

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2023**

**Dominika Trofimenková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Vplyv vybraných triptánov na chemicky  
indukovaný zápal v kožných bunkách**

**Diplomová práce**

**Dominika Trofimenková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Dominika TROFIMENKOVÁ**  
Osobní číslo: **R210606**  
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Vplyv vybraných triptánov na chemicky indukovaný zápal v kožných bunkách**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

- 1) Vypracovanie rešerše na tému diplomovej práce
- 2) Stanovenie hladiny pro-a protizápalových cytokínov v chemicky indukovanom zápale kožných buniek v prítomnosti triptánov
- 3) Stanovenie hladiny exprese bariérových génov v zápalovom kožnom modele po expozícii triptánmi
- 4) Vypracovanie diplomovej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe diplomovej práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

- 1) Danuta Gutowska-Owsiak et al: IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion, 2011, *Experimental Dermatology*
- 2) Franziska Rademacher et al: Skin microbiota and human 3D skin models, *Experimental Dermatology*, 2018
- 3) Ellen H. van den Bogaard et al: Genetic and Pharmacological Analysis Identifies a Physiological Role for the AHR in Epidermal Differentiation, *Journal of Investigative Dermatology*, 2015
- 4) Jinlei Yu et al: A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2019
- 5) Ehrlich A, Kerkvliet N: Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases? *Current opinion in Toxicology* 2, 2017
- 6) Články publikované v odborných periodikách

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 20. října 2021  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

## BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Meno a priezvisko autora	Dominika Trofimenková
Názov práce	Vplyv vybraných triptánov na chemicky indukovaný zápal v kožných bunkách
Typ práce	Diplomová práca
Pracovisko	Katedra bunkovej biológie a genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedúci práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Kožné zápalové ochorenia výrazne znižujú kvalitu života a ich liečba je orientovaná na imunomoduláciu. Táto práca sa zaoberá štúdiom vplyvu triptánov na obnovenie expresie bariérových génov hornerínu, filagrínu a involukrínu po jej znížení v chemicky indukovanom zápalu podobnom stave. Najskôr bola stanovená expresia cytokínov na úrovni mRNA po pôsobení rozličných koncentrácií imiquimodu – látky, ktorá sa v myšiach používa pri indukovaní psoriatického modelu kože. Keďže imiquimod expresiu cytokínov výrazne neovplyvňoval, prešlo sa k indukcii chemického zápalu použitím IL-17A, IL-1<math>\beta</math> a TNF<math>\alpha</math> po dobu 24 a 48 hodín a následne sledovaniu ich vplyvu na expresiu bariérových génov. V oboch inkubáciách cytokíny znižovali expresiu bariérových génov, najviac ju znižoval TNF<math>\alpha</math>. Následne bola sledovaná expresia bariérových génov po 24 hodinovom co-treatmente, v ktorom bola využitá kombinácia cytokínov s avitriptánom, donitriptánom, eletriptánom a rizatriptánom. Ani jednému z triptánov sa nepodarilo obnoviť expresiu bariérových génov.</p>
Kľúčové slová	bariérové gény, triptány, psoriáza, atopická dermatitída, AhR
Počet strán	81
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Dominika Trofimenková
Title	The Impact of Selected Triptans on Chemically Induced Inflammation in Skin Cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
The year of presentation	2023
Abstract	<p>Skin inflammatory diseases significantly lower quality of life and can be treated by immunomodulation. This thesis studies the impact of triptans on restoring the expression of barrier genes hornerin, filaggrin and involucrin after it has been reduced by chemically induced inflammation-like state. Firstly, mRNA expression of cytokines was measured after treatment with various concentrations of imiquimod – a substance used in inducing a psoriasis-like state in mice models. Imiquimod didn't significantly alter the expression of cytokines, which is why chemical inflammation was then induced by IL-17A, IL-1<math>\beta</math> and TNF<math>\alpha</math> in 24 and 48 hours. Then, the mRNA expression of barrier genes was measured. Cytokines decreased the expression of barrier genes with the biggest reduction seen after using TNF<math>\alpha</math>. Lastly, the expression of barrier genes mRNA was measured after co-treatment of cytokine mixture with avitriptan, donitriptan, eletriptan and rizatriptan. The triptans were not able to restore the expression of any of the barrier genes.</p>
Keywords	barrier genes, triptans, psoriasis, atopic dermatitis, AhR
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Slovak

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D s označením všetkých použitých literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa: .....

.....  
Dominika Trofimenková

## **Pod'akovanie**

Rada by som sa predovšetkým poďakovala vedúcemu mojej práce, pánovi doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, nesmiernu trpezlivosť, ochotu a čas, ktoré mi venoval. Poďakovanie patrí aj všetkým pracovníkom kolektívu Laboratória molekulárnej farmakológie a toxikológie, hlavne Mgr. Eliške Zgarbovej za jej cenné rady. Veľká vďaka patrí aj mojim rodičom, ktorí mi boli počas štúdia obrovskou oporou a komu je venovaná táto diplomová práca.



# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CIELE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNY PREHLAD.....	3
3.1.	Imunitný systém kože .....	3
3.1.1.	Bunky podieľajúce sa na fungovaní imunitného systému kože .....	3
3.1.1.1.	Keratinocyty .....	3
3.1.1.1.1.	HaCaT bunková línia .....	4
3.1.1.2.	Melanocyty.....	4
3.1.1.3.	B lymfocyty.....	4
3.1.1.4.	T lymfocyty .....	5
3.1.1.4.1.	Th lymfocyty (CD4+ bunky).....	5
3.1.1.4.2.	Cytotoxické T lymfocyty (CD8+ bunky).....	6
3.1.1.4.3.	Treg lymfocyty.....	6
3.1.1.4.4.	$\gamma\delta$ T lymfocyty .....	6
3.1.1.5.	NK a NKT bunky .....	7
3.1.1.6.	Neutrofilý .....	7
3.1.1.7.	Monocyty a makrofágy .....	7
3.1.1.8.	Bazofily.....	7
3.1.1.9.	Žirne bunky .....	8
3.1.1.10.	Eozinofily.....	8
3.1.1.11.	Endoteliálne bunky.....	8
3.1.2.	Iné bunkové a nebunkové zložky podieľajúce sa na fungovaní imunitného systému kože .....	9
3.1.3.	Kožný zápal.....	9
3.1.3.1.	Psoriáza .....	10
3.1.3.2.	Atopická dermatitída .....	12
3.2.	Cytokíny.....	13
3.2.1.	TNF- $\alpha$ – tumor necrosis factor $\alpha$ .....	14
3.2.2.	Interleukín 17A (IL-17A).....	16
3.2.3.	Interleukín 1 (IL-1) .....	18
3.3.	Receptory .....	22
3.3.1.	Toll-like receptory.....	22
3.3.2.	Aryluhľovodíkový receptor (AhR) .....	24
3.4.	Zlúčeniny .....	26
3.4.1.	Imiquimod.....	26

3.4.1.1.	Farmakokinetika.....	27
3.4.1.1.1.	Absorpcia, distribúcia a vylučovanie .....	27
3.4.1.1.2.	Metabolizmus .....	27
3.4.1.2.	Farmakodynamika.....	27
3.4.1.2.1.	Mechanizmus účinku skrz aktiváciu TLR7 a TLR8 .....	28
3.4.2.	Triptány.....	29
4	MATERIÁL A METÓDY .....	31
4.1.	Materiál .....	31
4.2.	Metodika práce.....	34
4.2.2.1.	Pasážovanie buniek HaCaT bunkovej línie.....	35
4.2.4.1.	Výsev pre izoláciu RNA .....	36
4.2.4.2.	Treatment pre izoláciu RNA .....	36
4.2.5.1.	Výsev pre izoláciu RNA .....	36
4.2.5.2.	Treatment pre izoláciu RNA .....	36
4.2.6.1.	Výsev pre izoláciu RNA .....	37
4.2.6.2.	Treatment pre izoláciu RNA .....	37
4.2.9.1.	TaqMan Gene Expression Assay .....	39
4.2.9.2.	KiCqStart Probe Assays .....	40
5	VÝSLEDKY .....	42
5.1.	1. experiment – vplyv IMQ na expresiu bariérových génov a cytokínov v HaCaT bunkovej línie na úrovni mRNA.....	42
5.2.	2. experiment – vplyv IMQ na expresiu cytokínov a vplyv cytokínov na expresiu bariérových génov.....	46
5.3.	3. experiment – vplyv cytokínov a triptánov vo forme co-treatmentu na expresiu bariérových génov na úrovni mRNA .....	49
6	DISKUSIA .....	54
7	ZÁVER .....	58
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	59

## Zoznam symbolov a skratiek

5-HT	5-hydroxytryptamín
A2A	adenozínový A2A receptor
Act1	signálny proteín v dráhe IL-17
AD	atopická dermatitída
AhR	aryl uhl'ovodíkový receptor
AIP/XAP2	s AhR interagujúci proteín inak nazývaný aj XAP2
AMPs	antimikrobiálne peptidy
AP-1	aktivačný proteín 1
APCs	antigén prezentujúce bunky
BCR	B antigénový receptor B buniek
AR	adenozínový receptor
ARNT	aryl uhl'ovodíkový receptorový jadrový translokátor
AVI	avitriptán
Bcl3	B cell lymphoma 3
CD	cluster of differentiation
CNS	centrálny nervový systém
CpG	oblasti DNA kde za cytozínom nasleduje guanín
CTLA8	starší názov pre IL-17A, cytotoxický T lymfocytový antigén 8
CYP	cytochróm P450
DAMP	damage associated molecular pattern – s poškodením súvisiaci molekulárny vzor
DD	death domain – doména smrti
DETC	dendritické epidermálne T bunky
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	dymetylsulfoxid
DONI	donitriptán
DRE	dioxín-responzívne elementy
ECM	extracelulárna matrix
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová
ELE	eletriptán
FADD	doména smrti asociovaná s Fas
FBS	fetálne bovinné sérum
FI	fold induction
FICZ	6-formylindolo(3,2-b)karbazol
FLG	filagrín
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
G-CSF	faktor stimulujúci granulocytárne kolónie
GM-CSF	faktor stimulujúci granulocytárne makrofágne kolónie
HPA	hypotalamo-hypofyzárna-nadobličková os
HRNR	hornerín
HSP90	heat-shock proteín 90
HSV13	čítací rámec 13 Herpesvírusu saimiri
HygB	hygromycín B
icIL-1Ra	vnútrobná izoforma IL-1Ra
IFN $\gamma$	interferón $\gamma$
IgE	imunoglobulín E
IKK	inhibitorová $\kappa$ B kináza
IL	interleukín
IL-17R	IL-17 receptor

IL-1R	IL-1 receptor
IL-1RacP	doplňkový receptor IL-1
IMQ	imiquimod
IVL	involukrín
I $\kappa$ B	inhibítor jadrového faktoru $\kappa$ B
LL37	katelicidínový proteín
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
LPS	lipopolysacharidy
MAL	mostíkový adaptor, komponent na MyD88 závislej signalizácie
MAOs	monoaminoxidázy
MAPK	mitogénom aktivované proteín kinázy
MD-2	koreceptorová molekula TLR4
MEKK3	tiež MAP3K3 – mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrixová metaloproteináza
MPS	mononukleárny fagocytový systém
MyD88	adaptorový proteín, myeloid differentiation primary response 88
NF- $\kappa$ B	jadrový/nukleárny faktor $\kappa$ B
NHK	normálne ľudské keratinocyty
NLRP3	proteín 3 obsahujúci na leucín bohaté opakovania a pyrín
PAMPs	molekulárne vzory patogénov, pathogen associated molecular patterns
PPRs	pattern recognition receptors – receptory rozpoznávajúce vzory
TLR	toll-like receptor
AMPs	antimikrobiálne peptidy
PAS	Period-Arnt-Single

PBS	fosfátový pufor
Rac1	GTP-viažuci proteín, regulátor bunkových procesov
RIP	s receptormi interagujúci proteín
RIZA	rizatriptán
ROS	reactive oxygen radicals – reaktívne kyslíkové radikály
SALT	skin associated lymphoid tissue - slizničný imunitný systém kože
SEFIR	štruktúrny motív intracelulárnej domény IL-17R
sIL-1Ra	sekrétovaná izoforma IL-1Ra
TACE	TNF konvertujúci enzým
Tc bunky	cytotoxické T bunky
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín
TCR	T bunkový receptor
Th bunky	pomocné T bunky
TIR	Toll-interleukín 1 receptorová doména
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nádorovej nekrózy
TNFR	TNF receptor
TRADD	s TNFR asociovaná doména smrti
TRAF	faktor asociovaný s TNFR
Treg bunky	regulačné T bunky
TRIF	TIR doménu obsahujúci adaptorový proteín indukujúci IFN $\beta$
TSLP	týmusový stromálny lymfopoetín
UT	untreated – negatívna kontrola

## Zoznam obrázkov a grafov

Obrázok č. 1: Klinické prejavy psoriasis vulgaris.....	11
Obrázok č. 2: Začervenaná koža ako prejav atopickej dermatitídy. ....	13
Obrázok č. 3: Chemická štruktúra imiquimodu. ....	27
Obrázok č. 4: Chemické štruktúry známych triptánov.....	30
Graf č. 1: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii. ....	42
Graf č. 2: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii. ....	43
Graf č. 3: Expresia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	44
Graf č. 4: Expresia génu IL-1 $\beta$ na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii. ....	45
Graf č. 5: Expresia génu TNF $\alpha$ na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	46
Graf č. 6: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii. ....	47
Graf č. 7: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	48
Graf č. 8: Expresia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	49
Graf č. 9: Expresia génu CYP1A1 na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	50
Graf č. 10: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii. ....	51
Graf č. 11: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	52
Graf č. 12: Expresia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.....	53

## **Zoznam tabuliek**

Tabuľka č. 1: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu. ....	39
Tabuľka č. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre TNF $\alpha$ , IL-17A a IL-1 $\beta$ pre RT-qPCR. ....	39
Tabuľka č. 3: Nastavenie RT-qPCR reakcie pre TaqMan Gene Expression Assay. ....	40
Tabuľka č. 4: Zloženie reakčnej zmesi pre HRNR, FLG a IVL pre RT-qPCR. ....	40
Tabuľka č. 5: Nastavenie RT-qPCR reakcie pre KiCqStart Probe Assays. ....	41



# 1 ÚVOD

Zápalové a autoimunitné ochorenia kože ako psoriáza a atopická dermatitída sú veľmi rozšírenými ochoreniami významne znižujúcimi kvalitu života ľudí na nich trpiacich. Ich liečba je sústredená mimo iné aj na aktiváciu aryl uhl'ovodíkového receptora, čo je ligandom aktivovaný transkripčný faktor. V bunkách kože sa chová ako biosenzor reagujúci na vonkajšie alebo vnútorné podnety transkripciou cieľových génov a podieľa sa taktiež na udržiavaní epidermálnej bariéry. Správna funkcia epidermálnej bariéry je podmienená rovnovážnou expresiou bariérových génov, medzi ktoré patrí aj hornerín, filagrín a involukrín. Zápalové ochorenia kože sú charakteristické expresiou rôznych cytokínov, ktoré sa podieľajú na ich patogenéze. Okrem aktivácie aryluhl'ovodíkového receptora sa k liečbe takýchto ochorení využíva aj modulácia expresie cytokínov, ktoré sa zúčastňujú v ich patogenéze. Táto diplomová práca sa zameriava na pôsobenie triptánov (antimigreník a ligandov aryluhl'ovodíkového receptora) na obnovovanie expresie bariérových génov kože, ktorá je po pôsobení cytokínov znížená.

## **2 CIELE PRÁCE**

### **Teoretická časť**

Vypracovanie rešerše k téme diplomovej práce

Vypracovanie diplomovej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe diplomovej práce

### **Experimentálna časť**

Stanovenie hladiny pro a protizápalových cytokínov v chemicky indukovanom zápale kožných buniek v prítomnosti triptánov

Stanovenie expresie bariérových génov v zápalovom kožnom modele po expozícii triptánmi

## 3 LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1. Imunitný systém kože

Koža je najväčším ľudským orgánom a jej hlavnou funkciou je, že tvorí fyzikálne-mechanickú bariéru brániacu organizmus pred vplyvom vonkajšieho prostredia. Jej ďalšou nevyhnutnou funkciou je tvorba množstva rôznych biologicky aktívnych látok imunitného systému, ktorá sa vyvinula ako doplnková forma obrany organizmu (Bos *et* Kapsenberg, 1986). Koža ako orgán obsahuje viacero typov imunitných buniek, ktoré sa zúčastňujú ako v procesoch vrodenej imunity, tak aj v procesoch imunity získanej. Imunitný systém kože zahŕňa kožné bunky a špeciálne imunitné bunky, čím tvorí SALT – slizničný imunitný systém kože (skin-associated lymphoid tissue) (Quaresma, 2019). Bunkové zložky SALT tvoria dendritické bunky, mastocyty, B a T lymfocyty a keratinocyty (Nestle *et al.*, 2009).

#### 3.1.1. Bunky podieľajúce sa na fungovaní imunitného systému kože

##### 3.1.1.1. Keratinocyty

Keratinocyty sú epiteliálne bunky prepojené tesnými spojeniami (tight junctions) a majú dôležitú úlohu pri udržiavaní mechanických a bariérových funkcií epidermis. Produkujú cytokíny a v určitých prípadoch exprimujú MHC II glykoproteíny (major histocompatibility complex), čím sa zúčastňujú infekčných a zápalových procesov v koži (Nickoloff *et* Turka, 1994). Dokážu rozoznať potenciálne patogény a vysoko konzervované štruktúry známe ako PAMPs – molekulárne vzory patogénov (pathogen-associated molecular patterns) (Nestle *et al.*, 2009). PAMPs sú rozpoznávané receptormi všeobecne známymi ako vzory-rozpoznávajúce receptory (PPRs – pattern recognition receptors), medzi ktoré patria aj toll-like receptory (TLR). Epidermálne keratinocyty exprimujú niekoľko druhov toll-like receptorov – na bunkovom povrchu hlavne TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 a TLR6 a v endozómoch exprimujú TLR3 a TLR9 (Lebre *et al.*, 2007). Aktivácia TLR signálnych dráh nastáva po väzbe PAMPs a spúšťa kaskádu imunitných odpovedí získanej a vrodenej imunity. Aktivácia TLR keratinocytov vedie k odpovedi hlavne Th1 buniek (T – pomocné bunky) a následnej aktivácii interferónov  $\alpha$  a  $\beta$  (Lai *et* Gallo, 2008). Produkujú antimikrobiálne peptidy (AMPs) defenzíny a katelicidíny, ktoré eukaryotickým bunkám slúžia ako vysoko konzervovaný obranný mechanizmus. AMPs sa exprimujú v poškodenom epiteli a pôsobia proti mikroorganizmom aktiváciou imunitných buniek a modulovaním hladiny cytokínov

(Gilliet *et Lande*, 2008). Keratinocyty produkujú hlavne IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22 a tumor nekrozový faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Albanesi *et al.*, 2005).

#### **3.1.1.1. HaCaT bunková línia**

HaCaT bunková línia je línia imortalizovaných ľudských keratinocytov využívaná pre štúdium epidermálnej homeostázy a patofyziológie, avšak oproti normálnym ľudským keratinocytom (NHK) má svoje limity. HaCaT bunky majú v bunkovej kultúre vysoký diferenciačný potenciál, čo vedie k ich používaniu ako alternatívy k NHK. HaCaT a NHK bunky majú rozdielny transkripčný profil epidermálnych diferenciačných markerov závislý na cytokínoch Th buniek (Seo *et al.*, 2012).

#### **3.1.1.2. Melanocyty**

Melanocyty sú odvodené z buniek neurálnej lišty (Park *et Yaar*, 2012). Produkujú pigment melanín, ktorý koži dodáva farbu a chráni keratinocyty pred UV radiáciou, ktorá môže indukovať DNA zlomy (Brenner *et Hearing*, 2008). Sú schopné kontrolovať lokálne odpovede vrodenej i získanej imunity, iniciujú fagocytózu patogénov a produkciu IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  a chemokínov (Mattei *et al.*, 1994). Po kontakte s infekčnými časticami sú schopné exprimovať niekoľko druhov TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 a TLR9) (Yu *et al.*, 2009).

#### **3.1.1.3. B lymfocyty**

B lymfocyty sú hlavné bunky humorálnej zložky imunitnej odpovede – syntetizujú protilátky (Laffleur *et al.*, 2017). Môžu taktiež fungovať ako antigén-prezentujúce bunky (APCs) a produkovať cytokíny (Rodríguez-Pinto, 2005). Exprimujú B antigénový receptor (BCR) – imunoglobulínová molekula skladajúca sa zo 4 reťazcov – 2 ľahké a 2 ťažké – spojených disulfidickými mostíkmi. BCR deteguje antigén priamo, a každá B bunka exprimuje špecifický BCR (Leichner *et Kambayashi*, 2014). B lymfocyty sa v zdravej koži vyskytujú len zriedka, migrujú do nej ak je prítomný nejaký antigén skrz endotel a interagujú s receptormi selektínov, integrínov s chemokínov (Shimizu *et al.*, 1992). Pri infekčných a zápalových kožných procesoch (napríklad atopická dermatitída) môžu B lymfocyty vykazovať prozápalové, no aj inhibičné efekty. Mechanizmus účinku B lymfocytov je sprostredkovaný ich interakciou s T lymfocytmi a zložkami vrodenej imunity (Geherin *et al.*, 2012).

### 3.1.1.4. T lymfocyty

T lymfocyty sú hlavnými bunkami získanej imunity a produkujú vysoko polymorfné antigénové receptory, ktorými sú schopné rozpoznať antigény. Po rozpoznaní antigénu, tzv. aktivácii, podstupujú klonálne preskupenie a postupne nadobúdajú schopnosť zabíjať patogénmi napadnuté bunky s vysokou presnosťou (von Boehmer, 1997). T bunky, rovnako ako B bunky vznikajú v kostnej dreni, avšak T bunky následne ešte migrujú do týmusu, kde dospievajú. Dospelé T bunky sa považujú za „naivné“ dokým nedôjde k ich stretu s antigénom. Po maturácii T bunky začnú na povrchu exprimovať unikátnu antigén viažucu molekulu – T bunkový receptor (TCR – T cell receptor). Zatiaľ čo B bunky vo svojom povrchu viažu protilátky, ktoré samotné dokážu rozpoznať antigén, väčšina TCR rozpoznáva antigén vo forme komplexných ligandov – antigénne peptidy naviazané na MHC molekulu (major histocompatibility complex) inej bunky (Moss *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 2006). Dospelé T lymfocyty exprimujú buď CD4 alebo CD8 glykoproteíny, na základe čoho sú rozdelené do dvoch základných efektorových subpopulácií: CD4+ pomocné (Th) a CD8+ cytotoxické (Tc) bunky (Andersen *et al.*, 2006). Fakt, že aj zdravá koža obsahuje T bunky je známy už od osemdesiatych rokov (Bos *et al.*, 1987), ide cca o 1 milión T buniek na cm<sup>2</sup> kože (Clark *et al.*, 2006) Populácia lymfocytov v koži je veľmi heterogénna a skladá sa hlavne z pamäťových T buniek (>95%) (Bos *et al.*, 1987). V epidermis sa nachádzajú v *stratum basale*, v blízkosti Langerhansových buniek (Foster *et al.*, 1990). V dermis sa T bunky zhlukujú v okolí kapilár, no je možné ich nájsť aj v zóne dermoepidermálnej junkcie a v okolí kožných prírveskov – nechtov, vlasov, potných a mazových žliaz. CD4+ a CD8+ T lymfocyty sa v koži vyskytujú v podobných množstvách a väčšina z nich je taktiež pamäťová (Bos *et al.*, 1987). V koži sa nachádzajú rôzne T lymfocyty zúčastňujúce sa klasických imunitných odpovedí, hlavne pomocné T lymfocyty (helper T cells) Th1, Th2, Th17 a regulačné T lymfocyty (Treg), ktoré boli v koži nájdené pri rôznych infekčných či zápalových ochoreniach ako je psoriáza alebo atopická dermatitída (Nestle *et al.*, 2009).

#### 3.1.1.4.1. Th lymfocyty (CD4+ bunky)

Pomocné Th lymfocyty sú nevyhnutné pre takmer všetky odpovede získaného imunitného systému. Pomáhajú aktivovať B bunky, ktorých funkciou je vylučovať protilátky a taktiež pomáhajú aktivovať cytotoxické T bunky, ktoré zabíjajú infikované

cieľové bunky (Alberts *et al.*, 2002). Th17 lymfocyty sú hlavným zdrojom IL-17 a regulujú tkanivové zápal (Park *et al.*, 2005). Sú taktiež kľúčovými bunkami pri patogenéze psoriázy a atopickej dermatitídy a skrz IL-17 zvyšujú expresiu keratinocytových AMPs (Liang *et al.*, 2006). Th22 bunky produkujú hlavne IL-22 a zúčastňujú sa imunopatologických procesov autoimunitných ochorení kože (Nogralles *et al.*, 2009).

#### **3.1.1.4.2. Cytotoxické T lymfocyty (CD8+ bunky)**

Cytotoxické T bunky exprimujú glykoproteín CD8, rozoznávajú peptidy naviazané na MHC triedy I a hrajú kľúčovú úlohu pri potláčaní až eradikovaní virálnych infekcií (Bjorkman *et al.*, 1987).

#### **3.1.1.4.3. Treg lymfocyty**

Existencia a supresorová funkcia Treg buniek boli postulované už v roku 1970. V tom čase neboli tieto bunky ani ich vylučované „faktory“ charakterizované a na celý koncept supresorových T buniek sa na pár rokov zabudlo (Gershon *et al.*, 1970). V roku 1995 boli tieto bunky popísané a pomenované ako Treg lymfocyty – podskupina periférnych CD4+ Th buniek exprimujúca CD25 (Sakaguchi *et al.*, 1995). Sú kritické pre správny vývin a udržiavanie „samotolerancie“ (prevencia autoimunity), potláčajú aktiváciu a proliferáciu ostatných T buniek a produkciu cytokínov (Sakaguchi, 2005). V zdravej, nezapálenej koži sú Treg distribuované preferenčne v blízkosti vlasových folikul a všeobecne v koži s vyššou hustotou ochlpenia (Rodriguez *et al.*, 2014).

#### **3.1.1.4.4. $\gamma\delta$ T lymfocyty**

$\gamma\delta$  T bunky boli objavené v roku 1986 (Bank *et al.*, 1986) a ide o epiteliálny typ buniek (Nielsen *et al.*, 2017). Rovnako ako B a T lymfocyty exprimujú TCR už v týmuse (Jin *et al.*, 2009).  $\gamma\delta$  T lymfocyty v koži tvoria intraepiteliálnu populáciu lymfocytov (IEL) a nazývajú sa taktiež dendritické epidermálne T bunky (DETC). Svojim TCR rozoznávajú neznáme ligandy poškodených keratinocytov. Aktivované DETC sú schopné cytolýzy, proliferácie *in vitro*, produkcie fibroblastového rastového faktora 7 (potrebný pri hojení rán) a produkcie cytokínov (Jameson *et al.*, 2004). Rovnako produkujú aj IL-17, zúčastňujúci sa v patogenéze psoriázy a môžu byť teda potenciálnym budúcim cieľom pri liečení tohto ochorenia (Cai *et al.*, 2011).

### **3.1.1.5. NK a NKT bunky**

NK bunky sú lymfocyty, ktoré neexprimujú T a B receptory (Kumar *et al.*, 2017). Sú súčasťou vrodenej aj získanej imunitnej odpovede a môžu produkovať granzým, perforín a granulyzín, čím sa taktiež zúčastňujú priamej degradácie mikroorganizmov (Trapani, 1995). Aktivujú makrofágy, čo vedie k fagocytóze mikroorganizmov (Kumar *et al.*, 2017).

NKT bunky sú typom NK buniek, ktoré vykazujú vlastnosti NK a T buniek a sú schopné uvoľňovať interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), IL-22 a IL-17. Tieto cytokíny sú dôležité pri aktivácii makrofágov a udržiavaní integrity epidermálnej bariéry (Rachitskaya *et al.*, 2008; Witte *et al.*, 2010; Mochiegan *et Malavolta*, 2004).

### **3.1.1.6. Neutrofilly**

Neutrofilly sú najpočetnejšími myeloidnými bunkami. Ide o mobilné, krátkožijúce fagotické leukocyty, ktoré patria do prvej línie obrany pri akútnych zápalových stavoch. Vznikajú v kostnej dreni a sú naplnené granulami. Ich funkcie pohlcovania, zabíjania a metabolizovania patogénov sú závislé na proteínoch v primárnych a sekundárnych granulách. Primárne granulá obsahujú najtoxickejšie mediátory - kationické defenzíny, myeloperoxidázu alebo elastázu, zatiaľ čo sekundárne granulá obsahujú chelátory železa, laktoferín a iné metaloproteázy. Mŕtve neutrofilly v miestach zápalu prispievajú k tvorbe hnisu (Lacy, 2006; Actor, 2012).

### **3.1.1.7. Monocyty a makrofágy**

Monocyty a makrofágy patria medzi mononukleárne fagocytujúce imunitné bunky. Cirkulujú krvným obehom a v prípade zápalu cestujú do zasiahnutého miesta (Olingy *et al.*, 2019). Makrofágy sú terminálne diferencované, dlho-žijúce monocyty žijúce v pojivovom tkanive kde tvoria mononukleárny fagocytový systém (MPS) - populáciu buniek odvodených od progenitorových buniek z kostnej drene, ktoré diferencujú na krvné monocyty, z ktorých v tkanivách vznikajú makrofágy (Van Furth, 1992). Špecializované makrofágy v koži sa nazývajú Langerhansove bunky (Actor, 2012).

### **3.1.1.8. Bazofily**

Bazofily boli objavené pred viac ako 140 rokmi (Ehrlich, 1879) a v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia bolo pozorované, že môžu vylučovať

histamín po cross-linkovaní s vysoko afinitným receptorom pre IgE (Ishizaka *et al.*, 1972). Prispievajú k patogenéze kožných alergických ochorení a zápalov (Mukai *et al.*, 2005; Obata *et al.*, 2007). Sú schopné infiltrácie do zapálených tkanív, hlavne u ľudí s atopickou dermatitídou (AD) (Stone *et al.*, 2010).

#### **3.1.1.9. Žirne bunky**

Žirne bunky sú tkanivové zápalové bunky hematopoietického pôvodu. Reagujú na signály vrodeneho a získaného imunitného systému okamžitou alebo oneskorenou sekréciou zápalových mediátorov. Nachádzajú sa prevažne v blízkosti pojivového tkaniva. Zapájajú sa do patogenézy hypersenzitivity, astmy, mastocytózy a autoimunitných ochorení a taktiež pri hojení rán (Yong, 1997; Stone *et al.*, 2010).

#### **3.1.1.10. Eozinofily**

Eozinofily, ako väčšina imunitných buniek, sú produkované v kostnej dreni z pluripotentných kmeňových buniek, ktoré najskôr diferencujú na hybridného prekursora. Tento hybridný prekursor nesie vlastnosti bazofilov a eozinofilov. Následne bunky ďalej diferencujú do samostatnej eozinofilovej línie, kde kľúčovým faktorom ich vývoja je cytokín IL-5. Ten je zároveň produkovaný v miestach alergického zápalu alebo infekcií a distálne pôsobí na kostnú dreň čo vedie k uvoľneniu eozinofilov (Boyce *et al.*, 1995, Rosenberg *et al.*, 2007). Eozinofily sú spájané s patogenézou alergií respiračného traktu, ktoré sa môže vyvinúť až do bodu alergickej astmy (Bochner *et Busse*, 2005).

#### **3.1.1.11. Endoteliálne bunky**

Endoteliálne bunky, rovnako ako hematopoietické bunky, vysoko pravdepodobne vznikajú z rovnakej prekursorovej bunky – hemangioblastu (Choi *et al.*, 1998). Sú dôležitou súčasťou srdcového a cievneho systému a zabezpečujú dôležité prepojenie medzi kardiovaskulárnym a imunitným systémom (Sturtzel, 2017). Pomáhajú udržiavať cievne steny a obehové funkcie. Tvoria bariéru nazývanú endotel, ktorá je semipermeabilná a má na starosti prenos malých i veľkých molekúl (Sumpio *et al.*, 2002). V imunitnom systéme a pri zápalových reakciách endoteliálne bunky regulujú pohyb lymfocytov a leukocytov do tkanív. Pri zápalových stavoch dochádza k hemodynamickým zmenám v mieste zápalu. Vďaka dilatácii ciev sa zvyšuje prúdenie krvi a mediátory pôsobiace na endotel sú uvoľnené. Aktivované endoteliálne bunky



syntetizujú IL-8, ktorý priťahuje neutrofilny a stimuluje ich degranuláciu (Sumpio *et al.*, 2002). V počiatočných fázach zápalu, kedy ešte prevládajú funkcie vrodenej imunity, bunky endotelu aktivujú TLR proteíny, ktoré sprostredkujú imunitné odpovede (Imhof *et al.*, 2017).

### **3.1.2. Iné bunkové a nebunkové zložky podieľajúce sa na fungovaní imunitného systému kože**

Fibroblasty síce nepatria do prvej línie obrany pri napadnutí imunitného systému, no spolupracujú s ním (Quaresma, 2019). Sú dôležité pri hojení rán a tvorbou extracelulárnej matrix (ECM) ovplyvňujú zápalové stavy v koži (Jordana *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 2007). Yao *et al.* dokázali, že kožné fibroblasty exprimujú 10 rôznych TLR, a že sú funkčne aktívne (Yao *et al.*, 2015).

Mazové žľazy sú holokrinné a sekretujú sebum – maz – do vrchnej časti vlasových folikul. Maz je následne distribuovaný po povrchu kože (Thody *et Shuster*, 1989). Exprimujú TLR-2 a TLR-4 (Oeff *et al.*, 2002). Narušenie mazovej lipidovej bariéry môže byť faktorom pri patogenéze acne vulgaris, atopickej dermatitíde, psoriáze, rosacee alebo seboreickej dermatitíde (Shi *et al.*, 2015).

Riol-Blanco *et al.* poukázali na blízky vzťah nociceptorov a dermálnych dendrocytov. Nociceptory sú ich interakciou s dermálnymi dendrocytmí schopné regulovať dráhu IL-23/IL-17 a kontrolovať imunitnú odpoveď kože (Riol-Blanco *et al.*, 2014).

### **3.1.3. Kožný zápal**

Zápalové reakcie organizmu všeobecne sú súčasťou nešpecifickej imunitnej odpovede na akýkoľvek typ zranenia. Medzi hlavné príznaky zápalu patria zvýšené prúdenie krvi, zvýšená miera bunkového metabolizmu, vazodilatácia, uvoľňovanie rozpustných mediátorov, únik tekutín a príval buniek. Zápalový proces organizmu je pri normálnych podmienkach regulovaný, no pri chronických zápalových ochoreniach sa stáva trvalým. Jedným z najdôležitejších rozpustných mediátorov zúčastňujúcich sa zápalového procesu je IL- $\beta$  – potentný pro-zápalový cytokín, ktorý vyvoláva zvýšenú teplotu, hypotenziu a produkciu ďalších cytokínov. Akútny zápalový stav je charakteristický infiltráciou buniek vrodeneho imunitného systému, konkrétne neutrofilmi a makrofágmi, zatiaľ čo chronický zápalový stav je charakteristický prísunom

T-lymfocytov a plazmatických buniek a eventuálne vedie až k strate tkanivovej funkcie následkom fibrózy (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). Koža, ako „najvonkajší“ orgán ľudského tela je exponovaná rôznym environmentálnym faktorom, ktoré ovplyvňujú homeostázu jej fyziologických funkcií. Niekedy tieto environmentálne faktory v koži indukujú zápalové odpovede, ktoré sú istou formou adaptácie na vonkajšie stimuly (Sawada *et al.*, 2021). Nasledujúca časť je venovaná popísaniu reprezentatívnych kožných zápalových ochorení.

### 3.1.3.1. Psoriáza

Psoriáza je chronické zápalové kožné ochorenie vykazujúce autoimunitné patogénne znaky, ktoré je typické silnou genetickou predispozíciou. Rozšírenosť vo svete činí okolo 2 %, no líši sa v rámci rôznych regiónov (Christophers, 2001). Najrozšírenejším typom je *psoriasis vulgaris*, ktorá činí okolo 90 % incidencií psoriázy celkovo. Je charakteristická prítomnosťou ostro ohraničených, začervenaných a svrbivých ložisiek – plakov – ktoré sú pokryté striebřistými šupinkami. Takéto plaky sa môžu zhlukovať a pokrývať veľké oblasti kože, vrátane trupu, končatín a pokožky hlavy (Nestle *et al.*, 2009). *Inverzná psoriáza* je variáciou psoriázy, pri ktorej sa ložiská nachádzajú v oblastiach kožných záhybov alebo anogenitálnej oblasti (Micali *et al.*, 2019). *Psoriáza guttata* je typická akútnym nástupom malých začervenaných plakov a zvyčajne postihuje deti a adolescentov. Často môže byť spustená streptokokálnymi infekciami a neskôr prerásť až do *psoriasis vulgaris* (Martin *et al.*, 1996). Medzi prejavy *pustulárnej psoriázy* patrí prítomnosť viacerých zlučujúcich sa sterilných pustúl. Môže byť lokalizovaná – napríklad palmoplantárna pustulárna psoriáza, alebo generalizovaná, ktorá postupuje akútne, spôsobuje difúzne začervenanie, subkorneálne pustuly a často ju sprevádzajú systémové symptómy (Navarini *et al.*, 2017). *Erythrodermická psoriáza* patrí medzi vzácne akútne ochorenia, pri ktorom je minimálne 75 % povrchu tela začervenaných a zapálených. Môže sa vyvinúť z ktoréhokoľvek typu psoriázy a vyžaduje si núdzové ošetrovanie (Singh *et al.*, 2016). Psoriáza typicky postihuje kožu, no môže taktiež zasiahnuť aj kĺby, pričom zápal môže postihnúť rôzne orgánové systémy (Gerdes *et al.*, 2016).



**Obrázok č. 1: Klinické prejavy psoriasis vulgaris.** (obrázok prevzatý z Rendon *et Schäkel*, 2019)

Kľúčovým príznakom psoriázy je trvalý zápal, ktorý vedie k nekontrolovanej proliferácii keratinocytov a ich dysfunkčnej diferenciácii. Zápalový infiltrát dermálnych dendritických buniek, makrofágov, T buniek a neutrofilov je prekrytý množenými keratinocytmi (Griffiths *et Barker*, 2007). Dôležitým faktorom taktiež je, že tvorba psoriatických plakov nie je limitovaná do epidermálnej vrstvy no prechádza až do *dermis*. Patogenéza psoriázy môže byť rozdelená do dvoch základných fáz – iniciačnej fázy a fázy udržiavania. Iniciačná fáza môže byť spustená traumou (Koebnerov fenomén), infekciou alebo liekmi. Fáza udržiavania je charakteristická chronickým postupom ochorenia (Di Meglio *et al.*, 2014). V počiatkovej fáze hrajú dôležitú úlohu hlavne dendritické bunky a ich schopnosť prezentovania antigénu, avšak ich aktivácia v rámci tohto ochorenia ešte nie je úplne objasneným fenoménom. Jedným z navrhovaných mechanizmov je rozpoznávanie AMPs, ktoré sú sekrétované keratinocytmi ako odpoveď na poranenie a ktoré sú v psoriatickej koži často nadexprimované. Konkrétne LL37 je vylučovaný poškodenými keratinocytmi a následne tvorí komplexy s DNA a RNA fragmentami, ktoré sú uvoľňované inými poškodenými bunkami. LL37/DNA komplex stimuluje toll like receptor 9 plasmacytoidných dendritických buniek, ktorých aktivácia je kľúčová pri počiatkovom vývine psoriatického plaku a je charakteristická produkciou IFN typu I. IFN typu I a cytokíny produkované aktivovanými keratinocytmi (IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF) môžu aktivovať myeloidné dendritické bunky. LL37/RNA komplex stimuluje plasmacytoidné dendritické bunky skrz toll like receptor 7 a myeloidné dendritické bunky skrz toll like receptor 8. Aktivované myeloidné dendritické bunky migrujú

do lymfatických uzlín a uvoľňujú TNF- $\alpha$ , IL-23 a IL-12. IL-23 a IL-12 modulujú diferenciáciu a proliferáciu Th17 a Th1 buniek. Aktivácia dermálnych dendritických buniek a ich interakcia s T bunkami je kritická pri tvorbe plakov, pretože vytvára IL-23/IL-17 zápalové prostredie, v ktorom IL-23 podporuje efektorové funkcie Th17 buniek a cytotoxických Tc17 buniek, čo udržuje psoriatický zápal v chronickej fáze. Tento patogénny crosstalk medzi keratinocytmi, dendritickými bunkami a T bunkami udržovaný TNF, IL-23 a IL-17 (klinicky relevantné pre psoriázu hlavne IL-17A a IL-17F) stojí za neusporiadanou imunitnou odpoveďou sledovanou u pacientov s psoriázou (Di Meglio *et al.*, 2014; Rendon *et Schäkel*, 2019). Dôležitosť IL-23/IL-17 osi v rámci imunopatogenézy psoriázy bola potvrdená sledovaním myšieho modelu, kde bola psoriáza indukovaná použitím imiquimodu (Yoshiki *et al.*, 2014).

### 3.1.3.2. Atopická dermatitída

Atopická dermatitída (AD) je komplexné a celkom časté zápalové kožné ochorenie, pre ktoré je typický imunitne sprostredkovaný zápal a dysfunkcia epidermálnej bariéry a svrbenie. Primárne postihuje deti a je taktiež charakteristická kombináciou environmentálnych a genetických faktorov. Gény implikované v patogenéze AD kódujú regulačné proteíny zúčastňujúce sa terminálnej diferenciácie keratinocytov ako aj faktory vrodeného a získaného imunitného systému (Guttman-Yassky *et al.*, 2017). Najčastejšie popisované mutácie sa týkajú variácií génu pre filagrín, ktoré sú nachádzané u 10 – 50 % jedincov s AD na svete. Variácie v expresii funkčného filagrínu môžu modulovať vývin a vážnosť AD (Irvine *et al.*, 2011). Odhliadnuc od filagrínu sa do patogenézy AD zapájajú aj ďalšie bariérové gény kódované epidermálnym diferenciačným komplexom (lokus na chromozóme 1q21) – lorikrín, involukrín a podobne (de Guzman Strong *et al.*, 2010). V rámci *stratum corneum* je filagrín esenciálny pre bariérovú funkciu kože, pretože sa vo forme monomérov integruje do lipidovej obálky. Vo vrchnej vrstve *stratum corneum* je degradovaný za uvoľňovania voľných aminokyselín, ktoré pomáhajú udržiavať vlhkosť kože (Thyssen *et Kezic*, 2014). Poškodenie kožnej bariéry aktivuje keratinocyty a Langerhansove bunky, ktoré obratom začnú produkovať pro-zápalové cytokíny ako TSLP (thymic stromal lymphoprotein), IL-25 a IL-33, ktoré následne spúšťajú aktiváciu Th2 buniek, IL-5 a IL-13. Langerhansove bunky a zápalové dendritické epidermálne bunke priamo spracovávajú antigény a prezentujú ich Th2 bunkám. Zápalové dendritické bunky taktiež uvoľňujú chemokíny CCL17, CCL18 a CCL22, ktoré privolávajú ďalšie Th2 bunky a zosilňujú ich

odpovede. Rovnako zosilňujú produkciu cytokínov Th2 a Th22 buniek (IL-4, IL-13, IL-31 a IL-22), ktoré downregulujú terminálnu diferenciáciu keratinocytov, expresiu proteínov epidermálnej bariéry a proteínov tesného spojenia. IL-31, konkrétne zintenzívňuje svrbenie a znižuje kvalitu života ľudí s týmto ochorením (Guttman-Yassky *et al.*, 2014; Sawada *et al.*, 2021).



**Obrázok č. 2: Začervenaná koža ako prejav atopickej dermatitídy.** (obrázok prevzatý zo Spergel *et Paller*, 2003)

### 3.2. Cytokíny

Cytokíny sú rozpustné proteíny produkované prevažne leukocytmi, no aj inými typmi buniek. Fungujú ako chemické medzibunkové komunikátory, sami o sebe nie sú efektorovými molekulami. Ich hlavnou úlohou je regulácia obrany organizmu pred patogénmi alebo zápalovými reakciami. Väčšina je sekretovaná, no niektoré z nich môžu byť exprimované na povrchu buniek. Viazu sa na špecifické receptory na povrchu cieľových buniek, čo následne spúšťa signálnu transdukciu. Väčšina z nich môže byť rozdelená do základných skupín: rastové faktory, pro alebo protizápalové molekuly alebo polarizátory imunitnej odpovede. Cytokíny taktiež vykazujú dve základné vlastnosti. Za prvé, jeden cytokín často spúšťa sekréciu ďalšieho cytokínu cieľovou bunkou, čomu sa hovorí cytokínová kaskáda. Po druhé, jednotlivé cytokíny môžu modulovať účinok ďalších cytokínov pôsobiacich na rovnakú cieľovú bunku (Pober *et Cotran*; 1990; Dinarello, 2007).

Cytokíny sa zúčastňujú vrodenných imunitných odpovedí. Zatiaľ čo takéto odpovede sú pre prežitie organizmu nevyhnutné, môže sa stať, že sa vymknú kontrole.

Čiže jeden cytokín, ktorý pri nejakom ochorení pracuje ako obranný, pri inom, trebárs autoimunitnom ochorení sa môže zúčastňovať práve jeho patogenézy (Dinarello, 2007).

Nasledujúca časť je venovaná popisu cytokínov, ktorých pôsobenie bolo sledované v experimentálnej časti tejto diplomovej práce.

### **3.2.1. TNF- $\alpha$ – tumor necrosis factor $\alpha$**

Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) bol prvýkrát objavený v roku 1985. V štúdiách Aggarwal a kolektívu boli izolované dva cytotoxické faktory – jeden z makrofágov o molekulovej hmotnosti 17 kDa neskôr nazvaný TNF a jeden odvodený z lymfocytov nazvaný lymfotoxín o hmotnosti 20 kDa. Zistené taktiež bolo, že sú tieto proteíny homológne, čo viedlo k pomenovaniu TNF- $\alpha$  a TNF- $\beta$  (Aggarwal *et al.*, 1984; Aggarwal *et al.*, 1985; Aggarwal *et al.*, 1985).

TNF je proteín zložený zo 157 aminokyselín a je prvotne syntetizovaný ako pro-TNF viazaný na membránu. Z membrány je následne uvoľnený pomocou TNF konvertujúceho enzýmu TACE (metaloпротеináza), ktorý sprostredkováva jeho odštiepenie (Aggarwal *et al.*, 1985).

TNF patrí do superrodiny, ktorá pozostáva z 19 ligandov a 29 receptorov, ktoré v organizme nesú rozdielne funkcie. Všetky TNF patriace do tejto superrodiny vykazujú prozápalovú aktivitu, sčasti aj skrz aktiváciu transkripčného faktora NF- $\kappa$ B. Mnoho TNF pôsobí na hematopoietické bunky proliferačne a niektoré hrajú svoju úlohu v apoptóze (Gaur *et Aggarwal*, 2003). Väčšina TNF má však aj podporné no aj potenciálne škodlivé účinky na organizmus (Aggarwal, 2003).

TNF- $\alpha$  môže byť exprimovaný dvoma spôsobmi – buď v jeho 26 kDa transmembránovej forme, alebo v jeho rozpustnej 17 kDa forme (Li *et al.*, 2006). Sadá na dva základné receptory TNFR1 a TNFR2. TNFR1 je exprimovaný na povrchu väčšiny buniek v tele, no TNFR2 je exprimovaný primárne na hematopoietických bunkách. Zatiaľ čo TNFR1 je aktivovaný rozpustným ligandom, TNFR2 je primárne aktivovaný transmembránovým TNF (Balkwill, 2009). Aj keď s TNF- $\alpha$  interagujú oba receptory, hlavným receptorom sprostredkujúcim bunkové efekty TNF je vo väčšine buniek práve TNFR1. TNFR1 obsahuje doménu smrti (DD), jedná sa teda o dôležitý receptor smrti, ktorý je schopný indukovať apoptózu. TNFR2 síce DD neobsahuje, no dokáže sprostredkovať signál na usmrtenie bunky nepriamo skrz TNFR1 (Wajant *et al.*, 2003).

Po naviazaní TNF (prirodzený homotrimér) na TNFR1 (tento receptor tiež tvorí homotrimér), dôjde k väzbe domény smrti a adaptorového proteínu TRADD (TNFR-associated death domain). TRADD sa naviaže na downstreamové adaptorové proteíny, konkrétne s receptormi interagujúci proteín (RIP), faktor 2 asociovaný s TNFR (TRAF-2) a doménu smrti asociovanú s Fas (FADD). TNFR1, TRADD, TRAF-2 a RIP spolu tvoria komplex I (Wang *et al.*, 2008). Ku komplexu I následne TRAF-2 privolá inhibítorovú  $\kappa$ B kinázu (IKK) (Devin *et al.*, 2000). IKK aktivácia je sprostredkovaná RIP, ktorý reaguje s MEKK3 (tiež MAP3K3 – mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza), ktorá fosforyluje a tým aktivuje IKK (Yang *et al.*, 2001). Aktivovaná IKK fosforyluje I $\kappa$ B (inhibítor  $\kappa$ B), ktorý je rapidne polyubikvitonovaný a degradovaný. Degradácia  $\kappa$ B vedie k ohaleniu jeho jadrového lokalizačného signálu NF- $\kappa$ B, čo spôsobuje jeho translokáciu do jadra, kde je spustená transkripcia jeho cieľových génov. Medzi cieľové gény NF- $\kappa$ B patria antiapoptotické A20, cIAP-1, cIAP-2, Bcl-xL, XIAP a IEX-1L (Karin *et al.*, 2004).

Apoptotická dráha TNF je iniciovaná keď TNRF1 signalizuje komplexu I aby formoval komplex II. Komplex II sa skladá z TRADD, RIP, FADD a kaspázy-8. Kaspáza-8 aktivuje kaspázy 3 a 7 a endonukleázy. Toto vedie k zničeniu bunkových proteínov, fragmentácii DNA a konečne až k apoptotickej smrti bunky (Wang *et al.*, 2008).

TNF môže taktiež indukovať nekrotickú bunkovú smrť, pri ktorej hrajú kritickú úlohu aj ROS (kyslíkové radikály – reactive oxygen species) (Lin *et al.*, 2004). TNF indukovaná nekróza vyžaduje RIP kinázovú aktivitu a dochádza k aktivácii NADPH oxidázy Nox1 formáciou komplexu s TRADD, RIP1 a Rac1 (Kim *et al.*, 2007).

Sérová koncentrácia TNF je zvýšená u pacientov s rakovinou (Ferrajoli *et al.*, 2002), no taktiež bola jeho zvýšená expresia pozorovaná v rôznych preneoplastických a tumorových tkanivách (Ferrajoli *et al.*, 2002; Szlosarek *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2001). Čiže TNF preukázateľne podporuje tvorbu nádorov, no viaceré štúdie potvrdili, že v niektorých experimentálnych systémoch vykazuje antirakovinotvorné účinky. Napríklad TNF<sup>-/-</sup> myši boli v štúdiu Swann *et al.*, signifikantne viac náchylné na 3'-metylcholantrenom indukovaný kožný sarkóm než wild-type myši (Swann *et al.*, 2008).

TNF- $\alpha$  je v koži síce primárne produkovaný aktivovanými makrofágmi, no vylučujú ho aj epidermálne keratinocyty (Köck *et al.*, 1990). Nízke hodnoty TNF- $\alpha$  sú prítomné v najvrchnejšej časti zdravej epidermis, no jeho syntéza a sekrécia keratinocytmi je zvýšená hlavne pri zraneniach, infekcii alebo UV radiácii (Griffiths *et al.*, 1991; Köck *et al.*, 1990; Kondo *et al.*, 1996). Z TNF- $\alpha$  receptorov keratinocyty exprimujú hlavne TNFR1 (Kondo *et al.*, 1997). Väzba TNF- $\alpha$  na TNFR1 spúšťa kaskádu procesov vedúcich k aktivácii transkripčných faktorov vrátane NF- $\kappa$ B a AP-1 (activator protein 1) (Baud *et al.*, 2001). TNF- $\alpha$  taktiež aktivuje imunitnú odpoveď skrz indukciu produkcie dodatočných „signálov“ keratinocytmi, ako napríklad IL-1 a IL-8 alebo TGF- $\beta$  (transformačný rastový faktor typu  $\beta$ ) (Barker *et al.*, 1991). TNF superrodina je taktiež spájaná s autoimunitnými ochoreniami, medzi ktoré patrí aj psoriáza, pri ktorej liečbe sa už začali používať TNF- $\alpha$  blokátory (Yost *et al.*, 2009).

### 3.2.2. Interleukín 17A (IL-17A)

IL-17A bol prvýkrát popísaný v roku 1993, kedy bol pomenovaný ako CTLA8 a o pár rokov neskôr bol aj naklonovaný. Neskôr bol premenovaný na IL-17 a eventuálne na IL-17A a ide o cytokín sekretovaný aktivovanými T-bunkami. Zaujímavé je, že je homológny s otvoreným čítacím rámcom 13 T-lymfotropného Herpesvírusu saimiri (HSV13) (Rouvier *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1996). Produkt ľudského IL-17A génu je proteín o 155 aminokyselinách s molekulárnou hmotnosťou 15 kDa. Je vylučovaný ako homodimér spojený disulfidovými väzbami (Fossiez *et al.*, 1996). Skrz databázové vyhľadávanie a degeneratívnu RT-PCR boli identifikované ďalšie blízke cytokíny zdieľajúce 20–50% homológiu s IL-17. IL-17 bol teda pomenovaný ako IL-17A – zakladateľ IL-17 cytokínovej rodiny, do ktorej patria cytokíny IL-17A až F (Li *et al.*, 2000; Starnes *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001; Hymowitz *et al.*, 2001). Zdieľanou vlastnosťou IL-17 cytokínov sú konzervované cysteíny, ktoré pri IL-17F a IL-17A vykazujú štruktúrny motív cystínového uzla rastových faktorov (Hymowitz *et al.*, 2001).

Primárnym zdrojom IL-17 sú Th17 lymfocyty, no sekrétujú ho aj  $\gamma\delta$ T bunky, NKT bunky, CD8<sup>+</sup> bunky, neutrofile a žirne bunky (Yao *et al.*, 1995; Infante-Duarte *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2009). Výnimkou je IL-17C, ktorý je produkovaný prevažne epiteliálnymi a nie hematopoietickými bunkami (Peng *et al.*, 2017) a je taktiež



produkovaný keratinocytmi a v myších modeloch sa používa pri indukovaní psoriatického zápalu (Peng *et al.*, 2017; Johnston *et al.*, 2013).

Cytokíny superrodiny IL-17 sa viažu na 5 možných receptorov IL-17RA až IL-17RE na povrchu cieľových buniek, čím vykonávajú svoje biologické funkcie (Moseley *et al.*, 2003). IL-17RA je exprimovaný takmer všetkými typmi buniek a bolo dokázané, že IL-17 viaže s prekvapivo nízkou afinitou (Yao *et al.*, 1995). Jeho prítomnosť je pre správnu funkciu IL-17A a IL-17F nevyhnutná (McAllister *et al.*, 2005). Ide o transmembránový receptorový glykoproteín typu I, ktorého extracelulárna doména sa skladá z 293 aminokyselín, transmembránová doména z 21 aminokyselín a má 525 aminokyselín dlhý cytoplazmatický „chvostík“ (Yao *et al.*, 1997). IL-17RB – IL-17RE sú taktiež transmembránové glykoproteínové receptory typu I, ide však o izoformy, ktoré si prešli výrazným alternatívnym splicingom (Moseley *et al.*, 2003).

Všetky IL-17R vo svojej extracelulárnej časti obsahujú fibronektínové domény typu III a v cytoplazmatických „chvostíkoch“ obsahujú unikátny štruktúrny motív SEFIR doménu – expresiou podobná génom fibroblastových rastových faktorov a IL-17R (similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R). SEFIR domény sú do istej miery homologické s Toll/IL-1 receptorovými doménami TLR (Toll-like receptory) a IL-1R (IL-1 receptory) (Novatchkova *et al.*, 2003).

IL-17A signalizuje skrz heteromérický receptorový komplex z IL-17RA a IL-17RC (Toy *et al.*, 2006). Pre IL-17 signálnu dráhu a na IL-17 závislé imunitné odpovede je nevyhnutný Act1 – multifunkčný signálny proteín, ktorý taktiež obsahuje SEFIR doménu. SEFIR doména je nutná pre vytvorenie spojenia IL-17R-Act1 skrz SEFIR-SEFIR doménovú interakciu (Qian *et al.*, 2007). Act1 má E3 ubikvitín ligázovú aktivitu a v rámci signalizácie IL-17 rapídne privoláva a ubikvitínuje faktor 6 asociovaný s TNF receptorom (TRAF6), čo je tiež E3 ubikvitín ligáza (Liu *et al.*, 2009). IL-17 týmto spúšťa NF- $\kappa$ B dráhu, skrz aktiváciu IKK a degradáciu I $\kappa$ B $\alpha$  (Schwandner *et al.*, 2000). NF- $\kappa$ B upreguluje expresiu Bcl3 (B cell lymphoma 3 encoded protein) a I $\kappa$ B $\zeta$ , ktoré ďalej spúšťajú expresiu rôznych s IL-17-NF- $\kappa$ B dráhou spojených prozápalových a antimikrobiálnych génov (Karlsen *et al.*, 2010; Tohyama *et al.*, 2018).

V keratinocytoch sa IL-17 signálnej transdukcie pravdepodobne zúčastňuje aj tyrozín kináza. Naviaže sa na Act1 a TRAF6 a vedie k expresii chemokínu CCL20 (ligand receptoru CCR6, ktorý sa nachádza na povrchu väčšiny Th17 buniek) čo môže

potenciálne viesť k Th17 riadeným zápalom (Wu *et al.*, 2015). V keratinocytoch IL-17 taktiež skrz Act1 signalizáciu indukuje proliferáciu čo je jedným z hlavných faktorov pri psoriáze (Chiricozzi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

IL-17A a IL-17F indukujú produkciu AMPs (defenzíny, S100 proteíny) (Liang *et al.*, 2006), cytokínov (IL-6, faktor stimulujúci granulocytárne kolónie G-CSF, faktor stimulujúci granulocytárne makrofágne kolónie GM-CSF) (Fossiez *et al.*, 1996; Numasaki *et al.*, 2004; Numasaki *et al.*, 2004), chemokínov (CCL2, CCL7, CXCL1, CCL20, IL-8) (Park *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2003) a matrixových metaloproteináz (MMP3, MMP13) fibroblastmi, endoteliálnymi bunkami a epitelálnymi bunkami (Park *et al.*, 2005). IL-17A taktiež reguluje medzibunkové adhézne molekuly 1 (ICAM-1) v keratinocytoch (Albanesi *et al.*, 1999). Nadmerná expresia IL-17F v pľúcach vedie k zvýšeniu expresie prozápalových cytokínov a chemokínov, čo vedie k zápalu asociovanému s neutrofilovým infiltrátom (Oda *et al.*, 2005). Je teda vysoko pravdepodobné, že IL-17A a IL-17F majú podobné biologické funkcie. Oba cytokíny môžu byť sekretované ako homodiméry alebo heterodiméry, pričom bolo zistené, že heterodimér IL-17A-F je pri indukcii chemokínovej expresie potentnejší ako homodimér IL-17F, no menej ako homodimér IL-17A (Liang *et al.*, 2007).

### 3.2.3. Interleukín 1 (IL-1)

Interleukín 1 bol skupinou Gery *et al.* prvým identifikovaným interleukínom, avšak na počiatku bol nazvaný lymfocyty aktivujúci faktor (Gery *et al.*, 1972). Patrí do IL-1 superrodiny cytokínov, ktorá spolu obsahuje 11 členov. IL-1 superrodina sa skladá z „podrodín“ IL-1, IL-18, IL-33 (Dinarello, 2009), IL-36, IL-37 a IL-38 (Hiz *et al.*, 2020), ktoré sú si príbuzné pôvodom, štruktúrou receptora a signálnymi dráhami (Arend *et al.*, 2008). Cytokíny IL-1 rodiny sú výrazne viac ako ostatné cytokíny spojené so zápalovými stavmi, no taktiež zvyšujú nešpecifickú rezistenciu k infekciám a imunitnú odpoveď ako reakciu na cudzie antigény, čiže všeobecne zvyšujú reakcie vrodenej aj získanej imunity (Dinarello, 2018). Dôležitosť IL-1 superrodiny pre vrodené imunitné odpovede začala byť hypotetizovaná, keď bolo zistené, že cytoplazmatická doména IL-1 receptora typu I sa nachádza tiež v Toll proteíne ovocnej mušky *Drosophila melanogaster* (Gay *et al.*, 1991). Funkčná doména cytozolickej časti IL-1R sa nazýva Toll interleukín-1 receptorová (TIR) doména a je vysoko homológna s TIR doménami

všetkých TLR. IL-1 a TLR ligandy teda vykazujú nerozlišiteľné odpovede (Dinarello, 2018).

IL-1 podrodina sa skladá z ligandov IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-1Ra (IL-1 receptorový antagonista) (Arend, 2002) a dvoch transmembránových receptorov IL-1R typu I (IL-1RI) a IL-1R typu II (IL-1RII) (Ricote *et al.*, 2004). S výnimkou IL-1Ra chýba všetkým členom podrodiny IL-1 signálny peptid a nachádzajú sa v cytoplazme vo forme prekurzorov. Každý prekurzor obsahuje konzervovanú sekvenciu 3 aminokyselín A-X-D (kde A môže byť akákoľvek alifatická aminokyselina nasledovaná X – akoukoľvek aminokyselinou a D – kyselina asparagová), ktorá sa nachádza 9 aminokyselín za miestom štiepenia pre dosiahnutie skladania cytokínu do formy kde vykazuje optimálnu bioaktivitu (Mantovani *et al.*, 2019). Ani IL-1 $\alpha$  ani IL-1 $\beta$  nie sú z buniek uvoľňované obvyklým mechanizmom vezikulárneho transportu z Golgiho aparátu (Arend *et al.*, 2008).

Vplyv IL-1 na CNS zahŕňa zvýšenú teplotu (Dinarello, 2009) a aktiváciu hypotalamo-hyozárne-nadobličkovej (HPA) osi (Dunn, 2000). Členovia IL-1 podrodiny sa taktiež zúčastňujú pri diferenciácii T buniek (O'Shea *et Paul*, 2010).

IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  sú syntetizované monocytmi, makrofágmi, neutrofilmi, hepatocytmi a tkanivovými makrofágmi (Arend *et al.*, 2008). V ľudských bunkách je IL-1 $\alpha$  v cytoplazme v asociácii s mikrotubulmi syntetizovaný ako plne bioaktívny prekurzor pro-IL-1 $\alpha$  o hmotnosti 31 kDa (Stevenson *et al.*, 1992). Pro-IL-1 $\alpha$  môže byť štiepený calpainom, čo je membránová cysteínová proteáza, ktorá pre svoju funkciu vyžaduje vápnik, za vzniku 17kDa IL-1 $\alpha$  (Kobayashi *et al.*, 1990). IL- $\beta$  sa taktiež syntetizuje v cytoplazme za vzniku prekurzorovej 31kDa molekuly pro-IL-1 $\beta$  ako odpoveď na patogénmi prinášané PAMPs. Jeho konečná forma je výsledkom mechanizmu využívajúceho IL-1 $\beta$  konvertujúci enzým ICE, dnes známy ako kaspáza-1 (Lopez-Castejon *et Brough*, 2011; Thornberry *et al.*, 1992). Pro-IL-1 $\beta$  je biologicky inaktívny, čiže pre získanie svojej funkcie musí byť konvertovaný na 17kDa konečný produkt IL-1 $\beta$  (Black *et al.*, 1988; Afonina *et al.*, 2011).

IL-1 $\alpha$  je cytokín s takzvanou duálnou funkciou, čo znamená, že je schopný viazať sa na DNA v jadre a vykonávať svoju funkciu, no rovnako sa môže viazať aj na membránové receptory a iniciovať signálne dráhy (Luheshi *et al.*, 2009). V prekurzorovom regióne IL-1 $\alpha$  je jadrová lokalizačná sekvencia a v jadre má IL-1 $\alpha$

funkciu transkripčného faktora, ktorý zvyšuje génovú expresiu IL-8 (Werman *et al.*, 2004). V praxi to môže znamenať, že keď je bunka vystavená proapoptotickému signálu, IL-1 $\alpha$  je schopný opustiť cytozol a rapídne prejsť do jadra, kde sa pevne naviaže na chromatin a nespustí zápal. Naopak, v prípade, že je bunka vystavená nekrotickému signálu IL-1 $\alpha$  prejde z jadra do cytozolu. Pri nekrotickej smrti bunky je IL-1 $\alpha$  uvoľnený až do extracelulárnych priestorov, kde stimuluje produkciu chemokínov, ktoré ultimátne vedú k infiltrácii neutrofilov a monocytov a finálne až k vzniku sterilného zápalu (Cohen *et al.*, 2010). Jeho prekursor sa nachádza na povrchu monocytov a B-lymfocytov vo forme membránového IL-1 $\alpha$  (Kurt-Jones *et al.*, 1985), no jeho obehová forma je aj u pacientov s vážnymi infekciami detekovaná len zriedka (Berda-Haddad *et al.*, 2011). Na rozdiel od ostatných členov IL-1 podrodiny sa cytokín IL-1 $\alpha$  nachádza prevažne v zdravých bunkách a tkanivách (Di Paolo *et al.*, 2016). Endoteliálne bunky obsahujú IL-1 $\alpha$  vo vezikulách endoteliálnej membrány, ktoré sa nazývajú apoptotické telieska a sú vysoko zápalové a prispievajú k vaskulitíde (Berda-Haddad *et al.*, 2011). IL-1 $\alpha$  je DAMP (s poškodením súvisiaci molekulárny vzor) a funkciou sa podobá alarmínom (endogénne, chemotaktické a imunitu-aktivujúce proteíny a peptidy, vylučované keď dochádza k degranulácii, porušeniu alebo smrti bunky alebo v rámci imunitnej odpovede organizmu (Yang *et al.*, 2017)), pretože už jeho samotný prekursor je aktívny (Kim *et al.*, 2013).

Po syntéze pro-IL-1 $\beta$  primárne ostáva v cytozole do jeho štiepenia na finálnu formu, kedy je transportovaný z bunky (Dinarello, 1997). IL-1 $\beta$  nemá známu membránovú formu a jeho prekursor je aktívny len minimálne (Jobling *et al.*, 1988). Je produkovaný hematopoietickými bunkami ako sú krvné monocyty, tkanivové makrofágy, kožné dendritické bunky a mozgové mikroglie ako odpoveď na aktiváciu TLR alebo ostatné cytokíny a IL-1 (Dinarello 2011). Spomínané štiepenie prekursoru na konečný produkt sprostredkované kaspázou-1 vedie k jeho uvoľneniu do extracelulárnych priestorov. Kaspáza-1 vzniká z proenzýmu prokaspázy-1, ktorý najskôr vyžaduje štiepenie inflamozómom a kľúčovou súčasťou tohto mechanizmu je makromolekulárny komplex obsahujúci proteín-nukleotid viažucu doménu a proteín NLRP3 (proteín 3 obsahujúci na leucín bohaté opakovania a pyrín) (Hoffman *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2017). Mutácie jednej aminokyseliny v NLRP3 vedú k nadmernej sekrécii IL-1 $\beta$ , čo je u pacientov s touto mutáciou spojené s autozápalovými ochoreniami (Mao *et al.*, 2018).

Rozdiely medzi IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  sú z väčšej časti spôsobené rozličnými bunkovými zdrojmi a rôznymi mechanizmami uvoľňovania a štiepenia (Garlanda *et al.*, 2013). Pri karcinogéze je rozdiel zjavný taktiež – u myší deficientných na IL-1 $\beta$  sa tvorí menej tumorov ako u IL-1 $\alpha$  deficientných myší a wild-type myší (Krelin *et al.*, 2007). IL-1 $\beta$  indukuje tumorovú angiogézu a metastatické šírenie tumorov (Carmi *et al.*, 2013). IL-1 podrodina všeobecne sa uplatňuje aj pri zápalových ochoreniach, ktoré zvyšujú incidenciu rakovín (Salcedo *et al.*, 2013). Oba sú kódované rozličnými génmi, no viažu sa na rovnaký receptor (IL-1RI) a zdieľajú isté biologické vlastnosti (Garlanda *et al.*, 2013). IL-1 všeobecne sú najpotentnejšie induktory zvýšenej teploty a to už v koncentrácii 1-10 ng/kg (Tewari *et al.*, 1990; Ogilvie *et al.*, 1996).

IL-1Ra sa štruktúrne podobá ostatným IL-1 ligandom, no podstúpil mutácie, kvôli ktorým je neschopný interakcie s IL-1RacP (Arend *et al.*, 2003). Efektívne sa teda viaže na oba typy IL-1R, no neaktivuje bunky a funguje skôr ako špecifický inhibítor. Jeho hlavnou izoformou je sekretovaný sIL-1Ra, ktorý je syntetizovaný v Golgiho aparáte a sekretovaný rovnakými bunkami ako IL-1 $\beta$  a nenesie vedúcu sekvenciu. Medzi jednu z jeho vnútrobunkových variant patrí icIL-1Ra typu 1, ktorý vzniká alternatívnym zostrihom. Jeho hmotnosť činí 18 kDa a je to jeden z hlavných proteínov v keratinocytoch, endoteliálnych bunkách, fibroblastoch a makrofágoch (Arend *et al.*, 2008).

Kožná bariéra by bez IL-1 nebola schopná svojich funkcií. Všetci členovia IL-1 podrodiny sú exprimované v ľudskej epidermis a majú svoje konkrétne úlohy v rámci kožnej imunopatológie. Dodatočne k ich patologickej úlohe udržiujú kožnú imunologickú bariéru, hojenie rán a fungujú v koži ako alarmíny (Macleod *et al.*, 2021). IL-1 $\alpha$  je konštitutívne exprimovaný keratinocytmi, no je udržiavaný vo vnútrobunkových zásobníkoch (Di Paolo *et al.*, 2016). IL-1 $\beta$  je v koži exprimovaný keratinocytmi, fibroblastmi a myeloidnými bunkami (Watanabe *et al.*, 2007; Tardif *et al.*, 2004) a pomáha v koži diskriminovať medzi patogénmi a komensálnymi baktériami (Leech *et al.*, 2019). IL-33 v koži prispieva k downregulácii filagrínu (Seltmann *et al.*, 2015) a keratinocyty zvyšujú jeho produkciu pri hypoosmotickom strese (Pietka *et al.*, 2019). Nesprávne štiepenie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-36 proteázami vylučovanými neutrofilmi v psoriatických léziách vedie k zosilňovaniu zápalového prostredia (Clancy *et al.*, 2018). IL-1 $\beta$  taktiež stimuluje dospievanie a migráciu Langerhansových buniek (Cumberbatch *et al.*, 1997) a spolu s IL-1 $\alpha$  aktivujú neutrofile a indukujú degranuláciu závislú

na vápniku (Smith *et al.*, 1986). IL-1Ra je v koži produkovaný keratinocytmi, infiltrujúcimi neutrofilmi a infiltrujúcimi alebo rezidentnými APC (MacLeod *et al.*, 2021). Mimo iné keratinocyty taktiež exprimujú aj IL-1RI a IL-1RII (Rauschmayr *et al.*, 1997). IL-1 cytokíny sa taktiež zúčastňujú zápalových ochorení ako je psoriáza a atopická dermatitída (Sims *et al.*, 2006). IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  uľahčujú hojenie rán indukciou proliferácie fibroblastov a keratinocytov či produkciou a degradáciou proteínov extracelulárnej matrix (Hübner *et al.*, 1996).

### 3.3. Receptory

#### 3.3.1. Toll-like receptory

Vrodený imunitný systém má vyššiu mieru špecificity ako o ňom bolo predpokladané. Ide o univerzálnu a evolučne starú formu obrany organizmu pred infekciami. Je založený na limitovanom počte receptorov kódovaných už v zárodočnej línii, ktoré sa vyvinuli tak aby boli schopné rozpoznať „vlastné“ od „cudzieho“. V tomto mechanizme hrajú dôležitú úlohu práve Toll-like receptory (TLR), ktorých stimulácia mikrobiálnymi produktmi mimo iné vedie k aktivácii signálnych dráh, ktoré indukujú antimikrobiálne gény a zápalové cytokíny (Janeway *et Medzhitov*, 2002).

TLR sú evolučne konzervované a uplatňujú sa hlavne v raných štádiách obrany organizmu pred patogénmi (Beutler *et Rietschel*, 2003) a to aj pre ich schopnosť rozpoznávania PAMPs alebo poškodenia, ktoré sú tieto patogény schopné spôsobiť (Behzadi *et al.*, 2021). Patria do rodiny vzory-rozpoznávajúcich receptorov (PRR) (Takeuchi *et Akira*, 2010). Ako už bolo spomenuté, skúmanie TLR rodiny začalo keď bol identifikovaný transmembránový proteín Toll – receptor exprimovaný hmyzom, ktorý je esenciálny pri určovaní dorzoventrálnej polarity v rámci embryogenézy (Hashimoto *et al.*, 1988). Neskoršie štúdie potvrdili jeho rozhodujúcu úlohu v hmyzej vrodenej imunitnej odpovedi konkrétne na fungálne infekcie (Lemaitre *et al.*, 1996).

TLR rodina sa u ľudí skladá z 10 členov – TLR1–TLR10, ide o integrálne membránové glykoproteíny typu I (Kawasaki *et Kawai*, 2014; Takeda *et al.*, 2003) a každý rozpoznáva a je aktivovaný rôznou skupinou molekúl (Moresco *et al.*, 2011). Na základe homológie sekvencií môžu byť TLR stavovcov rozdelené do 6 podrodín – TLR1/2/6/10, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 a TLR11/12/13/21/22/23 (Matsushima *et al.*, 2007; Roach *et al.*, 2005). TLR2 sa nachádza na plazmatických membránach, kde

viaže lipidy obsahujúce PAMPs formovaním dimérnych komplexov s TLR1 alebo TLR6 (Takeda *et al.*, 2003). TLR1/2 komplex rozpoznáva hlavne triacylované lipopeptidy a komplex TLR2/6 rozpoznáva ligandy diacylované (Botos *et al.*, 2011). Na rozdiel od ostatných TLR, TLR10 je považovaný za sirotsky receptor, ktorý ešte nie je dobre pochopený (Henrick *et al.*, 2019). TLR3 rozpoznáva dsRNA produkovanú množstvom vírusov v rámci ich reprodukčného cyklu (Takeda *et al.*, 2003). TLR4 viaže lipopolysacharidy (LPS), ktoré sú esenciálnou súčasťou vonkajších membrán gram negatívnych baktérií. Signalizácia TLR4 po naviazaní LPS prebieha za pomoci koreceptoru MD-2 (Beutler *et Rietschel*, 2003; Kim *et al.*, 2007). TLR5 je jeden z mála TLR, ktorý rozpoznáva bakteriálny flagelín (Hayashi *et al.*, 2001). Je vysoko exprimovaný v črevách kde reguluje zloženie črevnej mikroflóry (Uematsu *et Akira*, 2009; Vijay-Kumar *et al.*, 2010). TLR7, 8 a 9 sa nachádzajú v endozómoch a rozpoznávajú PAMPs nukleových kyselín (Hemmi *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2003) a medzi agonistov TLR7 a 8 patrí aj imiquimod (Wang *et al.*, 2005; O'Neill *et Bowie*, 2007). Konkrétne TLR9 rozpoznáva ssDNA s nemetylovanými CpG sekvenciami bakteriálnej a vírusovej DNA (Hemmi *et al.*, 2000).

Všetky TLR sú syntetizované v endoplazmatickom retikule, prepravované Golgiho aparátom a napokon lokalizované buď na plazmatickej membráne alebo vo vnútrobunkových endozómoch (Gay *et al.*, 2014). TLR mRNA je exprimovaná nie len v imunitných tkanivách, no vo všetkých tkanivách, vrátane periférnych krvných leukocytov, srdca, pečene, pankreasu, slepého čreva, tenkého čreva, pľúc, obličiek, vaječníkov, placenty, semenníkov, prostaty, kostného svalstva a mozgu (Zarembek *et Godowski*, 2002). Exprimujú ich na povrchu všetky imunitné bunky vrátane makrofágov, NK buniek, monocytov ako aj T a B lymfocytov a neimunitné bunky ako endoteliálne bunky a fibroblasty (Delneste *et al.*, 2007).

Rozozonávanie mikróbov pomocou TLR je uľahčené ich dimerizáciou, kde už spomínaný TLR2 tvorí heterodiméry s TLR1 a TLR6, no pri ostatných TLR dochádza k tvorbe homodimérov (Akira *et Takeda*, 2004; Saitoh *et al.*, 2004). Ich dimerizácia spúšťa aktiváciu signálnych dráh a podľa typu TLR dochádza k rozličným expresným profilom. Existujú dve základné signálne dráhy – na MyD88 závislá a na MyD88 nezávislá (Takeda *et Akira*, 2005).

### 3.3.2. Aryluhľovodíkový receptor (AhR)

Aryluhľovodíkový receptor je členom Period-Arnt-Single (PAS) superrodiny transkripčných faktorov, ktoré sa podieľajú na prijímaní environmentálnych signálov. V skratke ide o chemický senzor, ktorý je po naviazaní ligandu schopný pretlmočenia vonkajšieho alebo vnútorného signálu na bunkovú odpoveď. Zapája sa do metabolizmu liečiv, karcinogénnych a toxikologických odpovedí organizmu na environmentálne kontaminanty, obrany organizmu, homeostázy alebo udržiavania kmeňových buniek a bunkovej diferenciácie (Kawajiri *et Fujii-Kuriyama*, 2017). Medzi typické ligandy AhR patria TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxín), halogénované aromatické zlúčeniny, dibenzofurány, polychlorované bifenyly a polycyklické aromatické uhľovodíky, pričom všetky sa líšia v miere a type indukovanej odpovede (Safe *et al.*, 2018). Neaktivovaný AhR sa nachádza v cytoplazme ako súčasť komplexu, ktorý tvorí dimér heat-shock proteínu (HSP90), s AhR interagujúci proteín AIP (taktiež známy ako XAP2), kochaperón p23 a c-SRC proteín kináza. HSP90 udržiava AhR v takej konformácii, v ktorej má najväčšiu afinitu pre ligandy a AIP zabraňuje ubikvitinácii a degradácii AhR, čím v bunkách udržiava jeho dostatočné množstvo. Po aktivácii ligandom sa z komplexu uvoľňuje AIP, čo má za následok konformačné zmeny v AhR, ktoré odhaľujú jeho jadrový lokalizačný signál – AhR je teda z cytoplazmy translokovaný do jadra bunky. Zmeny v konformácii komplexu taktiež odhaľujú cieľové miesto pre proteín kinázu C, ktoré ak je fosforylované zabraňuje s jadrovou translokáciou AhR. Ide teda o jeden z kontrolných mechanizmov AhR. Po translokácii do jadra nastáva väzba AhR s ARNT (AhR jadrový translokátor). Komplex AhR/ARNT v DNA rozpoznáva dioxín responzívne elementy DRE, na ktoré sa následne viaže a to vedie ku kontrole transkripcie cieľových génov. Medzi cieľové gény AhR patria predovšetkým viaceré enzýmy metabolizujúce xenobiotiká, konkrétne rodina cytochrómov P450 – CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 a NAD(P)H-chinón oxidoreduktáza (Gutiérrez-Vazquez *et Quintana*, 2018).

Vycítanie a reagovanie kože na externé fyziologické a chemické stimuly hrá dôležitú úlohu pri udržovaní jej homeostázy. Keratinocyty, fibroblasty, melanocyty, endoteliálne bunky a Langerhansove bunky exprimujú AhR a patologické a fyziologické procesy kožnej homeostázy a diferenciácie sa sčasti spoliehajú na ligandom aktivované spustenie AhR dráhy (Furue *et al.*, 2014). Expresia AhR keratinocytmi pacientov s AD, psoriázou alebo iným kožným zápalovým ochorením je vyššia ako u zdravých pacientov (Kim *et al.*, 2014). Už pred minimálne 2000 rokmi sa na liečenie príznakov atopického



ekzému a kožných zápalových ochorení všeobecne používal uhoľný decht, avšak naši predkovia nevedeli, že tento spôsob liečby využíva aktiváciu signálnej dráhy AhR (McLean *et Irvine*, 2013). Aktivácia AhR využitím uhoľného dechtu vedie v kultúrach primárnych keratinocytov od pacientov s AD k indukcii epidermálnej diferenciácie upreguláciou expresie bariérových génov (filagrínu (FLG), lorikrínu (LOR) a hornerínu (HRNR)) a k zhrubnutiu kornifikovanej vrstvy. U pacientov s AD uhoľný decht dokonca kompletne obnovuje expresiu filagrínu (van den Bogaard *et al.*, 2013). Nie len uhoľný decht a jeho zložky ako ligandy AhR napomáhajú s epidermálnou diferenciáciou a bariérovou funkciou kože, čo je jedným z dôvodov prečo sa praktická časť tejto diplomovej práce sústreďovala na jeho aktiváciu. TCDD, kanonický ligand AhR, v jednovrstvových a organotypických kultúrach keratinocytov zvyšuje množstvo zrohovatených obálok, zvyšuje expresiu filagrínu, involukrínu, transglutaminázy a IL-1 $\beta$  a signifikantne ovplyvňuje expresiu mRNA ostatných génov epidermálneho diferenciačného komplexu (repetín, hornerín) (Loertscher *et al.*, 2001; Sutter *et al.*, 1991; Sutter *et al.*, 2011). Naopak, odstránenie ARNT z myšacej epidermis vedie k vážnym defektom deskvamácie a bariérovej funkcie epidermis (konkrétne znížená expresia FLG) (Geng *et al.*, 2006). Expozícia extrémne vysokým koncentráciám dioxínov (ligandy AhR) však u ľudí indukuje chlorakné, ktorého pravdepodobnou príčinou je mimo iné aj udržovanie AhR v hyperaktivovanom stave (Furue *et al.*, 2014).

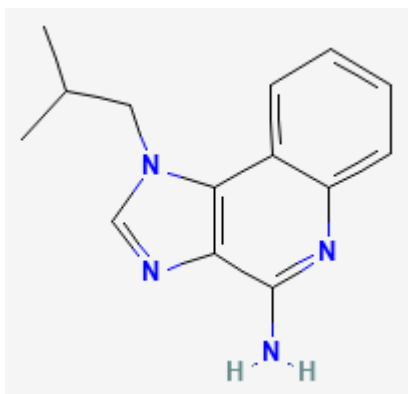
AhR hrá všeobecne dôležitú úlohu v imunitnom systéme a zápalových procesoch. Je kritickým regulátorom rovnováhy medzi populáciami prozápalových Th17 buniek a imunosupresívnych Treg buniek, čo je ovplyvnené bunkovým mikroprostredím alebo prítomnosťou určitých ligandov AhR (Fernández-Gallego *et al.*, 2021). AhR aktivácia pomocou TCDD spúšťa transaktiváciu génu FoxP3 *in vitro* a expanziu CD4+CD25+FoxP3+ Treg buniek *in vivo*. Aktivácia AhR taktiež vedie k epigenetickým zmenám lokusu FoxP3 a expresii dodatkových transkripčných faktorov nutných pre indukciu funkčných FoxP3+ Treg buniek (Singh *et al.*, 2011; Quintana *et al.*, 2008). Taktiež AhR uľahčuje ROR $\gamma$ t-sprostredkovanú transkripciu IL-22 Th17 bunkami (Fernández-Gallego *et al.*, 2021; Veldhoen *et al.*, 2008) a je esenciálny pre sekréciu IL-22 lymfocytmi vrodeneho imunitného systému, vrátane  $\gamma\delta$  T buniek a populácií lymfocytov vrodeneho imunitného systému 3 (Cibrian *et al.*, 2016, Martin *et al.*, 2009). Expresia AhR je taktiež nevyhnutná pre udržiavanie dendritických epidermálnych  $\gamma\delta$  T buniek v myšacej koži a prispieva k udržiavaniu prítomnosti kožných rezidentných T

pamäťových buniek (CD8+ alebo CD4+ T bunky, ktoré vstupujú do epidermis a dermis počas infekcie alebo zápalu a stanú sa z nich dlhožijúce v tkanivách rezidentné populácie buniek) (Kadow *et al.*, 2011; Zaid *et al.*, 2014). Problémom však je, že aberantná aktivácia týchto pamäťových buniek prispieva k chronicite kožných zápalových ochorení typu AD a psoriázy, pretože ostávajú vo vyliečených psoriatických léziách, sekretujú IL-17A a IL-22, čo môže spôsobiť relaps ochorenia (Cheuk *et al.*, 2014). Myši s kompletnou genetickou deléciou AhR rovnako ako myši exprimujúci konštitatívne aktívny AhR v keratinocytoch vykazujú zmeny v epidermis a kožnom zápale, ktoré pripomínajú AD, čo len prispieva k myšlienke relevancie AhR signálnej dráhy v koži (Fernandez-Salguero *et al.*, 1997; Tauchi *et al.*, 2005). Tapinarof (3,5-dihydroxy-4i-izopropylstilbén, prírodne derivovaná malá molekula produkovaná bakteriálnymi symbiontmi entomopatogénnych nematód) sa viaže priamo na AhR a vedie k downregulácii zápalových cytokínov vrátane IL-17A, IL-17F, IL-19, IL-22, IL-23 a IL-1 $\beta$  v psoriatickom modele indukovanom imiquimodom. Mimo iné tapinarof indukuje aj expresiu kožných bariérových génov skrz AhR singálnu dráhu, vrátane filagrínu a lorikrínu, čo z tapinarofu robí liek na AD a psoriázu (Smith *et al.*, 2017; Vu *et al.*, 2020).

### **3.4. Zlúčeniny**

#### **3.4.1. Imiquimod**

Imiquimod (IMQ), ako syntetická nízkomolekulárna zlúčenina, patrí medzi heterocyklické imidazoquinolíny (PubChem) a používa sa ako lokálny imunomodulátor, ktorý zvyšuje mieru imunitnej odpovede (Hengge *et al.*, 2001) hlavne skrz indukciu cytokínov (Gerster *et al.*, 2005). V súčasnosti sa používa hlavne ako liečivo na genitálne a perianálne kožné bradavice, aktinickú keratózu a pri povrchovom bazocelulárnom karcinóme kože (CLINICAL INFO, HIV.org). U imunokompetentných pacientov stimuluje produkciu zápalových cytokínov a vykazuje nepriamu antivirálnu aktivitu (Perry *et al.*, 1999).



**Obrázok č. 3: Chemická štruktúra imiquimodu.** (obrázok prevzatý z PubChem)

### **3.4.1.1. Farmakokinetika**

#### **3.4.1.1.1. Absorpcia, distribúcia a vylučovanie**

Perorálna biodostupnosť imiquimodu po podaní 100mg dávky je približne 47 %, pričom jeho absorpčný polčas (doba, za ktorú sa vstreba polovina látky) je približne 1 hodina (Soria *et al.*, 2000). Lokálne podávaný imiquimod vo forme krému v koncentrácii 5 % po jednej dávke nebol detekovaný v sére ani v moči a v stolici bolo detekovaných menej ako 0,9 % nezmeneného, rýchlo vylúčeného liečiva a jeho metabolitov (Owens *et al.*, 1998; HSDB). Po perkutánnom podaní sa imiquimod distribuuje hlavne medzi epidermis a dermis, kde jeho udržané množstvo závisí hlavne na obsahu vody (Telò *et al.*, 2017).

#### **3.4.1.1.2. Metabolizmus**

Biologický polčas imiquimodu po perkutánnom podaní je 20 hodín, po podaní subkutánnej dávky ide o 2 hodiny (DrugBank). V ľudských keratinocytoch je imiquimod primárne metabolizovaný izoformami CYP1A – pričom ide hlavne o CYP1A1 a CYP1A2 – a pravdepodobne taktiež zasahuje do CYP1A1-sprostredkovej degradácie endogénnych AhR agonistov. Degradáciou imiquimodu enzýmami CYP1A vznikajú jeho monohydroxylované metabolity (Mescher *et al.*, 2019; Wincent *et al.*, 2012).

### **3.4.1.2. Farmakodynamika**

Imiquimod stimuluje produkciu a sekréciu pro-zápalových cytokínov, ktoré ďalej indukujú bunkovú imunitnú odpoveď (Reiter *et al.*, 1994). Funguje ako agonista toll-like receptora 7 a 8 (TLR7, TLR8) monocytov, makrofágov a dendritických buniek (Hemmi *et al.*, 2002). Avšak, vykazuje taktiež apoptotické efekty na bunky tumorov ako napríklad

kožné metastázy ľudského malígneho melanómu (Schön *et* Schön, 2004; Schön *et al.*, 2004) - TLR-nezávislú stimuláciu expresie génov a interferuje so signálnou dráhou adenzínového receptora (AR) (Schön *et al.*, 2006).

#### **3.4.1.2.1. Mechanizmus účinku skrz aktiváciu TLR7 a TLR8**

Imiquimod aktivuje vrodenný imunitný systém, kde sú jeho cieľom kožné dendritické bunky, ktoré sú naň obzvlášť rezponzívne. Reakciou kožných dendritických buniek na stimuláciu IMQ je rozsiahla antitumorová imunitná odpoveď (Stanley, 2002). Mimo iné bolo prekázané, že perkutánne podávaný IMQ indukuje dozrievanie epidermálnych Langerhansových buniek *in vivo* a stimuluje taktiež ich migráciu do lokálnych lymfatických uzlín, kde dochádza k špecifickej imunitnej odpovedi sprostredkovanvej T-bunkami (Suzuki *et al.*, 2000).

Biologický efekt IMQ je primárne sprostredkovaný agonistickou interakciou s TLR7 a TLR8 (Hemmi *et al.*, 2002; Jurk *et al.*, 2002), medzi ktorých prirodzené ligandy patria ssRNA bohaté na guanozín a uridín (Heil *et al.*, 2004). Stimulácia TLR signálnej dráhy imiquimodom vedie k aktivácii nukleárneho faktora kappa B (NF- $\kappa$ B), ktorý patrí do rodiny dimerických proteínov/transkripčných faktorov, kam patrí napríklad p65, p50/p105 alebo RelB. Všetky z týchto proteínov obsahujú Rel homológnu doménu, ktorá je nevyhnutná pre dimerizáciu, väzbu inhibičných  $\kappa$ B proteínov (I $\kappa$ B), jadrovú translokáciu a väzbu na DNA (Karin *et* Lin, 2002). Keď NF- $\kappa$ B nie je potrebný, je ako dimér udržiavaný v neaktívnej forme v cytoplazme za pomoci I $\kappa$ B. Po stimulácii TLR, I $\kappa$ B kinázový komplex fosforyluje I $\kappa$ B, čo má za následok uvoľnenie NF- $\kappa$ B a jeho následnú translokáciu do jadra. V jadre NF- $\kappa$ B indukuje transkripciu veľkého množstva génov súvisiacich so zápalovými stavmi alebo vírusovými a bakteriálnymi infekciami (Rothwarf *et* Karin, 1999). Medzi gény transkribované po aktivácii TLR imiquimodom patria zápalové cytokíny IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 a rôzne chemokíny ako napríklad makrofágový zápalový proteín 1  $\alpha$  (Weeks *et* Gibson, 1994; Reiter *et al.*, 1994). Príkladom bunkových odpovedí na IMQ je funkčná stimulácia cytotoxických T buniek alebo už spomínaná migrácia dendritických buniek a ich prekursorov k aplikáčnemu miestu IMQ, čo má za následok zvýšenú Th1-bunkovú imunitnú odpoveď (Urosevic *et al.*, 2005). Aktivácia TLR imiquimodom sa taktiež podieľa na oprave zmien funkcie epidermálnej bariéry (Barland *et al.*, 2004). Všeobecne, IMQ vykazuje

v imunitných bunkách široké spektrum stimulačných efektov a funguje ako exogénny spojovník medzi získanou a vrodenu imunitou (Hurwitz *et al.*, 2003).

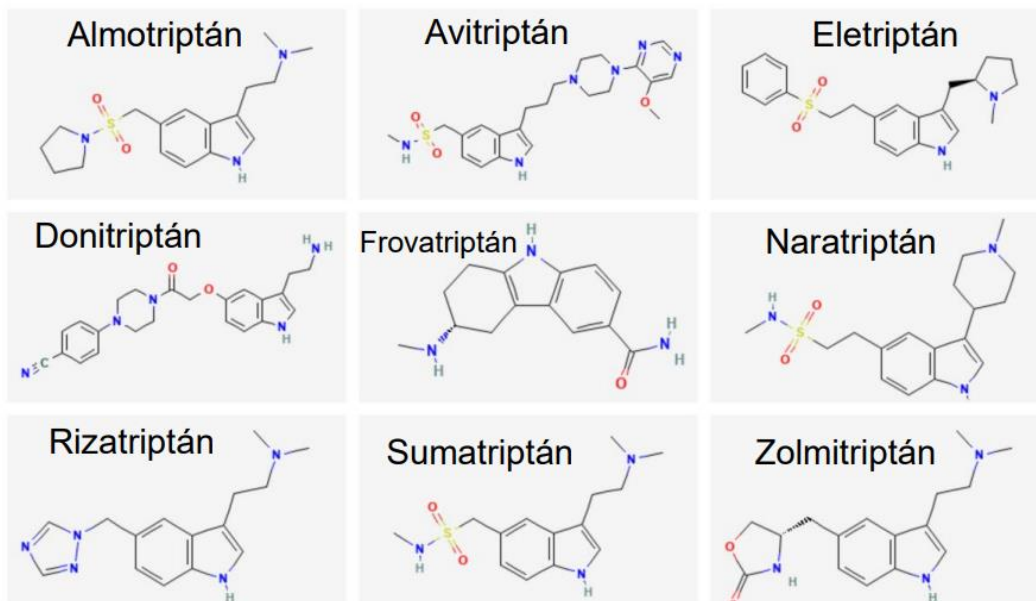
V HaCaT bunkovej línii imortalizovaných keratinocytov, ktoré neexprimujú TLR7 a TLR8, bola po expozícii IMQ sledovaná aktivácia NF- $\kappa$ B a zvýšená expresia IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Na základe týchto pozorovaní sa v štúdií Schön *et al.* kolektív sústredil na identifikovanie TLR7 a TLR8 nezávislej signálnej dráhy IMQ, pričom sa zistilo, že za určitých podmienok je IMQ schopný interagovať aj s AR. Podľa výsledkov tejto štúdie sa v experimentoch založených na kompetitívnej rádioligandovej väzbe IMQ viazal na AR, pričom vykazoval najvyššiu afinitu pre receptor A2A kde fungoval ako parciálny agonista. Rovnako bola odsledovaná aj mierna inhibícia adenylyl cyklázovej aktivity imiquimodom nezávislá na AR, no nie jej mechanizmus. Je teda možné, že TLR-nezávislá aktivita IMQ a naopak TLR-závislá aktivita IMQ spolupracujú a prispievajú k silnému zápalu (Schön *et al.*, 2006).

### 3.4.2. Triptány

Triptány sú v prvom rade potentní a selektívni agonisti serotonínových (5-HT) 1B a 1D receptorov. Ich väzba na serotonínové receptory vedie k vazokonstrikcii kraniálnych tepien, čo vedie k zmierneniu bolesti pri migrénových záchvatoch. V dnešnej dobe sú teda triptány triedou liekov patriacich do antimigreník (Armstrong *et Cozza*, 2002). Chemicky ide o zlúčeniny s indolovým jadrom, ktoré sa medzi sebou líšia vedľajšími reťazcami. Všetky triptány zdieľajú podobné farmakodynamické vlastnosti a líšia sa prevažne farmakokineticky. Tento fakt je spôsobený rozdielnymi hodnotami biodostupnosti jednotlivých triptánov. Všetky triptány podstupujú prvú fázu biotransformácie, kde nastávajú oxidačné reakcie transformujúce dané liečivo na jeho rozpustnejšiu/polárnejšiu verziu. Ide prevažne o reakcie sprostredkované cytochrómami P450 alebo monoaminoxidázami A a B (MAO-A, MAO-B) – triptány môžu byť metabolizované jedným z týchto dvoch systémov alebo oboma (Armstrong *et Cozza*, 2002; Nicolas *et Nicolas*, 2023).

Niektoré triptány sú taktiež schopné aktivovať AhR v pečenej bunkovej línii a črevnej bunkovej línii a na základe výsledkov mojej bakalárskej práce aj v HaCaT kožnej bunkovej línii. Aktivácia AhR dráhy mimo iné vykazuje aj pozitívne efekty na expresiu cytokínov a bariérových génov kože a práve preto je vyhľadávanie jeho

d'alších potenciálnych ligandov v rámci liečby zápalových kožných ochorení lukratívnou stratégiou (Vyhlídalová *et al.*, 2020; Trofimenková, 2021).



**Obrázok č. 4: Chemické štruktúry známych triptánov.** (Obrázky prevzaté z PubChem, upravené)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Biologický materiál

- Adherentná bunková línia ľudských imortalizovaných keratinocytov HaCaT (darované P. Boukampovou, IUF Düsseldorf, Nemecko)

#### 4.1.2. Použitý materiál

- 6 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- 96 jamkové biele doštičky pre PCR (Roche)
- automatické pipety 0,1–2,5µl; 0,5–10µl; 2–20µl; 20–200µl; 10–100µl; 100–1000µl (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- fólie pre PCR (Roche)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- kultivačná fľaša o obsahu 150 cm<sup>2</sup> (TPP)
- kultivačná fľaša o obsahu 25 cm<sup>2</sup> (TPP)
- kultivačná fľaša o obsahu 75 cm<sup>2</sup> (TPP)
- multikanálové pipety 0,5–10µl; 30–300µl; 20–200µl (Eppendorf)
- nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- papierová krabička na vzorky do –80 °C (Biologix)
- Petriho misky (TPP)
- plastové mikroskúmavky o objemoch 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml (BIOplastics)
- plastové skúmavky o objemoch 15 a 50 ml (TPP)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky (TPP)
- plastové špičky 0,1–10µl; 10–200µl; 10–1000µl
- sérologické pipety 0,1–2ml; 1–5ml; 1–10ml; 1–25ml (TPP)
- sklenená kadička (Simax)
- škrabka na bunky (TPP)
- 0,25% trypsín-EDTA (Sigma Aldrich. T4049)
- avitriptán fumarát (Sigma Aldrich, BM0009)
- deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- deoxynukleozidtrifosfáty (Takara)

- dATP (4026)
- dCTP (4028)
- dGTP (4027)
- dTTP (4029)
- dimetylsulfoxid DMSO (Sigma Aldrich, D8418)
- DNase/RNase free water (Invitrogen, 10977-035)
- donitriptán monohydrochlorid (Sigma Aldrich, D9071)
- eletriptán hydrobromid (Sigma Aldrich, SML3032)
- etanol (Sigma Aldrich, 459844)
- fetálne boviné sérum FBS (Sigma Aldrich, F6178)
- FICZ (Sigma Aldrich, SML 1489)
- TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific)
  - IL-1 $\beta$  (Hs01555410\_m1)
  - TNF $\alpha$  (Hs9999904\_m1)
- fosfátový Dulbecco's pufor PBS (Serana, BDL-001)
- Hygromycín B 50 mg/ml, na bunky aplikované 4 tisíciny objemu média, finálna koncentrácia 0,2 mg/l (ChemCruz, SC-29067)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- inhibítor ribonukleáz (New England BioLabs, M0307L)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025)
- izopropanol (Lach-Ner, 20037-AT0)
- komerčné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Sigma Aldrich, D6546)
- L-glutamín (Serana, RGL-001)
- neesenciálne aminokyseliny (Gibco, 11140-035)
- random primers 6 (New England BioLabs, S1230S)
- reakčný pufor pre M-MuLV reverznú transkriptázu (New England BioLabs, B0253S)
- reverzná transkriptáza M-MuLV (New England BioLabs, M0253L)
- TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, kat. č. 4444557)
- rizatriptán benzoátová soľ (Sigma Aldrich, SML0247)
- TriReagent (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- trypanová modrá (0,4% Trypan blue v PBS, Sigma Aldrich, T6146-25G)



- KiCqStart® Probe qPCR ReadyMix™ (Sigma Aldrich, kat. č. KCQS04)
- cytokíny (Peprotech)
  - TNF $\alpha$  (kat. č. 300-01A-10UG)
  - IL-1 $\beta$  (kat. č. 200-01B-50UG)
  - IL-17A (kat. č. 200-17-100UG)
- primery pre PCR, 100  $\mu$ M zásobný roztok (Sigma Aldrich)
  - IVL
    - **Forward:** 5'-CAGGTCCAAGACATTCAA-3'
    - **Reverse:** 5'-GGTGGTTATTTATGTTTGGG-3'
  - FLG
    - **Forward:** 5'-CCSSGAGCAATCGGTAGA-3'
    - **Reverse:** 5'-GCCSTCTCCTGATTGTTC-3'
  - HRNR
    - **Forward:** 5'-GGCTTAGGTCACCAAGAG-3'
    - **Reverse:** 5'-CGATGACTGTCCTGATGTA-3'
  - GAPDH
    - **Forward:** 5'-GAAGGAAATGAATGGGCAGC-3'
    - **Reverse:** 5'-TCTAGGAAAAGCATCACCCG-3'
  - CYP1A1
    - **Forward:** 5'-GGAAGTGTATCGGTGAGACC-3'
    - **Reverse:** 5'-CATAGATGGGGGTCATGTCC-3'
- Hydrolyzačné próby pre KiCqStart® ReadyMix™ (Sigma Aldrich)
  - IVL: 5'-[6FAM]TTCTGCTGCTGGTGCTCACA[OQA]-3'
  - FLG: 5'-[6FAM]TCTCATCACAGCCACACCACA[OQA]-3'
  - HRNR: 5'-[6FAM]TCCTCTGGCT)ACGGTCAACAC[OQA]-3'
  - CYP1A1: 5'-[6FAM]GCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCA[OQA]-3'
  - GAPDH: 5'-[6FAM]ACTAACCCTGCGCTCCTGCCTCGAT[OQA]-3'

#### 4.1.3. Prístroje

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- centrifúga 5418 R (Eppendorf)
- centrifúga Spectrafuge mini (Labnet)
- hlbokomraziaci box MDF-U53V

- chladnička (Gorenje)
- inkubátor CO<sub>2</sub> NB-203XL (N-Biotek)
- inverzný mikroskop (Novel Optics)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- laminárny box Labculture® (ESCO)
- Light Cyclers 480 II (Roche)
- mikrocentrifúga 5414 R (Eppendorf)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- odsávač Flask-Trap 1 (Biosan)
- prístroj na výrobu ľadu F100 Compact (Icematic)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- vodná kúpeľ LCB22D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)

#### **4.1.4. Počítačové programy**

- i-control 2.0
- LightCycler® 480 SW 1.5

## **4.2. Metodika práce**

V prvej polovici experimentálnej časti bola sledovaná expresia bariérových génov HRNR, IVL a FLG po pôsobení IMQ a cytokínov IL-17, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . V druhej polovici experimentálnej časti bola opäť sledovaná expresia bariérových génov, tentokrát však aj po aplikácii jednotlivých triptánov – avitriptánu, donitriptánu, eletriptánu a rizatriptánu, a ich kombinácii s jednotlivými cytokínmi. HaCaT bunky boli v natívnom stave udržiavané v kultivačných fľašiach pri 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti.

### **4.2.1. Príprava kultivačného média**

Pre bunky je nutné pripraviť živné médium. Do komerčného DMEM o objeme 500 ml bolo pridaných 5 ml L-glutamínu (uchovávaný pri –20 °C), 5 ml neesenciálnych aminokyselín, 50 ml FBS (uchovávané pri –20 °C) a 2 ml antibiotika Hygromicínu B (uchovávaný pri –20 °C) . Po premiešaní je nutné takto pripravené médium predhriať vo vodnej kúpeli na 37 °C. Po celú dobu prípravy média sa pracuje v sterilnom laminárnom boxe.

#### **4.2.2. Pasážovanie buniek**

Pasážovanie sa využíva k redukovaniu populácie udržiavaných buniek, čím sa zabraňuje ich prerasteniu v kultivačnom médiu. Skontrolovanie bunkovej konfluencie v kultivačnej fľaši sa vykonáva mikroskopicky. Po kontrole konfluencie pri potrebe pasáže dochádza k trypsinizácii - rozrušeniu medzibunkových kontaktov a kontaktu buniek s povrchom kultivačnej fľaše za použitia trypsínu (špecifická proteáza). Pasážovanie sa opakuje obvykle každé 2–3 dni, na základe rýchlosti rastu bunkovej kultúry alebo potreby buniek pre nasledujúcu experimentálnu prácu. Počet a dátum pasáže sú zaznamenávané. HaCaT bunky boli udržiavané do 30. – 35. pasáže, pričom sa ich aktivita s vyššou pasážou výrazne nemenila.

##### **4.2.2.1. Pasážovanie buniek HaCaT bunkovej línie**

Pred pasážovaním boli vo vodnom kúpeli zohriate zásobné fľaše s kultivačným médiom DMEM a PBS na 37 °C a medzitým bola mikroskopicky skontrolovaná konfluencia buniek v kultivačnej fľaši. Ďalej bola kultivačná fľaša s bunkami prenesená do laminárneho boxu a všetky nasledujúce kroky prebiehali za sterilných podmienok. Staré kultivačné médium bolo pomocou odsávačky a sérologickej pipety odsaté a bunky na dne kultivačnej fľaše boli premyté cca 5 ml roztoku PBS. Po premytí bol odsávačkou odstránený roztok PBS a k bunkám bol pridaný 0,25% trypsin (1 ml na fľašu s povrchom 75 cm<sup>2</sup>). Kultivačná fľaša bola uzavretá a prenesená do inkubátoru. Bunky boli pôsobeniu trypsínu vystavené po dobu 10–15 minút. Po trypsinizácii bola kultivačná fľaša s bunkami premiestnená do laminárneho boxu a pôsobenie trypsínu bolo zastavené pridaním DMEM (9 ml pre fľašu s povrchom 75 cm<sup>2</sup>). Zhluky buniek boli resuspendované sérologickou pipetou, čím bola dosiahnutá homogénnosť bunkovej suspenzie v celom objeme. Takto pripravená bunková suspenzia bola prenesená do sterilnej 15 ml skúmavky. Pre potreby počítania buniek bolo do plastovej mikroskúmavky prenesených 10 µl bunkovej suspenzie. Po vypočítaní množstva buniek potrebných na výsev bola zvyšková bunková suspenzia vrátená do kultivačnej fľaše a doplnená DMEM na cca 15 ml. Kultivačná fľaša bola vložená do inkubátoru, kde bola vystavená teplote 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

##### **4.2.3. Počítanie buniek**

Bunky boli počítané za použitia Bürkerovej komôrky a proces prebiehal mimo sterilný laminárny box. Z HaCaT bunkovej suspenzie bolo v laminárnom boxe odobraných 10 µl,

ktoré boli zmiešané s 90 µl 0,4% (w/v) roztoku trypanovej modrej v PBS. Do vrchnej a spodnej časti Bürkerovej komôrky bolo nanesených spolu cca 10 µl bunkovej suspenzie, ktorá bola premiešaná s trypanovou modrou jemným opakovaným pipetovaním. Pomocou mikroskopu bol spočítaný počet živých buniek (mŕtve bunky boli sfarbené namodro, kvôli nefunkčnej membráne, ktorá dovnútra prepúšťa farbivo) v desiatich štvorcoch. Tento počet bol prepočítaný na množstvo živých buniek v 1 ml bunkovej suspenzie.

#### **4.2.4. 1. experiment – vplyv IMQ**

##### **4.2.4.1. Výsev pre izoláciu RNA**

HaCaT bunky boli na 6 jamkové doštičky vysievané tak, aby sa v každej jamke nachádzalo približne 2 milióny buniek v 2 ml DMEM. Na celý experiment teda bolo treba približne 12 miliónov buniek v 24 ml DMEM. Po vysatí nasledovala inkubácia doštičiek po dobu 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

##### **4.2.4.2. Treatment pre izoláciu RNA**

V prvom experimente bol sledovaný vplyv rôznych koncentrácií IMQ (1; 10; 50 a 100 µM) v roztoku s DMEM na HaCaT bunkovú líniu. Ako negatívna kontrola (UT) bolo použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000 a ako pozitívna kontrola bol používaný FICZ vo finálnej koncentrácii 22,6 µM. Po pridaní roztokov chemikálií do jednotlivých jamiek bola doštička prenesená naspäť do inkubátoru, kde boli bunky vystavené pôsobeniu testovaných látok po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

#### **4.2.5. 2. experiment – vplyv IMQ a cytokínov**

##### **4.2.5.1. Výsev pre izoláciu RNA**

HaCaT bunky boli opäť vysievané na 6 jamkové doštičky tak, aby sa v každej jamke nachádzalo približne 2 milióny buniek v 2 ml DMEM. Na celý experiment bolo treba približne 48 miliónov buniek v 96 ml DMEM. Po vysatí boli doštičky inkubované 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

##### **4.2.5.2. Treatment pre izoláciu RNA**

V druhom experimente bol sledovaný vplyv cytokínov IL-17A (v koncentráciách 1; 10 a 100 ng/ml), IL-1β (v koncentráciách 1; 10 a 20 ng/ml) a TNFα (v koncentráciách

1; 10 a 20 ng/ml) na HaCaT bunkovú líniu. Ako UT bolo opäť použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000 a ako pozitívna kontrola FICZ v konečnej koncentrácii 10  $\mu$ M. Po pridaní roztokov chemikálie boli bunky vystavené pôsobeniu testovaných látok po dobu 24 a 48 hodín pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

#### **4.2.6. 3. experiment – co-treatment s cytokínmi a triptánmi**

##### **4.2.6.1. Výsev pre izoláciu RNA**

HaCaT bunky boli vysievane na 6 jamkové doštičky tak, aby sa v každej jamke nachádzalo približne 2 milióny buniek v 2 ml DMEM. Na celý experiment bolo treba približne 24 miliónov buniek v 48 ml DMEM. Po vysatí boli doštičky inkubované 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

##### **4.2.6.2. Treatment pre izoláciu RNA**

V rámci tohto experimentu bol sledovaný vplyv jednotlivých vybraných triptánov – avitriptánu (v koncentrácii 50  $\mu$ M), donitriptánu (v koncentrácii 50  $\mu$ M), eletriptánu (v koncentrácii 50  $\mu$ M) a rizatriptánu (v koncentrácii 100  $\mu$ M) – a ich vplyv v kombinácii s roztokom cytokínov (IL-17A v koncentrácii 10 ng/ml, IL-1 $\beta$  v koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  v koncentrácii 20 ng/ml) na HaCaT bunkovú líniu. Ako UT bolo použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000 a ako pozitívna kontrola bol použitý FICZ v konečnej koncentrácii 10  $\mu$ M. Roztok cytokínov bol taktiež využitý samostatne a v kombinácii s FICZ-om. Po ošetrení buniek jednotlivými roztokmi boli bunky vystavené ich pôsobeniu po dobu 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %.

##### **4.2.7. Izolácia mRNA**

RNA bola izolovaná metódou využívajúcou TRI Reagent®. Po inkubácii buniek z každého typu experimentu bolo z jamiek odstránené staré médium, doštičky boli osušené na buničine a do každej jamky bol pridaný 1 ml TRI Reagent®. Za použitia škrabky boli bunky oddelené od dna jamiek a ich homogenát bol prenesený do mikroskúmaviek o objeme 1,5 ml. Ku každej vzorke bolo pridaných 200  $\mu$ l chloroformu a mikroskúmavky s vzorkami boli dôkladne pretrepávané po dobu 1 minúty, po čom boli vzorky ponechané pri laboratórnej teplote po dobu cca 10 minút, pokiaľ nedošlo k oddeleniu jednotlivých fáz roztoku. Následne boli vzorky centrifugované pri 14 000 rpm a 4 °C po dobu 15 minút. Po centrifugácii bola z každej vzorky odňatá vrchná vodná fáza (o objeme približne 400–500  $\mu$ l), ktorá bola následne prenesená

do nových 1,5ml mikroskúmaviek. RNA bola precipitovaná pridaním 0,5 ml vychladeného izopropanolu do každej vzorky, pričom po jeho pridaní bola každá vzorka dôkladne zvertexovaná. Vzorky boli opäť ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 7–8 minút a následne opäť centrifugované pri 14 000 rpm s 4 °C po dobu 13 minút. Toto malo za účink vyvrážanie RNA na dne mikroskúmaviek. Z každej vzorky bol odstránený supernatant a nasledujúcim krokom bolo premývanie RNA peletu za použitia 1 ml 75% etanolu vychladeného na –20 °C. Vzorky s etanolom boli centrifugované po dobu 5 minút pri 14 000 rpm a 4 °C. Proces premývania bol opakovaný dvakrát. Po premytí bol z mikroskúmaviek odpipetovaný etanol a otvorené mikroskúmavky boli inkubované v termobloku pri 65 °C po dobu maximálne jednej minúty. Do každej mikroskúmavky s peletom bolo pridaných 30 µl prečistenej vody zbavenej nukleáz a pre zvýšenie rozpustnosti peletu boli vzorky inkubované v termobloku, tentokrát uzavreté, pri teplote 65 °C po dobu 5 minút. Nakoniec boli vzorky mierne zvertexované a okamžite prenesené na ľad. Pomocou prístroja NanoDrop Lite bola spektrofotometricky zmeraná čistota a koncentrácia izolovanej RNA.

#### **4.2.8. Reverzná transkripcia**

RNA vo vzorkách bola nariadená pre účely reverznej transkripcie tak, aby každá vzorka o objeme 5 µl obsahovala 1 000 ng RNA. Ku každej vzorke bol pridaný 1 µl Random Primers 6 (o koncentrácii 100 pmol/l) a vzorky boli prenesené na inkubáciu v termobloku po dobu 5 minút pri 65 °C. Následne boli vzorky krátko zcentrifugované a prenesené na ľad. Ku každej vzorke bolo pridaných 6 µl reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu (pripravená podľa tabuľky č. 1) a vzorky boli opäť krátko zcentrifugované. Vzorky s reakčnou zmesou boli inkubované pri 42 °C po dobu 1 hodiny a následne boli prenesené do termobloku o teplote 65 °C na 10 minútovú inkubáciu. Po inkubáciách boli mikroskúmavky so vzorkami prenesené na ľad, kde sa chladili 2 minúty. Každá vzorka s takto získanou cDNA bola 10x nariadená 108 µl ultračistej vody.

**Tabuľka č. 1: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.** Uvedené objemy sú pre reakčnú zmes pre 1 vzorku.

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
<b>Reverzná transkriptáza M-MuLV</b>	0,6
<b>Inhibítor ribonukleáz</b>	0,3
<b>dNTPs (10mM stock)</b>	0,6
<b>Reakčný pufor (10x koncentrovaný)</b>	1,2
<b>Ultračistá voda zbavená nukleáz</b>	3,3
<b>Celkom</b>	6

#### 4.2.9. RT-qPCR

##### 4.2.9.1. TaqMan Gene Expression Assay

Pre sledovanie expiesie génov TNF $\alpha$ , IL-17A a IL-1 $\beta$  bola využitá TaqMan Gene Expression Assay. Reakčná zmes bola pripravená podľa tabuľky č. 2. Na ľad bola umiestnená 96 jamková biela mikrotitračná doštička a do potrebného množstva jamiek bolo napipetovaných 9  $\mu$ l reakčnej zmesi a 2  $\mu$ l vzorky cDNA. Všetky vzorky boli pipetované v triplikáte. Doštička bola prekrytá priehľadnou fóliou a centrifugovaná pri 1 500 rpm pri 4 °C. Po centrifugácii bola doštička vložená do Light Cycler-a a podmienky PCR boli nastavené podľa tabuľky č. 3.

**Tabuľka č. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre TNF $\alpha$ , IL-17A a IL-1 $\beta$  pre RT-qPCR.** Uvedené objemy sú pre reakčnú zmes pre 1 vzorku.

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
<b>Master Mix (2x koncentrovaný)</b>	5,0
<b>TaqMan Gene Expression Assay (20x koncentrovaná)</b>	0,5
<b>Ultračistá voda zbavená nukleáz</b>	3,5
<b>Celkom</b>	9,0

**Tabuľka č. 3: Nastavenie RT-qPCR reakcie pre TaqMan Gene Expression Assay.**

Formát detekcie	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe		
<b>Celkový objem reakcie</b>	11 $\mu$ l		
<b>Cyklus</b>	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
<b>Preinkubácia</b>	95	20 s	1
<b>Amplifikácia</b>	95	1 s	45
	60	20 s	
<b>Chladenie</b>	40	30 s	1

#### 4.2.9.2. KiCqStart Probe Assays

Pre sledovanie expsie génov HRNR, FLG, IVL a CYP1A1 bola využitá KiCqStart Probe Assay. Reakčná zmes bola pripravená podľa tabuľky č. 4. Proces prípravy bol rovnaký ako pri TaqMan Gene Expression Assay, avšak objem reakčnej zmesi v jednej jamke činil 8  $\mu$ l a objem cDNA činil 2  $\mu$ l. Po centrifugácii bola doštička vložená do Light Cycler-a a podmienky PCR boli nastavené podľa tabuľky č. 5.

**Tabuľka č. 4: Zloženie reakčnej zmesi pre HRNR, FLG a IVL pre RT-qPCR.** Uvedené objemy sú pre reakčnú zmes pre 1 vzorku.

Reagencie	Objem [ $\mu$ l]
<b>KiCqStart Probe qPCR ReadyMix</b>	5,0
<b>Ultračistá voda zbavená nukleáz</b>	2,5
<b>F + R primer (10 <math>\mu</math>M)</b>	0,3
<b>Próba (10 <math>\mu</math>M)</b>	0,2
<b>Celkom</b>	8,0



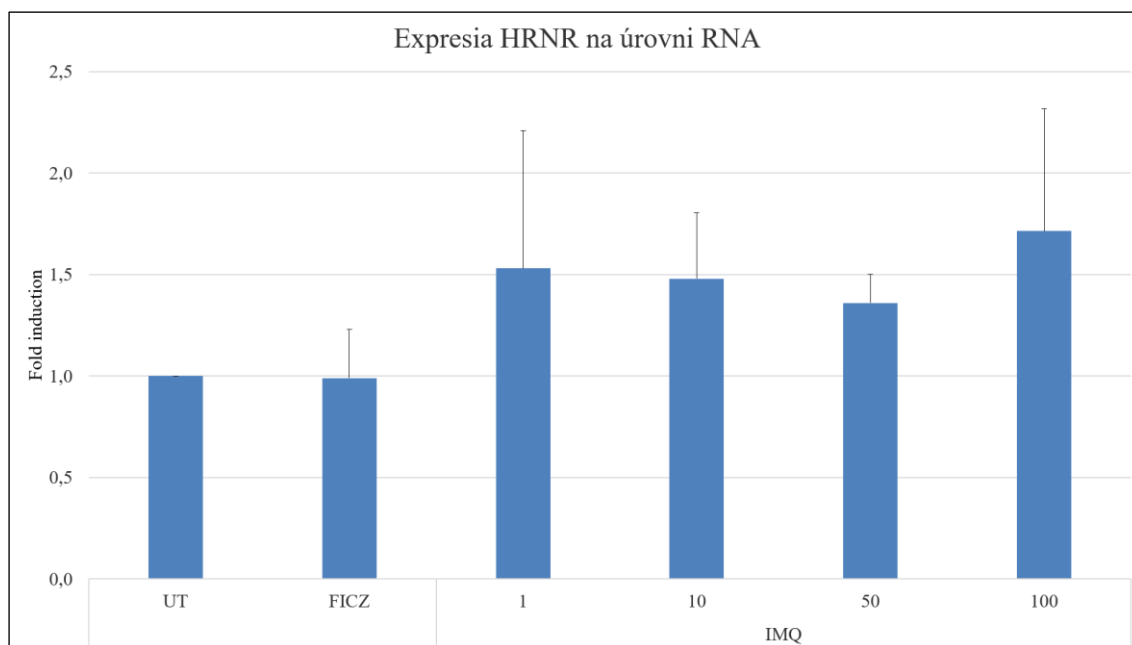
**Tabuľka č. 5: Nastavenie RT-qPCR reakcie pre KiCqStart Probe Assays.**

<b>Formát detekcie</b>	<b>Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe</b>		
<b>Celkový objem reakcie</b>	11 µl		
<b>Cyklus</b>	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
<b>Preinkubácia</b>	95	10 min	1
<b>Amplifikácia</b>	95	10 s	45
	60	30 s	
<b>Chladenie</b>	40	30 s	1

## 5 VÝSLEDKY

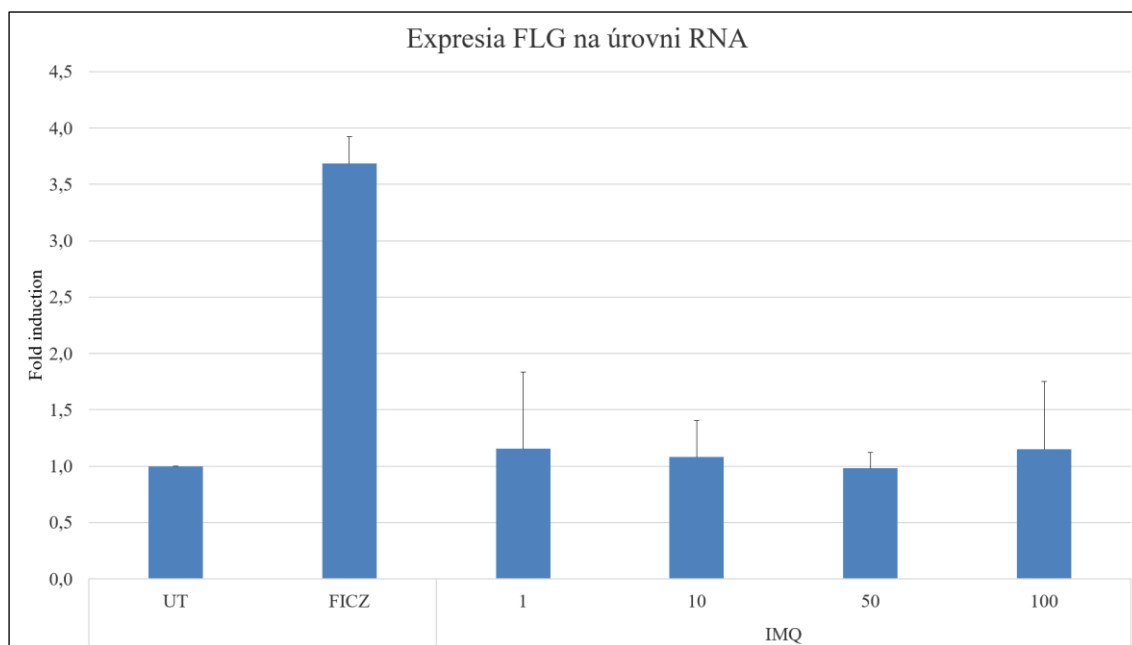
### 5.1. 1. experiment – vplyv IMQ na expresiu bariérových génov a cytokínov v HaCaT bunkovej línii na úrovni mRNA

Prvým krokom bolo otestovať či je možné chemicky vyvolať zápalu podobný stav pôsobením látky imiquimodu (IMQ), ktorá sa často používa v *in vivo* štúdiách (Choi *et al.*, 2021; van der Fits *et al.*, 2009). Bolo teda nutné zistiť či IMQ potlačuje expresiu epidermálnych bariérových génov a či indukuje markery zápalu. Indukcia expresie hornerínu (HRNR) bola meraná ako fold induction (FI) negatívnej kontroly (UT). FICZ (ligand AhR) nemal na expresiu HRNR žiadny vplyv. S rastúcou koncentráciou IMQ bolo sledované mierne navýšenie expresie (1,5x), ktoré však nebolo koncentračne závislé.



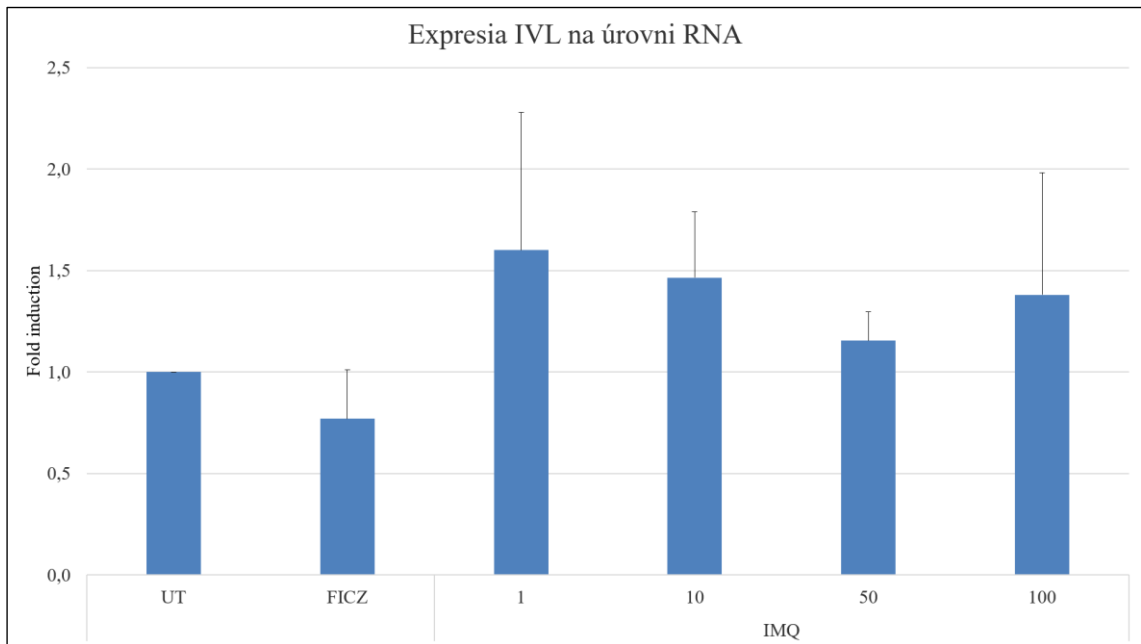
**Graf č. 1: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení imiquimodu o koncentráciách 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Výsledky sú predstavené ako násobok negatívnej kontroly (fold induction UT) a boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom dvoch nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Ďalší z bariérových génov, filagrín (FLG) bol FICZ-om indukovaný približne 3,7 krát oproti negatívnej kontrole a indukcia bola výrazná, aj keď nie štatisticky signifikantná. Imiquimod nemal na expresiu FLG žiadny vplyv.



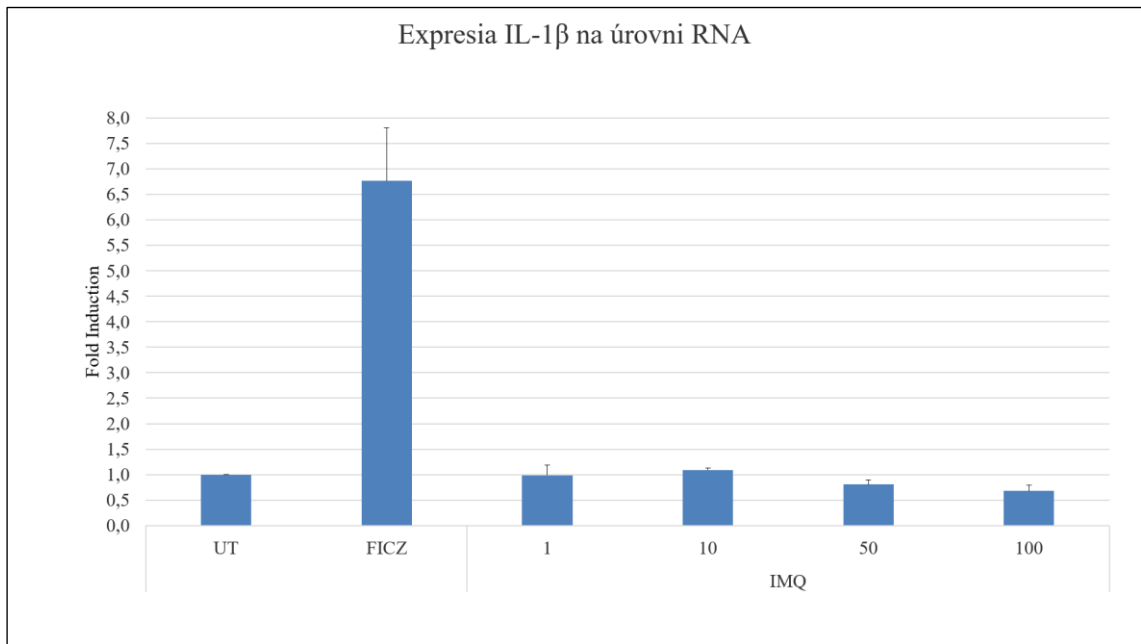
**Graf č. 2: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení imiquimodu o koncentráciách 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Výsledky sú predstavené ako násobok UT a boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom dvoch nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Hladina expresie posledného sledovaného bariérového génu involukrínu (IVL) bola ligandom Ahr FICZ-om znížená, avšak nie štatisticky významne. IMQ expresiu mierne zvýšil, avšak taktiež nie štatisticky významne.



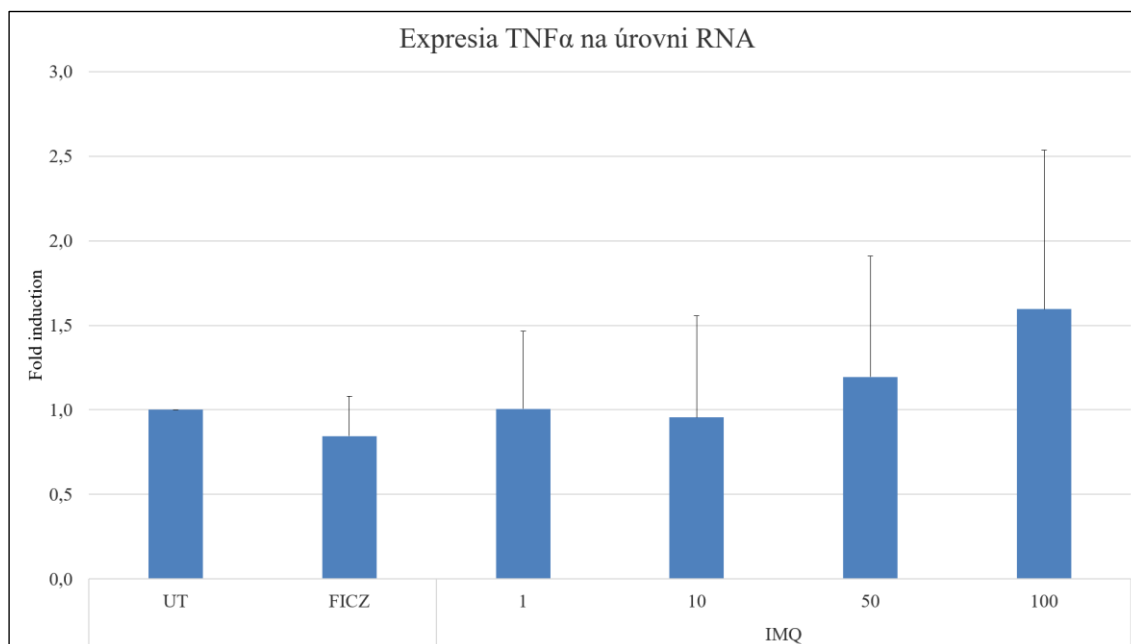
**Graf č. 3: Expresia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení imiquimodu o koncentráciách 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Výsledky sú predstavené ako násobok UT a boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom dvoch nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Medzi sledovanými cytokínmi, ktoré mali byť indukované chemickou cestou pomocou IMQ boli interleukín 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Cytokín IL-1 $\beta$  bol FICZ-om indukovaný štatisticky významne približne 6,8 krát viac ako UT. IMQ v žiadnej koncentrácii významne neovplyvňoval expresiu IL-1 $\beta$ , v koncentráciách 50 a 100  $\mu\text{M}$  ju dokonca mierne znižoval.



**Graf č. 4: Expresia génu IL-1β na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení imiquimodu o koncentráciách 1 μM, 10 μM, 50 μM a 100 μM. Výsledky sú predstavené ako násobok UT a boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom dvoch nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Expresia TNFα bola FICZ-om mierne, aj keď nie štatisticky významne, znížená. Výsledky naznačujú, že s rastúcou koncentráciou IMQ rastie aj expresia TNFα, ktorá bola IMQ v koncentrácii 100 μM indukovaná 1,6 krát viac ako negatívna kontrola, no ani tento výsledok nebol štatisticky preukazný.



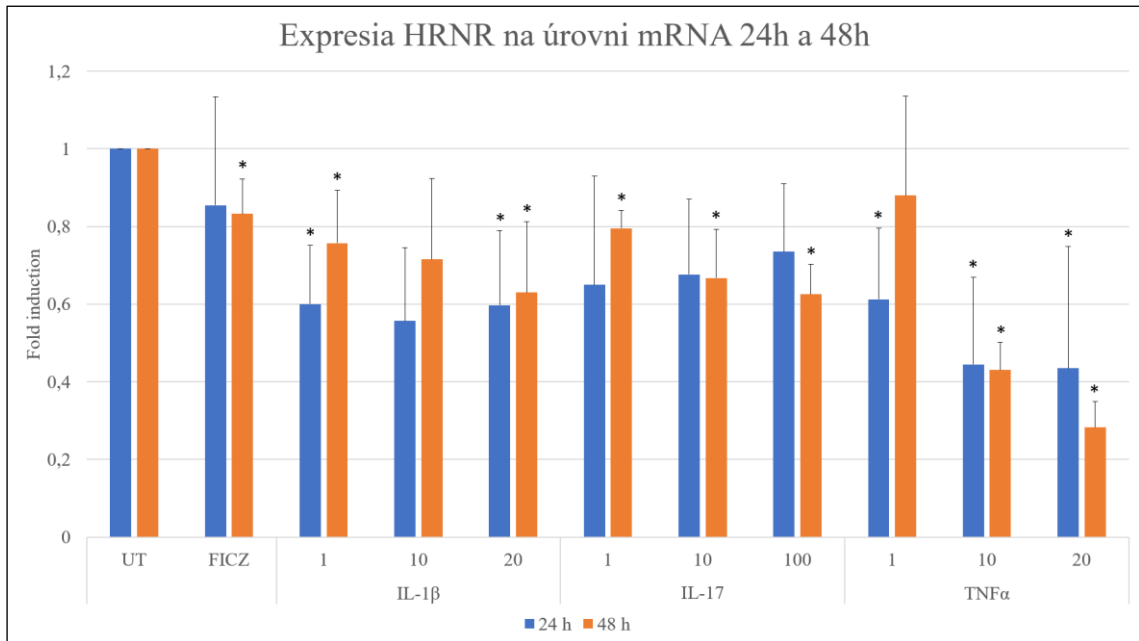
**Graf č. 5: Expresia génu TNF $\alpha$  na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení imiquimodu o koncentráciách 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Výsledky sú predstavené ako násobok UT a boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom dvoch nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Na základe výsledkov prvého experimentu bol pre ďalší experiment použitý imiquimod o koncentrácii 10  $\mu$ M s dobami inkubácie 24 a 48 hodín, aby sa zistilo či dlhšia doba môže mať vplyv na chemicky indukovaný zápal. Avšak, nebola zaznamenaná významná indukcia expresie ani jedného z daných cytokínov – z tohto dôvodu bol experiment s IMQ opustený a neprebehla ani zamýšľaná co-inkubácia s triptánmi, čo bol jeden z cieľov práce. Z vyššie uvedených dôvodov sa prešlo k indukcii zápalového stavu za použitia vybraných cytokínov IL-17A, IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ .

### 5.2. 2. experiment – vplyv cytokínov na expresiu bariérových génov

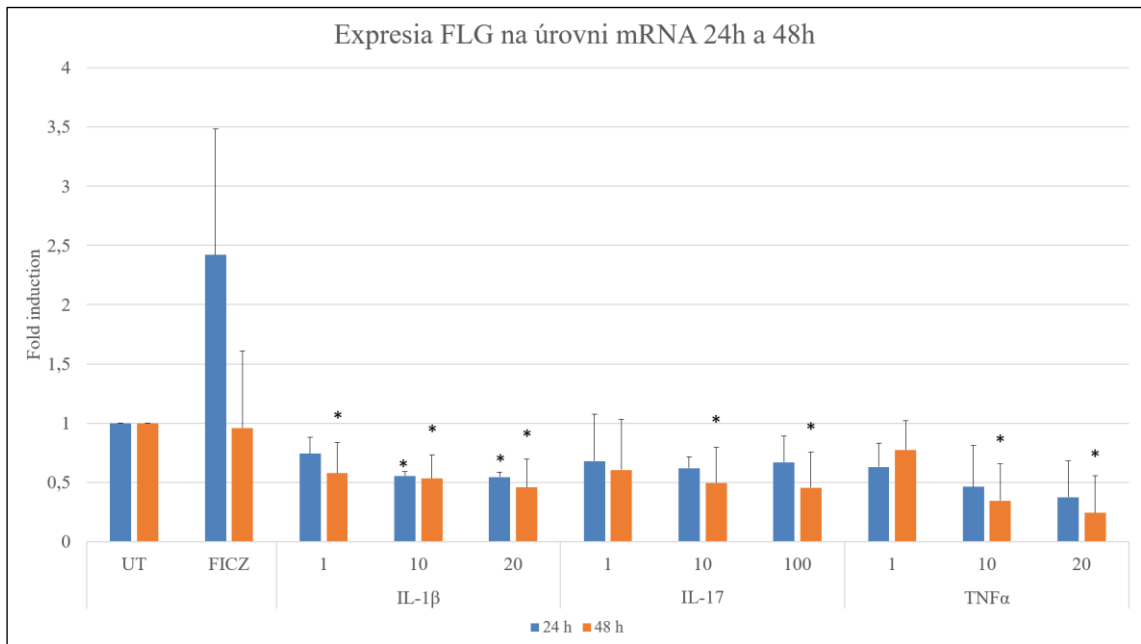
Použitie prozápalových cytokínov malo preukázateľný vplyv na expresiu bariérových génov. IL-1 $\beta$  ovplyvňoval expresiu HRNR podobne vo všetkých troch koncentráciách – štatisticky významne konkrétne v koncentráciách 1 a 20 ng/ml a to približne z dvoch tretín tak ako UT. IL-17 v koncentráciách 1 a 10 ng/ml znižoval expresiu HRNR na približne rovnakú úroveň. Najvýznamnejší dopad mal TNF $\alpha$  – s jeho rastúcou koncentráciou dochádzalo k štatisticky významnému poklesu v expresii HRNR. Po 48 hodinovej inkubácii bol trend v expresii HRNR podobný ako za 24 hodín – TNF $\alpha$

vo svojej najnižšej koncentrácii expresiu takmer neovplyvňoval. Najviac expresiu HRNR znižoval TNF $\alpha$  v koncentrácii 20 ng/ml a to na menej ako tretinu UT.



**Graf č. 6: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 a 48 hodín vystavená pôsobeniu cytokínov IL-1 $\beta$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml), IL-17 (o koncentráciách 1, 10 a 100 ng/ml) a TNF $\alpha$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

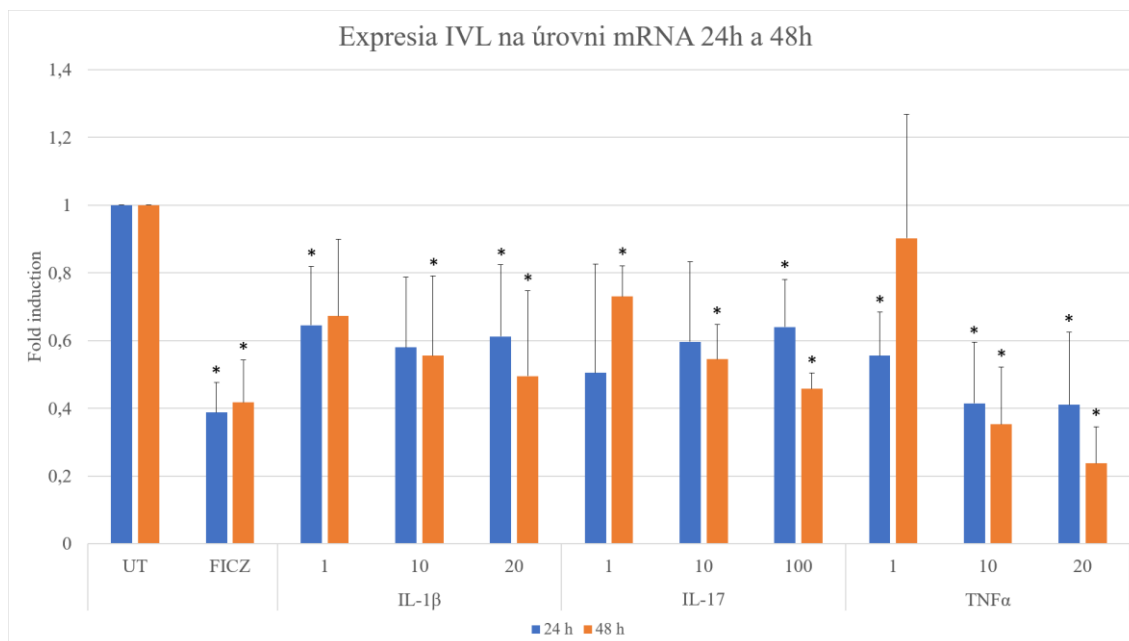
Zatiaľ čo FICZ expresiu FLG po 24 hodinovej inkubácii zvyšoval takmer 2,5 krát, po 48 hodinovej inkubácii FICZ už nemal na expresiu FLG takmer žiadny vplyv. Všetky tri cytokíny expresiu znižovali v porovnaní s negatívnou kontrolou za 24 aj 48 hodín. Podobne ako pri HRNR, IL-1 $\beta$  a IL-17 znížili expresiu na podobnú úroveň, bez ohľadu na použitú koncentráciu. Najmarkantnejšie znižoval expresiu FLG koncentračne závisle TNF $\alpha$  a to až na približne tretinu hodnoty UT pre koncentráciu 20 ng/ml.



**Graf č. 7: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 a 48 hodín vystavená pôsobeniu cytokínov IL-1 $\beta$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml), IL-17 (o koncentráciách 1, 10 a 100 ng/ml) a TNF $\alpha$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

FICZ expresiu IVL po 24 hodinovej inkubácii štatisticky významne redukoval až na menej ako polovicu hodnoty UT. Všetky tri cytokíny signifikantne znížili expresiu IVL, najviac opäť TNF $\alpha$ , tentokrát pre koncentrácie 20 a 10 ng/ml až na úroveň FICZ-u. Po 48 hodinách už všetky cytokíny vykazovali rovnaký trend, kde s rastúcou koncentráciou dochádzalo k poklesu expresie IVL. Tento trend bol jasnejší ako pri 24 hodinovej inkubácii. Najväčší pokles expresie bol opäť zaznamenaný po pôsobení TNF $\alpha$  v koncentrácii 20 ng/ml kde išlo o štatisticky významnú hodnotu.





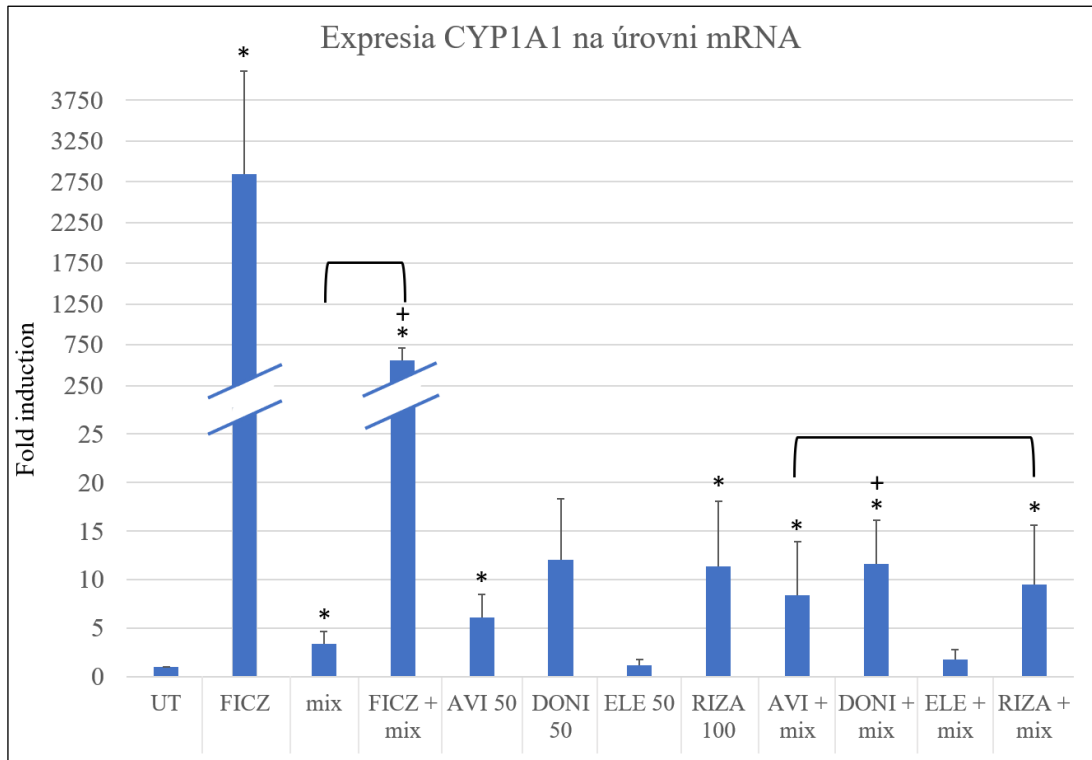
**Graf č. 8: Expressia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 a 48 hodín vystavená pôsobeniu cytokínov IL-1 $\beta$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml), IL-17 (o koncentráciách 1, 10 a 100 ng/ml) a TNF $\alpha$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) označené symbolom \*.

Na základe výsledkov druhého experimentu boli pre ďalší experiment použité IL-1 $\beta$  o koncentrácii 10 ng/ml, IL-17 o koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentrácii 20 ng/ml vo forme „mixu“ a v kombinácii s avitriptánom, donitriptánom a eletriptánom o koncentrácii 50  $\mu$ M a rizatriptánom o koncentrácii 100  $\mu$ M, kde dané koncentrácie boli zvolené na základe mojej bakalárskej práce (Trofimenková, 2021).

### 5.3. 3. experiment – vplyv cytokínov a triptánov vo forme co-treatmentu na expresiu bariérových génov na úrovni mRNA

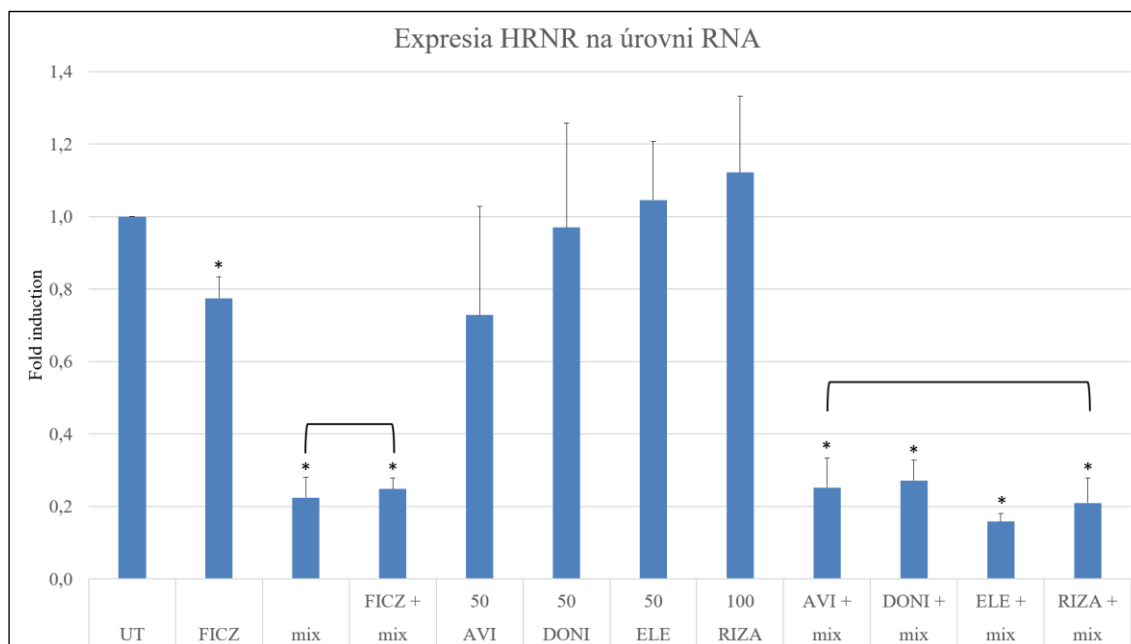
Takmer 2840 krát vyššia indukcia expresie CYP1A1 FICZ-om v porovnaní s UT štatisticky signifikantne potvrdila funkčnosť AhR. FICZ s mixom cytokínov indukoval expresiu CYP1A1 približne 559 krát viac ako UT a taktiež štatisticky významne, zatiaľ čo mix cytokínov samotný indukoval jeho expresiu viac ako trikrát viac ako negatívna kontrola. Teda prítomnosť mixu cytokínov znížila expresiu CYP1A1 indukovanú FICZ-om približne na šestinú. Miernu signifikantnú indukciu CYP1A1 vyvolali aj avitriptán (AVI), donitriptán (DONI) a rizatriptán (RIZA). Kombinácia triptánov s mixom

cytokínov nemala takmer žiadny významný vplyv na indukciu CYP1A1 v porovnaní s triptánmi samotnými.



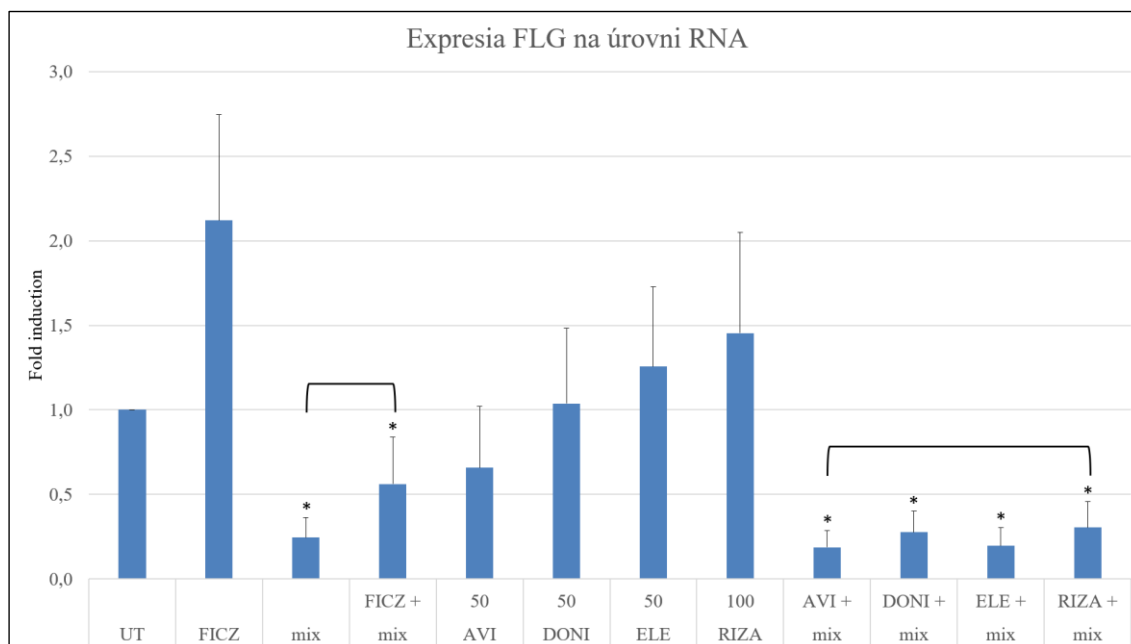
**Graf č. 9: Expresia génu CYP1A1 na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobeniu avitriptánu, donitriptánu a eletriptánu o koncentrácii 50  $\mu$ M a rizatriptánu o koncentrácii 100  $\mu$ M a následne jednotlivým triptánom v kombinácii s mixom cytokínov (IL-17 a IL-1 $\beta$  o koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentrácii 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 5 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s negatívnou kontrolou označené symbolom \* a v porovnaní s mixom označené symbolom +.

Hladina mRNA pre HRNR nebola ovplyvnená ligandom AhR, ale mix cytokínov znížil expresiu asi na 20 % negatívnej kontroly. Prítomnosť FICZ-u nemala na zníženie vplyv. Samotné triptány nemali štatisticky významný vplyv na expresiu HRNR. Ich kombinácia s mixom cytokínov hladinu mRNA rovnako neovplyvnila.



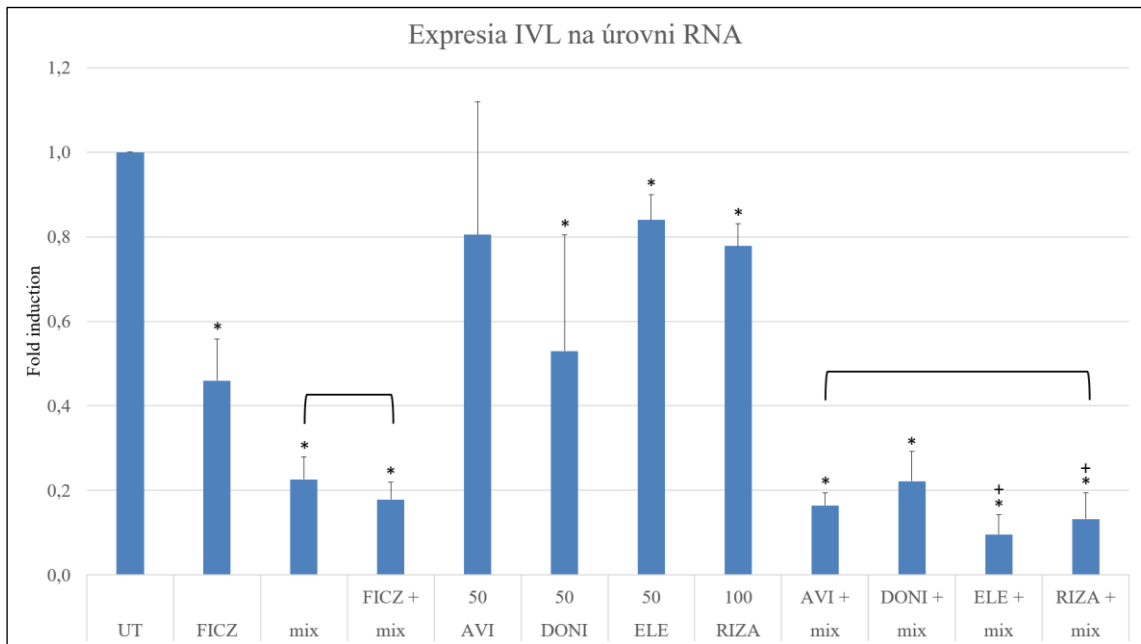
**Graf č. 10: Expresia génu HRNR na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobeniu avitriptánu, donitriptánu a eletriptánu o koncentrácii 50  $\mu$ M a rizatriptánu o koncentrácii 100  $\mu$ M a následne jednotlivým triptánom v kombinácii s mixom cytokínov (IL-17 a IL-1 $\beta$  o koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentrácii 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 5 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s negatívnou kontrolou označené symbolom \* a v porovnaní s mixom označené symbolom +.

Expresia FLG bola FICZ-om asi 2,1 krát indukovaná a redukovaná samotným mixom cytokínov na približne pätinu hodnoty UT. Kombinácia FICZ-u a mixu viedla k nárastu v porovnaní s mixom, ktorá však nebola v porovnaní s mixom štatisticky významná, čo naznačuje participáciu aktivovaného AhR v obnove expresie bariérového génu filagrínu. Prítomnosť žiadneho z testovaných triptánov však nevedla k podobnému efektu a ich prítomnosť tak nemala na cytokínmi indukovaný pokles FLG mRNA žiadny vplyv.



**Graf č. 11: Expresia génu FLG na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobeniu avitriptánu, donitriptánu a eletriptánu o koncentracii 50  $\mu\text{M}$  a rizatriptánu o koncentracii 100  $\mu\text{M}$  a následne jednotlivým triptánom v kombinácii s mixom cytokínov (IL-17 a IL-1 $\beta$  o koncentracii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentracii 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 5 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s negatívnou kontrolou označené symbolom \* a v porovnaní s mixom označené symbolom +.

Pri expresii IVL bola opäť pozorovaná jej markantná redukcia pôsobením FICZ-u či mixu cytokínov. Prekvapivo, FICZ v kombinácii s cytokínmi dokonca redukoval expresiu IVL ešte viac ako mix samotný a to štatisticky významne v porovnaní s UT. Samotné triptány znížili expresiu IVL na 60–80 % negatívnej kontroly a pri ich kombinácii s mixom cytokínov s výnimkou AVI a DONI došlo k signifikantnému synergickému efektu, kde bol podobne ako pre FICZ pozorovaný pokles väčší než pre mix samotný.



**Graf č. 12: Expresia génu IVL na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línii.** Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobeniu avitriptánu, donitriptánu a eletriptánu o koncentrácii 50  $\mu\text{M}$  a rizatriptánu o koncentrácii 100  $\mu\text{M}$  a následne jednotlivým triptánom v kombinácii s mixom cytokínov (IL-17 a IL-1 $\beta$  o koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentrácii 20 ng/ml). Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 5 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s negatívnou kontrolou označené symbolom \* a v porovnaní s mixom označené symbolom +.

## 6 DISKUSIA

Táto diplomová práca sa zaoberá vplyvom indukovaného chemického zápalu buniek kože na expresiu epidermálnych bariérových génov a jej obnovenie triptánmi skrz aktiváciu aryl uhl'ovodíkového receptora (AhR). Dysfunkcia expresie bariérových génov v koži je asociovaná so zápalovými ochoreniami ako je atopická dermatitída a psoriáza, ktoré sú charakteristické svojimi cytokínovými profilmi. Testované boli účinky imiquimodu (o koncentrácii 1, 10, 50 a 100  $\mu\text{M}$ ) na expresiu cytokínov TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , cytokínov IL-17A (o koncentráciách 1, 10 a 100 ng/ml), IL-1 $\beta$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml) a TNF $\alpha$  (o koncentráciách 1, 10 a 20 ng/ml) na expresiu bariérových génov HRNR, FLG a IVL a vybraných triptánov avitriptánu, donitriptánu, eletriptánu (o koncentrácii 50  $\mu\text{M}$ ) a rizatriptánu (o koncentrácii 100  $\mu\text{M}$ ) v kombinácii s mixom cytokínov (IL-17 a IL-1 $\beta$  o koncentrácii 10 ng/ml a TNF $\alpha$  o koncentrácii 20 ng/ml) na expresiu bariérových génov HRNR, FLG a IVL v HaCaT bunkovej línii imortalizovaných ľudských keratinocytov. Imiquimod sa v klinickej praxi využíva ako liečivo na genitálne a perianálne kožné bradavice, aktinickú keratózu a pri povrchovom bazálnom karcinóme kože a triptány (okrem avitriptánu a donitriptánu) sú využívané ako selektívni agonisti 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptorov pri liečbe akútnych migrenických stavov. Keďže medzi agonistov AhR patria aj zlúčeniny s indolovým jadrom, medzi ktoré patria aj triptány (Vyhlídalová *et al.*, 2021, Trofimenková, 2021) a aktivácia signálnej dráhy AhR sa využíva pri liečbe zápalových ochorení kože, základným cieľom tejto diplomovej práce bolo overiť hypotézu, že tieto látky budú schopné obnoviť chemicky indukovaným zápalom zníženú expresiu bariérových génov kože.

V štúdií Choi *et al.* bol sledovaný model psoriáze podobnému zápalu indukovaného IMQ v myšacích modeloch. Koža myši bola denne ošetrovaná 25 mg komerčne dostupného IMQ krému (5%) a následne bola sledovaná mRNA expresia cytokínov v koži pomocou RT-PCR. Pozorovaná bola indukcia expresie IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$  (viac ako dvakrát vyššia ako pri kontrole, v oboch prípadoch). V mojej diplomovej práci nebolo sledované signifikantné či už pozitívne alebo negatívne ovplyvnenie expresie cytokínov po pôsobení IMQ, v ktorejkoľvek koncentrácii. Tento fakt mohol byť spôsobený tým, že rozpustnosť IMQ v polárnych zlúčeninách je výrazne limitovaná a modely stavov podobného psoriáze sú založené na používaní IMQ vo forme krému, kde je jeho rozpustnosť markantne vyššia a možnosť jeho aplikácie jednoduchšia a tým

pádov pravdepodobne aj efektívnejšia v sprostredkovaní jeho imunomodulácie (Choi *et al.*, 2021).

Varma *et al.* vo svojej štúdií pôsobili IMQ v koncentrácii 100  $\mu$ M na HaCaT bunkovú líniu po dobu 96 hodín a sledovali expresiu FLG a IVL na úrovni mRNA. Expresia filagrínu po pôsobení IMQ narástla po 96 hodinách na približne dvojnásobok negatívnej kontroly, pričom expresia IVL bola indukovaná o niečo menej ako dvojnásobok negatívnej kontroly (Varma *et al.*, 2017). Z mojich výsledkov je zjavné, že IMQ expresiu FLG takmer neovplyvňoval a expresiu IVL zvyšoval len minimálne. Tento malý rozdiel medzi mojimi výsledkami a výsledkami štúdie Varma *et al.* byť spôsobený aj faktom, že Varma *et al.* vo svojej štúdií vystavovali HaCaT bunkovú líniu  $\text{CaCl}_2$  ešte pred treatmentom samotným, z dôvodu indukovania diferenciácie.

V štúdií Varma *et al.* bola taktiež sledovaná expresia vybraných cytokínov na úrovni mRNA v HaCaT bunkovej línií po 24 hodinovom pôsobení 100 $\mu$ M IMQ. Indukcia expresie TNF $\alpha$  sa blížila stonásobku negatívnej kontroly, pričom v mojich výsledkoch bola sledovaná iba 1,6 násobná indukcia expresie TNF $\alpha$  po pôsobení 100 $\mu$ M IMQ. Tento výrazný rozdiel môže byť taktiež spôsobený tým, že pôsobenie IMQ na HaCaT bunkovej línií, v ktorej bola použitím  $\text{CaCl}_2$  indukovaná ich diferenciácia (Varma *et al.*, 2017)

Tanaka *et al.* vo svojej štúdií indukovali expresiu IL-1 $\beta$  pôsobením 100nM FICZ-u po dobu 3 a 6 hodín v HaCaT bunkovej línií. Po trojhodinovej inkubácii FICZ indukoval expresiu IL-1 $\beta$  približne dvakrát viac ako negatívna kontrola a po šesť hodinovej inkubácii narástla jeho expresia na takmer štvornásobok negatívnej kontroly. V praktickej časti mojej diplomovej práce bola nameraná expresia IL-1 $\beta$  po pôsobení FICZ-u viac ako 6,5 krát vyššia ako negatívna kontrola. Mnou namerané výsledky sú v súlade s výsledkami štúdie Tanaka *et al.* aj keď sú vyššie, čo bolo pravdepodobne spôsobené tým, že v praktickej časti mojej diplomovej práce išlo o 24 hodinovú inkubáciu a FICZ bol použitý vo vyššej koncentrácii (10  $\mu$ M) (Tanaka *et al.*, 2018).

Objav schopnosti Tapinarofu viazať sa na AhR a tým ovplyvňovať expresiu bariérových génov bol významným pilotný krokom pri vyvíjaní nových foriem liečby kožných zápalových ochorení. Fakt, že tapinarof aktivuje moduluje AhR sprostredkovanú expresiu bariérových génov vedie k hypotéze, že iné molekuly (napríklad triptány), obsahujúce podobné štruktúry (aromatické cykly) môžu taktiež viesť k aktivácii AhR

a ovplyvneniu expresie bariérových génov. Vplyv tapinarofu na expresiu bariérových génov filagrínu a lorikrínu bol sledovaný v štúdiu Vu *et al.*, kde bola použitá bunková línia normálnych ľudských epidermálnych keratinocytov ošetrovaná tapinarofom o koncentrácii 500 nM po dobu 24, 48 a 72 hodín. Po 24 hodinách zvyšoval expresiu FLG na viac ako päťnásobok negatívnej kontroly. V mojich výsledkoch indukoval ligand AhR FICZ expresiu FLG o niečo viac ako 2 krát v porovnaní s negatívnou kontrolou. FICZ aj tapinarof ovplyvňujú expresiu FLG skrz AhR, výsledky mojej experimentálnej práce a štúdie Vu *et al.*, sa líšia pravdepodobne hlavne z dôvodu, že v mojej experimentálnej práci bola využívaná HaCaT bunková línia immortalizovaných keratinocytov (Vu *et al.*, 2020).

Tapinarof bol taktiež v štúdiu Smith *et al.* využitý pri obnovovaní expresie bariérových génov filagrínu, hornerínu a involukrínu, avšak na bunkovej línii primárnych ľudských keratinocytov počas 72 hodinovej inkubácie. Expresia IVL po pôsobení tapinarofu o koncentrácii 1  $\mu$ M bola po 72 hodinách približne štyri krát vyššia ako pri negatívnej kontrole s DMSO. V mojej experimentálnej práci som nepozorovala navýšenie expresie IVL ani jedným z použitých ligandov AhR (FICZ a triptány). Expresia FLG bola pôsobením tapinarofu v rovnakej koncentrácii indukovaná viac ako päť krát viac ako negatívna kontrola, pričom v mojom experimente som sledovala navýšenie jeho expresie len pri použití FICZ-u, eletriptánu a rizatriptánu a aj to menej ako v štúdiu Smith *et al.*. Najvýraznejšie 1  $\mu$ M tapinarof ovplyvňoval expresiu HRNR, kedy došlo k viac ako stonásobnému navýšeniu v porovnaní s negatívnou kontrolou. V rámci mojich experimentov indukoval expresiu HRNR len rizatriptán a aj to len minimálne. Tieto rozdiely môžu byť spôsobené jednak použitím iných bunkových línii, alebo možnosťou, že použité triptány nedostatočne aktivovali AhR (Smith *et al.*, 2017).

Gutowska-Owsiak *et al.* vo svojej štúdiu využívali IL-17A o koncentrácii 200 ng/ml na HaCaT bunkovej línii a sledovali downreguláciu mRNA profílagrínu po jeho dvanásť hodinovom pôsobení. Expresia profílagrínu bola pôsobením IL-17A znížená o viac ako polovicu v porovnaní s negatívnou kontrolou. Vo výsledkoch mojich experimentov bola zaznamenaná približne rovnako znížená expresia mRNA FLG po pôsobení IL-17A v koncentráciách 1, 10 a 100 ng/ml a to na približne polovinu hodnoty negatívnej kontroly. Moje výsledky a výsledky štúdie Gutowska-Owsiak sa výrazne nelíšia (Gutowska-Owsiak *et al.*, 2012).



Uhoľný decht ako aktivátor AhR signálnej dráhy bol využitý v štúdiu Bogaard *et al.*, kde boli použité kožné ekvivalenty generované z keratinocytov pacientov s AD, ktoré vykazovali heterozygotnú mutáciu FLG. Už po 3 dňoch aplikácie uhoľného dechtu začala expresia filagrínu a hornerínu narastať a po 7 dňoch už dosahovala hodnoty expresie pripomínajúce hodnoty expresie týchto proteínov v zdravej koži (Bogaard *et al.*, 2013). V mojich experimentoch ani jeden z triptánov nebol schopný obnoviť expresiu hornerínu a filagrínu zníženú prozápalovým mixom cytokínov. Tento fakt môže byť spôsobený viacerými faktormi – výrazne kratšia doba expozície bunkovej línie triptánom, použitie inej bunkovej línie alebo nedostatočná aktivácia AhR

Na základe porovnania mojich výsledkov a výsledkov iných štúdií je možné tvrdiť, že expresia bariérových génov nie je spojená len s aktiváciou AhR. Interleukíny použité v praktickej časti tejto diplomovej práce síce znižovali expresiu bariérových génov, no jej obnova vybranými aktivátormi AhR triptánmi, nebola úspešná. Ale aj napriek nedostatočnej komplexite využitého modelu, slabým aktivátorom AhR a jednorázovej aplikácii nemožno vylúčiť, že aktivácia AhR je správnym smerom v liečbe vybraných kožných ochorení, ako štúdie s Tapinarofom či uhoľným dechtom naznačujú.

## 7 ZÁVER

V rámci mojej diplomovej práce som sa venovala vplyvu chemicky indukovaného zápalu kože a jeho potlačenia triptánmi na expresiu bariérových génov v kožných bunkách. V prvej časti som pozorovala vplyv imiquimodu na expresiu bariérových génov kože (homerínu, filagrínu a involukrínu) a cytokínov spojených so zápalovými procesmi v koži (IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ ). Expresia HRNR, IVL ani FLG nebola pôsobením IMQ ovplyvnená, rovnako tak nebol pozorovaný signifikantný vplyv na expresiu vybraných cytokínov (IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ ). Preto bol experiment s IMQ opustený a prešlo sa k indukcii zápalového stavu použitím cytokínov. Použitie IL-17A, IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$  vyvolalo pokles expresie bariérových génov, kde najsilnejším induktorom poklesu bol TNF $\alpha$ , a to ako za 24 hodín, tak za 48 hodín. Na základe týchto výsledkov bol pre nasledujúce experimenty použitý mix cytokínov (IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml; IL-17, 10 ng/ml; TNF $\alpha$  20 ng/ml). Triptány a ich koncentrácie (avatriptán, donitriptán a eletriptán v koncentrácii 50  $\mu$ M, rizatriptán v koncentrácii 100  $\mu$ M) boli zvolené na základe výsledkov mojej bakalárskej práce. Expresia CYP1A1 indukovaná bola mixom cytokínov znížená asi na jednu pätinu. Avatriptán, donitriptán a rizatriptán vyvolali miernu signifikantnú indukciu expresie CYP1A1, prítomnosť mixu nemala na expresiu CYP1A1 žiadny významný vplyv. Mix cytokínov znižoval expresiu HRNR na asi pätinu negatívnej kontroly, pričom jeho kombinácia s FICZ-om či triptánmi nemala na zníženie žiadny vplyv. Pri expresii FLG, pridanie FICZ-u k mixu cytokínov spôsobilo nárast expresie FLG a naznačilo spoluprácu AhR na obnove jeho expresie. Ani jeden z triptánov na cytokínmi indukovaný pokles expresie FLG nemal žiadny vplyv. Pri expresii IVL bolo prekvapivé, že kombinácia mixu s FICZ-om štatisticky významne redukovala expresiu IVL viac ako samotný mix cytokínov. Jednotlivé triptány expresiu IVL znižovali a v ich kombinácii s cytokínmi dochádzalo k markantnému synergickému efektu – expresia IVL bola za prítomnosti triptánov a cytokínov naraz redukovaná viac ako pri cytokínoch zvlášť. Ani jednému z triptánov sa v rámci co-treatmentu nepodarilo obnoviť expresiu bariérových génov. Pre jednoznačnejšiu odpoveď či by vybrané triptány mohli obnovovať expresiu bariérových génov kože skrz aktiváciu AhR dráhy by možno bolo vhodné predĺžiť dobu inkubácie alebo pracovať s inou bunkovou líniou keratinocytov.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Actor, J. K. (2012). 2—Cells and Organs of the Immune System. V J. K. Actor (Ed.), *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology (Second Edition)* (s. 7–16). W.B. Saunders.
- Afonina, I. S., Tynan, G. A., Logue, S. E., Cullen, S. P., Bots, M., Lüthi, A. U., Reeves, E. P., McElvaney, N. G., Medema, J. P., Lavelle, E. C., & Martin, S. J. (2011). Granzyme B-Dependent Proteolysis Acts as a Switch to Enhance the Proinflammatory Activity of IL-1 $\alpha$ . *Molecular Cell*, *44*(2), 265–278.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, *3*(9), 745–756.
- Aggarwal, B. B., Henzel, W. J., Moffat, B., Kohr, W. J., & Harkins, R. N. (1985). Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(4), 2334–2344.
- Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., & Harkins, R. N. (1985). Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(4), 2345–2354.
- Aggarwal, B. B., Moffat, B., & Harkins, R. N. (1984). Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(1), 686–691.
- Ahmed, M. I., Salahy, E.-E., Fayed, S. T., El-Hefnawy, N. G., & Khalifa, A. (2001). Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: Relationship to spontaneous apoptosis and TNF- $\alpha$  1 Abbreviations: Cervical carcinoma (CC), Human papilloma virus (HPV), Tissue necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Normal cervical tissue (NCT), Squamous cell carcinoma (SCC), Adenocarcinoma (AC). *Clinical Biochemistry*, *34*(6), 491–498.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *4*(7), 499–511.
- Albanesi, C., Cavani, A., & Girolomoni, G. (1999). IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: Synergistic or antagonist effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *162*(1), 494–502.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, *4*(3), 329–334.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Helper T Cells and Lymphocyte Activation. V *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.
- Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(1), 32–41.

- Arend WP, Evans CH. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In: Thomson AW, Lotze MT, eds. *The Cytokine Handbook*, 4th edn. London, UK: Elsevier, 2003:669– 708
- Arend, W. P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(4), 323–340.
- Arend, W. P., Palmer, G., & Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*, 223(1), 20–38.
- Armstrong, S. C., & Cozza, K. L. (2002). Triptans. *Psychosomatics*, 43(6), 502–504.
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 361–371.
- Bank, I., DePinho, R. A., Brenner, M. B., Cassimeris, J., Alt, F. W., & Chess, L. (1986). A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature*, 322(6075), Article 6075
- Barker, J. N. W. N., Griffiths, C. E. M., Nickoloff, B. J., Mitra, R. S., Dixit, V. M., & Nickoloff, B. J. (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation. *The Lancet*, 337(8735), 211–214.
- Barland, C. O., Zettersten, E., Brown, B. S., Ye, J., Elias, P. M., & Ghadially, R. (2004). Imiquimod-induced interleukin-1 alpha stimulation improves barrier homeostasis in aged murine epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), 330–336.
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11(9), 372–377.
- Behzadi, P., García-Perdomo, H. A., & Karpiński, T. M. (2021). Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *Journal of Immunology Research*, 2021, 9914854.
- Bell, J. K., Mullen, G. E. D., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*, 24(10), 528–533.
- Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., Dignat-George, F., & Kaplanski, G. (2011). Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20684–20689.
- Beutler, B., & Rietschel, E. Th. (2003). Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 169–176.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., & Wiley, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329(6139), 512–518.
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Cantrell, M., Deeley, M. C., March, C. J., Prickett, K. S., Wignall, J., Conlon, P. J., Cosman, D., & Hopp, T. P. (1988). Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 263(19), 9437–9442.

- Bogaard, E. H. van den, Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., Vlijmen-Willems, I. M. J. J. van, Hato, S. V., Valk, P. G. M. van der, Schröder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L. J. M., & Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(2).
- Bochner, B. S., & Busse, W. W. (2005). Allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(5), 953–959.
- Bos, J. D., & Kapsenberg, M. L. (1986). The skin immune system Its cellular constituents and their interactions. *Immunology Today*, *7*(7), 235–240.
- Bos, J. D., Zonneveld, I., Das, P. K., Krieg, S. R., van der Loos, C. M., & Kapsenberg, M. L. (1987). The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *88*(5), 569–573.
- Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure (London, England: 1993)*, *19*(4), 447–459.
- Boyce, J. A., Friend, D., Matsumoto, R., Austen, K. F., & Owen, W. F. (1995). Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: Autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(1), 49–57.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(3), 539–549.
- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V. R., Zhang, H., Wang, T., Zheng, J., & Yan, J. (2011). Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Inflammation. *Immunity*, *35*(4), 596–610.
- Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M. R., Baron, R., Abutbul, S., Huszar, M., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Voronov, E. (2013). The Role of IL-1 $\beta$  in the Early Tumor Cell–Induced Angiogenic Response. *The Journal of Immunology*, *190*(7), 3500–3509
- Cibrian, D., Saiz, M. L., de la Fuente, H., Sánchez-Díaz, R., Moreno-Gonzalo, O., Jorge, I., Ferrarini, A., Vázquez, J., Punzón, C., Fresno, M., Vicente-Manzanares, M., Daudén, E., Fernández-Salguero, P. M., Martín, P., & Sánchez-Madrid, F. (2016). CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nature Immunology*, *17*(8), Article 8.
- Clancy, D. M., Sullivan, G. P., Moran, H. B. T., Henry, C. M., Reeves, E. P., McElvaney, N. G., Lavelle, E. C., & Martin, S. J. (2018). Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Reports*, *22*(11), 2937–2950.
- Clark, R. A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N. K., Yamanaka, K., Dowgiert, R. K., & Kupper, T. S. (2006). The Vast Majority of CLA<sup>+</sup> T Cells Are Resident in Normal Skin<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology*, *176*(7), 4431–4439.

- Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M. R., Voronov, E., Martin, M. U., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2010). Differential release of chromatin-bound IL-1 $\alpha$  discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(6), 2574–2579.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., & Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  for migration. *Immunology*, *92*(3), 388–395.
- de Guzman Strong, C., Conlan, S., Deming, C. B., Cheng, J., Sears, K. E., & Segre, J. A. (2010). A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: Implications for atopic dermatitis and psoriasis. *Human Molecular Genetics*, *19*(8), 1453–1460.
- Delneste, Y., Beauvillain, C., & Jeannin, P. (2007). [Innate immunity: Structure and function of TLRs]. *Medecine sciences*, *23*(1), 67–73.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. (2000). The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation. *Immunity*, *12*(4), 419–429.
- Di Meglio, P., Villanova, F., & Nestle, F. O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(8), a015354.
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 $\alpha$  and the inflammatory process. *Nature immunology*, *17*(8), 906–913.
- Dinarello, C. A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *8*(4), 253–265.
- Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*, *37*(S1), S34–S45.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, *27*(1), 519–550.
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, *117*(14), 3720–3732.
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, *281*(1), 8–27.
- Dunn, A. J. (2000). Cytokine activation of the HPA axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *917*, 608–617.
- Ehrlich, P. (1879). Beitrage zur Kenntnis der granulierten. Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol*, *3*, 166-169.
- Fernández-Gallego, N., Sánchez-Madrid, F., & Cibrián, D. (2021). Role of AHR Ligands in Skin Homeostasis and Cutaneous Inflammation. *Cells*, *10*(11), Article 11.

- Fernandez-Salguero, P. M., Ward, J. M., Sundberg, J. P., & Gonzalez, F. J. (1997). Lesions of Aryl-hydrocarbon Receptor-deficient Mice. *Veterinary Pathology*, *34*(6), 605–614.
- Ferrajoli, A., Keating, M. J., Manshouri, T., Giles, F. J., Dey, A., Estrov, Z., Koller, C. A., Kurzrock, R., Thomas, D. A., Faderl, S., Lerner, S., O'Brien, S., & Albitar, M. (2002). The clinical significance of tumor necrosis factor- $\alpha$  plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *100*(4), 1215–1219.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., & Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clinical and Experimental Immunology*, *147*(2), 227–235.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., & Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(6), 2593–2603.
- Foster, C. A., Yokozeki, H., Rappersberger, K., Koning, F., Volc-Platzer, B., Rieger, A., Coligan, J. E., Wolff, K., & Stingl, G. (1990). Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, *171*(4), 997–1013.
- Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., & Uchi, H. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Archives of Dermatological Research*, *306*(9), 769–779.
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*, *39*(6), 1003–1018.
- Gaur, U., & Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*, *66*(8), 1403–1408.
- Gay, N. J., & Keith, F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, *351*(6325), 355–356.
- Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(8), 546–558.
- Geherin, S. A., Fintushel, S. R., Lee, M. H., Wilson, R. P., Patel, R. T., Alt, C., Young, A. J., Hay, J. B., & Debes, G. F. (2012). The skin, a novel niche for recirculating B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *188*(12), 6027–6035.
- Gerdes, S., Mrowietz, U., & Boehncke, W.-H. (2016). Komorbidität bei Psoriasis vulgaris. *Der Hautarzt*, *67*(6), 438–444.
- Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunology*, *18*(5), 723–737.
- Gerster, J. F., Lindstrom, K. J., Miller, R. L., Tomai, M. A., Birmachu, W., Bomersine, S. N., Gibson, S. J., Imbertson, L. M., Jacobson, J. R., Knafla, R. T., Maye, P. V., Nikolaidis, N., Oneyemi, F. Y., Parkhurst, G. J., Pecore, S. E., Reiter, M. J., Scribner, L. S., Testerman, T. L., Thompson, N. J., ... Lupu, M. (2005).

- Synthesis and structure-activity-relationships of 1H-imidazo[4,5-c]quinolines that induce interferon production. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(10), 3481–3491.
- Gery, I., Gershon, R. K., & Waksman, B. H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens: I. The responding cell. *Journal of Experimental Medicine*, 136(1), 128–142. Scopus.
- Gilliet, M., & Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 20(4), 401–407.
- Griffiths, C. E. M., Barker, J. N. W. N., Kunkel, S., & Nickoloff, B. J. (1991). Modulation of leucocyte adhesion molecules, a T-cell chemotaxin (IL-8) and a regulatory cytokine (TNF- $\alpha$ ) in allergic contact dermatitis (rhus dermatitis). *British Journal of Dermatology*, 124(6), 519–526.
- Griffiths, C. E., & Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*, 370(9583), 263–271.
- Gutiérrez-Vázquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, 48(1), 19–33.
- Gutowska-Owsiak, D., Schaupp, A. L., Salimi, M., Selvakumar, T. A., McPherson, T., Taylor, S., & Ogg, G. S. (2012). IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Experimental Dermatology*, 21(2), 104–110.
- Guttman-Yassky, E., Waldman, A., Ahluwalia, J., Ong, P. Y., & Eichenfield, L. (2017). Atopic dermatitis: Pathogenesis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 36(3), 100–103.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269–279.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., & Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1526–1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), 196–200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–745.
- Hengge, U., Benninghoff, B., Ruzicka, T., & Goos, M. (2001). Topical immunomodulators—Progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 189–198.



- Henrick, B. M., Yao, X.-D., Zahoor, M. A., Abimiku, A., Osawe, S., & Rosenthal, K. L. (2019). TLR10 Senses HIV-1 Proteins and Significantly Enhances HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology*, *10*, 482.
- Hiz, P., Kanbur, E., Demir, N., Akalin, H., Cagan, E., Pashazadeh, M., Bal, S. H., Tezcan, G., Oral, H. B., & Budak, F. (2020). Roles of novel IL-1 family (IL-36, IL-37, and IL-38) members in chronic brucellosis. *Cytokine*, *135*, 155211.
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., & Kolodner, R. D. (2001). Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nature Genetics*, *29*(3), Article 3.
- Hübner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fässler, R., & Werner, S. (1996). DIFFERENTIAL REGULATION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING WOUND HEALING IN NORMAL AND GLUCOCORTICOID-TREATED MICE. *Cytokine*, *8*(7), 548–556.
- Hurwitz, D. J., Pincus, L., & Kupper, T. S. (2003). Imiquimod: A Topically Applied Link Between Innate and Acquired Immunity. *Archives of Dermatology*, *139*(10).
- Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R. F., Pan, G., Gurney, A. L., de Vos, A. M., & Starovasnik, M. A. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: Structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *The EMBO Journal*, *20*(19), 5332–5341.
- Cheuk, S., Wikén, M., Blomqvist, L., Nylén, S., Talme, T., Ståhle, M., & Eidsmo, L. (2014). Epidermal Th22 and Tc17 Cells Form a Localized Disease Memory in Clinically Healed Psoriasis. *The Journal of Immunology*, *192*(7), 3111–3120.
- Chiricozzi, A., & Krueger, J. G. (2013). IL-17 targeted therapies for psoriasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *22*(8), 993–1005.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., & Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, *125*(4), 725–732.
- Choi, M. R., Kim, H. D., Cho, S., Jeon, S. H., Kim, D. H., Wee, J., & Yang, Y. D. (2021). Anoctamin1 Induces Hyperproliferation of HaCaT Keratinocytes and Triggers Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Injury in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), Article 13.
- Christophers, E. (2001). Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clinical and Experimental Dermatology*, *26*(4), 314–320.
- Imhof, B. A., Jemelin, S., & Emre, Y. (2017). Toll-like receptors elicit different recruitment kinetics of monocytes and neutrophils in mouse acute inflammation. *European Journal of Immunology*, *47*(6), 1002–1008.
- Imiquimod*. (n.d.). Obdržané Jún 14, 2022, z <https://go.drugbank.com/drugs/DB00724>

*Imiquimod—Patient* / NIH. (n.d.). Obdržané Jún 7, 2022, z <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/drugs/imiquimod/patient>

Infante-Duarte, C., Horton, H. F., Byrne, M. C., & Kamradt, T. (2000). Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells1. *The Journal of Immunology*, *165*(11), 6107–6115.

Irvine, A. D., McLean, W. H. I., & Leung, D. Y. M. (2011). Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, *365*(14), 1315–1327.

Ishizaka, T., De Bernardo, R., Tomioka, H., Lichtenstein, L. M., & Ishizaka, K. (1972). Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *108*(4), 1000–1008.

Jameson, J. M., Sharp, L. L., Witherden, D. A., & Havran, W. L. (2004). Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *9*, 2640–2651.

Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*, 197–216.

Jin, N., Roark, C. L., Miyahara, N., Taube, C., Aydinug, M. K., Wands, J. M., Huang, Y., Hahn, Y.-S., Gelfand, E. W., O'Brien, R. L., & Born, W. K. (2009). Allergic Airway Hyperresponsiveness-Enhancing  $\gamma\delta$  T Cells Develop in Normal Untreated Mice and Fail to Produce IL-4/13, Unlike Th2 and NKT Cells1. *The Journal of Immunology*, *182*(4), 2002–2010.

Jobling, S. A., Auron, P. E., Gurka, G., Webb, A. C., McDonald, B., Rosenwasser, L. J., & Gehrke, L. (1988). Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 beta and subpeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(31), 16372–16378.

Johnston, A., Fritz, Y., Dawes, S. M., Diaconu, D., Al-Attar, P. M., Guzman, A. M., Chen, C. S., Fu, W., Gudjonsson, J. E., McCormick, T. S., & Ward, N. L. (2013). Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(5), 2252–2262.

Jordana, M., Särnstrand, B., Sime, P. J., & Ramis, I. (1994). Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *The European Respiratory Journal*, *7*(12), 2212–2222.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., & Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, *3*(6), 499–499.

Kadow, S., Jux, B., Zahner, S. P., Wingerath, B., Chmill, S., Clausen, B. E., Hengstler, J., & Esser, C. (2011). Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gammadelta T cells in the murine epidermis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *187*(6), 3104–3110.

Kang, M.-J., Jo, S.-G., Kim, D.-J., & Park, J.-H. (2017). NLRP3 inflammasome mediates interleukin-1 $\beta$  production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice. *Immunology*, *150*(4), 495–505.

- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3(3), 221–227.
- Karin, M., Yamamoto, Y., & Wang, Q. M. (2004). The IKK NF- $\kappa$ B system: A treasure trove for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(1), 17–26.
- Karlsen, J. R., Borregaard, N., & Cowland, J. B. (2010). Induction of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Expression by Co-stimulation with Interleukin-17 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Is Controlled by I $\kappa$ B- $\zeta$  but neither by C/EBP- $\beta$  nor C/EBP- $\delta^*$ . *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14088–14100.
- Kawaguchi, M., Kokubu, F., Matsukura, S., Ieki, K., Odaka, M., Watanabe, S., Suzuki, S., Adachi, M., & Huang, S.-K. (2003). Induction of C-X-C Chemokines, Growth-Related Oncogene  $\alpha$  Expression, and Epithelial Cell-Derived Neutrophil-Activating Protein-78 by ML-1 (Interleukin-17F) Involves Activation of Raf1-Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase-Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 1213–1220.
- Kawajiri, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2017). The aryl hydrocarbon receptor: A multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Experimental Animals*, 66(2), 75–89.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Kim, B., Lee, Y., Kim, E., Kwak, A., Ryoo, S., Bae, S., Azam, T., Kim, S., & Dinarello, C. (2013). The Interleukin-1 $\alpha$  Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Frontiers in Immunology*, 4.
- Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J.-I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., & Lee, J.-O. (2007). Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell*, 130(5), 906–917.
- Kim, H. O., Kim, J. H., Chung, B. Y., Choi, M. G., & Park, C. W. (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Experimental Dermatology*, 23(4), 278–281.
- Kim, Y.-S., Morgan, M. J., Choksi, S., & Liu, Z. (2007). TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Molecular Cell*, 26(5), 675–687.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J. J., & Matsushima, K. (1990). Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5548–5552.
- Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., & Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *Journal of Experimental Medicine*, 172(6), 1609–1614.
- Kondo, S., & Sauder, D. N. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF- $\alpha$ -induced skin inflammation. *European Journal of Immunology*, 27(7), 1713–1718.

- Kondo, T., & Ohshima, T. (1996). The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: A preliminary study for possible wound age determination. *International Journal of Legal Medicine*, 108(5), 231–236.
- Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2007). Interleukin-1 $\beta$ -Driven Inflammation Promotes the Development and Invasiveness of Chemical Carcinogen-Induced Tumors. *Cancer Research*, 67(3), 1062–1071.
- Kumar, A., Suryadevara, N., Hill, T. M., Bezbradica, J. S., Van Kaer, L., & Joyce, S. (2017). Natural Killer T Cells: An Ecological Evolutionary Developmental Biology Perspective. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Kurt-Jones, E. A., Beller, D. I., Mizel, S. B., & Unanue, E. R. (1985). Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(4), 1204–1208.
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 2(3), 98–108.
- Laffleur, B., Debeauvais, O., Dalloul, Z., & Cogné, M. (2017). B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory. *Frontiers in Immunology*, 8, 1277.
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2008). Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infectious Disorders Drug Targets*, 8(3), 144–155.
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M. G., van Baarsen, L., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(2), 331–341.
- Lee, J., Ho, W.-H., Maruoka, M., Corpuz, R. T., Baldwin, D. T., Foster, J. S., Goddard, A. D., Yansura, D. G., Vandlen, R. L., Wood, W. I., & Gurney, A. L. (2001). IL-17E, a Novel Proinflammatory Ligand for the IL-17 Receptor Homolog IL-17Rh1 \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1660–1664.
- Leech, J. M., Dhariwala, M. O., Lowe, M. M., Chu, K., Merana, G. R., Cornuot, C., Weckel, A., Ma, J. M., Leitner, E. G., Gonzalez, J. R., Vasquez, K. S., Diep, B. A., & Scharschmidt, T. C. (2019). Toxin-Triggered Interleukin-1 Receptor Signaling Enables Early-Life Discrimination of Pathogenic versus Commensal Skin Bacteria. *Cell Host & Microbe*, 26(6), 795-809.e5.
- Leichner, T., & Kambayashi, T. (2014). White Blood Cells and Lymphoid Tissue. V *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86(6), 973–983.
- Li, H., Chen, J., Huang, A., Stinson, J., Heldens, S., Foster, J., Dowd, P., Gurney, A. L., & Wood, W. I. (2000). Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 773–778.

- Li, Q., Li, L., Shi, W., Jiang, X., Xu, Y., Gong, F., Zhou, M., Edwards, C. K., & Li, Z. (2006). Mechanism of action differences in the antitumor effects of transmembrane and secretory tumor necrosis factor- $\alpha$  in vitro and in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(12), 1470–1479.
- Liang, S. C., Long, A. J., Bennett, F., Whitters, M. J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S. J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C. M. M., Wright, J. F., & Fouser, L. A. (2007). An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(11), 7791–7799.
- Liang, S. C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., & Fouser, L. A. (2006a). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), 2271–2279.
- Lin, Y., Choksi, S., Shen, H.-M., Yang, Q.-F., Hur, G. M., Kim, Y. S., Tran, J. H., Nedospasov, S. A., & Liu, Z. (2004). Tumor Necrosis Factor-induced Nonapoptotic Cell Death Requires Receptor-interacting Protein-mediated Cellular Reactive Oxygen Species Accumulation \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10822–10828.
- Liu, C., Qian, W., Qian, Y., Giltiay, N. V., Lu, Y., Misra, S., Deng, L., Chen, Z. J., & Li, X. (2009). Act1, a novel U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17R-mediated signalling. *Science signaling*, 2(92), ra63.
- Loertscher, J. A., Sattler, C. A., & Allen-Hoffmann, B. L. (2001). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the differentiation pattern of human keratinocytes in organotypic culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175(2), 121–129.
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195.
- Luheshi, N., Rothwell, N., & Brough, D. (2009). Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: Implications for anti-interleukin-1 therapy. *British Journal of Pharmacology*, 157(8), 1318–1329.
- Macleod, T., Berekmeri, A., Bridgewood, C., Stacey, M., McGonagle, D., & Wittmann, M. (2021). The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier. *Frontiers in Immunology*, 12, 808012.
- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*, 50(4), 778–795.
- Mao, L., Kitani, A., Strober, W., & Fuss, I. J. (2018). The Role of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Martin, B. A., Chalmers, R. J. G., & Telfer, N. R. (1996). How Great Is the Risk of Further Psoriasis Following a Single Episode of Acute Guttate Psoriasis? *Archives of Dermatology*, 132(6), 717–718.
- Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B., & Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing  $\gamma\delta$  T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*, 31(2), 321–330.

- Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., & Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 8, 124.
- Mattei, S., Colombo, M. P., Melani, C., Silvani, A., Parmiani, G., & Herlyn, M. (1994). Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *International Journal of Cancer*, 56(6), 853–857.
- McAllister, F., Henry, A., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Ulrich, L., Steele, C., Finder, J. D., Pilewski, J. M., Carreno, B. M., Goldman, S. J., Pirhonen, J., & Kolls, J. K. (2005). Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 Receptor in Regulating Growth-Related Oncogene- $\alpha$  and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Bronchial Epithelium: Implications for Airway Inflammation in Cystic Fibrosis 1. *The Journal of Immunology*, 175(1), 404–412.
- McLean, W. H. I., & Irvine, A. D. (2013). Old King coal—Molecular mechanisms underlying an ancient treatment for atopic eczema. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 551–553.
- Mescher, M., Tigges, J., Rolfes, K. M., Shen, A. L., Yee, J. S., Vogeley, C., Krutmann, J., Bradfield, C. A., Lang, D., & Haarmann-Stemann, T. (2019). The Toll-like receptor agonist imiquimod is metabolized by aryl hydrocarbon receptor-regulated cytochrome P450 enzymes in human keratinocytes and mouse liver. *Archives of Toxicology*, 93(7), 1917–1926.
- Micali, G., Verzi, A. E., Giuffrida, G., Panebianco, E., Musumeci, M. L., & Lacarrubba, F. (2019). Inverse Psoriasis: From Diagnosis to Current Treatment Options. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 953–959.
- Mocchegiani, E., & Malavolta, M. (2004). NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell*, 3(4), 177–184.
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), R488–R493.
- Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L., & Reddi, A. H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(2), 155–174.
- Moss, P. A. H., Rosenberg, W. M. C., & Bell, J. I. (1992). The Human T Cell Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 10(1), 71–96.
- Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., Minegishi, Y., Yonekawa, H., & Karasuyama, H. (2005). Basophils Play a Critical Role in the Development of IgE-Mediated Chronic Allergic Inflammation Independently of T Cells and Mast Cells. *Immunity*, 23(2), 191–202.
- Navarini, A. a., Burden, A. d., Capon, F., Mrowietz, U., Puig, L., Köks, S., Kingo, K., Smith, C., Barker, J. n., & Network, the E. (2017). European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(11), 1792–1799.

- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(10), 679–691.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., & Barker, J. (2009). Mechanisms of Disease: Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 496–509.
- Nickoloff, B. J., & Turka, L. A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: New insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology Today*, 15(10), 464–469.
- Nicolas, S., & Nicolas, D. (2023). Triptans. V *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Nielsen, M. M., Witherden, D. A., & Havran, W. L. (2017).  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nature Reviews Immunology*, 17(12), Article 12.
- Nogales, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(6), 1244-1252.e2.
- Novatchkova, M., Leibbrandt, A., Werzowa, J., Neubüser, A., & Eisenhaber, F. (2003). The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 226–229.
- Numasaki, M., Takahashi, H., Tomioka, Y., & Sasaki, H. (2004). Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunology Letters*, 95(1), 97–104.
- Numasaki, M., Tomioka, Y., Takahashi, H., & Sasaki, H. (2004). IL-17 and IL-17F modulate GM-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunology Letters*, 95(2), 175–184.
- O’Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 7(5), 353–364.
- O’Shea, J. J., & Paul, W. E. (2010). Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4<sup>+</sup> T Cells. *Science*, 327(5969), 1098–1102.
- Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, Karasuyama H. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):913-20. doi: 10.1182/blood-2007-01-068718. Epub 2007 Apr 4. PMID: 17409268.
- Oda, N., Canelos, P. B., Essayan, D. M., Plunkett, B. A., Myers, A. C., & Huang, S.-K. (2005). Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(1), 12–18.

- Oeff, M. K., Seltmann, H., Hakiy, N., Bogdanoff, B., Nastos, A., Walters, R., ... & Zouboulis, C. C. (2002, September). Toll-like receptor 2 and 4-dependent regulation of inflammatory signaling in human sebocytes. In *JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* (Vol. 119, No. 3, pp. 736-736). 350 MAIN ST, MALDEN, MA 02148 USA: BLACKWELL PUBLISHING INC.
- Ogilvie, A. C., Hack, C. E., Wagstaff, J., van Mierlo, G. J., Erenberg, A. J., Thomsen, L. L., Hoekman, K., & Rankin, E. M. (1996). IL-1 beta does not cause neutrophil degranulation but does lead to IL-6, IL-8, and nitrite/nitrate release when used in patients with cancer. *The Journal of Immunology*, *156*(1), 389–394.
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., & Hedrick, C. C. (2019). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, *106*(2), 309–322.
- Owens, Bridson, Smith, Myers, Fox & Wells, (1998). Percutaneous penetration of Aldara cream, 5% during the topical treatment of genital and perianal warts. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, *5*(4), 151.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, *6*(11), 1133–1141.
- Park, H.-Y., & Yaar, M. (2012). Chapter 72. Biology of Melanocytes. In L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. A. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell, & K. Wolff (Eds.), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (8th ed.). The McGraw-Hill Companies.
- Peng, T., Chanthaphavong, R. S., Sun, S., Trigilio, J. A., Phasouk, K., Jin, L., Layton, E. D., Li, A. Z., Correnti, C. E., De van der Schueren, W., Vazquez, J., O'Day, D. R., Glass, I. A., Knipe, D. M., Wald, A., Corey, L., & Zhu, J. (2017). Keratinocytes produce IL-17c to protect peripheral nervous systems during human HSV-2 reactivation. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(8), 2315–2329.
- Perry, C. M., & Lamb, H. M. (1999). Topical Imiquimod. *Drugs*, *58*(2), 375–390.
- Pietka, W., Khnykin, D., Bertelsen, V., Lossius, A. H., Stav-Noraas, T. E., Hol Fosse, J., Galtung, H. K., Haraldsen, G., & Sundnes, O. (2019). Hypo-osmotic Stress Drives IL-33 Production in Human Keratinocytes—An Epidermal Homeostatic Response. *Journal of Investigative Dermatology*, *139*(1), 81–90.
- Pober, J. S., & Cotran, R. S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological Reviews*, *70*(2), 427–451.
- PubChem. (n.d.). *Hazardous Substances Data Bank (HSDB): 8129*. Cit 7. jún 2022, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/8129>
- PubChem. (n.d.). *Imiquimod*. Obdržané 7 Jún , 2022, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/57469>
- PubChem. (n.d.-a). *Almotriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/123606>
- PubChem. (n.d.-b). *Avitriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/133081>
- PubChem. (n.d.-c). *Donitriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/197706>



PubChem. (n.d.-d). *Eletriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77993>

PubChem. (n.d.-e). *Frovatriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77992>

PubChem. (n.d.-f). *Naratriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4440>

PubChem. (n.d.-g). *Rizatriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5078>

PubChem. (n.d.-h). *Sumatriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5358>

PubChem. (n.d.-i). *Zolmitriptan*. Cit 28. júl 2023, z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60857>

Qian, Y., Liu, C., Hartupée, J., Altuntas, C. Z., Gulen, M. F., Jane-wit, D., Xiao, J., Lu, Y., Giltiay, N., Liu, J., Kordula, T., Zhang, Q.-W., Vallance, B., Swaidani, S., Aronica, M., Tuohy, V. K., Hamilton, T., & Li, X. (2007). The adaptor Act1 is required for interleukin 17–dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*, 8(3), 247–256.

Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 10.1128/cmr.00034-18.

Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., & Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453(7191), 65–71.

Rachitskaya, A. V., Hansen, A. M., Horai, R., Li, Z., Villasmil, R., Luger, D., Nussenblatt, R. B., & Caspi, R. R. (2008). Cutting Edge: NKT Cells Constitutively Express IL-23 Receptor and ROR $\gamma$ t and Rapidly Produce IL-17 upon Receptor Ligation in an IL-6-Independent Fashion. *The Journal of Immunology*, 180(8), 5167–5171.

Rauschmayr, T., Groves, R. W., & Kupper, T. S. (1997). Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5814–5819.

Reiter, M. J., Testerman, T. L., Miller, R. L., Weeks, C. E., & Tomai, M. A. (1994). Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(2), 234–240.

Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), Article 6.

Ricote, M., García-Tuñón, I., Bethencourt, F. R., Fraile, B., Paniagua, R., & Royuela, M. (2004). Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer*, 100(7), 1388–1396.

Riol-Blanco, L., Ordovas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriot, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J. N., & von Andrian, U. H. (2014). Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*, 510(7503), Article 7503.

- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., & Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(27), 9577–9582.
- Rodriguez, R. S., Pauli, M. L., Neuhaus, I. M., Yu, S. S., Arron, S. T., Harris, H. W., Yang, S. H.-Y., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Krow-Lucal, E., MacKenzie, T. C., Johnson, D. S., Meyer, E. H., Löhr, A., Hsu, A., Koo, J., Liao, W., Gupta, R., Debbaneh, M. G., ... Rosenblum, M. D. (2014). Memory regulatory T cells reside in human skin. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(3), 1027–1036.
- Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*, *238*(2), 67–75.
- Rosenberg, H. F., Phipps, S., & Foster, P. S. (2007). Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(6), 1303–1310; quiz 1311–1312.
- Rothwarf, D. M., & Karin, M. (1999). The NF- $\kappa$ B Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus. *Science's STKE*, *1999*(5).
- Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattéi, M. G., Denizot, F., & Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *The Journal of Immunology*, *150*(12), 5445–5456.
- Safe, S., Han, H., Goldsby, J., Mohankumar, K., & Chapkin, R. S. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands as Selective AhR Modulators: Genomic Studies. *Current opinion in toxicology*, *11–12*, 10–20.
- Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., & Miyake, K. (2004). Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*, *16*(7), 961–969.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, *6*(4), 345–352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, *155*(3), 1151–1164.
- Salcedo, R., Cataisson, C., Hasan, U., Yuspa, S. H., & Trinchieri, G. (2013). MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends in Immunology*, *34*(8), 379–389.
- Sawada, Y., Saito-Sasaki, N., Mashima, E., & Nakamura, M. (2021). Daily Lifestyle and Inflammatory Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(10), 5204.
- Seltmann, J., Roesner, L. M., Hesler, F.-W. von, Wittmann, M., & Werfel, T. (2015). IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(6), 1659-1661.e4.

- Seo, M.-D., Kang, T. J., Lee, C. H., Lee, A.-Y., & Noh, M. (2012). HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomolecules & Therapeutics*, 20(2), 171–176.
- Shi, V. Y., Leo, M., Hassoun, L., Chahal, D. S., Maibach, H. I., & Sivamani, R. K. (2015). Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73(5), 856–863.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., & Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today*, 13(3), 106–112.
- Schön, M. P., & Schön, M. (2004). Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis*, 9(3), 291–298.
- Schön, M. P., Schön, M., & Klotz, K.-N. (2006). The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(6), 1338–1347.
- Schön, M. P., Wienrich, B. G., Drewniok, C., Bong, A. B., Eberle, J., Geilen, C. C., Gollnick, H., & Schön, M. (2004). Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(5), 1266–1276.
- Schwandner, R., Yamaguchi, K., & Cao, Z. (2000). Requirement of Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Factor (Traf)6 in Interleukin 17 Signal Transduction. *Journal of Experimental Medicine*, 191(7), 1233–1240.
- Sims, J., Towne, J., & Blumberg, H. (2006). 11 IL-1 family members in inflammatory skin disease. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 56, 187–191.
- Singh, N. P., Singh, U. P., Singh, B., Price, R. L., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2011). Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PloS One*, 6(8), e23522.
- Singh, R. K., Lee, K. M., Ucmak, D., Brodsky, M., Atanelov, Z., Farahnik, B., Abrouk, M., Nakamura, M., Zhu, T. H., & Liao, W. (2016). Erythrodermic psoriasis: Pathophysiology and current treatment perspectives. *Psoriasis: Targets and Therapy*, 6, 93–104.
- Smith, R. J., Bowman, B. J., & Speziale, S. C. (1986). Interleukin-1 stimulates granule exocytosis from human neutrophils. *International Journal of Immunopharmacology*, 8(1), 33–40.
- Smith, S. H., Jayawickreme, C., Rickard, D. J., Nicodeme, E., Bui, T., Simmons, C., Coquery, C. M., Neil, J., Pryor, W. M., Mayhew, D., Rajpal, D. K., Creech, K., Furst, S., Lee, J., Wu, D., Rastinejad, F., Willson, T. M., Viviani, F., Morris, D. C., ... Cote-Sierra, J. (2017). Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(10), 2110–2119.

- Soria, I., Myhre, P., Horton, V., Ellefson, P., McCarville, S., Schmitt, K., & Owens, M. (2000). Effect of food on the pharmacokinetics and bioavailability of oral imiquimod relative to a subcutaneous dose. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *38*(10), 476–481.
- Spergel, J. M., & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *112*(6, Supplement), S118–S127.
- Stanley, M. A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: Mechanism of action and therapeutic potential. *Clinical and Experimental Dermatology*, *27*(7), 571–577.
- Starnes, T., Broxmeyer, H. E., Robertson, M. J., & Hromas, R. (2002). Cutting Edge: IL-17D, a Novel Member of the IL-17 Family, Stimulates Cytokine Production and Inhibits Hemopoiesis. *The Journal of Immunology*, *169*(2), 642–646.
- Stevenson, F. T., Torrano, F., Locksley, R. M., & Lovett, D. H. (1992). Interleukin 1: The patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, *152*(2), 223–231.
- Stone, K. D., Prussin, C., & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S73–S80.
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. V S. Sattler & T. Kennedy-Lydon (Ed.), *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology* (s. 71–91). Springer International Publishing.
- Sumpio, B. E., Timothy Riley, J., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: Endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *34*(12), 1508–1512.
- Sutter, C. H., Bodreddigari, S., Champion, C., Wible, R. S., & Sutter, T. R. (2011). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the expression of genes in the human epidermal differentiation complex and accelerates epidermal barrier formation. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *124*(1), 128–137.
- Sutter, T. R., Guzman, K., Dold, K. M., & Greenlee, W. F. (1991). Targets for dioxin: Genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5030), 415–418.
- Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C., & Mills, K. H. G. (2009). Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from  $\gamma\delta$  T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*, *31*(2), 331–341.
- Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G. M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M. A., Miller, R. L., & Sauder, D. N. (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, *114*(1), 135–141.
- Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(2), 652–656.

- Szlosarek, P. W., Grimshaw, M. J., Kulbe, H., Wilson, J. L., Wilbanks, G. D., Burke, F., & Balkwill, F. R. (2006). Expression and regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  in normal and malignant ovarian epithelium. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(2), 382–390.
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14.
- Takeda, K., Kaisho, T., & Akira, S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 335–376.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820.
- Tanaka, Y., Uchi, H., Hashimoto-Hachiya, A., & Furue, M. (2018). Tryptophan Photoproduct FICZ Upregulates IL1A, IL1B, and IL6 Expression via Oxidative Stress in Keratinocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, e9298052.
- Tardif, F., Ross, G., & Rouabhia, M. (2004). Gingival and dermal fibroblasts produce interleukin-1 $\beta$  converting enzyme and interleukin-1 $\beta$  but not interleukin-18 even after stimulation with lipopolysaccharide. *Journal of Cellular Physiology*, 198(1), 125–132.
- Tauchi, M., Hida, A., Negishi, T., Katsuoka, F., Noda, S., Mimura, J., Hosoya, T., Yanaka, A., Aburatani, H., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2005). Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9360–9368.
- Telò, I., Favero, E. D., Cantù, L., Frattini, N., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., Sonvico, F., & Nicoli, S. (2017). Gel-like TPGS-Based Microemulsions for Imiquimod Dermal Delivery: Role of Mesostructure on the Uptake and Distribution into the Skin. *Molecular Pharmaceutics*, 14(10), 3281–3289.
- Tewari, A., Starnes, H. F., & Buhles, W. C. (1990). Preliminary report: Effects of interleukin-1 on platelet counts. *The Lancet*, 336(8717), 712–714.
- Thody, A. J., & Shuster, S. (1989). Control and function of sebaceous glands. *Physiological Reviews*, 69(2), 383–416.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J.-F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjuco, G., Palyha, O. C., ... Tocci, M. J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768–774.
- Thyssen, J. P., & Kezic, S. (2014). Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), 792–799.
- Tohyama, M., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Dai, X., Shiraishi, K., Murakami, M., Miyawaki, S., Mori, H., Utsunomiya, R., Masuda, K., Hashimoto, K., & Sayama, K. (2018). Bcl-3 induced by IL-22 via STAT3

activation acts as a potentiator of psoriasis-related gene expression in epidermal keratinocytes. *European Journal of Immunology*, 48(1), 168–179.

Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Bos, T. V., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., & Peschon, J. (2006). Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex. *The Journal of Immunology*, 177(1), 36–39.

Trapani, J. A. (1995). Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 25(6), 793–799.

Trofimenková D. (2021): Modulácia expresie bariérových génov v kožných bunkách triptánmi. Bakalárska práca. Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Uematsu, S., & Akira, S. (2009). Immune responses of TLR5(+) lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection. *Journal of Gastroenterology*, 44(8), 803–811.

Urosevic, M., Dummer, R., Conrad, C., Beyeler, M., Laine, E., Burg, G., & Gilliet, M. (2005). Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid predendritic cells following imiquimod treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(15), 1143–1153.

van den Bogaard, E. H., Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Hato, S. V., van der Valk, P. G. M., Schröder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L. J. M., & Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 917–927.

van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Floencia, E., Prens, E. P., & Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis1. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5836–5845.

Van Furth, R. (1992). Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. V R. Van Furth (Ed.), *Mononuclear Phagocytes* (s. 3–12). Springer Netherlands.

Varma, S. R., Sivaprakasam, T. O., Mishra, A., Prabhu, S., M, R., & P, R. (2017). Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin. *European Journal of Pharmacology*, 813, 33–41.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453(7191), Article 7191.

Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2010). Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science*, 328(5975), 228–231.

- Von Boehmer, H. (1997). Aspects of lymphocyte developmental biology. *Immunology Today*, 18(6), 260–262.
- Vu, Y. H., Hashimoto-Hachiya, A., Takemura, M., Yumine, A., Mitamura, Y., Nakahara, T., Furue, M., & Tsuji, G. (2020). IL-24 Negatively Regulates Keratinocyte Differentiation Induced by Tapinarof, an Aryl Hydrocarbon Receptor Modulator: Implication in the Treatment of Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9412.
- Vyhřídálová, B., Krasulová, K., Pečínková, P., Poulíková, K., Vrzal, R., Andrysík, Z., Chandran, A., Mani, S., & Dvorak, Z. (2020). Antimigraine Drug Avitriptan Is a Ligand and Agonist of Human Aryl Hydrocarbon Receptor that Induces CYP1A1 in Hepatic and Intestinal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2799.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45–65 (2003).
- WANG, X., & LIN, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta pharmacologica Sinica*, 29(11), 1275–1288.
- Wang, Y., Abel, K., Lantz, K., Krieg, A. M., McChesney, M. B., & Miller, C. J. (2005). The Toll-Like Receptor 7 (TLR7) Agonist, Imiquimod, and the TLR9 Agonist, CpG ODN, Induce Antiviral Cytokines and Chemokines but Do Not Prevent Vaginal Transmission of Simian Immunodeficiency Virus When Applied Intravaginally to Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 79(22), 14355–14370.
- Watanabe, H., Gaide, O., Pétrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., Kummer, J. A., Tschopp, J., & French, L. E. (2007). Activation of the IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8), 1956–1963.
- Weeks, C. E., & Gibson, S. J. (1994). Induction of Interferon and Other Cytokines by Imiquimod and Its Hydroxylated Metabolite R-842 in Human Blood Cells *In Vitro*. *Journal of Interferon Research*, 14(2), 81–85.
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.-K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2004). The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2434–2439.
- Werner, S., Krieg, T., & Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998–1008.
- Wincent, E., Bengtsson, J., Bardbori, A. M., Alsberg, T., Luecke, S., Rannug, U., & Rannug, A. (2012). Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4479–4484.

- Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., Sabat, R., & Wolk, K. (2010). Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5), 365–379.
- Wu, L., Chen, X., Zhao, J., Martin, B., Zepp, J. A., Ko, J. S., Gu, C., Cai, G., Ouyang, W., Sen, G., Stark, G. R., Su, B., Vines, C. M., Tournier, C., Hamilton, T. A., Vidimos, A., Gastman, B., Liu, C., & Li, X. (2015). A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4–ERK5 axis. *Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1571–1587.
- Wu, N.-L., Huang, D.-Y., Tsou, H.-N., Lin, Y.-C., & Lin, W.-W. (2015). Syk Mediates IL-17-Induced CCL20 Expression by Targeting Act1-Dependent K63-Linked Ubiquitination of TRAF6. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(2), 490–498.
- Yang, D., Han, Z., & Oppenheim, J. J. (2017). ALARMINS AND IMMUNITY. *Immunological reviews*, 280(1), 41–56.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., & Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nature Immunology*, 2(7), Article 7.
- Yao, C., Oh, J.-H., Lee, D. H., Bae, J.-S., Jin, C. L., Park, C.-H., & Chung, J. H. (2015). Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(5), 1443–1450.
- Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A.-M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., & Spriggs, M. K. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3(6), 811–821.
- Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., & Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(12), 5483–5486.
- Yao, Z., Spriggs, M. K., Derry, J. M. J., Strockbine, L., Park, L. S., VandenBos, T., Zappone, J., Painter, S. L., & Armitage, R. J. (1997). MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE HUMAN INTERLEUKIN (II)-17 RECEPTOR. *Cytokine*, 9(11), 794–800.
- Yao, Z., Timour, M., Painter, S., Fanslow, W., & Spriggs, M. (1996). Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene. *Gene*, 168(2), 223–225.
- Yong, L. C. J. (1997). The mast cell: Origin, morphology, distribution, and function. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49(6), 409–424.
- Yoshiki, R., Kabashima, K., Honda, T., Nakamizo, S., Sawada, Y., Sugita, K., Yoshioka, H., Ohmori, S., Malissen, B., Tokura, Y., & Nakamura, M. (2014). IL-23 from Langerhans Cells Is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17A-Producing  $\gamma\delta$  T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 1912–1921.



Yost, J., & Gudjonsson, J. E. (2009). The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy: New implications for associated comorbidities. *F1000 Medicine Reports, 1*.

Yu, N., Zhang, S., Zuo, F., Kang, K., Guan, M., & Xiang, L. (2009). Cultured human melanocytes express functional Toll-like receptors 2–4, 7 and 9. *Journal of Dermatological Science, 56*(2), 113–120.

Zaid, A., Mackay, L. K., Rahimpour, A., Braun, A., Veldhoen, M., Carbone, F. R., Manton, J. H., Heath, W. R., & Mueller, S. N. (2014). Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111*(14), 5307–5312.

Zarembek, K. A., & Godowski, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 168*(2), 554–561.