ed.), *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (pp. 71-87). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7)
- Moreiras, H., Seabra, M. C., & Barral, D. C. (2021). Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094466>
- Murphrey, M. B., Miao, J. H., & Zito, P. M. (2021). Histology, Stratum Corneum. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71–83. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>
- Ochu, E. E., Rothwell, N. J., & Waters, C. M. (1998). Caspases Mediate 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis but Not Necrosis in PC12 Cells. *Journal of*

- Neurochemistry*, 70(6), 2637-2640. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062637.x>
- Pehalova, L., Krejci, D., Snajdrova, L., & Dusek, L. (2021). Cancer incidence trends in the Czech Republic. *Cancer Epidemiology*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2021.101975>
- Procházka, S. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- Racek, J., & Rajdl, D. (2021). *Klinická biochemie* (Třetí, přepracované a rozšířené vydání). Galén.
- Rajnochová Svobodová, A. (2012). Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence. Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3183-3.
- Ryšavá K (2021): *Vliv UV záření na kožní buňky*. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- 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>
- Shibata, A., Nakagawa, K., Yamanoi, H., Tsuduki, T., Sookwong, P., Higuchi, O., Kimura, F., & Miyazawa, T. (2010). Sulforaphane suppresses ultraviolet B-induced inflammation in HaCaT keratinocytes and HR-1 hairless mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 702-709. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.007>
- Svobodová, A., & Vostálová, J. (2010). Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options. *International Journal of Radiation Biology*, 86(12), 999-1030. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.501842>
- Svobodová, A., Walterova, D., & Vostálová, J. (2006). ULTRAVIOLET LIGHT INDUCED ALTERATION TO THE SKIN. *Biomedical Papers*, 150(1), 25-38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Szüciová L, Spíchal L, Dolezal K, Zatloukal M, Greplová J, Galuszka P, Krystof V, Voller J, Popa I, Massino FJ, et al. (2009). Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorg Med Chem*, 17(5):1938-47. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.041>.

- Šíma, P., & Turek, B. (2015). Vitamín D a imunita. *Živa: Rozhled v oboru veškeré přírody*, 2015(6), 279-281. <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vitamin-d-a-imunita.pdf>
- Vostálová, J., Zdařilová, A., & Svobodová, A. (2010). Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 302(3), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00403-009-0999-6>
- Wanitphakdeedecha, R., Meeprathom, W., & Manuskiatti, W. (2015). Efficacy and safety of 0.1% kinetin cream in the treatment of photoaging skin. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 81(5). <https://doi.org/10.4103/0378-6323.157446>
- Wohlrab, J., & Kreft, D. (2014). Niacinamide - Mechanisms of Action and Its Topical Use in Dermatology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(6), 311-315. <https://doi.org/10.1159/000359974>
- Xu H, Yan Y, Li L, Peng S, Qu T, Wang B. (2010) Ultraviolet B-induced apoptosis of human skin fibroblasts involves activation of caspase-8 and -3 with increased expression of vimentin. *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*. 26(4):198-204. <https://doi: 10.1111/j.1600-0781.2010.00522>.
- Yang, B., Ji, C., Kang, J., Chen, W., Bi, Z., & Wan, Y. (2009). Trans-Zeatin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAP kinase signaling in human skin fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 23(4), 555–560. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000164](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000164)
- Yousef, H., Alhaji, M., & Sharma, S. (2021). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Zhao, H.-C., Xiao, T., & Chen, Y.-J. (2021). Ultraviolet Induced Skin Inflammation. *International Journal of Dermatology and Venereology*, 4(4), 229-235. <https://doi.org/10.1097/JD9.0000000000000144>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
BSA	hovězí sérový albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	dihydroxyfenylalanin
DTT	dithiotreitol
EAS	endogenní antioxidační systém
EC	enzyme commission number
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EtOH	ethanol
F	6-furfurylamino-9-(2-tetrahydrofuran-2-yl)purin
FBS	fetální bovinní sérum
GPx	glutathionperoxidasa
GSR	glutathionreduktasa
GST	glutathion-S-transferasa
H	6-(tetrahydrofuran-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
H6	6-(thiofen-2-ylmethylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)purin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
IL-6	interleukin-6
IR	infračervené
K	kinetin
KAT	katalasa
LDH	laktátdehydrogenasa
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
P	6-furfurylamino-9-(2-tetrahydropyran-2-yl)purin
PABA	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina
PBS	fosfátový pufr
PNC	roztok penicilinu
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
STR	streptomycin
TxR	thioredoxinreduktasa
UV	ultrafialový
UVA	ultrafialový A (dlouhovlnné)
UVB	ultrafialový B (středněvlnné)
UVC	ultrafialový C (krátkovlnné)
VIS	viditelné