

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



Bc. Eva TINKOVÁ

**Ovlivnění procesů v kůži přírodními látkami**

*Diplomová práce*

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie N1407

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.

Olomouc 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, dne 3.5.2017

.....  
Eva Tinková

### **Poděkování:**

Touto cestou bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři a při zpracování předkládané diplomové práce. Děkuji také doc. Ing. Aleně Rajnochové Svobodové, Ph.D. za odborné rady a pomoc při práci s buňkami. Poděkování patří i Mgr. Pavlu Kosinovi, Ph.D. za provedenou HPLC analýzu silymarinu. Děkuji celému kolektivu Ústavu lékařské chemie a biochemie za poskytnutí příjemného pracovního prostředí. Děkuji také za finanční podporu grantu GA CR 15-10897S, IGA\_LF\_2017\_011 a za Institucionální podporu Univerzity Palackého v Olomouci RVO 61989592.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Eva Tinková  
Název práce: Ovlivnění procesů v kůži přírodními látkami  
Typ práce: Diplomová  
Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty  
Univerzity Palackého, Olomouc  
Školitel: doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt: Kůže je ovlivňována celou řadou vnějších faktorů, především slunečním zářením, které při opakované expozici vyvolává typické změny předčasného stárnutí kůže (photoaging). Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vybrané flavonoidy (apigenin, baikalein, kaempferol, kvercetin, naringenin, taxifolin), silymarin (extrakt ze semen *Silybum marianum*) a v něm obsažené flavonolignany (silybin, dehydrosilybin, silychristin, silydianin, isosilybin) mohou ovlivnit aktivitu vybraných enzymů (elastasy, kolagenasy, hyaluronidasy a tyrosinasy), aktivovaných při předčasném stárnutí kůže. Největší vliv na elastasu a kolagenasu byl pozorován u kvercetinu, dehydrosilybinu a silymarinu. Tyrosinasa byla aktivována všemi flavonoidy, nejúčinnější byly kaempferol, apigenin, baikalein a naringenin. Efekt flavonolignanů a silymarinu na aktivitu tyrosinasy byl minimální. Aktivita hyaluronidasy nebyla ovlivněna žádnou z testovaných látek. U silymarinu a flavonolignanů byl dále studován vliv na hladinu karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech po působení UVA záření. Silymarin a flavonolignany snižovaly hladinu karbonylovaných proteinů nejen v buňkách ozářených, ale i neozářených. Nejvýraznější efekt byl pozorován u dehydrosilybinu a silymarinu. U dehydrosilybinu byl však se vzrůstající koncentrací pozorován pokles ochranného účinku, což souvisí s jeho prooxidační aktivitou. Studované flavonoidy, ale i flavonolignany a silymarin mají příznivý efekt na kůži a mohly by se využít v přípravcích určených ke zpomalování procesu stárnutí kůže.

Klíčová slova: kůže, předčasné stárnutí, UVA záření, flavonoidy, silymarin, flavonolignany, elastasa, kolagenasa, hyaluronidasa, tyrosinasa, karbonylované proteiny, primární lidské dermální fibroblasty

Počet stran: 88  
Počet příloh: 0  
Jazyk: čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Eva Tinková  
Title: Effect of natural substances on processes in the skin  
Type of thesis: Master  
Department: Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc  
Supervisor: doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D.  
The year of presentation: 2017

Abstract: The skin is affected by various exogenous factors, especially solar radiation, which at repeated exposures causes typical changes of skin aging (photoaging). The aim of this diploma thesis was to find out whether selected flavonoids (apigenin, baicalein, kaempferol, quercetin, naringenin, taxifolin), silymarin (extract from seeds of *Silybum marianum*) and its flavonolignans (silybin, dehydrosilybin, silychristin, silydianin, isosilybin) can influence the activity of selected enzymes (elastase, collagenase, hyaluronidase and tyrosinase), which are activated in photoaging of skin. The most potent inhibitors of elastase and collagenase were quercetin, dehydrosilybin and silymarin. All studied flavonoids activated tyrosinase. The most effective activators were kaempferol, apigenin, baicalein and naringenin. The effect of flavonolignans on tyrosinase was negligible. The activity of hyaluronidase was affected by none of the test substances. Further protective effect of silymarin and flavonolignans on the level of carbonylated proteins was studied in human skin fibroblasts after exposure to UVA radiation. Silymarin and flavonolignans diminished the level of carbonylated proteins not only in irradiated cells, but also in nonirradiated ones. Dehydrosilybin and silymarin were the most effective. However, the decrease in protective effect of dehydrosilybin with its increasing concentration was observed which may be associated with its pro-oxidant activity. Flavonoids, silymarin and flavonolignans have beneficial effects on the skin and may be used in preparations that contribute to slowing down of skin photoaging.

Keywords: skin, photoaging, UVA radiation, flavonoids, silymarin, flavonolignans, elastase, collagenase, hyaluronidase, tyrosinase, carbonylated proteins, primary human dermal fibroblasts  
Number of pages: 88  
Number of appendixes: 0  
Language: Czech

## Seznam použitých zkratek

AP-1	aktivační protein 1
API	apigenin
BA	baicalein
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
DMAB	4-(dimethylamino)benzaldehyd
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPA	3,4-dihydroxy-L-fenylalanin
DS	dehydrosilybin
EGF	epiteliální růstový faktor
EGTA	ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FE	1,10 – fenantrolin monohydrát
FTC	fluorescein thiosemikarbazid
HA	kyselina hyaluronová
HCl	kyselina chlorovodíková
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
CH <sub>3</sub> COOH	kyselina octová
IČ	infračervené záření
IL-1	interleukin-1
IS	isosilybin
KA	kaempferol
KBO <sub>2</sub>	boritan draselný

KCl	chlorid draselný
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	dihydrogenfosforečnan draselný
KK	kojová kyselina
KO	oleanolová kyselina
KV	kvercetin
MAPK	mitogeny-aktivované proteinové kinasy
MMP	matrixové metaloproteinasy
NA	naringenin
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
NaCl	chlorid sodný
NaF	fluorid sodný
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	vanadičnan sodný
PBS	fosfátový pufr
ROS	reaktivní formy kyslíku
SATMH	hydrát aurothiomalátu sodného
SB	silybinin
SD	silydianin
SCH	silychristin
SM	silymarin
TA	taxifolin
TCA	trichloroctová kyselina
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	6
1. Úvod .....	11
2. Cíle práce .....	12
3. Teoretická část .....	13
3.1. Lidská kůže.....	13
3.1.1. Pokožka .....	14
3.1.2. Škára.....	16
3.1.3. Podkožní vazivo .....	16
3.2. UV záření .....	17
3.2.1. UVC záření .....	17
3.2.2. UVB záření .....	18
3.2.3. UVA záření.....	19
3.3. Účinky UV záření na kůži .....	19
3.3.1. Akutní změny kůže po expozici UV záření.....	20
3.3.1.1. Solární erytém.....	20
3.3.1.2. Pigmentace.....	20
3.3.1.3. Fotodermatózy .....	21
3.3.1.3.1. Fotodermatózy vyvolané vnějšími faktory.....	21
3.3.1.3.2. Fotodermatózy spojené s poruchou opravy DNA.....	23
3.3.1.4. Fotoimunosuprese .....	23
3.3.2. Chronické změny kůže po expozici UV záření .....	24
3.3.2.1. Předčasné stárnutí kůže .....	24
3.3.2.1.1. Enzymy ovlivňující děje spojené s předčasným stárnutím kůže ..	26
3.3.2.1.1.1. Elastasa .....	27
3.3.2.1.1.2. Kolagenasa.....	28
3.3.2.1.1.3. Hyaluronidasa .....	29
3.3.2.1.1.4. Tyrosinasa.....	30
3.3.2.2. Fotokancerogeneze.....	32
3.4. Polyfenolové látky .....	34
3.4.1. Flavonoidy .....	35
3.4.2. Silymarin a jeho flavonoligany.....	38



4.	Experimentální část .....	40
4.1.	Materiál, chemikálie, roztoky, přístroje a vybavení .....	40
4.1.1.	Biologický materiál .....	40
4.1.2.	Studované polyfenolové látky .....	40
4.1.3.	Chemikálie .....	40
4.1.4.	Roztoky .....	41
4.1.5.	Laboratorní přístroje .....	44
4.1.6.	Ostatní materiál a vybavení .....	45
4.2.	Použité metody .....	45
4.2.1.	Vliv rozpouštědla na aktivitu enzymů .....	45
4.2.2.	Příprava zásobních roztoků studovaných látek .....	45
4.2.3.	Stanovení vlivu polyfenolů na aktivitu enzymů .....	46
4.2.3.1.	Stanovení antielastasové aktivity .....	46
4.2.3.2.	Stanovení antikolagenasové aktivity .....	48
4.2.3.3.	Stanovení antihyaluronidasové aktivity .....	49
4.2.3.4.	Stanovení antityrosinasové aktivity .....	50
4.2.4.	Vliv testovaných látek na produkci karbonylů .....	51
4.2.4.1.	Kultivace fibroblastů .....	51
4.2.4.2.	Příprava fibroblastů pro experimenty .....	52
4.2.4.3.	Ozařování buněk .....	52
4.2.4.4.	Toxicita polyfenolových látek .....	53
4.2.4.5.	Vliv testovaných látek na produkci karbonylů vyvolaných působením UVA záření .....	53
4.2.4.6.	Stanovení karbonylovaných proteinů .....	54
4.2.5.	Statistická analýza .....	55
5.	Výsledky .....	56
5.1.	Stanovení aktivity enzymů .....	56
5.1.1.	Stanovení antielastasové aktivity .....	56
5.1.2.	Stanovení antikolagenasové aktivity .....	60
5.1.3.	Stanovení antihyaluronidasové aktivity .....	64
5.1.4.	Stanovení antityrosinasové aktivity .....	64
5.2.	Vliv testovaných látek na produkci karbonylů .....	67
5.2.1.	Stanovení optimální dávky UVA záření .....	67
5.2.2.	Toxicita polyfenolových látek .....	69

5.2.3. Vliv testovaných látek na produkci karbonylů vyvolaných působením UVA záření.....	70
6. Diskuze .....	74
7. Závěr.....	81
Seznam použité literatury .....	82

# 1. Úvod

Incidence kožních onemocnění v posledních letech neustále narůstá. Jednou z příčin je zvýšená expozice kůže slunečnímu záření, zejména jeho UV složce. UV záření vyvolává zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou zodpovědné za oxidační stres, poškození buněčných makromolekul a rozvoj zánětlivé reakce spojené se syntézou enzymů podílejících se na degradaci extracelulární matrix. Tyto procesy mohou vést k předčasnému stárnutí a k rozvoji rakoviny kůže.

Jednou z možností ochrany pokožky před škodlivými účinky UV záření je použití přípravků, které by obsahovaly látky schopné absorbovat UV záření, odrážet paprsky a eliminovat vzniklé ROS. Fotoprotektivní účinky jsou v poslední době zkoumány zejména u polyfenolových látek, které se běžně vyskytují v přírodě a velmi často jsou součástí diety.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv mají látky z řad flavonoidů a flavonolignanů, včetně extraktu ze semen ostropestřce mariánského (silymarinu), na aktivitu enzymů podílejících se na procesech předčasného stárnutí kůže. Dále bylo zkoumáno, zda silymarin a flavonolignany, které jsou v něm obsaženy, mohou ovlivnit tvorbu karbonylových proteinů v lidských kožních fibroblastech po působení UVA záření.

## 2. Cíle práce

1. Literární rešerše na téma vliv přírodních látek a slunečního záření v procesu stárnutí kůže.
2. Studium vlivu polyfenolových látek na aktivitu vybraných enzymů (elastasy, kolagenasy, hyaluronidasy a tyrosinasy) ovlivňujících děje spojené s předčasným stárnutím kůže.
3. Stanovení optimální dávky UVA záření, která je schopna vyvolat tvorbu karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech.
4. Vliv samotných polyfenolových látek na hladinu karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech.
5. Studium vlivu polyfenolových látek na produkci karbonylovaných proteinů vyvolanou působením UVA záření.

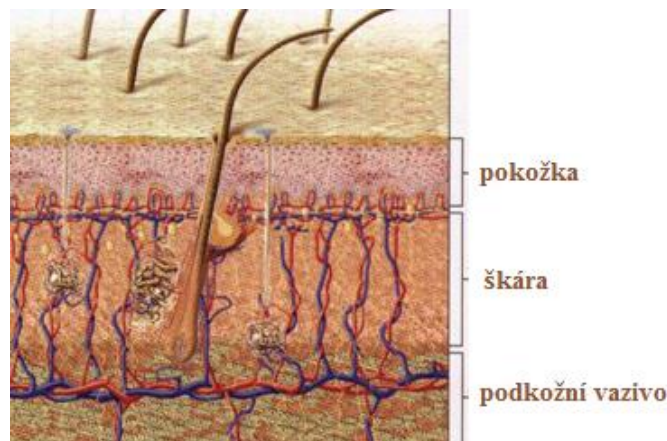
## 3. Teoretická část

### 3.1. Lidská kůže

Kůže (řec. dermis; lat. cutis), souvislý, pevný a pružný pokryv těla, je největším lidským orgánem. Tvoří zhruba 15 % z celkové tělesné hmotnosti a u dospělého člověka zaujímá povrch o rozsahu 1,5 – 2,0 m<sup>2</sup>. Barva kůže se liší na různých místech těla, rozhodující je množství přítomného pigmentu, prokrvení a tloušťka kůže. Tloušťka kůže může být od 0,4 do 4 mm v závislosti na věku, pohlaví, typu či lokalizaci kůže (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014; Hanzlová *et al.*, 2007).

Kůže tvoří bariéru mezi vnitřním prostředím organismu a jeho okolím, chrání před slunečním zářením, podílí se na termoregulaci, brání vstupu škodlivých látek či mikroorganismů, absorpci i ztrátě vody. Svou pevností a elasticitou poskytuje mechanickou ochranu hlouběji uloženým orgánům. Velké množství nervových zakončení v kůži umožňuje vnímání dotyku, tepla, chladu a bolesti. Vykazuje schopnost tvorby provitaminu D a vylučuje, nebo vstřebává některé látky, plní tedy funkci metabolickou. Má také funkci estetickou - změna barvy a prokrvení kůže při vzájemné komunikaci je odrazem celkového fyzického a psychického stavu jedince (Grim *et al.*, 2014; Hanzlová *et al.*, 2007).

Kůže je uspořádána do 3 základních vrstev – pokožka, škára a podkožní vazivo (obr. 1).

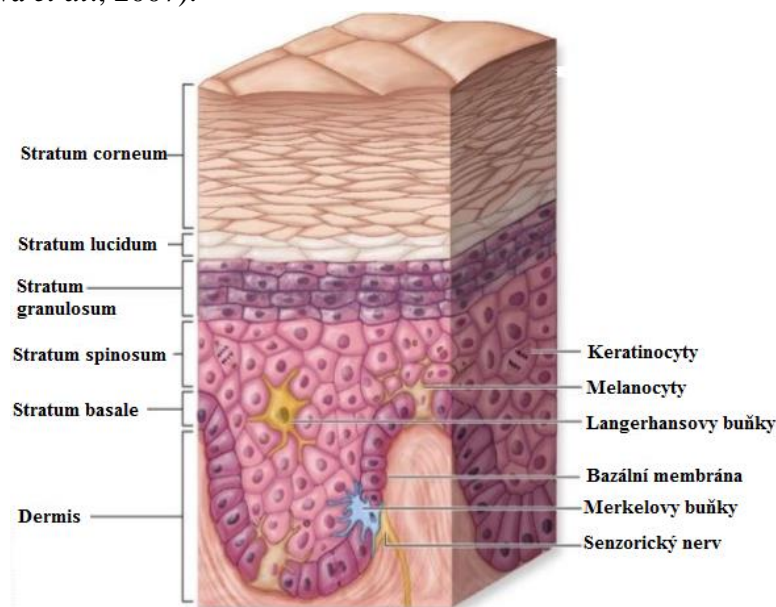


Obr. 1: Stavba kůže

(upraveno podle <http://rozkosna.kvalitne.cz/pokozka.htm>)

### 3.1.1. Pokožka

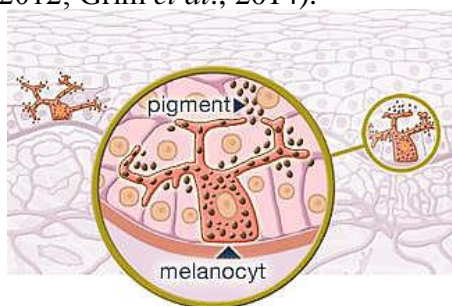
Pokožka (řec. epidermis; lat. epikutis) (obr. 1) je vnější vrstva kůže tvořená mnohovrstevným dlaždicovým epitelem. Skládá se z 5 vrstev morfologicky odlišných keratinocytů (obr. 2), buněk produkujících skleroprotein keratin. Základní a nejhlubší vrstva pokožky, bazální vrstva (lat. stratum basale), je tvořena kubickými až cylindrickými buňkami navzájem spojených desmozomy. Tyto buňky jsou označovány jako buňky kmenové, neustále se mitoticky dělí, migrují k povrchu a nahrazují vrchní vrstvu epidermis. Bazální vrstva společně s vrstvou ostnitou (lat. stratum spinosum) se označují jako vrstva germinativní (lat. stratum germinativum). Z germinativní vrstvy se keratinocyty posunují do zrnité vrstvy pokožky (lat. stratum granulosum) obsahující keratohyalin, prekursor keratinu, a dále do světlé vrstvy (lat. stratum lucidum), v jejichž buňkách je přítomna bílkovina eleidin, další prekursor keratinu. Keratinocyty postupně ztrácejí schopnost dělení a mění se z vysokých cylindrických buněk bazální vrstvy v ploché, bezjaderné buňky, korneocyty, tvořící rohovou vrstvu (lat. stratum corneum). V důsledku ukládání zrn keratohyalinu v zrnité vrstvě, degradace jádra i cytoplazmatických organel a rozrušení desmozomů se buňky odlupují z povrchu kůže v podobě šupinek – proces postupného rohovění kůže, tzv. keratinizace. Posun mitoticky aktivních buněk z bazální vrstvy na povrch pokožky trvá přibližně 3-4 týdny (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014; Hanzlová *et al.*, 2007).



Obr. 2: Vrstvy pokožky

(upraveno podle <http://www.slideshare.net/KemUnited/general-anatomy-35444127>)

V pokožce jsou vedle keratinocytů přítomny další specializované buňky - melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy buňky. Melanocyty (obr. 3) jsou buňky s četnými výběžky, uložené mezi keratinocyty bazální vrstvy a ve vlasových folikulech. Melanocyty obsahují specifické organely, melanosomy, ve kterých je syntetizován pigment melanin. Melanosomy jsou transportovány ve výběžcích melanocytů k jejich povrchu a předávány do cytoplazmy keratinocytů – kůže, chlupy a vlasy tak získávají své zbarvení. Melaninová granula se v keratinocytech hromadí kolem jádra, čímž chrání DNA buňky před poškozením vyvolaným ultrafialovým zářením (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014).



Obr. 3: Melanocyt produkující melanin

(upraveno podle <https://www.huidzorghouten.nl/wp-content/uploads/2012/09/Melanocyt.jpg>)

Merkelovy buňky (obr. 2) jsou uloženy v ostnitě vrstvě pokožky, především v kůži dlaní a chodidel. Jsou to receptorové buňky reagující na mechanické podněty, jsou v synaptickém kontaktu s nervovým zakončením a uplatňují se jako mechanoreceptory (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014).

Langerhansovy buňky (obr. 2) jsou antigen-prezentující dendritické buňky hematopoetického původu, v jejichž cytoplazmě jsou přítomny inkluze tyčinkovitého tvaru, tzv. Birbeckova granula. Vznikají v kostní dřeni z monocytů a do škáry se dostávají krevní cestou. Prostupují stěnou krevních kapilár, překonávají bazální vrstvu a vstupují do ostnitě vrstvy pokožky. Pokud jsou Langerhansovy buňky v kontaktu s antigenem, lymfatickou cestou se dostávají do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen T-lymfocytům a podílí se tak na jejich aktivaci. Hrají tedy důležitou roli v imunitních reakcích kůže, jsou zodpovědné za kožní alergické reakce a ovlivňují přijímání transplantátů (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014).

Během prenatalního vývoje jsou vytvořeny přídatné součásti pokožky označované jako deriváty epidermis, mezi něž se řadí deriváty rohové (chlupy, vlasy a nehty) a deriváty žláznové (mazové, potní a mléčné žlázy) (Grim *et al.*, 2014).

### 3.1.2. Škára

Škára (řec. dermis; lat. corium) (obr. 1) je vazivová vrstva kůže o tloušťce 0,5-4 mm, oddělená od pokožky bazální membránou, jež umožňuje prostup látek mezi oběma vrstvami. Škára se skládá z povrchové vrstvy (lat. stratum papillare) a hlubší vrstvy (lat. stratum reticulare). Povrchová vrstva, tvořená řídkým kolagenním vazivem a mnoha buňkami (fibroblasty, makrofágy a žírnými buňkami), vybíhá proti pokožce v podobě dermálních papil, což zajišťuje těsné spojení obou vrstev. Hlubší vrstva škáry je bohatá na kolagenní a elastická vlákna. V dermální vrstvě jsou přítomny především fibroblasty, protáhlé buňky s výrazným drsným endoplazmatickým retikulem, kde probíhá mimo jiné syntéza všech proteinových vláken škáry. Až 90 % vláken tvoří kolagen (především typu I a III) zodpovědný za pevnost a tuhost kůže, pružnost kůže je zajišťována vlákny elastinu. Prostor mezi buňkami a vlákny je vyplněn proteoglykany a glykoproteiny. Na regulaci tělesné teploty a výživě bezcévnaté pokožky se podílí síť lymfatických a krevních kapilár, která je součástí dermální vrstvy. Ve škáře jsou uloženy také vlasové folikuly, mazové, potní a pachové žlázy, svazky buněk hladkého svalstva, nervy a nervová zakončení pro vnímání dotyku (Meissnerova tělíska), chladu (Krauseova tělíska) a tepla (Ruffiniho tělíska) (Rajnochová Svobodová, 2012; Grim *et al.*, 2014).

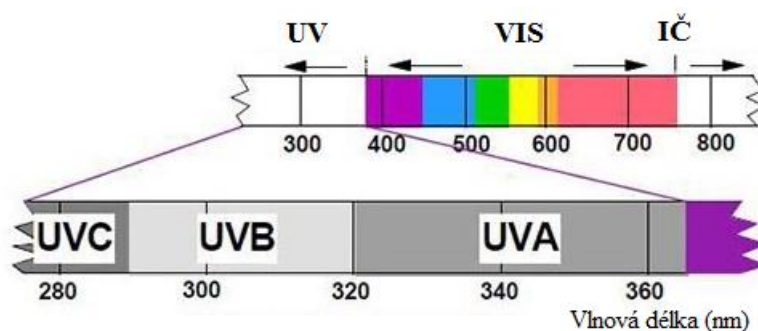
### 3.1.3. Podkožní vazivo

Nejhlubší vrstvou kůže je podkožní vazivo (řec. hypodermis; lat. subcutis) (obr. 1) tvořené řídkým kolagenním vazivem. Podkožní vazivo obsahuje tukové buňky (adipocyty), které mohou hromadit velké množství tuku uloženého mezi silnými pruhy vaziva. Tloušťka podkožního vaziva kolísá mezi 0,5-10 cm v závislosti na množství podkožní tukové tkáně, dále na výživě, věku, pohlaví, tělesné lokalizaci a činnosti žláz s vnitřní sekrecí. Podkožní vazivo je zásobárnou energie a vitaminů rozpustných v tucích. Soustava nervů a cév opět zajišťuje regulaci tělesné teploty. V podkožním vazivu jsou uložena také Vater-Paciniho tělíska (mechanoreceptory), receptory tahu a tlaku (Rajnochová Svobodová, 2012; Hanzlová *et al.*, 2007).



## 3.2. UV záření

Slunce je přirozeným zdrojem elektromagnetického záření, které se dále dělí podle vlnové délky na gama, rentgenové, ultrafialové (UV), viditelné (VIS) a infračervené (IČ) záření. Záření dopadající na zemský povrch (tzv. terestriální záření) je filtrováno průchodem atmosférou a neobsahuje vlnové délky kratší než 290 nm. Lidská kůže je tedy vystavena pouze UV, VIS (400-760 nm) a IČ záření (760-3000 nm) (obr. 4). Škodlivé působení slunečního záření je připisováno zejména UV záření, které může vyvolat řadu akutních či chronických změn v kožní tkáni. Podle Mezinárodní komise pro radiaci se UV záření (100-400 nm) člení v závislosti na vlnové délce do 3 pásem: UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) a UVA (320-400 nm) (Ettler, 2004; Rostová *et al.*, 2006).



Obr. 4: Elektromagnetické spektrum

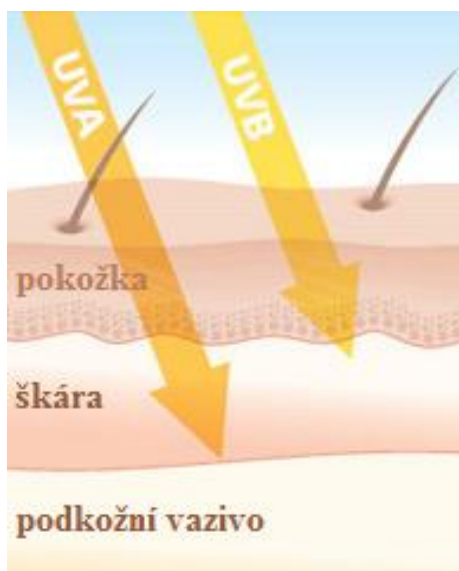
(upraveno podle <http://davidduke.com/category/healthfitness/page/2/>)

### 3.2.1. UVC záření

Nejvyšší energii, tudíž i nejintenzivnější biologické účinky, má krátkovlnné UVC záření. Působí mutageně a genotoxicky na všechny formy života již při velmi krátké expozici, jeho vlnové délky totiž zahrnují absorpční maximum bazí DNA (260-265 nm). UVC záření je naštěstí pohlcováno ozónovou vrstvou, na zemský povrch nedopadá a na patologických procesech v kůži se proto nepodílí. UVC záření se používá jako účinný germicidní prostředek k dezinfekci operačních sálů či laboratoří (Rostová *et al.*, 2006; Rajnochová Svobodová, 2012).

### 3.2.2. UVB záření

Ozónová vrstva zachycuje i většinu UVB záření, na zemský povrch dopadá přibližně 1-10 % o vlnových délkách 290-320 nm. UVB záření způsobuje opálení (pigmentaci) kůže, neboť stimuluje syntézu kožního pigmentu melaninu a současně je nezbytné pro produkci provitaminu D. Většina UVB záření je pohlcena rohovou vrstvou pokožky (obr. 5). Zbylé záření proniká až do buněk bazální vrstvy pokožky, kde přímo působí hlavně na baze DNA a aromatické kyseliny proteinů, které jsou schopny absorbovat UVB fotony. V důsledku přímého poškození bází nukleových kyselin dochází k apoptóze buněk nebo k mutacím, které mohou vést až ke vzniku nádorů. Modifikace především aromatických aminokyselin ovlivňuje funkce proteinů a buněčnou signalizaci. UVB záření vyvolává i nepřímé poškození makromolekul spojené se zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Molekulární účinky UVB záření se projevují vznikem edému, erytému či alergickými reakcemi. Opakovaná expozice UVB záření přispívá nejen k předčasnému stárnutí kůže, ale i ke vzniku rakoviny kůže (Rajnochová Svobodová, 2012; Svobodová *et al.*, 2006).



Obr. 5: Absorpce UV záření kůží

(upraveno podle <http://www.skincancer.org/prevention/uva-and-uvb>)

### 3.2.3. UVA záření

Více než 90 % terestriálního záření je tvořeno dlouhovlnným UVA zářením. UVA proniká hlouběji do kůže, většinou k rozhraní epidermis – dermis (obr 5). Minoritní část UVA ale působí i na buňky hypodermis, což vede nejen k poškození kožních buněk, ale také k nekróze endoteliálních buněk a narušení kožních cév. Poškození makromolekul UVA zářením nastává nepřímo interakcí UVA fotonů s endogenními nebo exogenními chromofory - fotosenzitivními molekulami (nukleové kyseliny, aromatické aminokyseliny, NADH, NADPH, 7-dehydrocholesterol, hem, chinony, flaviny, porfyriny, karotenoidy, eumelanin nebo urokanová kyselina). Excitované fotosenzitivní molekuly předají energii kyslíku, čímž dochází k masivní produkci ROS, které atakují DNA, lipidy či proteiny a způsobují jejich oxidační poškození. Výsledkem je tvorba lipidových hydroperoxidů, karbonylovaných proteinů, zlomů DNA a modifikovaných DNA bazí. Opakované a dlouhodobé působení UVA záření způsobuje předčasné stárnutí kůže, ovlivňuje také imunitní reakce v organismu, je příčinou fototoxických reakcí a může vést ke vzniku erytému. UVA stimuluje oxidaci melaninu a jeho přesun z melanocytů do keratinocytů, využívá se proto v solárních studiích a dále k fototerapii při léčbě lupénky a vitiliga (Rajnochová Svobodová, 2012).

### 3.3. Účinky UV záření na kůži

UV záření významným způsobem ovlivňuje zdraví člověka. Je nutné pro syntézu biologicky aktivní formy vitamínu D, vyvolává však také mnoho negativních biologických účinků, zejména na kůži a oči, které jsou jeho působení vystaveny přímo. V důsledku expozice kůže UV záření dochází k akutním či chronickým změnám, jejichž rozsah závisí na intenzitě záření a době expozice, na tloušťce kůže i kožním fototypu (Rostová *et al.*, 2006; Rajnochová Svobodová, 2012).

### **3.3.1. Akutní změny kůže po expozici UV záření**

Biologické změny vyvolané akutní expozicí UV záření se mohou projevit vznikem solárního erytému, pigmentací, fotodermatózou či fotoimunosupresí (Rajnochová Svobodová, 2012).

#### **3.3.1.1. Solární erytém**

Nejnápadnější akutní kožní odpovědí na UV ozáření je solární erytém (solární dermatitida, úžeh). Pro solární erytém jsou typické projevy zánětu – zarudnutí, zvýšená teplota, bolest a otok, při delší expozici a vyšší dávce záření se mohou tvořit puchýře. Solární erytém může být dále doprovázen bolestmi hlavy, zimnicí či zrychleným tepem (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

Histologickým projevem zánětlivých změn způsobených UV zářením je vznik tzv. sunburn cells – keratinocytů zaniklých apoptózou. Jejich zánik byl vyvolán UV zářením, jež způsobilo ireverzibilní poškození genetické informace. Pokud nejsou tyto buňky včas odstraněny, mohou vznikat buněčné linie náchylné k maligním transformacím. Dále dochází ke snížení počtu Langerhansových a žírných buněk, je patrný edém cévního endotelia a vzniká zánětlivý infiltrát v okolí cév, který je tvořen převážně T-lymfocyty, monocyty, makrofágy a neutrofilny (Rostová *et al.*, 2006; Obstová, 2011).

#### **3.3.1.2. Pigmentace**

Dalším projevem působení UV záření na kůži je pigmentace. Kůže hnědne dvěma různými mechanismy. První z nich je označován jako časné pigmentační ztmavnutí, druhý typ jako pozdní pigmentace (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

Časné pigmentační ztmavnutí je rychlé ztmavnutí kůže, které se objevuje už během expozice slunečnímu záření a dosahuje maxima bezprostředně po něm. Po slabé expozici UVA nebo VIS záření časná pigmentace mizí již během několika

minut, při vyšších dávkách záření může trvat i několik dní, fotoprotektivní účinky jsou však minimální. Časné pigmentační ztmavnutí je výsledkem oxidace melaninu již přítomného v kůži a redistribuce melanosomů z okolí jádra do dendritů melanocytů. Z melanocytů jsou melanosomy transportovány do cytoplazmy keratinocytů, kde se shromažďují v okolí jader (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

Pozdní pigmentace je vyvolána UVB zářením, které stimuluje novou syntézu melaninu (melanogeneze) a tyrosinasy. UVB fotony zvyšují tvorbu melaninu v melanocytech a urychlují jeho transport z melanocytů do keratinocytů. Při expozici UVB záření narůstá také množství a velikost dendritů i počet melanosomů. Melaninová granula jsou v melanocytech a keratinocytech soustředěna kolem jádra, čímž chrání zejména jadernou DNA před působením UVB záření. Pozdní pigmentace je patrná až 3 dny po ozáření a přetrvává po dobu 8 týdnů (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

### **3.3.1.3. Fotodermatózy**

Fotodermatózy jsou skupinou kožních onemocnění spojených s patologickým zvýšením citlivosti kůže vůči slunečnímu záření, zejména jeho UV složky. V praxi se nejčastěji setkáváme s fotodermatózami vyvolanými vnějšími faktory (chemikálie apod.) a fotodermatózy spojené s poruchou opravy DNA (Rostová *et al.*, 2006; Rajnochová Svobodová, 2012).

#### **3.3.1.3.1. Fotodermatózy vyvolané vnějšími faktory**

Abnormální reakce kůže je způsobená interakcí chemické látky (fotosenzibilizátoru) s fotony z UV nebo VIS oblasti. Po absorpci fotonů s vlnovou délkou specifickou pro daný fotosenzibilizátor (chromofor) dochází k fotosenzitivním reakcím, které se podle mechanismu vzniku dělí na fototoxické a fotoalergické reakce (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

Fototoxické reakce jsou neimunologické reakce, přímo závislé na dávce záření a koncentraci fotosenzibilizující látky. Mohou postihnout každého jedince bez ohledu

na rasu či fototyp. Principem je přímé poškození buněk chromoforem po jeho aktivaci zejména UVA zářením. Klinický nástup reakce je patrný po 12 až 72 hodinách. V místě expozice slunečnímu záření se objevuje pálivý erytém, otoky, puchýře, později i melaninová pigmentace. Mezi fotosenzibilizující látky patří různé lokální a celkově podávané léky včetně antidiabetik (tolbutamid), diuretik (furosemid), antibiotik (tetracykliny, doxycyklin, sulfonamidy), cytostatik (vinblastin), psychofarmak (tricyklická antidepresiva, chlorprotixen), nesteroidních antirevmatik a antiflogistik (ibuprofen, ketoprofen) či látek ovlivňujících kardiovaskulární systém (amiodaron). Fototoxicky působí také barviva (antrachinony, xanteny, methylenová modř), kosmetické přípravky a parfémy (levandulový, bergamotový a citrusový olej), složky fotoprotektivních prostředků (benzofenony, 4-aminobenzoová kyselina a její deriváty, estery skořicové kyseliny) nebo furokumariny obsažené v mnohých rostlinách a plodech (karotka, celer, petržel, pastinák, bolševník, citrusy). Po dobu léčby fotodermatóz je důležité vyhnout se fotosenzibilizujícím látkám i pobytu na slunci, jsou přikládány chladivé obklady a podávány kortikoidy, případně antihistaminika. Zvýšená citlivost trvá několik týdnů, proto je vhodné chránit kůži oděvem a fotoprotektivními prostředky (Rajnochová Svobodová, 2012; Polícarová, 2016).

Fotoalergické reakce jsou mnohem vzácnější než fototoxické, postihují pouze predisponované jedince a nejsou závislé na koncentraci látky. Jedná se o imunologické akutní nebo chronické reakce vznikající za účasti fotoalergenu a UV záření po předchozí senzibilizaci. Nejprve je chemická látka aktivována fotony hlavně UVA vlnových délek, následně dochází k vazbě tohoto fotoproduktu na bílkovinu za vzniku antigenu. Při další expozici s fotoalergenem je vyvolána typická kontaktní dermatitida charakterizovaná zarudnutím, svěděním, pupínky a puchýřky v místech exponovaných světlu. V chronickém stádiu dochází k lichenifikaci (zhrubění) a olupování kůže. Mezi kontaktní fotoalergeny se řadí antibakteriální látky (triclosan, chlorhexidin, sulfonamidy), složky parfémů (syntetické pyžmo, santalový olej), absorbující látky ve fotoprotektivních přípravcích (4-aminobenzoová kyselina a její estery padimát A a O, benzofenony) a v neposlední řadě léčiva (chlorpromazin, promethazin, ketoprofen). Léčba je stejná jako v případě fototoxických reakcí. Nejdůležitější je identifikace a odstranění vyvolávajícího fotoalergenu. Senzibilizace na daný fotoalergen je trvalá, proto je vhodné vyhnout se jeho aplikaci zvláště v kombinaci s UV ozářením (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004; Polícarová, 2016).

### **3.3.1.3.2. Fotodermatózy spojené s poruchou opravy DNA**

UV záření vyvolává změny v genomové DNA. Fotodermatózy spojené s poruchou opravy DNA souvisí s defekty v reparačních procesech, což má za následek zvýšenou citlivost k chemickým i fyzikálním karcinogenům, tedy i zvýšené riziko vzniku nádoru (Rajnochová Svobodová, 2012; Rostová *et al.*, 2006).

Příkladem je xeroderma pigmentosum, vzácná autozomálně recesivně dědičná genodermatóza s poruchou reparace DNA, tzv. NER (nucleotide excision repair), který patří k nejvšestranějším reparačním mechanismům DNA. Xeroderma pigmentosum se projevuje již v časném dětství na místech exponovaných světlu ve formě erytému, hyperpigmentací a depigmentací, které mohou přecházet v kožní malignity (bazaliomy, spinaliomy a melanomy). Částečnou prevencí je vyhýbání se světelné expozici, i přesto však dochází k velkému výskytu tumorů a nemocný umírá do 30. roku života (Rajnochová Svobodová, 2012; Policarová, 2016).

### **3.3.1.4. Fotoimunosuprese**

UV záření ovlivňuje také imunitní systém kůže, jehož součástí jsou Langerhansovy buňky (antigen prezentující buňky), T-lymfocyty, keratinocyty, fibroblasty (produkce cytokinů) a endoteliální buňky (exprese adhezivních molekul). Po expozici kůže UV záření je zahájen proces, při němž dochází k poškození DNA (cyklobutanové pyrimidinové dimery), izomeraci kyseliny urokanové (z *trans* na *cis* formu) a aktivaci transkripčních faktorů v cytoplazmě. Lokálně, ale i do systémové cirkulace je uvolněno množství mediátorů včetně zánětlivých i protizánětlivých cytokinů, histaminu, prostaglandinů, neuropeptidů a neurohormonů. V důsledku produkce uvedených mediátorů dochází do 24 hodin po UV expozici k poklesu množství Langerhansových buněk v epidermis a jejich přesunu do lymfatických uzlin, současně je narušena schopnost Langerhansových buněk prezentovat antigeny. Potlačení imunitních reakcí vede ke snížení rezistence vůči virovým, bakteriálním, parazitickým a fungálním infekcím (Rajnochová Svobodová, 2012; Rostová *et al.*, 2006; Ettler, 2004).

### 3.3.2. Chronické změny kůže po expozici UV záření

Opakovaná, dlouhodobá expozice slunečnímu záření vyvolává v organismu chronické změny, jejichž vznik souvisí s akutními poškozeními kůže. Změny spojené s chronickou expozicí se projevují předčasným stárnutím kůže a fotokancerogenezí (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

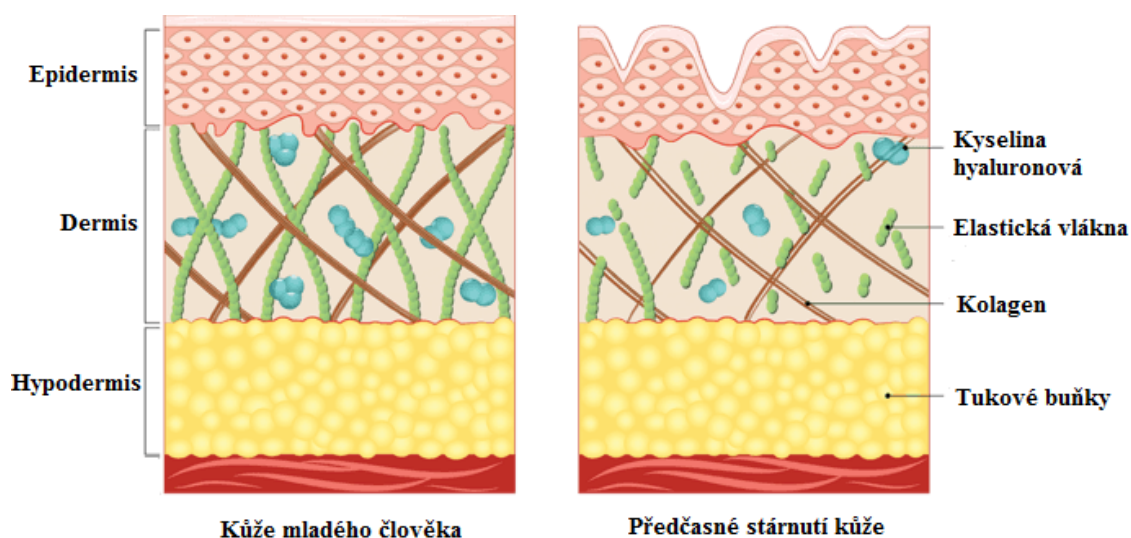
#### 3.3.2.1. Předčasné stárnutí kůže

Stárnutí kůže je složitý biologický proces ovlivňovaný jak endogenními (genetika, hormonální a metabolické procesy), tak exogenními (chronické vystavení světlu, znečištění, chemikálie, toxiny) faktory, jejichž kumulací dochází ke strukturálním a fyziologickým změnám ve všech vrstvách kůže. Na předčasné stárnutí kůže má vliv především sluneční záření. Více prostupující UVA, VIS a IR záření se podílí hlavně na změnách v dermis, méně pronikavé UVB záření odpovídá za změny v epidermis (Ganceviciene *et al.*, 2012; Rajnochová Svobodová, 2012).

Kůže starších lidí, jež nebyla vystavována slunečnímu světlu, je hladká, ztenčená, méně elastická s prohloubením ohybových rýh. Předčasné stárnutí kůže (photoaging) vyvolané působením chronické expozice slunečnímu světlu se projevuje snížením elasticity, tvorbou vrásek, zdrsněním, vyschlostí, olupováním, zažloutnutím, snížením tónu kůže a abnormální pigmentací, v konečném důsledku mohou vznikat aktinické keratózy, bazaliomy, spinaliomy či lentiginózní melanom, případně různé benigní útvary (Rajnochová Svobodová, 2012; Rostová *et al.*, 2006).

Histologickým projevem předčasného stárnutí kůže je tvorba a hromadění amorfní změní elastických vláken v dermální vrstvě, množství kolagenních vláken naopak klesá v důsledku zvýšené degradace kolagenu matrixovými metaloproteinásami či serinovými proteasami (obr. 6). Narůstá počet hyperplastických fibroblastů a zánětlivých buněk v dermis, krevní cévy jsou rozšířené. Epidermis je ztluštělá, keratinocyty ztrácí polaritu, je patrná variabilita jejich velikosti (Rajnochová Svobodová, 2012; Ganceviciene *et al.*, 2012; Yaar *et al.*, 2007).

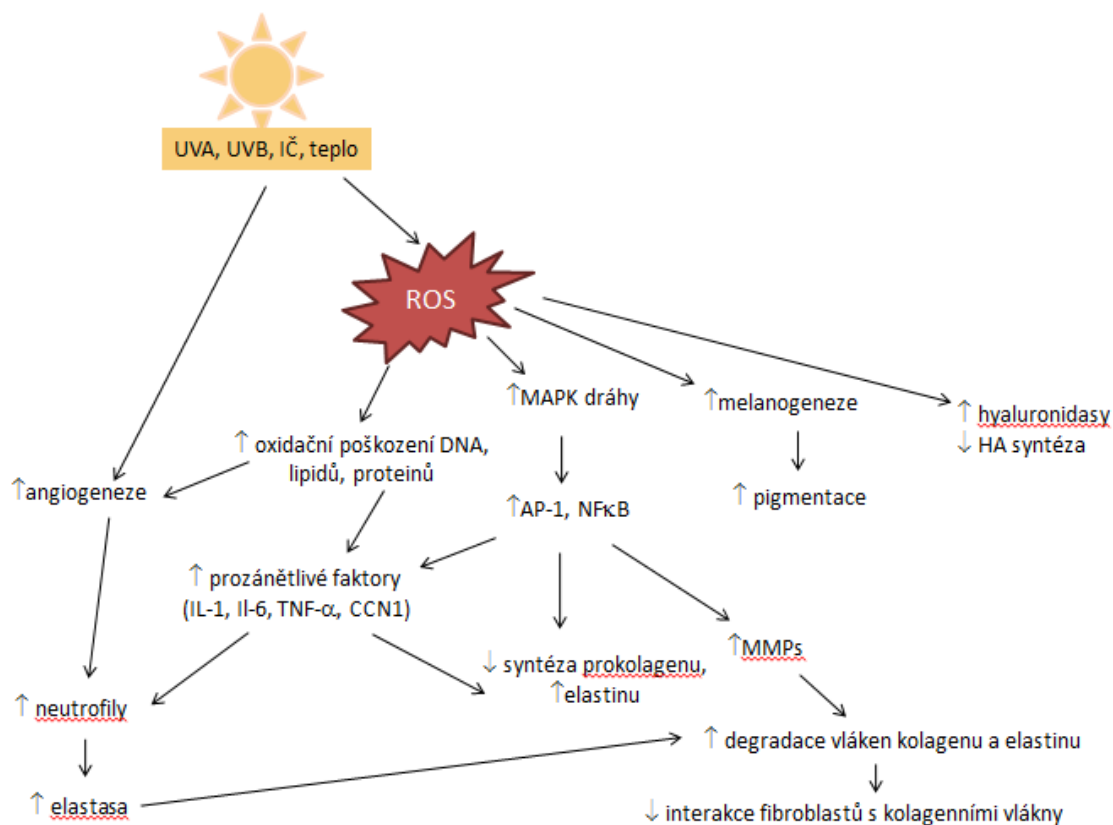




Obr. 6: Histologický projev předčasného stárnutí kůže

(upraveno podle <https://irp-cdn.multiscreensite.com/ccea65b6/dms3rep/multi/mobile/younger-older-skin-compressor-1200x620.png>)

Molekulární podstatou předčasného stárnutí kůže je masivní produkce ROS vlivem slunečního záření, což vede k aktivaci receptorů EGF (epiteliální růstový faktor), IL-1 (interleukin-1) a TNF- $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy  $\alpha$ ) na povrchu keratinocytů a fibroblastů. Následně jsou stimulovány mitogeny-aktivované kinasy proteinů (MAPK) a dochází k indukci transkripce aktivačního proteinu-1 (AP-1). AP-1 stimuluje expresi matrixových metaloproteinů (MMP) odpovědných za proteolýzu extracelulárních proteinů tvořících dermální matrix, včetně kolagenu (obr. 7). Produkty degradace kolagenu a AP-1 inhibují také novou syntézu kolagenu. Přítomné ROS oxidují štěpné produkty MMP (zpomalení normálně rychlé degradace) a poškozují mitochondriální DNA (snížení oxidativní fosforylace a narušení metabolických procesů v buňce) (Rajnochová Svobodová, 2012; Yaar *et al.*, 2007).



Obr. 7: Schématické zobrazení patogeneze předčasného stárnutí kůže

(upraveno podle Kim *et al.*, 2016)

### 3.3.2.1.1. Enzymy ovlivňující děje spojené s předčasným stárnutím kůže

Opakovaná expozice kůže slunečnímu záření je příčinou vzniku ROS, které jsou schopny vyvolat zánět a poškodit kožní tkáň. Tyto zánětlivé reakce stimulují sekreci a syntézu enzymů, které se podílejí na degradaci extracelulární matrix, např. vlákna fibrinu, elastinu, kyseliny hyaluronové a kolagenu typu I a III (obr. 6). Vlivem tohoto procesu ztrácí kůže svoji pružnost i pevnost. Mezi enzymy ovlivňující děje spojené s předčasným stárnutím kůže se řadí zejména elastasa, kolagenasa a hyaluronidasa (Maity *et al.*, 2012; Nema *et al.*, 2013). Nadměrná produkce ROS vznikajících po expozici kůže UV záření, vede také k aktivaci tyrosinasy a zvýšení její tvorby, čímž je zvýšena syntéza melaninu - kožního pigmentu, který má primárně fotoprotektivní účinky. V důsledku nadměrné akumulace a abnormální distribuce melaninu však může docházet k tvorbě hyperpigmentačních skvrn (Uchida *et al.*, 2014).

### 3.3.2.1.1.1. *Elastasa*

Elastasa je serinová proteasa, endopeptidasa, která specificky štěpí peptidové vazby mezi malými hydrofobními aminokyselinami alaninem, valinem, serinem, glycinem, leucinem a isoleucinem ([www.serva.de](http://www.serva.de)). V lidském organismu existuje 6 genů kódujících elastasu, z nichž nejznámější je gen ELANE, kódující neutrofilní elastasu, a geny CELA, kódující pankreatickou elastasu ([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)).

Neutrofilní elastasa je uložena v cytoplazmatických azurofilních granulích leukocytů a je vylučována granulovanými neutrofily nebo-li granulocyty či makrofágy při zánětlivých procesech kůže jako odpověď na poškození dermální či epidermální pojivové tkáně (Nema *et al.*, 2011). Polypeptidový řetězec elastasy lidských neutrofilů je sestaven z 218 aminokyselin spojených 4 disulfidovými můstky, typické jsou také 2 sacharidové řetězce vázané na asparagin ([www.serva.de](http://www.serva.de)).

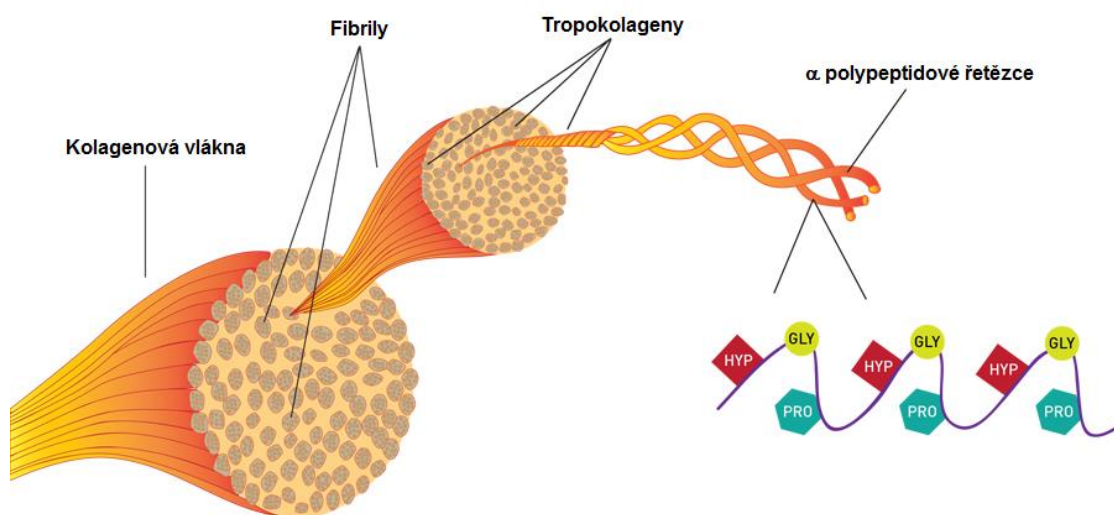
Aktivní místo neutrofilní i pankreatické elastasy se skládá z tzv. katalytické triády, jež obsahuje 3 aminokyselinové zbytky – histidin (H71), serin (S214) a kyselinu asparagovou (D119) ([www.worthington-biochem.com](http://www.worthington-biochem.com)).

Přirozeným substrátem elastasy jsou elastinová vlákna tvořená elastinem obklopeným mikrovláknem fibrillinu-1. Elastin je nerozpustný, velmi stabilní protein extracelulární matrix zodpovědný za pružnost a pevnost tkání a orgánů, např. větších cév, plic, kůže, vazů, šlach a elastických chrupavek (Mithieux *et al.*, 2005). Velká část polypeptidového řetězce elastinu je tvořena hydrofobními aminokyselinami, jako je valin či alanin, bohatě zastoupen je i glycin a lysin. Prekurzorem elastinu v těle je rozpustný tropoelastin syntetizovaný buňkami hladkého svalstva, endotelovými buňkami, fibroblasty a chondrocyty. Molekula tropoelastinu se skládá z 2 typů domén. Hydrofobní doména je sestavena z aminokyselinových zbytků glycinu, valinu, alaninu a prolinu, hydrofilní doména obsahuje velký obsah lysinových a alaninových zbytků, jež hrají důležitou roli při zesíťování vláken tropoelastinu (Daamen *et al.*, 2007).

### 3.3.2.1.1.2. Kolagenasa

Kolagenasa se řadí mezi matrixové metaloproteinasy (MMP), endopeptidasy, degradující proteiny extracelulární matrix. MMP využívají při štěpení peptidových vazeb koordinačního efektu kovového iontu, zejména  $Zn^{2+}$ . MMP jsou zapojeny do různých biologických procesů, jako je proliferace, diferenciace, angiogeneze, apoptóza, embryonální vývoj, orgánová morfogeneze, účastní se také tkáňové remodelace, hojení ran či nádorového bujení. V lidském organismu existují tři typy kolagenasy: MMP-1 označovaná jako kolagenasa I (intersticiální kolagenasa), MMP-8 známá jako kolagenasa II (neutrofilní kolagenasa) a MMP-13 jako kolagenasa III (Zaluski *et al.*, 2009; Nagase *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2008).

Kolagenasa štěpí peptidové vazby mezi neutrálními aminokyselinami (X) a glycinem v sekvenci Pro-X-Gly-Pro hojně se vyskytující v kolagenu (www.thermofisher.com). Kolagen je hlavní protein extracelulární matrix, je součástí všech pojivových tkání - kůže, šlach, vaziva, cév, chrupavek a kostí. Kolagenová vlákna jsou tvořena fibrilami, které jsou sestaveny z tropokolagenových jednotek uspořádaných do trojitě šroubovice. Tropokolageny se skládají z 3  $\alpha$  polypeptidových řetězců (prokolagenů) tvořených převážně 4 aminokyselinami: glycinem, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylysinem (obr. 8).



Obr. 8: Struktura kolagenových vláken

(upraveno podle <https://www.proto-col.com/blog/2014/07/collagen/>)

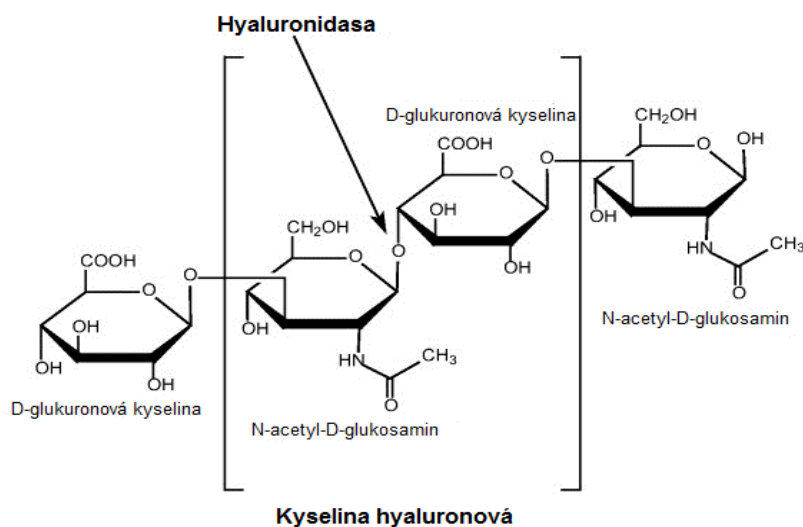
Kolagenasa je produkováána fibroblasty, keratinocyty či osteoblasty jako odpověď na imunitní reakci (en.wikipedia.org). Při expozici kůže UV záření se uvolňují zánětlivé cytokiny, které stimulují expresi MMP, včetně kolagenasy, dochází k degradaci vláken elastinu a kolagenu. Kůže ztrácí pružnost, pevnost a tvoří se vrásky. Inhibicí kolagenasy či elastasy je možné degradaci elastinových a kolagenových vláken zabránit.

### 3.3.2.1.1.3. *Hyaluronidasa*

Hyaluronidasa je enzym degradující kyselinu hyaluronovou (HA), vysokomolekulární lineární glykosaminoglykanový polymer extracelulární matrix, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny vzájemně spojených  $\beta$ -(1→3) a  $\beta$ -(1→4) glykosidovou vazbou (Cowman *et al.*, 2015; Bühren *et al.*, 2016; Necas *et al.*, 2008). Kyselina hyaluronová je součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání, hojně se vyskytuje v kůži, očním sklivci, pupeční šňůře a synoviální tekutině (Papakonstantinou *et al.*, 2012). Kyselina hyaluronová má viskoelastické vlastnosti. Je extrémně hydrofilní a má vysokou hydratační kapacitu, což je důležité pro modulaci tkáňové hydratace a osmotické rovnováhy. Kyselina hyaluronová působí jako signální molekula - interaguje s receptory na povrchu buněk, čímž reguluje buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci. Podílí se na embryogenezi a tumorigenezi, je také vhodným nádorovým markerem - využívá se k monitorování progresu některých typů rakoviny (Bühren *et al.*, 2016; Ndlovu *et al.*, 2013; Necas *et al.*, 2008).

Kyselina hyaluronová je produkováána především diferencovanými mesenchymálními buňkami, které současně uvolňují také hyaluronidasu degradující tento polysacharid za vzniku oligosacharidů s menší molekulovou hmotností (Robert *et al.*, 2010). Produkce hyaluronidasy je dále stimulována cytokiny, které jsou uvolňovány polymorfonukleárními leukocyty při zánětlivých procesech (Stern *et al.*, 2008). Hyaluronidasa může být produkováána také bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Clostridium perfringens*, čímž dochází k narušení integrity pojivové tkáně a usnadnění šíření bakteriální infekce (Cowman *et al.*, 2015; Bühren *et al.*, 2016; Necas *et al.*, 2008).

Hyaluronidasa katalyzuje hydrolyzu  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidové vazby mezi N-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou (obr. 9), čímž snižuje viskozitu kyseliny hyaluronové a zvyšuje propustnost pojivové tkáně, což se využívá v medicíně, např. k urychlení vstřebání léčiv. Hydrolyzou je ale také porušena strukturální integrita kyseliny hyaluronové, kůže tak ztrácí elasticitu. Degradaci kyseliny hyaluronové lze potlačit inhibitory hyaluronidasy. Inhibitory hyaluronidasy se podílí na zachování strukturální integrity a zabraňují ztrátě vlhkosti kůže - jsou využívány k zpomalení procesu stárnutí, také jako antimikrobiální a protizánětlivé preparáty (McCook *et al.*, 2016).

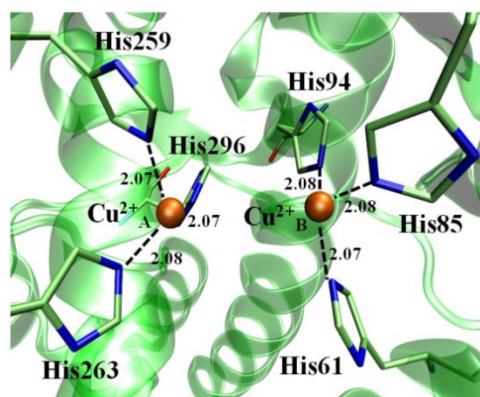


Obr. 9: Degradace kyseliny hyaluronové

(upraveno podle <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/glycosaminoglycans-and-proteoglycans.html>)

#### 3.3.2.1.1.4. *Tyrosinasa*

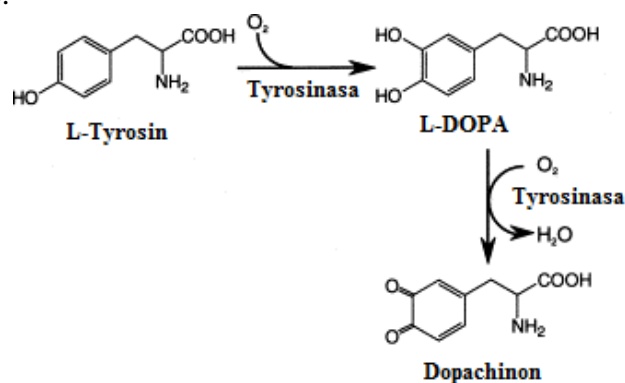
Tyrosinasa je glykosylovaný, monooxygenasový enzym široce distribuovaný v houbách, vyšších rostlinách i u živočichů. Tyrosinasa je produkována melanocyty, buňkami produkujícími pigment melanin (Uchida *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2009). Molekula tyrosinasy obsahuje v aktivním místě 2 ionty mědi ( $\text{Cu}^{2+}$ ), z nichž každý je koordinačně vázán 3 histidinovými zbytky (obr. 10). Katalytická aktivita tyrosinasy je iniciována interakcí atomů mědi a molekulárního kyslíku (Lima *et al.*, 2014; Ramsden *et al.*, 2014).



Obr. 10: Aktivní místo tyrosinasy

(upraveno podle <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/7/9591/htm>)

Tyrosinasa se podílí na prvních dvou krocích biosyntézy melaninu - nejdříve katalyzuje hydroxylaci L-tyrosinu na 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) a následně oxidaci L-DOPA za vzniku dopachinonu (obr. 11) (Uchida *et al.*, 2014; Chang, 2009; Liang *et al.*, 2014).



Obr. 11: Biosyntéza melaninu katalyzovaná tyrosinásou

(upraveno podle [http://biochem.pepperdine.edu/dokuwiki/doku.php?id=chem330:fall2013:lab\\_3\\_-\\_ph\\_dependence\\_of\\_enzymatic\\_activity\\_harry\\_potter\\_edition](http://biochem.pepperdine.edu/dokuwiki/doku.php?id=chem330:fall2013:lab_3_-_ph_dependence_of_enzymatic_activity_harry_potter_edition))

Melanin je tvořen komplexem červeno-žlutého feomelaninu a tmavého hnědo-černého eumelaninu, který je schopen absorbovat energii fotonů UVA, UVB, VIS a IR fotony. Melanin tak redukuje množství záření pronikajícího do epidermis, vychytává volné radikály, které vznikají v kůži po UV ozáření, chelatuje ionty přechodných kovů a chrání jadernou DNA keratinocytů, dermální proteiny, kolagen i elastin před poškozením UV (Rajnochová Svobodová, 2012; Ettler, 2004).

Při expozici kůže UV záření dochází k zvýšené expresi tyrosinasy v melanocytech a zvýšené produkci melaninu, který chrání kožní buňky před slunečním zářením. Při nadměrné expozici kůže UV záření dochází k abnormální produkci tyrosinasy a melaninu a nerovnoměrné distribuci melaninu, což vede ke vzniku hyperpigmentačních skvrn. Inhibicí tyrosinasy lze syntézu melaninu v kůži snížit (Uchida *et al.*, 2014).

### 3.3.2.2. Fotokancerogeneze

Vznik nádoru je komplikovaný, vícestupňový proces. V první iniciační fázi dochází k poškození genetické informace, jež není opraveno reparačními mechanismy. Druhým krokem je propagace, kdy je poškozená DNA přenesena z mateřské buňky do buněk dceřiných. Ve fázi progresu přechází buňky v metastazující, invazivní tumor. Tyto procesy jsou ovlivněny slunečním zářením, které může poškozovat DNA, vyvolávat tvorbu ROS, produkci cytokinů, stimulovat zánět, imunosupresi, ovlivňovat expresi genů či buněčnou signalizaci. V důsledku těchto procesů mohou vznikat kožní nádory, které se v současné době řadí mezi nejčastější maligní onemocnění, jejich incidence v posledních letech celosvětově stoupá (Rajnochová Svobodová, 2012; Rostová *et al.*, 2006). Podle svého původu se dělí na nemelanomové kožní nádory (aktinická keratóza, spinaliom a bazaliom) pocházející z rozdílných vrstev epidermálních buněk a melanom vzniklý maligní transformací melanocytů (Krajsová, 2008).

Aktinická keratóza (solární keratom) je považována za prekancerózní kožní lézi, která může přecházet ve spinocelulární karcinom. Objevuje se převážně u starších osob se světlou, málo pigmentovanou kůží na místech chronicky vystavovaných slunečnímu záření (tj. čelo, spánková oblast, nos, uši, hřbety rukou, temeno hlavy u mužů s androgenní alopecí). Tato léze se projevuje jako ohraničené zarudlé ložisko se zhrubělým povrchem (obr. 12), které se může během let vyvinout v masivní rohovinovou vrstvu hnědožluté barvy. Účinnou léčbou aktinické keratózy je kryoterapie či fotodynamická terapie, v některých případech je nezbytný chirurgický zákrok (Rajnochová Svobodová, 2012; Divišová *et al.*, 2010).





Obr. 12: Aktinická keratóza



Obr. 13: Bazaliom

(upraveno podle <http://www.bpac.org.nz/BPJ/2013/December/skincancer.aspx>)

(upraveno podle <http://www.doktor24.si/revija-doktor/tema-meseca/304-kozni-rak-prepoznajte-ga-dovolj-zgodaj?tmpl=component&print=1>)

Nejčastějším nemelanomovým kožním nádorem je bazaliom (bazocelulární karcinom) vznikající z buněk bazální vrstvy. Bazaliom vyrůstá opět v oblastech kůže s chronickou expozicí slunečnímu záření, nejčastěji v obličeji kolem očí, nosu a na zádech. Vyšší riziko postihuje především osoby starší 60 let se světlou pletí a větším počtem pigmentových névů. Klinicky se tento typ nádoru jeví jako čožkovitá šedobělavá indurace až uzlík, může vředovatět (obr. 13). Bazaliom většinou lokálně destruktivně roste, metastázy jsou naštěstí velmi vzácné. Po chirurgickém vyjmutí se často objevuje recidiva, další možností léčby je kryoterapie, aktinoterapie nebo fotodynamická terapie (Krajsová, 2008; Ettler, 2004; Rajnochová Svobodová, 2012).

Méně častý je spinaliom (spinocelulární karcinom) vyskytující se opět u starších lidí následkem chronické expozice UV záření. Spinaliom pochází z buněk ostnitě vrstvy epidermis, makroskopicky se jeví jako tuhá papula, později přechází v infiltrované hyperkeratotické ložisko s nerovným povrchem, rychle se zvětšuje, může vředovatět, mokvat či krvácet (obr. 14). Nejčastěji je lokalizován na obličeji, krku, hřbetech rukou, předloktí, vyskytuje se i na sliznici. Spinaliomy mohou metastazovat lymfatickou cestou do mizních uzlin a odstraňují se chirurgicky (Rostová, 2008; Rajnochová Svobodová, 2012).



Obr. 14: Spinaliom



Obr. 15: Maligní melanom

(upraveno podle <https://www.dr-hilton.de/hautkrebs-vorsorge/weisser-hautkrebs/>)

(upraveno podle <http://www.gate2biotech.cz/geneticka-pricina-melanomu-nalezena-v-nekodujici-dna/>)

Maligní melanom vzniká maligní přeměnou melanocytů, vzácně vychází z névocytů. Ke vzniku melanomu vede akutní popálení sluncem až do vzniku puchýřků. Melanom se trvale zvětšuje, vytváří plošné hnědě až černě pigmentované, nepravidelné, asymetrické ložisko a metastazuje (obr. 15). Kvůli agresivnímu průběhu a vysoké mortalitě se melanom řadí mezi maligní nádory s velmi špatnou prognózou. Pro úspěšnou léčbu je důležitá včasná diagnostika a odstranění primárního tumoru (Rostová, 2006; Krajsová, 2008; Ettler, 2004).

### 3.4. Polyfenolové látky

V současné době existuje více než 8000 známých fenolových látek, jejichž společným strukturním znakem je aromatický kruh s alespoň jednou hydroxylovou skupinou. Fenolové látky jsou rostlinné sekundární metabolity běžně se vyskytující v bylinách, ovoci, zelenině, obilí, zeleném a černém čaji či v kávových zrnech - jsou tedy nedílnou součástí lidské diety (Svobodová *et al.*, 2003).

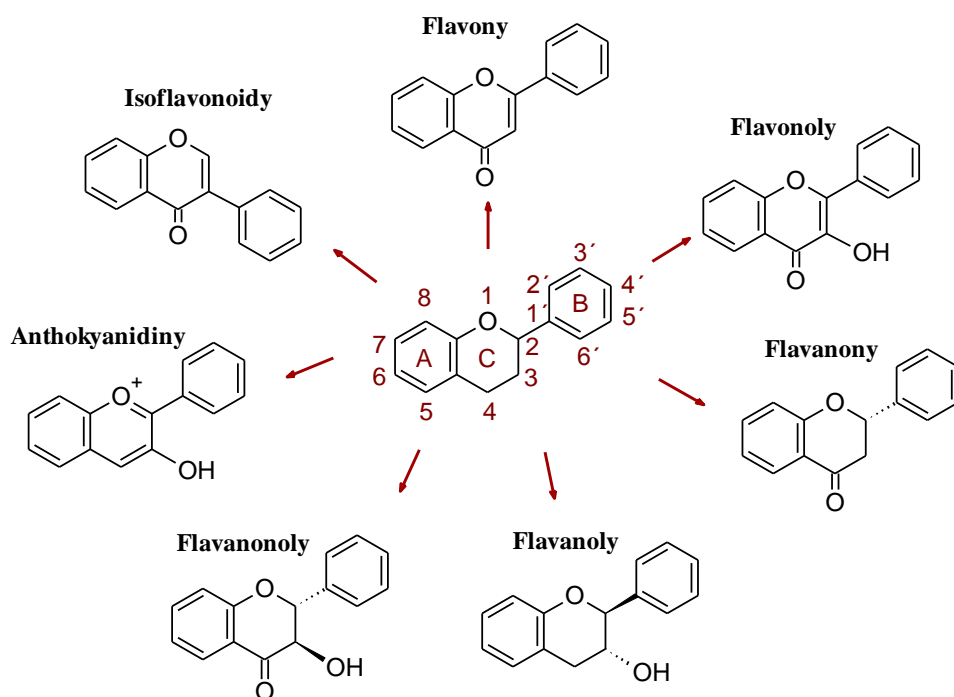
Tyto látky rostlinného původu jsou schopny absorbovat UV záření, reagovat s ROS a neutralizovat je (vytvářet méně reaktivní nebo stabilní produkty) či chelátovat ionty přechodných kovů a bránit tak tzv. Fentonově reakci. Polyfenolové látky vykazují mnoho biologických účinků včetně antivirových, antimikrobiálních, antioxidačních, protizánětlivých, fotoprotektivních, hepatoprotektivních,

vazorelaxačních, imunomodulačních, antialergických, protinádorových, antiangiogenních, antihypertenzivních, antiarytmických, antitrombotických či antiischemických. Polyfenolové látky také inhibují aktivitu mnoha enzymů včetně lipoxygenasy, cyklooxygenasy, monooxygenasy, xantinoxidasy, NADPH-oxidasy, fosfolipasy A<sub>2</sub>, proteinkinasy, aj. (Svobodová *et al.*, 2003; Rajnochová Svobodová, 2012; Agrawal, 2011).

Polyfenolové látky lze rozdělit do čtyř skupin: fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové), flavonoidy, stilbeny a lignany (Rajnochová Svobodová, 2012). V této diplomové práci byly studovány vybrané flavonoidy, dále extrakt ze semen ostropestřce mariánského (silymarin) a flavonolignany, které jsou v něm obsaženy.

### **3.4.1. Flavonoidy**

Flavonoidy jsou nejpočetnějšími a nejvíce studovanými polyfenolovými látkami. K dnešnímu dni je identifikováno více než 4000 flavonoidů, které jsou rozděleny do 7 tříd: flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, flavanonoly, isoflavonoidy a anthokyanidiny (obr. 16). Flavonoidy jsou široce distribuované v listech, semenech a květech rostlin, jimž poskytují ochranu proti UV záření, patogenům či býložravcům. Tyto látky jsou zodpovědné za zbarvení plodů a některých druhů zeleniny (Chang, 2009). V řadě studií bylo prokázáno, že flavonoidy snižují riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění, metabolických poruch a nádorových onemocnění. V důsledku antioxidantních vlastností flavonoidů dochází k redukci oxidačního stresu, inhibici oxidace lipoproteinů a agregace krevních destiček (Arulmoli *et al.*, 2016; Procházková *et al.*, 2011).



Obr. 16: Přehled flavonoidů

Z široké škály flavonoidů bylo v rámci této diplomové práce zkoumáno pouze 6 látek: kvercetin, kaempferol, taxifolin, apigenin, baicalein a naringenin (obr. 17).

Kvercetin je jedním z nejúčinnějších antioxidantů ze skupiny flavonoidů (obr. 17). Tento žlutý rostlinný pigment patří do skupiny flavonolů. Kvercetin je ve větším množství obsažen v červených hroznech, třešních, borůvkách, brusinkách, citrusech, cibuli, brokolici, zelené listové zelenině, nachází se také v různých semenech, pohance, olivovém oleji, červeném víně a v zeleném čaji. Kvercetin je známý zejména svými protizánětlivými, protinádorovými, antialergickými, antihypertenzivními a vazodilatačními účinky (Arulmoli *et al.*, 2016).

Dalším významným antioxidantem ze skupiny flavonolů je kaempferol (obr. 17) hojně se vyskytující v čaji, brokolici, jablcích, jahodách a fazolích. Kaempferol vykazuje imunomodulační, protizánětlivé a protinádorové účinky - inhibuje proliferaci nádorových buněk a angiogenezi, indukuje apoptózu nádorových buněk a reguluje klíčové kroky buněčné signální transdukce (Chen *et al.*, 2013).

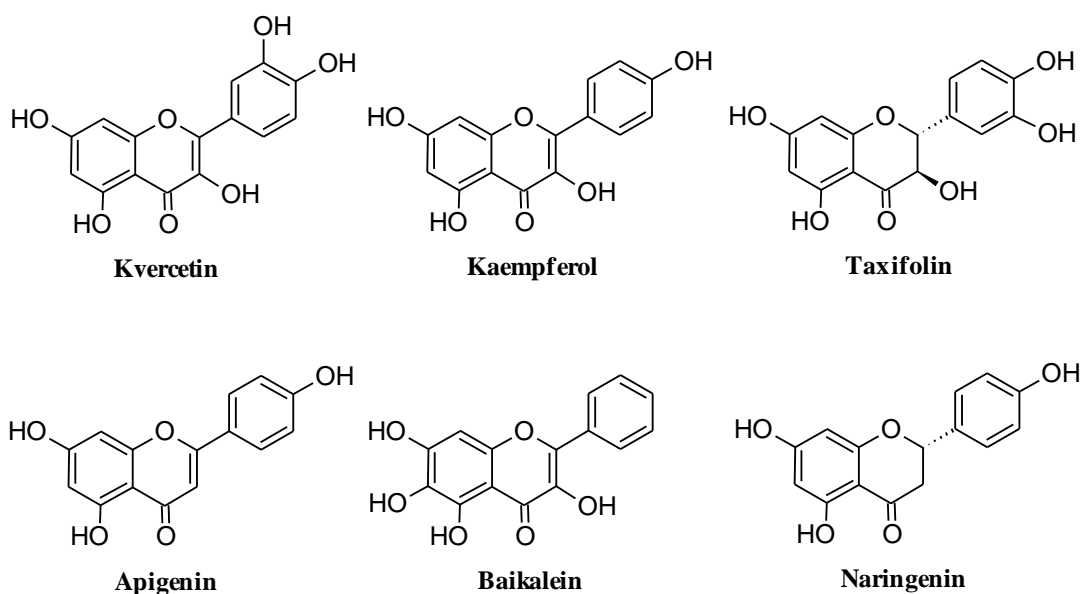
Taxifolin (obr. 17) je flavonoid řadící se mezi flavanonoly. Běžně se vyskytuje v jehličnanech, např. v cedru himalájském či modřínu sibiřském a je přítomen

také v silymarinu. Taxifolin vykazuje silné antioxidační, ale také antiproliferační účinky na různých typech rakovinových buněk (Alzaharna et al., 2017; en.wikipedia.org).

Apigenin (obr. 17), patřící mezi flavony, je nejvíce obsažený v heřmánku, červeném víně, celeru, petrželi, pomerančích a pšeničných klíčcích. U apigeninu byly prokázány protizánětlivé, antioxidační, antivirové a protinádorové účinky (Shukla *et al.*, 2010).

Mezi flavony patří také baikalein (obr. 17), flavonoid izolovaný z šišáku bajkalského. Baikalein, aglykon baikalinu, je používán v tradiční čínské medicíně pro prevenci a léčbu různých onemocnění včetně kardiovaskulárních chorob, hypertenze, bakteriálních infekcí nebo chronické hepatitidy. Nedávno byly potvrzeny také protinádorové účinky této látky – baikalein indukuje apoptózu pankreatických nádorových buněk, zajímavé účinky byly pozorovány také u hematologických malignit (Donald *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

Naringenin (obr. 17), přítomný zejména v citrusových plodech, hroznech a rajčatech, se řadí mezi flavanony. Tento aglykon naringinu vykazuje antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální a chemoprotektivní účinky. Některé studie naznačují, že naringenin by mohl být prospěšný v léčbě obezity, diabetu, metabolického syndromu a hypertenze, dosud však tyto účinky nebyly potvrzeny v kvalitní klinické studii (Alam *et al.*, 2014; Turgut *et al.*, 2016).



Obr. 17: Chemické struktury vybraných flavonoidů

### 3.4.2. Silymarin a jeho flavonoligany

Silymarin je standardizovaný extrakt ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) (obr. 18) z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*).

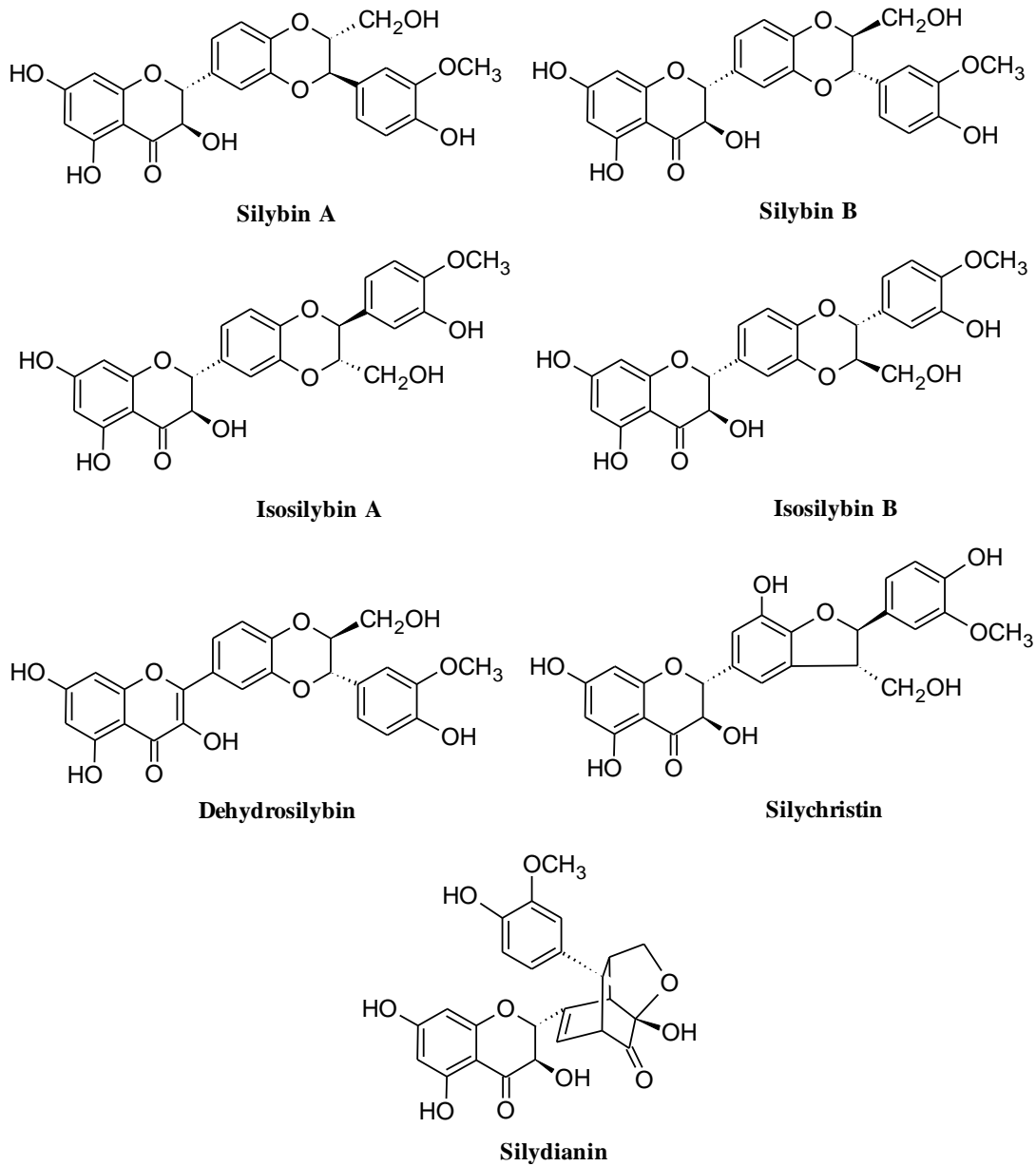


Obr. 18: Ostropestřec mariánský

(upraveno podle <http://www.spektrumzdravi.cz/w/spektrumzdravi/files/ostropestrec.jpg>)

Silymarin obsahuje 70-80 % flavonolignanů a 20-30 % chemicky nedefinované frakce, tvořené zpolymerizovanými oxidovanými polyfenoly. Nejvíce zastoupeným flavonolignanem je silybin (obr. 19), který je díky antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem považován za hlavní biologicky aktivní složku silymarinu. Přírodní silybin je směsí dvou diastereoizomerů A a B v poměru 1:1. Mezi další flavonoligany silymarinu se řadí isosilybin (směs diastereoizomerů A a B), silydianin, silychristin, v menším množství je přítomný i 2,3-dehydrosilybin (obr. 19) a flavonoid taxifolin (obr. 17) (Svobodová *et al.*, 2003; Rajnochová Svobodová, 2012; Choo *et al.*, 2009).

Silymarin má výrazné hepatoprotektivní účinky a je využíván k léčbě různých jaterních onemocnění. Vykazuje také kardioprotektivní, antidiabetické, antibakteriální a protinádorové účinky. U silymarinu a silybinu byly dále prokázány fotoprotektivní účinky a schopnost potlačovat fotokancerogenezi (Svobodová *et al.*, 2003; Choo *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2017).



Obr. 19: Chemické struktury flavonolignanů silymarinu

## **4. Experimentální část**

### **4.1. Materiál, chemikálie, roztoky, přístroje a vybavení**

#### **4.1.1. Biologický materiál**

Pro experimenty v této diplomové práci byly použity primární kultury lidských kožních fibroblastů izolovaných z lidské kůže. Kůže byla získána od dobrovolných dárců, kteří podstoupili chirurgický zákrok na Oddělení plastické a estetické chirurgie ve Fakultní nemocnici Olomouc. Dárci podepsali informovaný souhlas. Odběr kůže byl proveden s povolením Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v souladu s českou legislativou.

#### **4.1.2. Studované polyfenolové látky**

Kvercetin (KV) byl dodán firmou Lachema (ČR), taxifolin (TA), baikalein (BA), apigenin (API), kaempferol (KA) a naringenin (NA) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (ČR).

Dále byl testován extrakt z ostropestřce mariánského (silymarin) a flavonolignany, které jsou v něm obsaženy. Silymarin (SM) byl dodán jako dar od firmy Teva (ČR), 2,3-dehydrosilybin (DS), silybin (SB), silychristin (SCH), silydianin (SD) a isosilybin (IS) byly získány jako dar od spolupracujícího pracoviště Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Praze (ČR).

#### **4.1.3. Chemikálie**

Azid sodný, 3,4-dihydroxy-L-fenylalanin (DOPA), 4-(dimethylamino)benzaldehyd (DMAB), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), Dulbecco's Modified Eagles médium (DMEM), elastasa z lidských neutrofilů, ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA), dimethylsulfoxid (DMSO),



fetální bovinní sérum (FBS), fluorescein thiosemikarbazid (FTC), glycerolfosfát, L-glutamin, guanidin HCl, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), hyaluronidasa, hyaluronová kyselina, hydrát aurothiomalátu sodného (SATMH), kojová kyselina (KK), kolagenasa, kolagen-fluorescein, N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid, oleanolová kyselina (KO), 0,4 % roztok trypanové modři, 0,25 % roztok trypsin-EDTA, penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml), Triton X-100, tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl), tyrosinasa a vanadičnan sodný ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (ČR). Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), monohydrát 1,10-fenantrolinu a fluorid sodný (NaF) byly zakoupeny v Lachemě (ČR). Od firmy Lach-Ner (ČR) byl koupen aceton, dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ethanol, chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), chlorid vápenatý ( $\text{CaCl}_2$ ), kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), methanol a trichloroctová kyselina (TCA). Dále byl použit hovězí sérový albumin (BSA) a Tween 20 od firmy Bio Basic INC. (Kanada), inhibitor proteas Complete™ od firmy Roche (Německo) a boritan draselný ( $\text{KBO}_2$ ), Pierce® BCA Protein Assay Reagent A a Pierce® BCA Protein Assay Reagent B od firmy Thermo Fisher Scientific (ČR).

#### 4.1.4. Roztoky

##### **Roztoky pro stanovení antielastasové aktivity:**

0,1 M HEPES pufr (pH = 7,5)

**Enzym:** roztok elastasy z lidských neutrofilů (E8140) o enzymové aktivitě 1 UN/ml deionizované vody

**Substrát:** 4,4 mM N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid v 0,1 M HEPES pufru (pH = 7,5)

##### **Roztoky pro stanovení antikolagenasové aktivity:**

**Zásobní roztok pufru (pH = 7,6):** 0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl; 50 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 2 mM azid sodný

**Pracovní roztok pufru:** 10 krát naředěný zásobní roztok pufru

**Enzym:** roztok kolagenasy (C0130) o aktivitě 200 U/ml deionizované vody

**Substrát:** 0,6 mg kolagen-fluoresceinu/ml deionizované vody

**Roztoky pro stanovení antihyaluronidasové aktivity:**

0,8 M  $\text{KBO}_2$

12,5 mM  $\text{CaCl}_2$

**Roztok činidla DMAB:** 4 g DMAB/40 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 5 ml 10 N HCl

0,02 M fosfátový pufr se 77 mM NaCl (pH = 7) s 0,01 % BSA

0,1 M acetátový pufr (pH = 3,5)

**Enzym:** 1,5 mg hyaluronidasy (H3506)/ml 0,02 M fosfátového pufru se 77 mM NaCl s 0,01 % BSA

**Substrát:** 1 mg hyaluronové kyseliny/ml 0,1 M acetátového pufru (pH = 3,5)

**Roztoky pro stanovení antityrosinasové aktivity:**

50 mM fosfátový pufr (pH = 6,8)

**Enzym:** zásobní roztok tyrosinasy o aktivitě 11 542 U/ml, pracovní roztok tyrosinasy o aktivitě 100 U/ml 50 mM fosfátového pufru (pH = 6,8)

**Substrát:** 2,5 mM DOPA v 50 mM fosfátovém pufru (pH = 6,8)

**Roztoky pro izolaci, kultivaci a ozařování fibroblastů:**

**Fosfátový pufr (PBS) (pH = 7,4):** 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,96 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; před použitím roztok 10 krát naředit deionizovanou vodou

**Roztok pro transport kůže:** 10 krát naředěný PBS obsahující penicilin (500 mg/ml), streptomycin (500 U/ml) a amphotericin B (1,25 mg/ml)

**Roztok pro kultivaci kůže:** Dulbecco's Modified Eagles médium (DMEM) a Ham's F12 Nutrient Mixture (1:3) obsahující FBS (10 %), penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml), amphotericin B (0,125 mg/ml), hydrokortison (0,8 µg/ml), adenin (24 µg/ml), insulin (0,12 U/ml), epidermální růstový faktor (1 ng/ml) a 3,3',5-trijod-L-thyronin (0,136 µg/ml)

**Kultivační médium pro fibroblasty:** DMEM, 10 % FBS, penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml)

**Růstové médium:** DMEM; penicilin (100 mg/ml), streptomycin (100 U/ml)

**PBS s glukosou:** 10 krát naředěný PBS s glukosou (1 mg/ml)

#### **Roztoky pro stanovení karbonylovaných proteinů:**

Fosfátový pufr (PBS) (pH = 7,4)

0,1 M HEPES (pH = 6,0)

6 M guanidin HCl

20 % roztok TCA

0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (pH = 7)

**Zásobní roztok fluorescenční sondy:** 100 mM FTC

**Pracovní roztok fluorescenční sondy:** 200 µM FTC

**Lyzační roztok (pH = 7,5):** 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM NaF; 5 mM EGTA; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 20 mM glycerolfosfát; 1 % Triton X-100; Tween 20; 1 tableta proteasových inhibitorů

### **Roztoky pro stanovení proteinů:**

Směs roztoku Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Reagent A a Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Reagent B (50:1)

Standardní roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentraci 0,05-1 mg/ml

### **4.1.5. Laboratorní přístroje**

Centrifuga *MiniSpin*<sup>®</sup> (Eppendorf, Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor *Forma Direct Heat* (Thermo Fisher Scientific, USA)

Fotometr pro měření absorbance *Infinite M200 Pro* (Tecan, Švýcarsko)

Chlazená centrifuga *Jouan BR4i* (Jouan, Francie)

Inverzní mikroskop *CK-2 Tr* (Olympus, Japonsko)

Laminární box *Jouan MSC 9 Standard* (Jouan, Francie)

Odsávačka *Gilson Safe Aspiration Station* (Gilson, USA)

Termomixer *Comfort* (Eppendorf, Německo)

Třepačka *Reax Top* (Heidolph, Německo)

Vortex *Mixer VX-200* (Labnet International, USA)

Ultrazvuková vodní lázeň (Memmert GmbH + Co. KG, Německo)

pH-metr *inoLab pH Level 1* s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo)

UV lampa, UV metr (Dr.Hönle UV technology, Německo)

Váhy *AX105 Delta Range* (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Elektromagnetická míchačka *RH Basic KT/C* (IKA<sup>®</sup> - Werke, Německo)

#### **4.1.6. Ostatní materiál a vybavení**

Plastové mikrozkušavky, pipety a špičky (Eppendorf, ČR)

Kultivační láhve, kultivační desky a centrifugační zkumavky (Biotech, ČR)

Sterilní Petriho misky (Sigma-Aldrich, ČR)

Sterilní škrabky (Biologix Research Company, USA)

96-jamkové destičky (Dispolab, ČR)

Bürkerova komůrka, krycí sklička, chladicí box, chladicí destičky, dezinfekční roztok, gáza, buničina a ubrousky

## **4.2. Použité metody**

### **4.2.1. Vliv rozpouštědla na aktivitu enzymů**

Nejdříve byl ověřen vliv rozpouštědla, ve kterém byly připraveny zásobní roztoky testovaných látek na enzymovou reakci. Do reakční směsi byl přidán příslušný objem daného rozpouštědla (ethanolu, methanolu a DMSO) a byl porovnán jejich efekt se stejným objemem reakčního pufru, který sloužil jako kontrolní (srovnávací). V přítomnosti ethanolu a methanolu byl pozorován výrazný inhibiční účinek na aktivitu elastasy, aktivita enzymu klesla vlivem rozpouštědla až o 50%. V případě DMSO nebyl pozorován vliv na aktivitu elastasy. DMSO byl proto použit jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních roztoků studovaných látek. U ostatních enzymů nebyl zaznamenán vliv rozpouštědla na jejich aktivitu.

### **4.2.2. Příprava zásobních roztoků studovaných látek**

Pro experimenty byly připraveny zásobní roztoky polyfenolových látek v DMSO, které byly dále ředěny DMSO na požadované koncentrace.

Silymarin je směs polyfenolových látek. Celkový obsah flavonolignanů včetně taxifolinu je v silymarinu 69,4 % (viz tabulka 1), zbytek tvoří neidentifikovaná polymerní frakce. Pro přípravu zásobního roztoku silymarinu byla použita stejná navážka, tedy stejná hmotnostní koncentrace jako u ostatních flavonolignanů (flavonolignany mají stejnou relativní molekulovou hmotnost mimo dehydrosilybin).

Tabulka 1: Složení silymarinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z 6 měření  $\pm$  směrodatná odchylka.

Látka	Obsah (%)
Taxifolin	2,09 $\pm$ 0,41
Silychristin	15,25 $\pm$ 1,33
Silydianin	4,55 $\pm$ 0,62
Silybin A	16,34 $\pm$ 1,60
Silybin B	21,64 $\pm$ 1,53
Dehydrosilychristin	0,56 $\pm$ 0,09
Isosilybin A	5,73 $\pm$ 1,16
Isosilybin B	2,90 $\pm$ 0,65
Dehydrosilybin	0,33 $\pm$ 0,07

### 4.2.3. Stanovení vlivu polyfenolů na aktivitu enzymů

Pro studium vlivu látek na aktivitu vybraných enzymů byly zásobní roztoky polyfenolových látek dále ředěny DMSO na výslednou koncentraci, která se pohybovala v rozmezí 0,1-200  $\mu$ M.

#### 4.2.3.1. Stanovení antielastasové aktivity

Elastasa z lidských neutrofilů katalyzuje hydrolýzu peptidové vazby mezi malými hydrofobními aminokyselinami, jako je glycin, alanin a valin. K stanovení aktivity elastasy z lidských neutrofilů byla využita kinetická metoda. Jako substrát byl použit N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid, bezbarvá látka

absorbující záření o vlnové délce 315 nm. N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid je hydrolyzován za vzniku žlutého produktu p-nitroanilinu (schéma 1). Rychlost hydrolyzy substrátu (uvolňování p-nitroanilinu) byla monitorována měřením absorbance (A) při 410 nm. Za standardní inhibitor elastasy byla zvolena kyselina oleanolová (KO), která byla použita v koncentracích 10, 50, 100 a 200  $\mu\text{M}$ . Její zásobní roztok byl připraven v DMSO. Postup stanovení antielastasové aktivity byl modifikován podle studie Kim *et al.* (2009), Maity *et al.* (2012) a Nema *et al.* (2011).

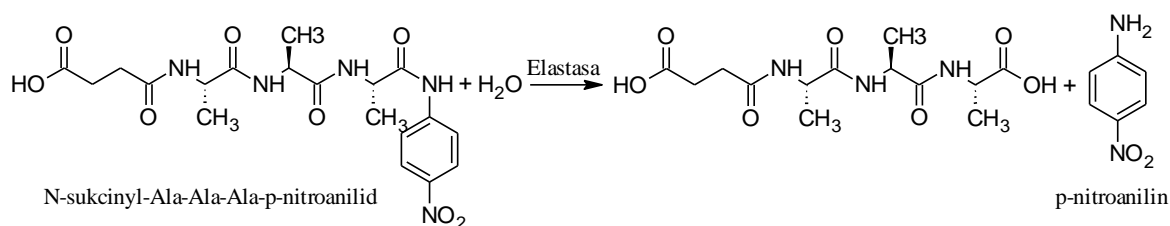


Schéma 1: Hydrolyza N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilidu elastasou

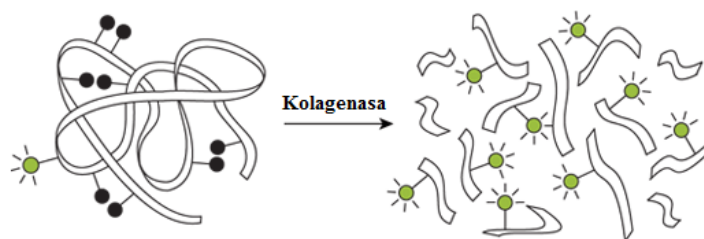
Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno po 100  $\mu\text{l}$  0,1 M HEPES pufru (pH = 7,5), 10  $\mu\text{l}$  vzorku (testované polyfenolové látky nebo kyseliny oleanolové nebo DMSO) a bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  elastasy (1 UN/ml). Tato reakční směs byla inkubována při 30  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut. Reakce byla zahájena přidáním 30  $\mu\text{l}$  substrátu N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilidu (4,4 mM). Na spektrofotometru byla měřena změna A/min při 410 nm. Měření bylo prováděno v dubletech ve 3 opakováních. Procento inhibice bylo vypočítáno podle vzorce:

$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - [(A_{vz} - A_{sl}) / (A_k - A_{sl})] \cdot 100,$$

kde  $A_{vz}$  je změna absorbance vzorku (kompletní reakční směs se substrátem, enzymem a příslušnou studovanou látkou),  $A_{sl}$  je změna absorbance slepého vzorku (reakční směs se substrátem, bez enzymu, DMSO místo testované látky) a  $A_k$  je změna absorbance kontrolního vzorku (reakční směs se substrátem, enzymem, DMSO místo testované látky).

#### 4.2.3.2. Stanovení antikolagenasové aktivity

Kolagenasa je matrixová metaloproteinasa štěpící kolagen a další proteiny extracelulární matrix. Pro experiment byla použita kolagenasa z bakterie *Clostridium histolyticum*, jako substrát byl zvolen kolagen značený fluoresceinem. Kolagenasa štěpí kolagen-fluorescein za vzniku fluorescenčních peptidů (obr. 20). Na spektrofotometru byla měřena změna fluorescence při excitaci 495 nm a emisi 515 nm - zvýšení fluorescence je přímo úměrné proteolytické aktivitě kolagenasy. Jako standardní inhibitor byl použit 1,10 - fenantrolin monohydrát (FE) v koncentracích 10, 50, 100, 200 a 500  $\mu\text{M}$ , zásobní roztok byl ředěn DMSO. Postup pro stanovení antikolagenasové aktivity byl modifikován podle Maity *et al.* (2012).



Obr. 20: Degradace fluorescenčně značeného proteinu kolagenasou

(upraveno podle <http://aetherforce.com/how-fluorescent-light-works/>)

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno po 110  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku pufru o  $\text{pH} = 7,6$ . Dále bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  vzorku (testované polyfenolové látky nebo 1,10-fenantrolin monohydrátu nebo DMSO), 20  $\mu\text{l}$  kolagenasy (1,05 mg/ml) a 20  $\mu\text{l}$  substrátu (0,6 mg/ml). Reakční směs byla inkubována při 25  $^{\circ}\text{C}$ . Byla měřena změna fluorescence při excitaci 495 nm/emisi 515 nm ihned po smíchání a pak po 10, 20 a 30 minutách. Měření bylo prováděno v dubletech ve 4 opakováních. Pro výpočet inhibice (%) byl použit vzorec:

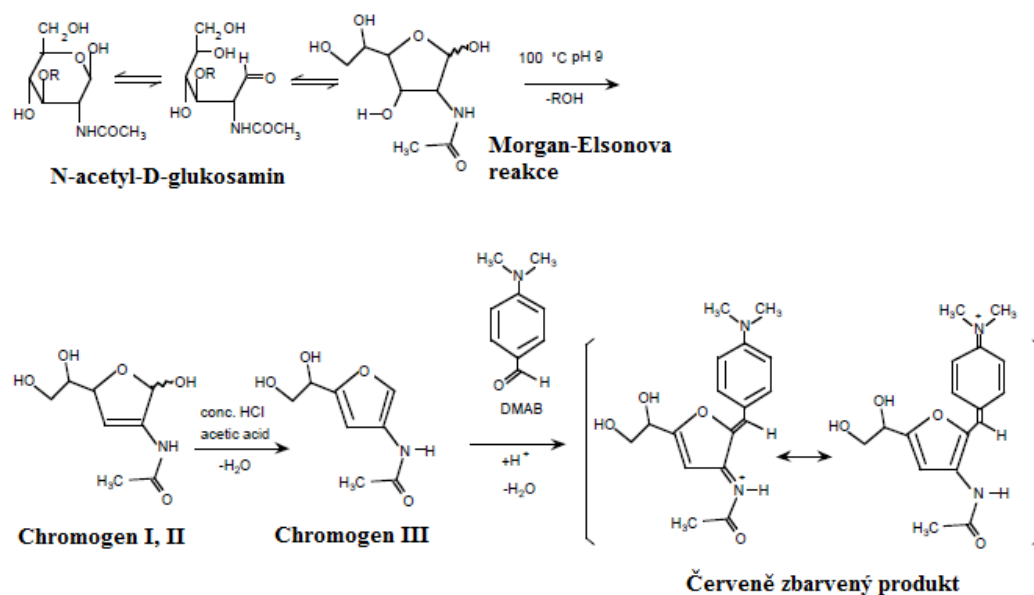
$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - [(A_{\text{vz}} - A_{\text{sl}})/(A_{\text{k}} - A_{\text{sl}})] \cdot 100,$$

kde  $A_{\text{vz}}$  je absorbance vzorku (kompletní reakční směs se substrátem, enzymem a příslušnou studovanou látkou),  $A_{\text{sl}}$  je absorbance slepého vzorku (reakční směs se substrátem, bez enzymu, DMSO místo testované látky) a  $A_{\text{k}}$  je absorbance kontrolního vzorku (reakční směs se substrátem, enzymem, DMSO místo testované látky).



#### 4.2.3.3. Stanovení antihyaluronidasové aktivity

Hyaluronidasa z hovězích varlat štěpí  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovou vazbu mezi N-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou v polymerním řetězci kyseliny hyaluronové za vzniku 3-(4-deoxy- $\beta$ -D-gluko-4-enuronosyl)-N-acetyl-D-glukosaminu, který je zahřátím na 100 °C v alkalickém prostředí převeden na chromogen I ( $\alpha$  konfigurace) a chromogen II ( $\beta$  konfigurace). Následně dochází v kyselém prostředí k dehydrataci za vzniku chromogenu III, který reaguje s p-dimethylaminobenzaldehydem (DMAB) za vzniku červeně zbarveného produktu (Morgan-Elsonova reakce, obr. 21) (Takahashi *et al.* 2003, Muckenschnabel *et al.*, 1998). Množství produktu je detekováno fluorometricky při excitaci 545 nm a emisi 612 nm. Jako standardní inhibitor byl použit hydrát aurothiomalátu sodného (SATMH; 2,8 mg/ml). Postup pro stanovení antihyaluronidasové aktivity byl modifikován podle Ndlovu *et al.* (2013).



Obr. 21: Princip Morgan-Elsonovy reakce (upraveno podle Takahashi *et al.*, 2003)

Do 2 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 25  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  (12,5 mM), 10  $\mu$ l vzorku (testované polyfenolové látky nebo SATMH nebo DMSO) a 10  $\mu$ l hyaluronidasy (1,5 mg/ml). Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 10 minut. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l kyseliny hyaluronové (1 mg/ml) a 15  $\mu$ l 0,02 M fosfátového pufru se 77 mM NaCl (pH = 7) s 0,01 % BSA a vše bylo inkubováno při 37 °C po dobu

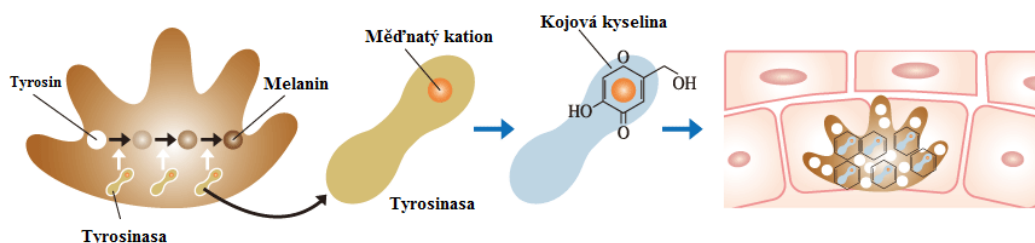
40 minut. Následně bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$   $\text{KBO}_2$  (0,8 M) a po 3 minutové inkubaci při 100  $^\circ\text{C}$  byla reakční směs ochlazena na pokojovou teplotu. Po ochlazení bylo do všech zkumavek přidáno 800  $\mu\text{l}$  činidla DMAB (4g DMAB/40 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 5 ml 10 N HCl) a směs byla opět inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Alikvot reakční směsi (200  $\mu\text{l}$ ) byl v dubletech přepipetován na mikrotitrační destičku a byla měřena fluorescence při excitaci 545 nm a emisi 612 nm. Měření bylo opakováno 5 krát. Procentuální inhibice byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - [(A_{vz} - A_{sl}) / (A_k - A_{sl})] \cdot 100,$$

kde  $A_{vz}$  je absorbance vzorku (kompletní reakční směs se substrátem, enzymem a příslušnou studovanou látkou),  $A_{sl}$  je absorbance slepého vzorku (reakční směs se substrátem, bez enzymu, DMSO místo testované látky) a  $A_k$  je absorbance kontrolního vzorku (reakční směs se substrátem, enzymem, DMSO místo testované látky).

#### 4.2.3.4. Stanovení antityrosinase aktivity

Tyrosinasa je enzym zapojený do procesu melanogeneze. Pro experiment byla použita tyrosinasa izolovaná z hub. Jako substrát byl použit 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), který byl tyrosinase oxidován za vzniku dopachinonu. Na spektrofotometru byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Běžně užívaným inhibátorem tyrosinasy je kojová kyselina (KK), která chelatuje měď v aktivním místě enzymu (obr. 22). Zásobní roztok kojové kyseliny byl ředěn DMSO na koncentrace 1, 5, 10, 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Postup pro stanovení antityrosinase aktivity byl modifikován podle studií Uchida *et al.* (2014) a Liang *et al.* (2014).



Obr. 22: Inhibice tyrosinasy kojovou kyselinou

(upraveno podle [www.chinaseniorsupplier.com](http://www.chinaseniorsupplier.com))

Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno po 10  $\mu$ l vzorku (testované polyfenolové látky nebo kojové kyseliny nebo DMSO), po té bylo přidáno 80  $\mu$ l substrátu L-DOPA (2,5 mM) a 70  $\mu$ l pracovního roztoku tyrosinasy (100 U/ml). Reakční směs byla inkubovaná při 25 °C. Po 10 minutách byla na spektrofotometru měřena absorbance při 450 nm. Měření bylo prováděno v dubletech ve 3 opakováních. Inhibice (%) tyrosinasy byla vypočtena podle vzorce:

$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - [(A_{vz} - A_{sl}) / (A_k - A_{sl})] \cdot 100,$$

kde  $A_{vz}$  je absorbance vzorku (kompletní reakční směs se substrátem, enzymem a příslušnou studovanou látkou),  $A_{sl}$  je absorbance slepého vzorku (reakční směs se substrátem, bez enzymu, DMSO místo testované látky) a  $A_k$  je absorbance kontrolního vzorku (reakční směs se substrátem, enzymem, DMSO místo testované látky).

#### **4.2.4. Vliv testovaných látek na produkci karbonylů**

##### **4.2.4.1. Kultivace fibroblastů**

Kůže byla transportována z Oddělení plastické a estetické chirurgie ve sterilním roztoku PBS obsahujícím penicilin (500 mg/ml), streptomycin (500 U/ml) a amphotericin B (1,25 mg/ml). V tomto roztoku byla ponechána asi 1 hodinu. Poté byla tkáň opláchnuta sterilním PBS a následně byla sterilně rozřezána na kousky o velikosti 1 cm<sup>2</sup>, které byly umístěny do Petriho misky a zality kultivačním médiem tak, aby povrch kůže nebyl překryt roztokem. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 37 °C a atmosféře obohacené o 5 % CO<sub>2</sub>. Médium bylo vyměňováno dle potřeby, obvykle každé 2-3 dny. Po pokrytí dna Petriho misky fibroblasty byly fragmenty kožní tkáně přeneseny do nové Petriho misky a kultivovány stejným způsobem, jako je popsáno výše. Buňky, které pokrývaly dno Petriho misky, byly opláchnuty PBS a uvolněny trypsinem. Poté bylo přidáno kultivační médium se sérem a následovala centrifugace při 328 x g po dobu 10 minut. Pelet byl rozsuspendován ve 20 ml kultivačního média se sérem, směs byla přenesena do kultivačních lahví s plochou 75 cm<sup>2</sup> a inkubována při 37 °C. Po dosažení monovrstvy byly buňky po uvolnění trypsinem rozděleny do více kultivačních lahví. Pro experimenty byly použity fibroblasty mezi 2. a 4. pasáží.

#### 4.2.4.2. Příprava fibroblastů pro experimenty

Po dosažení monovrstvy fibroblastů v kultivačních lahvích bylo slito kultivační médium se sérem. Naadherované buňky byly opláchnuty PBS a byl přidán 1 ml trypsinu. Po 10 minutové inkubaci bylo přidáno kultivační médium se sérem pro deaktivaci trypsinu. Buněčná suspenze byla přenesena do plastové zkumavky a centrifugována při 328 x g po dobu 10 minut. Vzniklý pelet buněk byl rozsuspendován v 20 ml kultivačního média se sérem. Poté bylo odebráno 10  $\mu$ l buněčné suspenze a smícháno s 10  $\mu$ l trypanové modři, směs byla nanesena pod krycí sklíčko Bürkerovy komůrky a mikroskopicky byl stanoven počet buněk. Buněčná suspenze byla poté naředěna kultivačním médiem se sérem tak, aby po vysetí na 6-ti jamkovou kultivační desku byla jejich koncentrace  $0,5 \cdot 10^5$  buněk/cm<sup>2</sup>. Buňky byly po vysetí inkubovány 24 hodin při 37 °C v inkubátoru a následně použity pro další experimenty.

#### 4.2.4.3. Ozařování buněk

Po 24 hodinové inkubaci bylo odstraněno kultivační médium. Monovrstva fibroblastů byla opláchnuta PBS, bylo přidáno 1,5 ml PBS s glukosou (1 mg/ml) a buňky byly vystaveny UVA záření. UVA záření iniciuje tvorbu ROS, které atakují buněčné makromolekuly včetně proteinů a indukují jejich oxidační poškození za vzniku karbonylovaných proteinů, které jsou po té stanovovány.

Byla zjišťována optimální dávka UVA záření, která vyvolá produkci karbonylovaných proteinů. Fibroblasty byly ozařovány dávkou UVA záření 5 a 10 J/cm<sup>2</sup>. Doba ozáření závisí na intenzitě záření (W/cm<sup>2</sup>) a byla vypočítána podle vzorce:

$$\text{Doba ozáření (min)} = \frac{\text{dávka (J/cm}^2\text{)} \cdot 1000}{\text{intenzita záření (W/cm}^2\text{)} \cdot 60}$$

Během ozařování byly desky s buňkami chlazeny, aby nedošlo k poškození buněk teplem. Současně byl prováděn experiment s buňkami, které nebyly vystaveny

UVA záření. Kontrolní buňky byly v době ozařování inkubovány v PBS s glukosou v inkubátoru při 37 °C ve tmě.

Po ozáření bylo odstraněno PBS s glukosou a bylo aplikováno bezsérové médium. Další postup byl shodný i pro buňky neozářené. Roztok PBS s glukosou byl odstraněn a k buňkám bylo přidáno 1,5 ml kultivačního média bez séra. Fibroblasty byly následně inkubovány při 37 °C po dobu 1, 2, 4 a 24 hodin. Po jednotlivých časových intervalech bylo stanovováno množství karbonylovaných proteinů.

#### **4.2.4.4. Toxicita polyfenolových látek**

Dále bylo zjišťováno, zda samotné testované polyfenolové látky nemají vliv na oxidační poškození fibroblastů. V DMSO byly nejprve připraveny zásobní roztoky silymarinu a flavonolignanů, které jsou v něm obsaženy. Zásobní roztoky byly ředěny v médiu tak, aby výsledná koncentrace byla 75, 25 a 12,5  $\mu\text{M}$  a obsah DMSO v médiu byl 0,5 %. Z kultivačních desek pokrytých monovrstvou fibroblastů bylo odstraněno kultivační médium se sérem. Do každé jamky bylo přidáno 1,5 ml kultivačního média bez séra s příslušnou koncentrací testované látky (12,5-75  $\mu\text{M}$ ). Kontrolní buňky obsahovaly místo testované látky stejný alikvot DMSO. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 a 24 hodin, následně bylo stanovováno množství karbonylovaných proteinů.

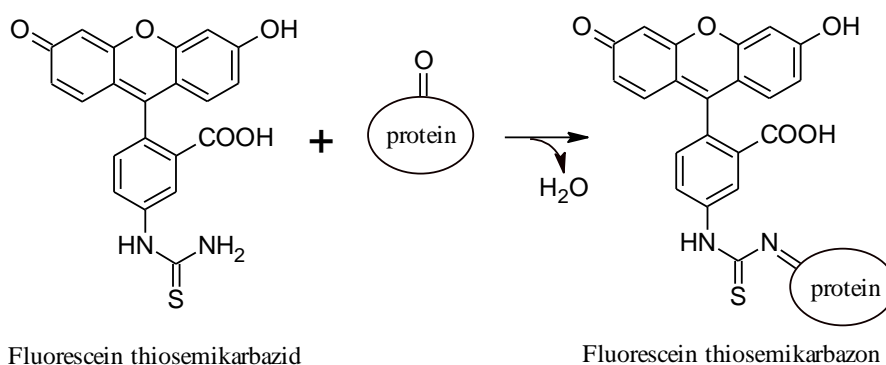
#### **4.2.4.5. Vliv testovaných látek na produkci karbonylů vyvolaných působením UVA záření**

Fibroblasty byly preinkubovány s testovanými látkami o koncentraci 12,5 a 25  $\mu\text{M}$  v inkubátoru při 37 °C po dobu 1 hodiny v bezsérovém médiu. Následně bylo odstraněno kultivační médium, buňky byly opláchnuty PBS a bylo přidáno 1,5 ml PBS s glukosou. Buňky byly ozařovány dávkou UVA záření 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Po ozařování byl roztok PBS s glukosou nahrazen kultivačním médiem bez séra. Paralelně byl opět prováděn pokus s buňkami, které ozářeny nebyly. Fibroblasty byly inkubovány při 37 °C 24 hodin. Poté bylo stanoveno množství karbonylovaných proteinů.

#### 4.2.4.6. Stanovení karbonylovaných proteinů

ROS generované během UVA ozařování mohou oxidovat proteiny za vzniku karbonylovaných derivátů. Kvantifikace obsahu karbonylovaných proteinů vztažená na obsah proteinů je měřítkem oxidačního poškození proteinu.

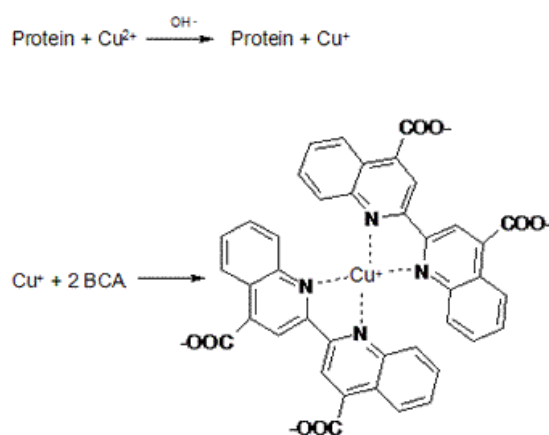
Fluorescenční sonda fluorescein thiosemikarbazid (FTC) specificky reaguje s karbonylovými skupinami oxidovaných proteinů. 1 mol FTC reaguje s 1 molem karbonylu za vzniku 1 molu thiosemikarbazonu, u něhož je měřena fluorescence při excitaci 485 nm a emisi 535 nm (obr. 23). Postup pro stanovení karbonylovaných proteinů byl modifikován podle Mohanty *et al.* (2010).



Obr. 23: Reakční schéma fluorescein thiosemikarbazidu s karbonylovaným proteinem

Z fibroblastů bylo odstraněno kultivační médium. Buňky byly opláchnuty PBS, seškrábnuty do PBS a centrifugovány (1000 ot/min) při 4 °C po dobu 10 minut. Po odstranění PBS byly buňky lyzovány v 50  $\mu$ l lyzačního roztoku, bylo přidáno 50  $\mu$ l 200  $\mu$ M FTC a směs byla inkubována přes noc ve tmě. Proteiny byly vysráženy přidáním 400  $\mu$ l ledového roztoku 20 % TCA. Po 10 minutové inkubaci na ledu byla směs centrifugována (10 000 ot/min) při 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odsán. Nezareagovaný FTC byl odstraněn přidáním 1 ml acetonu, směs byla vortexována a centrifugována (10 000 ot/min) při 4 °C 10 minut. Tento proces byl opakován 3 krát. Po odsátí acetonu byly proteiny ponechány na vzduchu, aby uschly. Po vysušení byly proteiny rozpuštěny v 50  $\mu$ l 6 M guanidinu HCl. Následně bylo přidáno 450  $\mu$ l 0,1 M  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$  (pH=7). Na mikrotitrační destičku bylo napipetováno 150  $\mu$ l roztoku a byla měřena fluorescence při excitaci 485 nm a emisi 535 nm.

Ve stejném alikvotu byla měřena celková koncentrace proteinů bicinchoninovou kyselinou. Metoda je založena na redukci měďnatého iontu na měďný proteinem v alkalickém prostředí a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku purpurového komplexu (obr. 24). Pro spektrofotometrické stanovení celkových proteinů bylo k 10  $\mu\text{l}$  roztoku přidáno 200  $\mu\text{l}$  směsi roztoku A a B v poměru 50:1. Po 15 minutové inkubaci byla měřena absorbance při 562 nm. Byly připraveny také standardní roztoky hovězího sérového albuminu o koncentraci 0,05-1 mg/ml, u nichž byla měřena absorbance. Poté byla sestrojena kalibrační křivka (graf závislosti absorbance na koncentraci), ze které byla odečtena koncentrace proteinů. Podíl naměřené fluorescence a celkové koncentrace proteinů odpovídá množství karbonylovaných proteinů. Měření bylo prováděno v dubletech ve 4 nezávislých opakováních.



Obr. 24: Reakční schéma stanovení proteinů bicinchoninovou kyselinou

(upraveno podle <http://nfsc4500101groupa.weebly.com/bca-assay-for-protein-determination.html>)

#### 4.2.5. Statistická analýza

Všechny experimenty byly provedeny v dubletech v minimálně 3 nezávislých opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny v programu MS Excel 2010 a jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí Studentova t-testu.

## 5. Výsledky

### 5.1. Stanovení aktivity enzymů

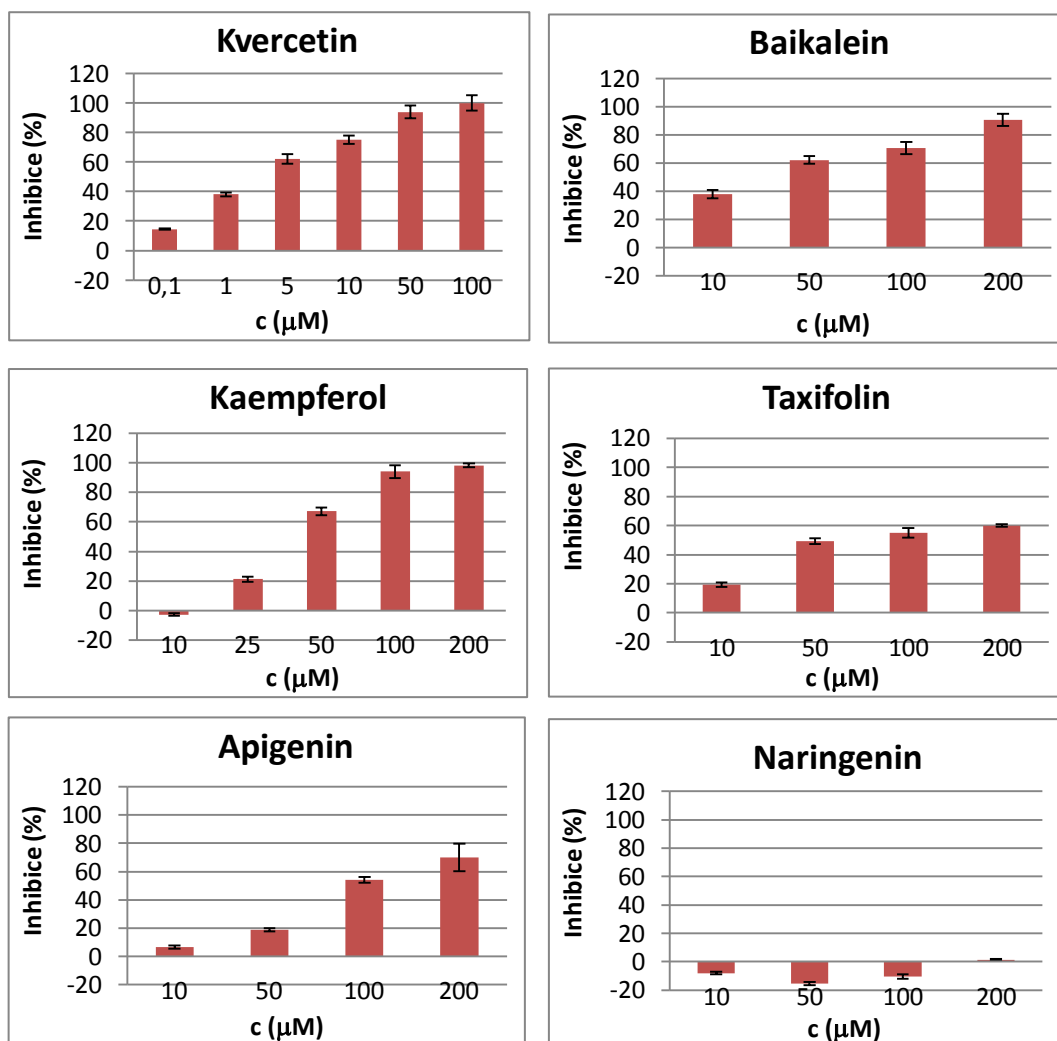
#### 5.1.1. Stanovení antielastasové aktivity

V tomto experimentu byly zkoumány vybrané polyfenolové látky o různých koncentracích (0,1 až 200  $\mu\text{M}$ ) pro jejich potenciální antielastasovou aktivitu. U dehydrosilybinu byla použita maximální koncentrace 100  $\mu\text{M}$  z důvodu omezené rozpustnosti. Působením elastasy je substrát N-sukcinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid štěpen a uvolňuje se žlutý p-nitroanilin. Množství vzniklého produktu bylo sledováno jako změna A/min při 410 nm. Jako pozitivní kontrola byla použita kyselina oleanolová (KO).

Výsledky z měření antielastasové aktivity flavonoidů, silymarinu a jeho flavonolignanů jsou shrnuty na obr. 25 a 26, hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (tj. koncentrace látky, při níž dochází k 50 % inhibici aktivity enzymu) jednotlivých polyfenolů jsou uvedeny v tabulce 2. Ve většině případů byl sledován nárůst inhibice elastasy se zvyšující se koncentrací testovaných polyfenolových látek. U kyseliny oleanolové je hodnota  $\text{IC}_{50} = 10,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ .

Z testovaných flavonoidů vykazuje nejvyšší antielastasovou aktivitu kvercetin (obr. 25). Jeho  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena na  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , kvercetin je tedy 5 krát aktivnější než kyselina oleanolová. Efekt baikaleinu ( $\text{IC}_{50} = 28,6 \pm 2,5 \mu\text{M}$ ), kaempferolu ( $\text{IC}_{50} = 38,4 \pm 2,7 \mu\text{M}$ ), taxifolinu ( $\text{IC}_{50} = 52,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ) a apigeninu ( $\text{IC}_{50} = 91,1 \pm 3,8 \mu\text{M}$ ) na aktivitu elastasy je nižší v porovnání s kyselinou oleanolovou. U naringeninu nebylo možné hodnotu  $\text{IC}_{50}$  stanovit. Při nižších koncentracích (10-100  $\mu\text{M}$ ) byl spíše pozorován nárůst reakční rychlosti, tedy aktivace enzymu a při nejvyšší použité koncentraci 200  $\mu\text{M}$  nebyl pozorován efekt na aktivitu elastasy. Vyšší koncentrace nebyly použity z důvodu rozpustnosti.

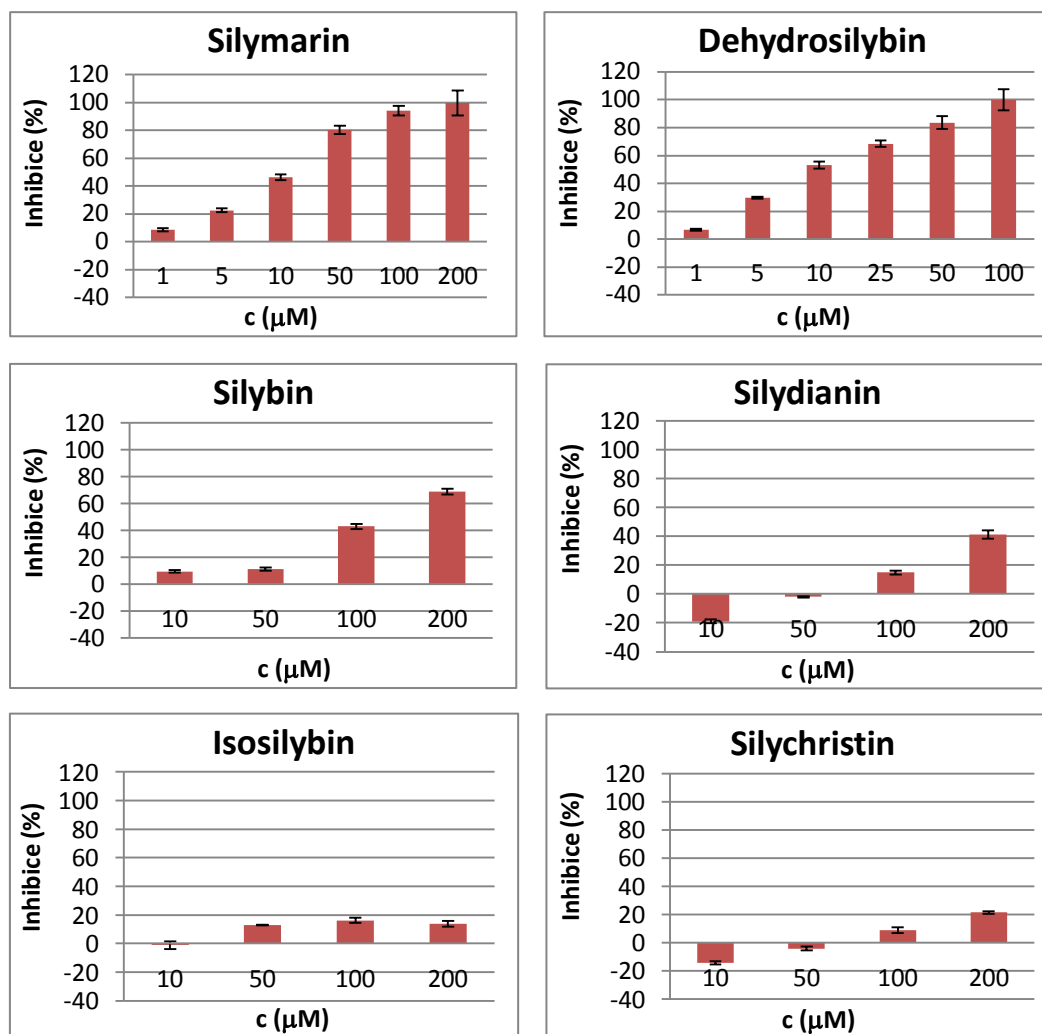




Obr. 25: Vliv testovaných flavonoidů na aktivitu elastasy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % inhibice aktivity elastasy. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

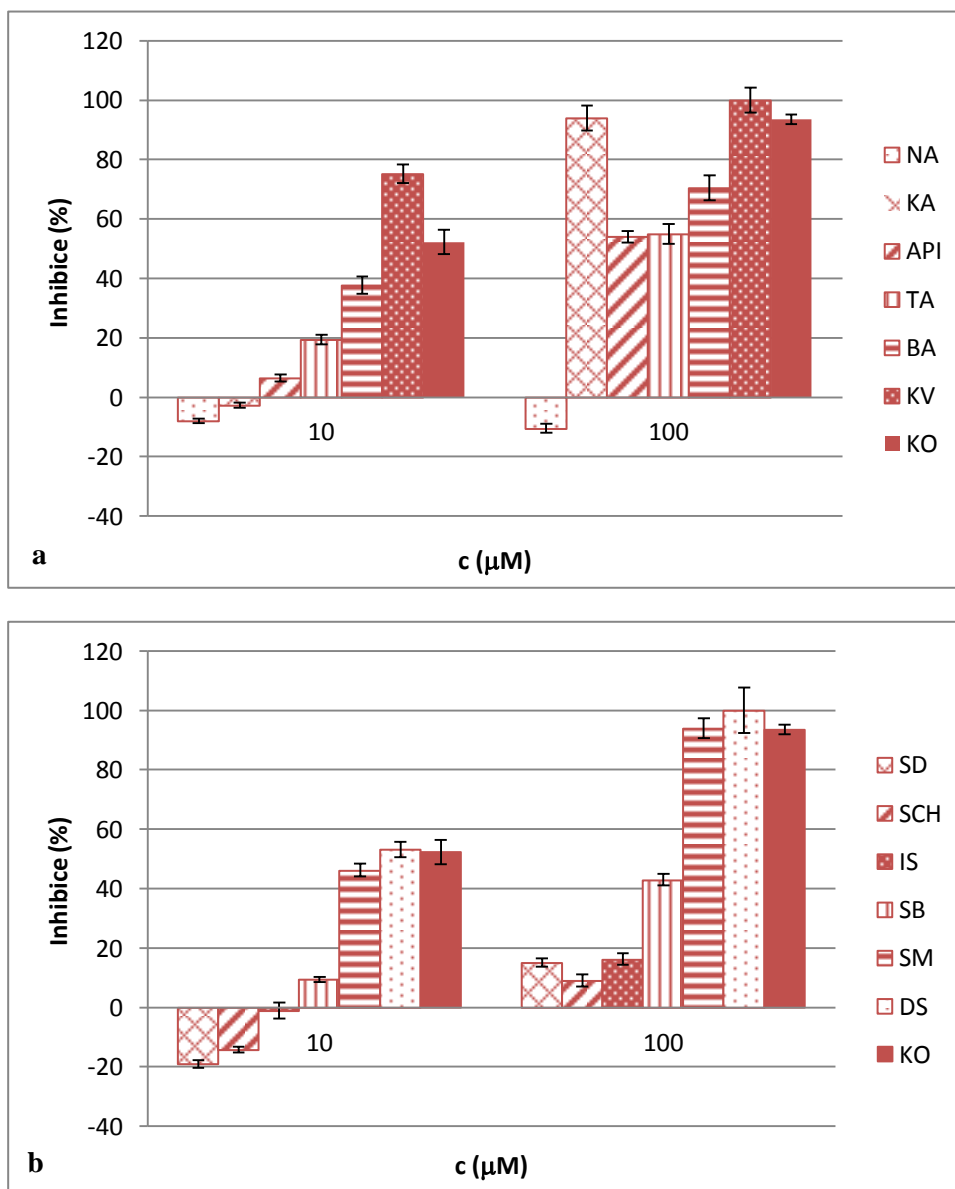
Ze všech studovaných flavonolignanů (obr. 26) byl nejúčinnější dehydrosilybin ( $IC_{50} = 8,6 \pm 0,5 \mu M$ ). Dehydrosilybin byl signifikantně lepší než standardní inhibitor (KO), stejně jako kvercetin. Vysoká inhibice byla stanovena i u silymarinu.  $IC_{50}$  je rovna  $12,8 \pm 0,9 \mu M$ , silymarin tedy vykazuje podobný inhibiční účinek jako kyselina oleanolová. U silybinu byla naměřena hodnota  $IC_{50}$  při koncentraci  $122,6 \pm 4,8 \mu M$ . U dalších testovaných flavonolignanů nebylo možné  $IC_{50}$  stanovit. Tyto látky mají na inhibici elastasy zanedbatelný vliv v porovnání s kyselinou oleanolovou, což vyplývá i z obr. 27. U silychristinu a silydianinu můžeme při nižších

koncentracích pozorovat pozitivní efekt na aktivitu enzymu elastasy, obdobně jako u naringeninů.



Obr. 26: Vliv silymarinu a jeho flavonolignanů na aktivitu elastasy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % inhibice aktivity elastasy. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

Pro porovnání inhibičních účinků flavonoidů, silymarinu a jeho flavonolignanů a kyseliny oleanolové při koncentraci 10 a 100 μM je vložen obr. 27.



Obr. 27: Porovnání účinku testovaných polyfenolů na aktivitu elastasy a) flavonoidy a kyselina oleanolová, b) silymarin, flavonolignany a kyselina oleanolová. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % inhibice aktivity elastasy. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

Tabulka 2: Hodnoty IC<sub>50</sub> (μM) testovaných flavonoidů, silymarinu a jeho flavonolignanů pro enzym elastasu z lidských neutrofilů. N.S. znamená, že u látek nebylo možné hodnotu IC<sub>50</sub> stanovit pro nízkou účinnost. Data představují průměr z 3 nezávislých měření. # Hodnota je statisticky významně odlišná od kyseliny oleanolové (IC<sub>50</sub> = 10,8 ± 0,6 μM) (p<0,05).

Flavonoidy	IC <sub>50</sub> (μM)	Flavonolignany	IC <sub>50</sub> (μM)
Kvercetin	2,1 ± 0,7 #	Dehydrosilybin	8,6 ± 0,5 #
Baikalein	28,6 ± 2,5	Silymarin	12,8 ± 0,9
Kaempferol	38,4 ± 2,7	Silybin	122,6 ± 4,8
Taxifolin	52,1 ± 0,9	Silydianin	N.S.
Apigenin	91,1 ± 3,8	Isosilybin	N.S.
Naringenin	N.S.	Silychristin	N.S.

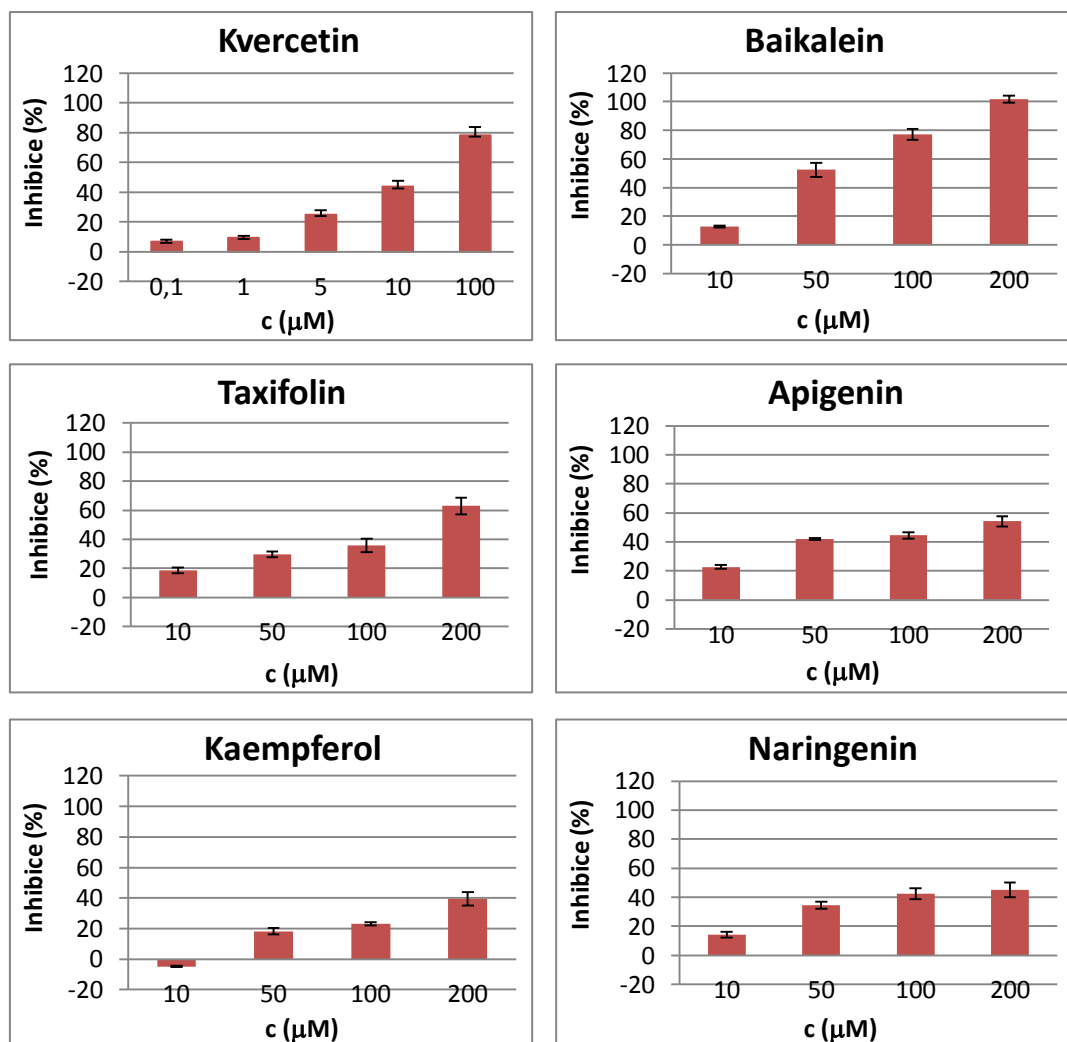
### 5.1.2. Stanovení antikolagenasové aktivity

Potenciální inhibiční účinky flavonoidů, silymarinu a jeho flavonolignanů na aktivitu kolagenasy byly studovány s využitím fluorescenčně značeného kolagenu. Substrát kolagen s navázaným fluoresceinem byl hydrolyzován kolagenasou, což se projevilo nárůstem fluorescence. Inhibicí aktivity kolagenasy vhodnými inhibitory lze tento proces kolagenolýzy zpomalit. Jako pozitivní kontrola je běžně využíván inhibitor matrixových metaloproteinás 1,10-fenantrolin (FE).

Naměřené výsledky inhibice kolagenasy flavonoidy, silymarinem a flavonolignany jsou zobrazeny v grafech na obr. 28 a 29, hodnoty jejich IC<sub>50</sub> jsou shrnuty v tabulce 3. Z grafů na obr. 28 a 29 lze vidět, že inhibice kolagenasy se zvyšující se koncentrací polyfenolových látek narůstá, stejně jako tomu bylo v případě elastasy. U standardního inhibitoru 1,10-fenantrolinu byla IC<sub>50</sub> stanovena při koncentraci 161,3 ± 4,6 μM.

Ze všech testovaných flavonoidů (obr. 28) měl nejvýraznější inhibiční efekt kvercetin, jehož IC<sub>50</sub> byla nalezena již při koncentraci 17,4 ± 1,2 μM. Také baikalein vykazoval signifikantně vyšší inhibiční účinky (IC<sub>50</sub> = 94,6 ± 5,1 μM) v porovnání se standardním inhibitorem (FE). U taxifolinu a apigeninu byla stanovena téměř stejná

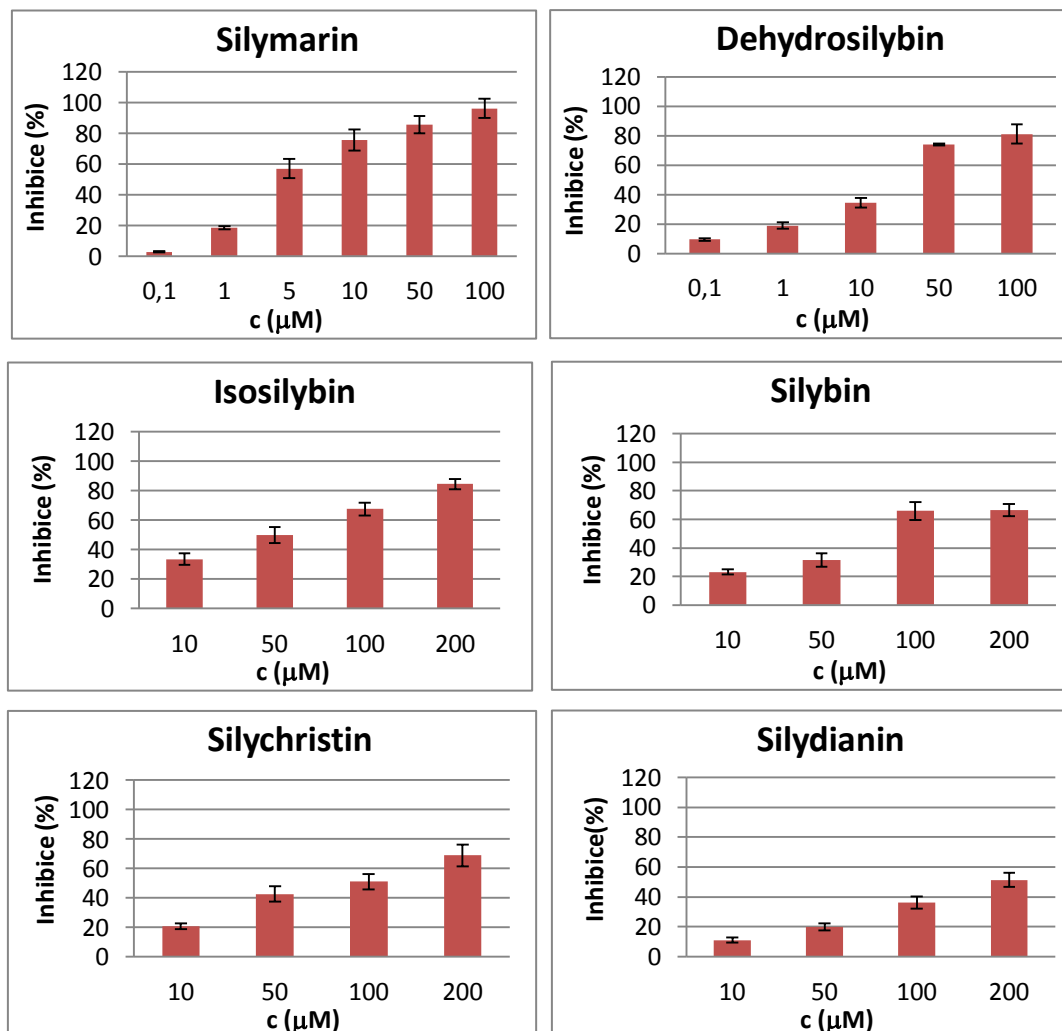
antikolagenasová aktivita jako u 1,10-fenantrolinu. Nejmenší efekt na enzym kolagenasu byl prokázán u kaempferolu a naringeninu, jejichž hodnota  $IC_{50}$  převyšovala nejvyšší testovanou koncentraci 200  $\mu M$ .



Obr. 28: Vliv testovaných flavonoidů na aktivitu kolegenasy. Hodnoty jsou vyjádřeny v % inhibice. Data představují průměr ze 4 nezávislých měření.

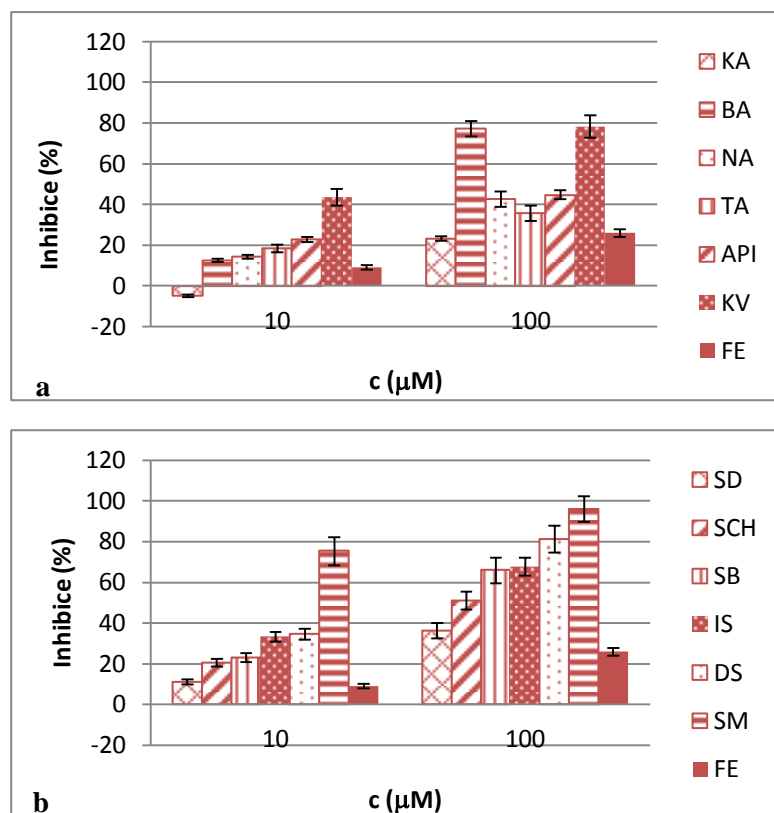
Z tabulky 3 je patrné, že silymarin a jeho flavonolignany vykazují v porovnání s testovanými flavonoidy mnohem větší inhibiční účinky na aktivitu kolagenasy. Nejvyšší antikolagenasovou aktivitu má silymarin, jeho  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci  $4,2 \pm 0,6 \mu M$ . Velmi účinný je i dehydrosilybin s koncentrací  $IC_{50} = 23,4 \pm 2,9 \mu M$ . U isosilybinu a silybinu byla naměřena asi 3 krát vyšší účinnost než u 1,10-fenantrolinu.

U silychristinu byl také prokázán signifikantně větší inhibiční účinek než u standardu (FE). Z flavonolignanů vykazoval nejmenší vliv na kolagenasu silydianin s  $IC_{50} = 190,3 \pm 4,4 \mu\text{M}$ .



Obr. 29: Vliv silymarinu a jeho flavonolignanů na aktivitu kolagenasy. Hodnoty jsou vyjádřeny v % inhibice. Data představují průměr ze 4 nezávislých měření.

Inhibiční účinky jednotlivých flavonoidů, silymarinu a flavonolignanů a 1,10-fenantrolinu při koncentracích 10 a 100  $\mu\text{M}$  jsou shrnuty v grafech na obr. 30.



Obr. 30: Porovnání účinku testovaných polyfenolů na aktivitu kolagenasy a) flavonoidy a 1,10-fenantrolin, b) silymarin, flavonolignany a 1,10-fenantrolin. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % inhibice aktivity kolagenasy. Data představují průměr ze 4 nezávislých měření.

Tabulka 3: Hodnoty  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) testovaných flavonoidů, silymarinu a flavonolignanů pro kolagenasu z *Clostridium histolyticum*. Data představují průměr ze 4 nezávislých měření. # Hodnota je statisticky významně odlišná od 1,10-fenantrolinu ( $IC_{50} = 161,3 \pm 4,6 \mu M$ ) ( $p < 0,005$ ).

Flavonoidy	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	Flavonolignany	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
KV	$17,4 \pm 1,2$ #	SM	$4,2 \pm 0,6$ #
BA	$94,6 \pm 5,1$ #	DS	$23,4 \pm 2,9$ #
TA	$153,1 \pm 5,3$	IS	$50,8 \pm 4,5$ #
API	$154,3 \pm 2,9$	SB	$52,2 \pm 5,0$ #
KA	>200	SCH	$95,9 \pm 5,7$ #
NA	>200	SD	$190,3 \pm 4,4$

### 5.1.3. Stanovení antihyaluronidasové aktivity

Potenciální inhibiční účinky polyfenolových látek byly zkoumány také u hyaluronidasy. Hyaluronidasa hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou za vzniku 3-(4-deoxy- $\beta$ -D-gluko-4-enuronosyl)-N-acetyl-D-glukosaminu. Množství uvolněného produktu je monitorováno měřením fluorescence při excitaci 545 nm a emisi 612 nm. Jako standardní inhibitor byl použit hydrát aurothiomalátu sodného (SATMH).

U studovaných polyfenolových látek nebyly prokázány výraznější inhibiční účinky na aktivitu hyaluronidasy. Při 200  $\mu$ M koncentraci látek dosahovala inhibice hyaluronidasy méně než 10 %. Stanovení inhibice hyaluronidasy při vyšších koncentracích polyfenolů je bezvýznamné. Lze tedy konstatovat, že testované flavonoidy, silymarin a flavonolignany, které jsou v něm obsaženy, aktivitu hyaluronidasy neovlivňují.

### 5.1.4. Stanovení antityrosinasové aktivity

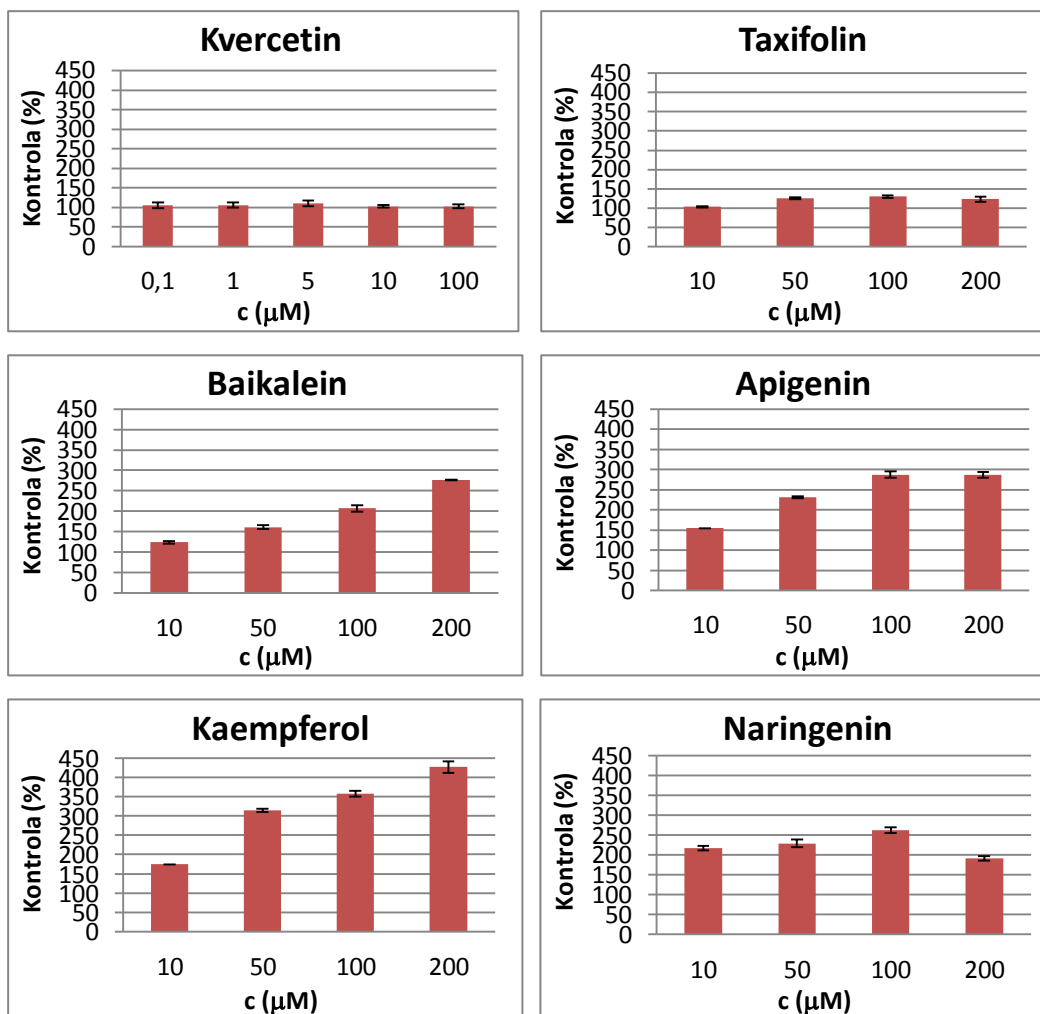
Byl zkoumán také vliv polyfenolových látek na aktivitu tyrosinasy. Tyrosinasa oxiduje L-DOPU na dopachinon, který absorbuje záření o vlnové délce 450 nm. Jako standardní inhibitor byla použita kojová kyselina (KK).

U kojové kyseliny byla stanovena  $IC_{50}$  při koncentraci  $5,2 \pm 0,6 \mu$ M. Studované polyfenolové látky nesnižují aktivitu tyrosinasy. Flavonoidy, silymarin a jeho flavonolignany aktivitu tyrosinasy naopak zvyšují, což ukazují grafy na obr. 31 a 32. Výsledné hodnoty jsou vztaženy ke vzorku, který obsahoval stejný objem čistého rozpouštědla, tedy DMSO, což bylo považováno jako kontrola, která má hodnotu 100 %. Jestliže je hodnota kontroly testované polyfenolové látky vyšší než 100 %, pak je tyrosinasa danou látkou aktivována.

Z grafů kvercetinu a taxifolinu na obr. 31 je vidět, že s rostoucí koncentrací kvercetinu a taxifolinu se % kontroly téměř nemění, tyrosinasa tedy není těmito flavonoidy aktivována. Výrazné účinky na aktivitu tyrosinasy lze pozorovat u baikaleinu, apigeninu a kaempferolu (obr. 31). Se zvyšující se koncentrací těchto látek aktivita tyrosinasy narůstá. Nejvyšší pozitivní účinky na aktivitu tyrosinasy vykazuje

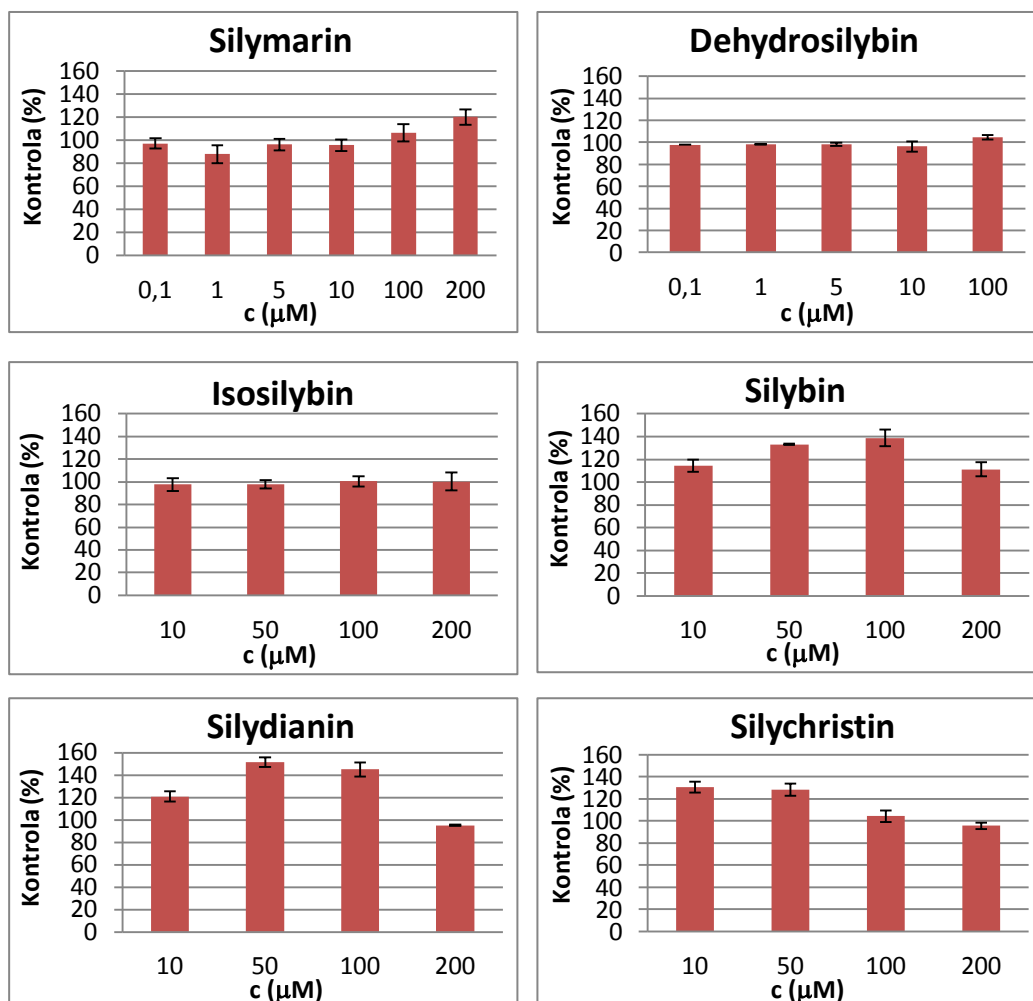


kaempferol. U naringenin (obr. 31) byla aktivace maximální při koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , při vyšší koncentraci byl pozorován pokles aktivity tyrosinasy.



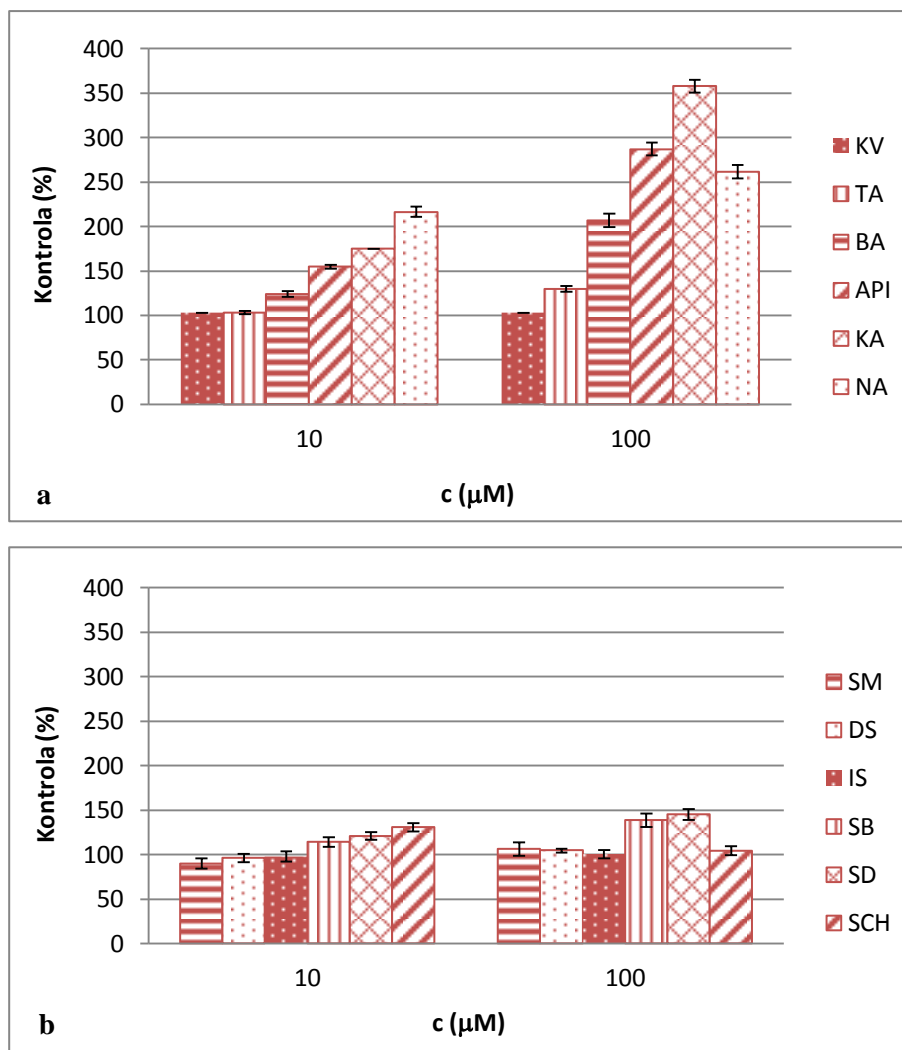
Obr. 31: Vliv testovaných flavonoidů na aktivitu tyrosinasy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

U silymarinu, dehydrosilybinu a isosilybinu (obr. 32) není pozorován téměř žádný efekt na aktivitu tyrosinasy. Z flavonolignanů tyrosinasu aktivuje pouze silybin, silydianin a silychristin (obr. 32) při nižších testovaných koncentracích, kdy dochází maximálně k nárůstu aktivity o 40 %. Silychristin má maximální aktivační účinky již při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Při nejvyšší koncentraci (200  $\mu\text{M}$ ) je pozorován pokles aktivity na hodnotu kontroly (100 %).



Obr. 32: Vliv silymarinu a jeho flavonolignanů na aktivitu tyrosinasy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

Na obr. 33 lze porovnat účinky flavonoidů, silymarinu i jeho flavonolignanů na aktivitu tyrosinasy při koncentracích 10 a 100 µM. Z grafů na obr. 33 jasně vyplývá, že flavonoidy jsou mnohem účinnějšími aktivátory tyrosinasy v porovnání se silymarinem a jeho flavonolignany, jež tento extrakt obsahuje.



Obr. 33: Porovnání účinku testovaných polyfenolů na aktivitu tyrosinasy a) flavonoidy, b) silymarin a jeho flavonolignany. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly. Data představují průměr z 3 nezávislých měření.

## 5.2. Vliv testovaných látek na produkci karbonylů

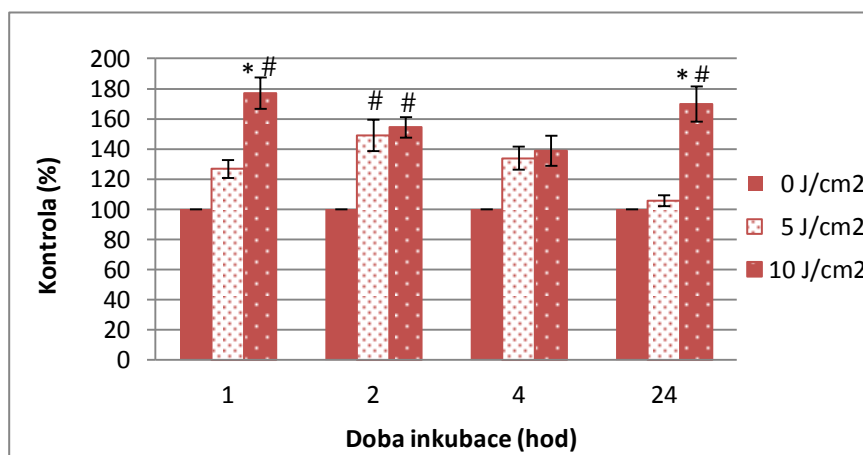
### 5.2.1. Stanovení optimální dávky UVA záření

UVA ozáření způsobuje produkci ROS, které oxidačně modifikují proteiny a vznikají jejich karbonylované deriváty. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaká dávka UVA záření je schopna vyvolat tvorbu karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech *in vitro*. Monovrstva fibroblastů byla vystavena dávce

UVA záření 5 a 10 J/cm<sup>2</sup> a v různých časových intervalech (1, 2, 4 a 24 hodin) byla poté měřena hladina karbonylovaných proteinů a koncentrace proteinů. Hodnota karbonylovaných proteinů byla vztažena ke koncentraci proteinů ve vzorku. Hodnoty karbonylovaných proteinů ve vzorku byly vztaženy k buňkám, které nebyly ozařovány UVA zářením. Tyto buňky jsou považovány za kontrolu, která má hodnotu 100 %. Pokud je hodnota kontroly ozářených buněk vyšší než 100 %, dochází k tvorbě karbonylovaných derivátů.

S rostoucí dávkou UVA záření v jednotlivých časových intervalech množství karbonylovaných derivátů narůstá (obr. 34). Nejvyšší produkce karbonylovaných derivátů je vyvolána dávkou UVA záření 10 J/ cm<sup>2</sup>. Tato dávka UVA záření byla zvolena pro ozáření fibroblastů v experimentech, v kterých byl studován vliv polyfenolových látek na poškození fibroblastů způsobené UVA zářením.

Z grafu na obr. 34 je také vidět, že nejvyšší produkce karbonylovaných derivátů po ozáření dávkou UVA záření 10 J/ cm<sup>2</sup> je dosaženo již po 1 hodinové inkubaci. Po 2 a 4 hodinové inkubaci buněk došlo k mírnému poklesu tvorby karbonylů. Po 24 hodinové inkubaci byla hladina karbonylovaných proteinů opět zvýšena. Nejvyšší nárůst produkce karbonylovaných proteinů byl tedy zaznamenán po 1 a 24 hodin od působení UVA záření.

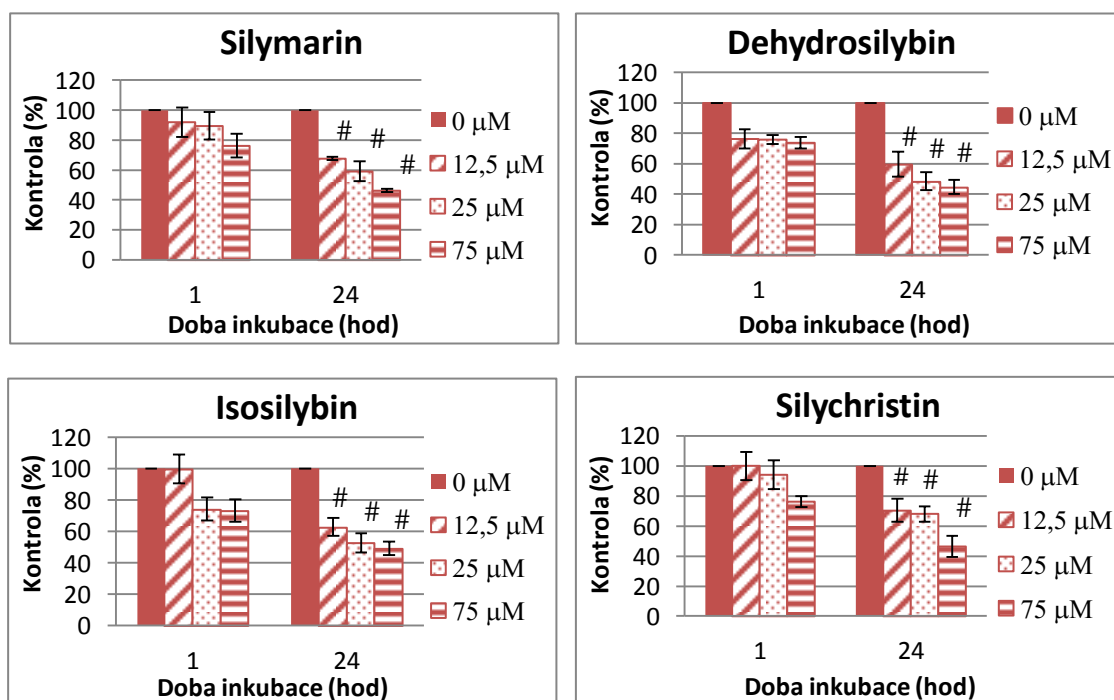


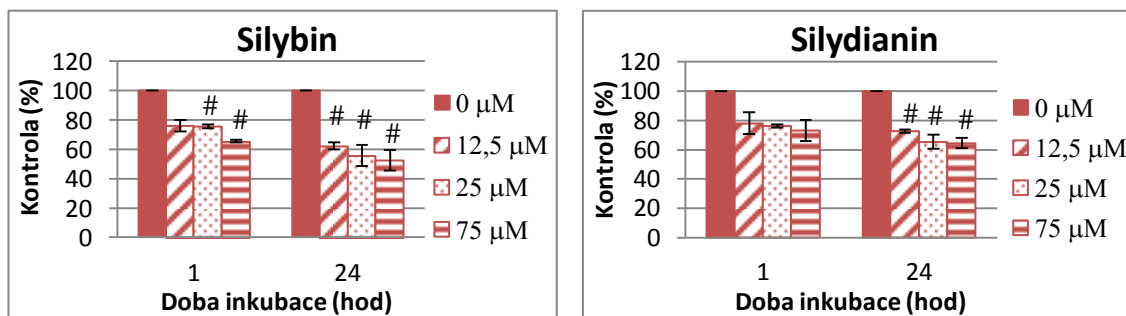
Obr. 34: Vliv UVA záření na produkci karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly. Data představují průměr z 3 nezávislých měření. # Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p<0,05). \* Hodnota je statisticky významně odlišná od UVA ozářeného vzorku dávkou 5 J/cm<sup>2</sup> (p<0,05).

## 5.2.2. Toxicita polyfenolových látek

Dále bylo zkoumáno, zda samotné testované polyfenolové látky nejsou toxické a nevyvolávají oxidační modifikaci proteinů ve fibroblastech. Fibroblasty byly preinkubovány se silymarinem a flavonolignany o koncentraci 12,5-75  $\mu\text{M}$  po dobu 1 a 24 hodin. Poté byla zjišťována hladina oxidačně modifikovaných proteinů ve fibroblastech stanovením obsahu karbonylovaných proteinů a koncentrace proteinů. Kontrolní buňky obsahovaly místo testované látky pouze rozpouštědlo, tedy stejný alikvot DMSO. Hodnota kontroly těchto buněk byla považována za 100 %.

Z grafů na obr. 35 je vidět, že již po 1 hodině inkubace klesá obsah karbonylovaných proteinů s rostoucí koncentrací polyfenolových látek v porovnání s kontrolním vzorkem. Po 24 hodinové inkubaci je pokles ještě více prohlouben. Silymarin a testované flavonolignany tedy nevyvolávají oxidační poškození proteinů. Snížený obsah karbonylovaných proteinů naopak poukazuje na antioxidační vlastnosti všech testovaných polyfenolových látek, včetně silymarinu.





Obr. 35: Vliv silymarinu a jeho flavonolignanů na hladinu karbonylovaných proteinů v lidských kožních fibroblastech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % kontroly. Data představují průměr z 3 nezávislých měření. # Hodnota je statisticky významně odlišná od kontroly ( $p < 0,05$ ).

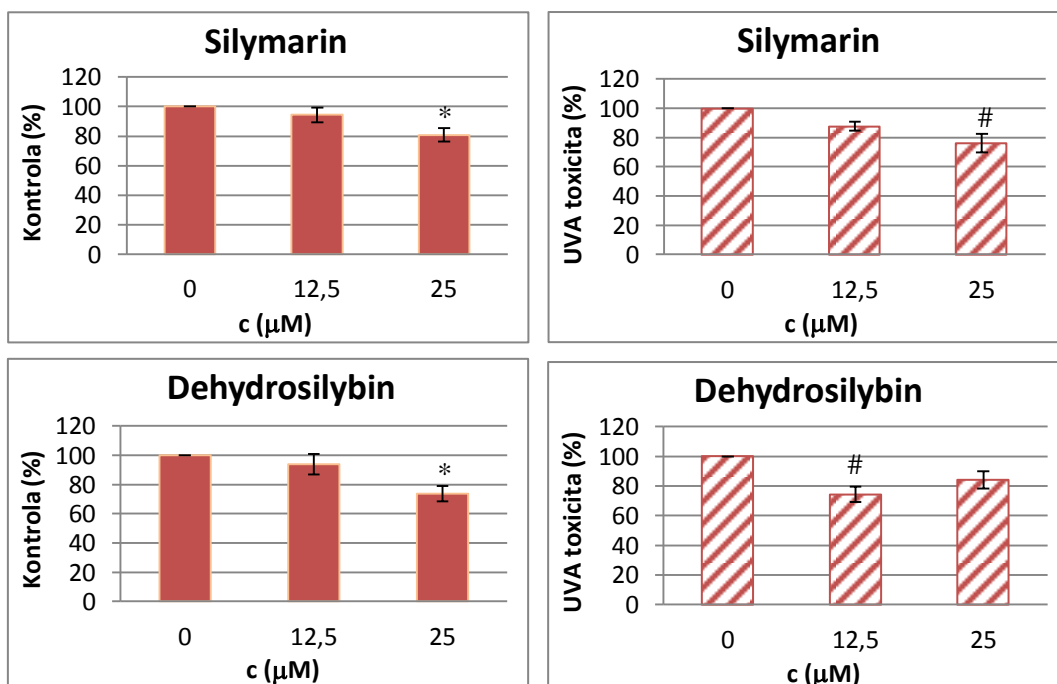
### 5.2.3. Vliv testovaných látek na produkci karbonylů vyvolaných působením UVA záření

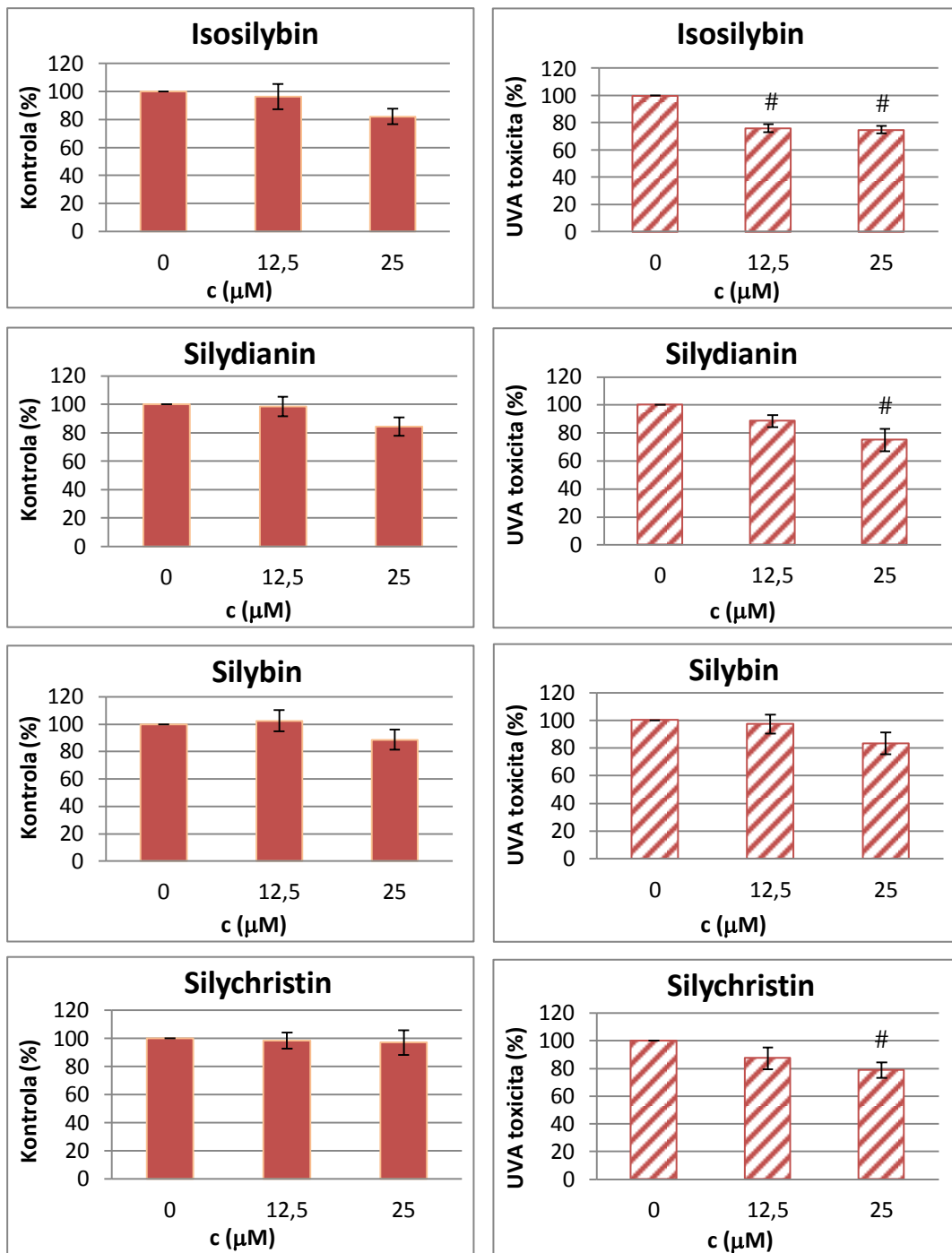
Protože testované flavonolignany a silymarin nemají toxický efekt, naopak byl pozorován ochranný efekt, bylo u nich zkoumáno, jestli nejsou schopny ovlivnit tvorbu karbonylovaných proteinů vzniklých působením UVA ozáření. Fibroblasty byly 1 hodinu inkubovány se silymarinem a flavonolignany (12,5 a 25  $\mu\text{M}$ ) a poté byly buňky ozářeny dávkou UVA záření 10 J/  $\text{cm}^2$  a inkubovány v médiu bez séra 24 hodin. Následně byl stanoven obsah karbonylovaných proteinů. Paralelně byly fibroblasty inkubovány pouze v médiu s DMSO (0,5 %) a ozářeny, jejich hodnota odpovídala 100 % UVA toxicity. Současně byl proveden i experiment s fibroblasty, které byly inkubovány pouze v médiu s testovanými látkami a tyto buňky nebyly ozářeny. Kontrola (100 % kontroly) odpovídala fibroblastům preinkubovaným v médiu s DMSO (0,5 %), které nebyly ozářeny.

Vliv silymarinu a flavonolignanů na ozářené i neozářené buňky je popsán v grafech na obr. 36. U buněk, které nebyly vystaveny UVA záření (grafy vlevo) je vidět, že působením polyfenolových látek je tvorba karbonylovaných proteinů snižována. Největší snížení bazální hladiny karbonylovaných proteinů

bylo pozorováno u silymarinu a dehydrosilybinu. Silychristin prakticky neovlivňoval bazální hladinu karbonylovaných proteinů.

V grafech vpravo na obr. 36 je zobrazen vliv polyfenolových látek na produkci karbonylů vzniklých po UVA ozáření. S rostoucí koncentrací polyfenolových látek hladina karbonylovaných proteinů klesá, což potvrzuje, že látka má antioxidační vlastnosti. Výrazné ochranné účinky vykazoval silymarin, při koncentraci 25  $\mu\text{M}$  byla signifikantně snížena hladina karbonylovaných proteinů (o 24 %) oproti pozitivní kontrole (UVA záření). U dehydrosilybinu při koncentraci 12,5  $\mu\text{M}$  signifikantně klesla hladina karbonylů (o 26 %) v porovnání s ozářenými buňkami. Při vyšší koncentraci dehydrosilybinu (25  $\mu\text{M}$ ) jsou ochranné účinky nižší (pokles jen o 16 %), což naznačuje, že při vyšší koncentraci dehydrosilybinu se projeví jeho prooxidační účinky. U silybinu bylo pozorováno snížení hladiny karbonylovaných proteinů, ale při žádné z koncentrací nebyl pozorován signifikantní pokles. I když silychristin nevykazoval vliv na hladinu karbonylovaných proteinů v neozářených fibroblastech, u ozářených fibroblastů byl pozorován ochranný efekt (snížení hladiny karbonylovaných proteinů), což je vidět v obr. 38. Ochranné vlastnosti polyfenolových látek korelují s jejich antioxidačními účinky a schopností eliminovat ROS, které jsou generovány UVA zářením.



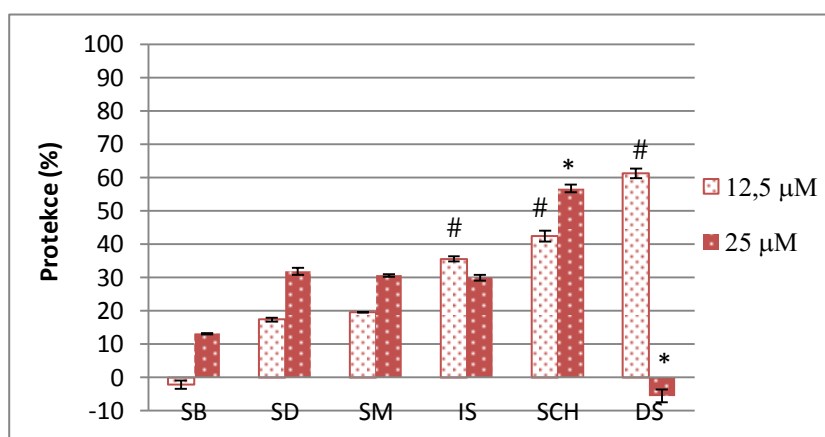


Obr. 36: Vliv silymarinu a jeho flavonolignanů na produkci karbonylovaných proteinů. Pro neozářené buňky jsou hodnoty vyjádřeny jako % kontroly (viz. plné sloupce). Pro buňky ozářené dávkou UVA záření 10 J/ cm<sup>2</sup> jsou hodnoty vyjádřeny jako % UVA toxicity (viz. šrafované sloupce). Data představují průměr ze 4 nezávislých měření. \* Hodnota je statisticky významně odlišná od neozářené kontroly (p<0,05).



Byl také stanoven protektivní účinek silymarinu a jeho flavonolignanů vztažený k jejich vlastní kontrole. Výsledné hodnoty protekce jednotlivých polyfenolových látek jsou shrnuty v grafu na obr. 37.

Nejvyšší protektivní účinek při koncentraci 12,5  $\mu\text{M}$  byl prokázán u dehydrosilybinu. Při 25  $\mu\text{M}$  koncentraci dehydrosilybinu byl naopak pozorován pokles ochrany a současně nejnižší ochranný účinek v porovnání s ostatními látkami. U všech flavonolignanů kromě dehydrosilybinu a isosilybinu můžeme sledovat koncentračně závislý ochranný efekt silymarinu a ostatních flavonolignanů. Výrazná protekce byla zjištěna u silychristinu, nejméně účinný byl silybin.



Obr. 37: Vliv silymarinu a flavonolignanů na lidské kožní fibroblasty ozářené UVA. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % protekce. Výsledky jsou průměrem ze 4 nezávislých měření. # Hodnota je statisticky významně odlišná od silymarinu (12,5  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ). \* Hodnota je statisticky významně odlišná od silymarinu (25  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ).

## 6. Diskuze

Při opakované expozici slunečnímu záření jsou v kůži produkovány ROS, které vyvolávají oxidační stres a zánětlivé reakce v dermální a epidermální vrstvě pojivové tkáně. ROS atakují buněčné membrány, lipidy, proteiny a DNA a indukují tak jejich oxidační poškození. Jako odpověď na poškození kůže UV zářením jsou infiltrovány zánětlivé neutrofilové buňky, je stimulována sekrece a syntéza enzymů v dermální či epidermální vrstvě a dochází k degradaci extracelulární matrix tvořené převážně elastinovými a kolagenovými vlákny, kyselinou hyaluronovou, aj. Degradace vláken extracelulární matrix vede ke snížení pružnosti pokožky, tvorbě vrásek a dehydrataci kůže. Tyto procesy přispívají k předčasnému stárnutí kůže (Nema *et al.*, 2011).

V poslední době jsou intenzivně vyhledávány látky z přírodních zdrojů, které by mohly být součástí kosmetických přípravků a mohly by zmírnit projevy předčasného stárnutí kůže stimulované účinkem slunečního záření (Nema *et al.*, 2011). Studovány jsou zejména polyfenolové látky, sekundární metabolity rostlin, které se podílejí na ochraně rostlin před nežádoucími účinky slunečního záření. Většinou jsou tyto látky řazeny mezi antioxidanty a vykazují širokou škálu prospěšných biologických účinků včetně antivirových, antibakteriálních, imunostimulačních, antialergických, antilipoperoxidačních, hepatoprotektivních, protizánětlivých, protinádorových, atd. Polyfenoly vykazují také inhibiční účinky na aktivitu enzymů, např. lipoxygenasy, cyklooxygenasy, monooxygenasy, xantinoxidasy, NADPH-oxidasy, fosfolipasy A<sub>2</sub>, proteinkinasy, aj. (Svobodová *et al.*, 2003).

V rámci této diplomové práce byl zjišťován vliv polyfenolových látek na aktivitu elastasy, kolagenasy a hyaluronidasy, tedy enzymů, které štěpí vlákna extracelulární matrix a ovlivňují tak děje spojené s předčasným stárnutím kůže. Z polyfenolových látek byly zkoumány účinky vybraných flavonoidů (kvercetin, baikalein, kaempferol, taxifolin, apigenin a naringenin), silymarinu (extraktu ze semen ostropestřce mariánského) a flavonolignanů, které jsou v něm obsaženy (dehydrosilybin, silybin, isosilybin, silydianin a silychristin). U těchto látek byl také sledován vliv na enzym tyrosinazu, která se podílí nejen na zvyšování hladiny ochranného pigmentu melaninu v kůži, čímž je zvyšována endogenní ochrana kůže

před nežádoucími účinky slunečního záření, ale při její zvýšené aktivitě může docházet k tvorbě pigmentových skvrn.

Elastasa je proteinasový enzym, který degraduje vlákna fibrinu a elastinu. Poškození elastinových vláken vede ke snížení elasticity kůže. Inhibicí aktivity elastasy lze tomuto procesu zabránit nebo ho zmírnit (Kim *et al.*, 2009).

Z testovaných flavonoidů vykazoval nejvyšší antielastasovou aktivitu kvercetin. Jeho  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci  $2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , kvercetin má tedy 5 krát větší inhibiční účinek v porovnání s kyselinou oleanolovou, která je považována za standardní inhibitor ( $IC_{50} = 10,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ). Baikalein ( $IC_{50} = 28,6 \pm 2,5 \mu\text{M}$ ), kaempferol ( $IC_{50} = 38,4 \pm 2,7 \mu\text{M}$ ), taxifolin ( $IC_{50} = 52,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ) i apigenin ( $IC_{50} = 91,1 \pm 3,8 \mu\text{M}$ ) byly v porovnání s kyselinou oleanolovou méně účinné. U naringeninu nebylo možné hodnotu  $IC_{50}$  stanovit. Při nižších koncentracích naringeninu byl pozorován koncentračně závislý nárůst inhibice elastasy. Účinky kvercetinu a kaempferolu zkoumal také Kanashiro *et al.* (2007). U kvercetinu popsal koncentračně závislý inhibiční efekt nad  $2 \mu\text{M}$ , u kaempferolu výraznější inhibici enzymu neprokázal. Kanashiro *et al.* (2007) a Trouillas *et al.* (2008) studovali také vztah mezi biologickou aktivitou a chemickou strukturou flavonoidů. Uvádí, že pro vysoký inhibiční účinek je důležitá hydroxylová skupina v pozici 3 na kruhu C, dvojná vazba mezi  $C_2-C_3$  a 3',4'-katecholová struktura B kruhu, která je u kvercetinu přítomna, u kaempferolu nikoli, čímž lze vysvětlit jeho nižší biologickou aktivitu. V struktuře taxifolinu je přítomna 3',4'-katecholová struktura na kruhu B, ale neobsahuje dvojnou vazbu mezi  $C_2-C_3$  na kruhu C, proto je jeho inhibiční účinek nižší v porovnání s kvercetinem.

Z testovaných flavonolignanů vykazoval největší antielastasovou aktivitu dehydrosilybin ( $IC_{50} = 8,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ). Téměř stejný inhibiční účinek jako u kyseliny oleanolové byl stanoven také u silymarinu ( $IC_{50} = 12,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ). Silybin byl v porovnání s kyselinou oleanolovou mnohem méně účinný ( $IC_{50} = 122,6 \pm 4,8 \mu\text{M}$ ). Ostatní flavonolignany nemají na aktivitu elastasy téměř žádný vliv, při nižších koncentracích je jimi elastasa naopak aktivována. Dehydrosilybin má na rozdíl od ostatních flavonolignanů mezi  $C_2-C_3$  dvojnou vazbu na kruhu C, která je v konjugaci s hydroxylovou skupinou v pozici 3 a oxo-skupinou C

kruhu, čímž je umožněn efektivnější záchyt ROS. Inhibiční účinky dehydrosilybinu jsou proto vyšší v porovnání s dalšími flavonolignany (Trouillas *et al.*, 2008).

Dalším enzymem, u kterého byl studován vliv polyfenolových látek je kolagenasa, která patří mezi matrixové metaloproteinasy obsahující v aktivním místě zinečnatý kation. Tento enzym je odpovědný za degradaci kolagenových vláken extracelulární matrix. V důsledku poškození strukturálních vláken extracelulární matrix ztrácí kůže svoji pevnost a pružnost a dochází ke zvýšené tvorbě vrásek (Pientaweeratch *et al.*, 2016). Nejběžnějším inhibitorem kolagenasy je 1,10-fenantrolin. Hodnota  $IC_{50}$  1,10-fenantrolinu byla stanovena při koncentraci  $161,3 \pm 4,6 \mu\text{M}$ .

Mezi flavonoidy měl největší vliv na inhibici kolagenasy kvercetin, jehož  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci  $17,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ . Aktivnější než 1,10-fenantrolin byl také baikalein ( $IC_{50} = 94,6 \pm 5,1 \mu\text{M}$ ). Taxifolin a apigenin vykazovaly podobné inhibiční účinky jako 1,10-fenantrolin. Malešev *et al.* (2007) zkoumal původ silných biologických účinků, které byly pozorovány u metaloproteinů, kdy dochází k vzniku komplexu mezi kovem a flavonoidem. Došel k závěru, že hlavní komplexační doménou, která interaguje s kovy v aktivním místě enzymu, je hydroxylová skupina v pozici 3, karbonylová skupina v pozici 4 a hydroxylová skupina v pozici 5 na kruhu C flavonoidů. Kvercetin, baikalein, taxifolin i kaempferol mají hydroxylovou skupinu v pozici 3. S výjimkou kaempferolu tyto látky vykazovaly inhibiční účinky na aktivitu kolagenasy. Výše uvedené výsledky potvrzují, že přítomnost hydroxylové skupiny v pozici 3 na kruhu C flavonoidů je pro chelataci zinečnatého kationtu a inhibici aktivity kolagenasy důležitá.

U silymarinu byla prokázána velmi výrazná antokolagenasová aktivita ( $IC_{50} = 4,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) v porovnání s 1,10-fenantrolinem. Účinný byl i dehydrosilybin, jehož hodnota  $IC_{50}$  odpovídá koncentraci  $23,4 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . U isosilybinu, silybinu a silychristinu byla také zjištěna větší antokolagenasová aktivita než u 1,10-fenantrolinu. Silymarin a jeho flavonolignany vykazují větší inhibiční účinky ve srovnání s testovanými flavonoidy i samotným 1,10-fenantrolinem (obr. 30). Z grafů na obr. 28 a 29 je vidět, že inhibice kolagenasy je koncentračně závislá. Inhibiční účinky silymarinu popsal nedávno i Pientaweeratch *et al.* (2016), ale nestudoval vliv jednotlivých flavonolignanů.

Hyaluronidasa je enzym depolymerizující kyselinu hyaluronovou, která udržuje vlhkost v kůži, její strukturu a elasticitu, podílí se také na tkáňové proliferaci a regeneraci. Při UV indukovaném poškození kůže je aktivita hyaluronidasy zvýšena, kůže ztrácí pevnost, pružnost, tvoří se vrásky (Ndlovu *et al.*, 2013). Vhodnými inhibitory lze aktivitu hyaluronidasy potlačit.

U testovaných flavonoidů, silymarinu ani jeho flavonolignanů nebyly zjištěny inhibiční účinky na aktivitu hyaluronidasy. Není známo mnoho studií, ve kterých by byl prokázán výrazný efekt polyfenolových látek na inhibici hyaluronidasy. Ve většině studií byly použity velmi vysoké koncentrace, kterých není možno dosáhnout v lidském organismu. Kuppusamy *et al.* (1991) studoval účinky flavonoidů na aktivitu hyaluronidasy z hadího jedu. *In vitro* studie ukázaly, že apigenin, luteolin a kaempferol hyaluronidasu inhibovaly v závislosti na dávce, u naringenin a katechinu žádné účinky prokázány nebyly. Li *et al.* (2007) zkoumal účinky kaempferolu, kvercetinu a apigeninu na aktivitu hyaluronidasy z opičích spermií. Publikoval, že tyto flavonoidy v koncentračním rozmezí 200 až 500  $\mu\text{M}$  hyaluronidasu inhibovaly. Vliv flavonů a flavanonů na inhibici hyaluronidasy zkoumal také Pessini *et al.* (2001). Z 5 testovaných látek prokázal inhibiční účinky pouze u jedné z nich (desmethoxycentaureidin), u zbylých flavonoidů při nejvyšší testované koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  zjistil pouze minimální nebo žádný efekt.

I když je pigment melanin nezbytnou součástí ochranných mechanismů kůže vůči působení slunečního záření, je známo, že jeho nadprodukce a nekontrolovaná produkce vede ke vzniku hyperpigmentačních skvrn, jejichž zvyšující se výskyt je charakteristický pro stárnutí kůže (Chang, 2009). Sluneční záření zvyšuje tvorbu a aktivitu tyrosinasy a následně se zvyšuje produkce melaninu v melanocytech. Inhibicí tyrosinasy lze syntézu melaninu potlačit. Inhibitory tyrosinasy jsou proto využívány k prevenci vzniku hyperpigmentačních skvrn (Uchida *et al.*, 2014). Nejběžnějším inhibitorem tyrosinasy je kojová kyselina, jejíž hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena při koncentraci  $5,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ .

V této diplomové práci nebyly u testovaných polyfenolových látek prokázány negativní účinky na aktivitu tyrosinasy. Vybrané flavonoidy, silymarin a jeho flavonolignany aktivitu tyrosinasy naopak zvyšovaly. Největší vliv na aktivitu tyrosinasy vykazoval kaempferol, účinný byl také baikalein, apigenin a naringenin.

U kvercetinu a taxifolinu nebyl pozorován žádný efekt na aktivitu tyrosinasy. Chang (2009) uvedl, že existuje mnoho látek z řad polyfenolů, které jsou silnými inhibitory tyrosinasy. Klíčovou roli v inhibici tyrosinasy hraje chelatace mědi v aktivním místě enzymu. Pro chelataci mědi v aktivním místě tyrosinasy je důležité strukturní uspořádání hydroxylové skupiny v pozici 3 a keto skupiny v pozici 4 na kruhu C flavonoidů. Xie *et al.* (2003) studoval účinky některých flavonoidů (kvercetin, luteolin, apigenin, kaempferol, chrysin, aj.) na oxidaci L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) a zjistil, že tyto látky tyrosinasy inhibují. Nejúčinnějším inhibitorem byl kvercetin. Inhibici tyrosinasy kvercetinem při použití substrátu L-DOPA pozoroval také Matsuda *et al.* (1995). Při koncentraci kvercetinu 10 µg/ml však uvádí pouze 20 % inhibici, kojová kyselina vykazovala při stejné koncentraci 5 krát větší účinek (98,6 % inhibice). Kvercetin je tedy v porovnání s kojovou kyselinou pouze slabým inhibitorem tyrosinasy. Chang (2009) uvádí, že i v citrusové kůře se nachází flavonoidy (nobiletin, naringin, neohesperidin), které jsou identifikovány jako inhibitory tyrosinasy, jejich účinky jsou však ve srovnání s kojovou kyselinou zanedbatelné. Uvádí, že flavonoidy nejsou kvůli slabým inhibičním účinkům na tyrosinasy vhodné pro léčbu hyperpigmentačních skvrn (Chang, 2009).

U silymarinu a jeho flavonolignanů byly také pozorovány pozitivní účinky na tyrosinasy. Tyrosinasa byla nejvíce aktivována silybinem, silydianinem a silychristinem. U silymarinu, dehydrosilybinu a isosilybinu nebyl prokázán vliv na aktivitu tyrosinasy.

Pokud aktivací tyrosinasy dochází k zvýšení produkce melaninu, který chrání kožní buňky, především keratinocyty v *stratum basale*, před slunečním zářením, mohly by být testované polyfenolové látky potenciálně využity ve fotoprotektivních přípravcích. Zvýšením hladiny pigmentu melaninu v kůži dochází naopak ke snížení produkce ROS a tím i k snížení aktivace enzymů podílejících se na degradaci komponent extracelulární matrix. Tak mohou tyto polyfenoly příznivě působit na kůži a zpomalovat degenerativní procesy v kůži spojené s expozicí UV záření (Chaiprasongsuk *et al.*, 2016, Brenner *et al.*, 2009; Slominski *et al.*, 2005).

UVA záření iniciuje tvorbu ROS, které mohou oxidovat proteiny za vzniku karbonylovaných proteinů. Kvantifikace vzniklých karbonylovaných proteinů je měřítkem oxidačního poškození biomolekul, především proteinů (Mohanty *et al.*, 2010).

Protože je popsáno, že silymarin/silybin jsou schopny ochránit kůži před působením především UVB záření, byl studován jejich možný ochranný efekt proti působení UVA záření (Svobodová *et al.*, 2003; Svobodová *et al.*, 2007). V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že samotný silymarin a testované flavonolignany nevyvolávají oxidační modifikaci proteinů, naopak snižují oxidační procesy v buňce (obr. 35). Silymarin a jeho flavonolignany tedy oxidační poškození proteinů nezpůsobují, naopak díky svým vlastnostem snižují bazální tvorbu karbonylovaných proteinů, což potvrzuje jejich antioxidační účinky (Mohanty *et al.*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2015). Dále bylo zjištěno, že silymarin i další testované flavonolignany jsou schopny snížit oxidační poškození vyvolané UVA zářením. Protektivní účinky látek se zvyšovaly s jejich rostoucí koncentrací s výjimkou dehydrosilybinu (obr. 37). Při koncentraci 12,5  $\mu\text{M}$  vykazoval dehydrosilybin největší protekci ze všech testovaných flavonolignanů. Při vyšší testované koncentraci (25  $\mu\text{M}$ ) byla protekce dehydrosilybinem snížena, což naznačuje jeho prooxidační efekt. Protektivní účinky silymarinu a flavonolignanů zkoumala také Svobodová (2006), jako model použila linii keratinocytů HaCaT, které byly po ozáření kultivovány se studovanými polyfenoly. Silybin a silymarin vykazovaly zvyšující se ochranné účinky látek se vzrůstající koncentrací. Avšak u dehydrosilybinu došlo k poklesu ochranného efektu při vyšší koncentraci, což ukazuje, že účinek látek s výrazným antioxidačním potenciálem může klesat se vzrůstající koncentrací díky narušení antioxidační rovnováhy buňky. Trouillas *et al.* (2008) také zkoumal antioxidační účinky flavonolignanů. Uvádí, že silybin a ostatní flavonolignany mají mnohem menší biologickou aktivitu v porovnání s dehydrosilybinem z důvodu jeho většího antioxidačního potenciálu, který má díky přítomnosti dvojně vazby v C kruhu. Tento výrazný antioxidační efekt však může vést k negativnímu prooxidačnímu efektu, který je limitován biodostupností a rozpustností látky.

Z výsledků získaných měření vlivu silymarinu a flavonolignanů a účinku na oxidační stres vyvolaný UVA zářením ve fibroblatech vyplývá, že při použití extraktu ze semen ostropestřce mariánského jsou pozorovány lepší nebo srovnatelné účinky s čistými flavonolignany a nebyly pozorovány nežádoucí účinky, jak v případě dehydrosilybinu. Proto je možné doporučit používání silymarinu, protože příprava čistých flavonolignanů je časově a finančně náročnější, nehledě na nižší obsah účinnějších flavonolignanů, např. silychristinu v silymarinu (viz tabulka 1).

Získané výsledky ukazují, že testované polyfenolové látky by mohly být potenciálně využity jako aktivní složky v kosmetických přípravcích používaných proti stárnutí či k ochraně kůže před působením slunečního záření, především jeho UVA složky, která vyvolává oxidační stres v kůži a vede k jejímu předčasnému stárnutí. Získané výsledky je ovšem nutné ověřit kvalitní klinickou studií na dobrovolnících.



## 7. Závěr

V rámci této diplomové práce byly zkoumány účinky vybraných flavonoidů, silymarinu a jeho flavanolignanů na aktivitu elastasy, kolagenasy a hyaluronidasy. Tyto enzymy jsou zodpovědné za destrukci extracelulární matrix, což vede k předčasnému stárnutí kůže. Dále byl studován vliv na enzym tyrosinasy, která je zodpovědná za produkci melaninu. Všechny uvedené enzymy jsou aktivovány slunečním zářením, především vlivem UVA záření.

Testované polyfenoly snižují hladinu elastasy a kolagenasy, mohly by být proto využity v kosmetických přípravcích ke zmírnění projevu stárnutí. Největší efekt byl prokázán u kvercetinu, dehydrosilybinu a silymarinu. Na aktivitu hyaluronidasy neměly testované látky žádný vliv. Tyrosinasa byla flavonoidy a flavanolignany aktivována, nejúčinnější byl kaempferol, apigenin a baikalein. Aktivací tyrosinasy dochází ke zvýšené produkci kožního melaninu v melanocytech, tyto látky by proto mohly zvyšovat endogenní ochranu kůže.

Dále bylo zkoumáno, jestli má silymarin a jeho flavanolignany vliv na oxidační poškození vyvolané UVA ozářením. *In vitro* studie na lidských kožních fibroblastech potvrdily, že testované polyfenolové látky vykazují antioxidační účinky, inhibují oxidační poškození vyvolané UVA zářením a poskytují buňkám kůže ochranu před slunečním zářením.

Testované polyfenolové látky mají schopnost chránit kůži před nepříznivými účinky UV, respektive slunečního záření a mohou být použity nejen ve fotoprotektivních přípravcích, ale také v regenerativních přípravcích zpomalující proces stárnutí kůže.

## Seznam použité literatury

AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2011, 4 (2), 1394-1398.

ALAM, M. A. et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanism of action. *Advances in Nutrition*. 2014, 5 (4), 404-417.

ALZAHARNA, M. et al. Taxifolin synergizes andrographolide-induced cell death by attenuation of autophagy and augmentation of caspase dependent and independent cell death in HeLa cells. *PLoS One*. 2017, 12 (2).

ARULMOLI, R. et al. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*. 2016, 10 (20), 84-89.

BRENNER, M. et al. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, 84 (3), 539-549.

BUHREN, B. A. et al. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *European Journal of Medical Research*. 2016, 21, 5. DOI 10.1186/s40001-016-0201-5.

COWMAN, M. K. et al. Viscoelastic properties of hyaluronan in physiological conditions. *F1000 Research*. 2015, 4, 622.

DAAMEN, W. F. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007, 28, 4378-4398.

DIVIŠOVÁ, B. et al. Nejčastější maligní epitelové kožní nádory. *Onkologie*. 2010, 4, 230-232.

DONALD, G. et al. Baicalein – an intriguing therapeutic phytochemical in pancreatic cancer. *Current Drug Targets*. 2012, 13 (14), 1772-1776.

ETTLER, K. Fotoprotekce kůže. Ochrana kůže před účinky ultrafialového záření. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-7254-463-2.

FUJII, T. et al. *Amla (Emblica officinalis Gaertn)* extract promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, 119,53-57.

GANCEVICIENE, R. et al. Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology*. 2012, 4 (3), 308-319.

GRIM, M. et al. *Základy anatomie*. 4b. Periferní nervový systém, smyslové orgány a kůže. 2. vyd. Praha: Galén, 2014. ISBN 978-80-7492-156-8.

HANZLOVÁ, J. et al. *Základy anatomie soustavy dýchací, srdečně cévní, lymfatického systému, kůže a jejich derivátů III*. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 2007. ISBN 978-80-210-4360-2.

[http://www.serva.de/www\\_root/documents/20927\\_1.pdf](http://www.serva.de/www_root/documents/20927_1.pdf) (staženo 28. 12. 2016).

[http://www.serva.de/www\\_root/documents/Collagenases%20for%20Tissue%20Dissociation\\_1.pdf](http://www.serva.de/www_root/documents/Collagenases%20for%20Tissue%20Dissociation_1.pdf) (staženo 23. 3. 2017).

<http://www.worthington-biochem.com/es/default.html> (staženo 28. 12. 2016).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Collagenase> (staženo 16. 3. 2017).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Elastase> (staženo 28. 12. 2016).

<https://en.wikipedia.org/wiki/Taxifolin> (staženo 13. 4. 2017)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17100017> (staženo 16. 3. 2017).

CHAIPRASONGSUK, A. et al. Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses. *Redox Biology*. 2016, 8, 79-90.

CHANG, T. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, 10, 2440-2475.

CHEN, A. Y. et al. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*. 2013, 138 (4), 2099-2107.

CHEN, H. et al. Exploring therapeutic potentials of baicalin and its aglycone baicalein for hematological malignancies. *Cancer Letters*. 2014, 354 (1), 5-11.

- CHOI, E. et al. Silymarin and its active component silibinin act as novel therapeutic alternatives for salivary gland cancer by targeting the ERK1/2-Bim signaling cascade. *Cellular Oncology*. 2017, DOI 10.1007/s13402-017-0318-8.
- CHOO, S. et al. Silymarin inhibits melanin synthesis in melanocyte cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009, 61, 663-667.
- KANASHIRO, A. et al. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2007, 62, 357-361.
- KIM, J. H. et al. Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolatus*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009, 3 (11), 914-920.
- KIM, M. et al. Molecular mechanism of the aging process and rejuvenation. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 2016. ISBN 978-953-51-2569-3.
- KRAJSOVÁ, I. Opalování a kožní nádory. *Praktické lékařství*. 2008, 4 (3), 123-125.
- KUPPUSAMY, U. et al. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*. 1991, 47 (11-12), 1196-1200.
- LI, M. W. et al. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biology of Reproduction*. 1997, 56 (6), 1383-1389.
- LIANG, CH. P. et al. *In vitro* antioxidant activities, free radical scavenging capacity, and tyrosinase inhibitory of flavonoid compounds and ferulic acid from *Spiranthes sinensis*. *Molecules*. 2014, 19, 4681-4694.
- LIMA, C. R. et al. Combined kinetic studies and computational analysis on kojic acid analogs as tyrosinase inhibitors. *Molecules*. 2014, 19, 9591-9605.
- MAITY, N. et al. Standardized *Clitoria ternatea* leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrix-metalloproteinase-1 inhibitor. *Indian Journal of Pharmacology*. 2012, 44 (5), 584-587.

- MALEŠEV, D. et al. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2007, 72 (10), 921-939.
- MATSUDA, H. et al. Studies of cuticle drugs from natural sources.III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1995, 18 (8), 1148-1150.
- McCOOK, J. P. et al. Ability of sodium copper chlorophyllin complex to repair photoaged skin by stimulation of biomarkers in human extracellular matrix. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2016, 9, 167-174.
- MITHIEUX, S. M. et al. Elastin. *Advances in Protein Chemistry*. 2005, 70, 437-461.
- MOHANTY, J. G. et al. A fluorimetric semi-microplate format assay of protein carbonyls in blood plasma. *Analytical Biochemistry*. 2010, 400 (2), 289-294.
- MUCKENSCHNABEL, I. et al. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Letters*. 1998, 131, 13-20.
- MUKHERJEE, K. et al. Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015, 84, 11-21.
- NAGASE, H. et al. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274(31), 21491-21494.
- NDLOVU, G. et al. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013, 13, 304.
- NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, 53(8), 397-411.
- NEMA, N. K. et al. Cucumis sativus fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. *Archives of Dermatological Research*. 2011, 303, 247-252.

- NEMA, N. K. et al. Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of *Centella asiatica*. *Pharmaceutical Biology*. 2013, 51(9), 1182-1187).
- OBSTOVÁ, I. Péče o kůži po opalování. *Dermatologie pro praxi*. 2011, 5 (2), 79-80.
- PAPAKONSTANTINOOU E. et al. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*. 2012, 4(3), 253-258.
- PESSINI, A. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*. 2001, 39 (10), 1495-1504.
- PIENTAWEEERATCH, S. et al. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharmaceutical Biology*. 2016, 54 (9), 1865-1872.
- POLICAROVÁ, M. Fotodermatózy. *Dermatologie pro praxi*. 2016, 10 (2), 60-61.
- PROCHÁZKOVÁ, D. et al. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011, 82, 513-523.
- RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc, 2012. ISBN 978-80-244-3183-3.
- RAMSDEN, CH. A. et al. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2014, 22, 2388-2395.
- ROBERT, L. et al. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*. 2010, 58, 187-198.
- ROSTOVÁ, J. et al. Akutní účinek UV záření na imunitní systém. *Vojenské zdravotnické listy*. 2006, 2, 56-64.
- ROSTOVÁ, J. et al. Chronický účinek ultrafialového záření na organismus. *Vojenské zdravotnické listy*. 2006, 3-4, 111-119.
- ROSTOVÁ, J. et al. Vybrané akutní účinky UV záření na organismus. *Vojenské zdravotnické listy*. 2006, 1, 17-24.

- SHUKLA, S. et al. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*. 2010, 27 (6): 962-978.
- SLOMINSKI, A. et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*. 2005, 27(2), 137-148.
- STERN, R. et al. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology*. 2008, 26, 106-122.
- SVOBODOVÁ, A. Effects of natural polyphenols on UV-induced damage to keratinocytes. Palacký University in Olomouc. Olomouc 2006.
- SVOBODOVÁ, A. et al. Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin. *Journal of Dermatological Science*. 2007, 46 (1), 21-30.
- SVOBODOVÁ, A. et al. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*. 2003, 147 (2), 137-145.
- SVOBODOVÁ, A. et al. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic*. 2006, 150, 25-38.
- TAKAHASHI, T. et al. A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*. 2003, 322, 257-263.
- TROUILLAS, P. et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A*. 2008, 112, 1054-1063.
- TURGUT, N. H. et al. The protective effect of naringin against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. *Pulmonary Medicine*. 2016. ID 7601393.
- UCHIDA, R. et al. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014, 4(2), 141-145.
- YAAR, M. et al. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology*. 2007, 157, 874-887.

ZALUSKI, D. et al. Plant inhibitors of metalloproteinases and the possibility of their application in the prevention of photoaging. *Annales UMCS Pharmacia*. 2009, 22(2), 89-96.