

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Dominika Trofimenková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Modulácia exprese bariérových génov v kožných
bunkách triptánmi**

Bakalářská práce

Dominika Trofimenková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Dominika TROFIMENKOVÁ
Osobní číslo: R18660
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Modulácia exprese bariérových génov v kožných bunkách triptánmi
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Zásady:

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení viability kožních buněk
- 3) Stanovení exprese bariérových genů v kožních buňkách
- 4) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

- Susan H Smith et al.: Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans, Journal of Investigative Dermatology, 2017
- Ellen H. van den Bogaard et al: Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis, The Journal of Clinical Investigation, 2013
- Ehrlich A, Kerkvliet N: Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases? Current opinion in Toxicology 2, 2017
- Allais G and Benedetto C.: Spotlight on frovatriptan: a review of its efficacy in the treatment of migraine. Drug design, development and therapy, 2016
- Negro A et al: Pharmacokinetic evaluation of frovatriptan. Expert opinion on drug metabolism and toxicology, 2011

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 27. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Hlčice
tel.: +420 585 634 901
-2-

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Meno a priezvisko autora	Dominika Trofimenková
Názov práce	Modulácia expresie bariérových génov v kožných bunkách triptánmi
Typ práce	Bakalárska práca
Pracovisko	Katedra bunkovej biológie a genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedúci práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Psoriáza a atopická dermatitída patria medzi najrozšírenejšie kožné zápalové ochorenia a ich liečba je možná aj cez aktiváciu aryl uhľovodíkového receptora (AhR). Táto práca sa zaoberá štúdiom vplyvu triptánov na transkripčnú aktivitu aryl uhľovodíkového receptora. Najskôr bola určená cytotoxicita triptánov, následne bola metódou Reporter Gene Assay stanovená aktivita AhR a nakoniec bolo vykonané stanovenie expresie bariérových proteínov na úrovni mRNA v AhR-responzívnej bunkovej línii AhaRaCaT. Niektoré triptány po 24-hodinovom pôsobení vykazovali koncentračne závislú zvýšenú aktivitu AhR, po 48 hodinách bola významná zvýšená aktivita len pre donitriptán. Rovnako niektoré z triptánov významne indukovali aj expresiu CYP1A1 a expresiu filagrínu (FLG). Pri horerine nedošlo k významnému nárastu expresie, rizatriptán expresiu HRNR však významne znížil. Expresia involukrínu (IVL) ligandom AhR nebola indukovaná.</p>
Kľúčové slová	AhR, psoriáza, atopická dermatitída, bariérové gény, triptány
Počet strán	70
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Dominika Trofimenková
Title	Modulation of barrier gene expression in skin cells by triptans
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Psoriasis and atopic dermatitis are common inflammatory skin conditions. They are also treatable through the activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR). This thesis deals with the effect of triptans on the transcriptional activity of AhR. Firstly, the cytotoxicity of these drugs was measured, then, using Reporter Gene Assay, the activity of AhR was determined and lastly, the expression of barrier gene proteins was measured at mRNA level. Some of the triptans after 24-hour treatment showed concentration-dependent increased activity of AhR. After the 48-hour treatment only donitriptan activated AhR significantly. Some of the triptans significantly induced the expression of CYP1A1 and filaggrin. Hornerin expression wasn't significantly induced by any of the triptans, but rizatriptan significantly inhibited its expression. The expression of involucrin wasn't induced by the ligand of AhR.</p>
Keywords	AhR, psoriasis, atopic dermatitis, barrier genes, triptans
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlásenie

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

V Olomouci dňa:

.....
Dominika Trofimenková

PodĎakovanie

Rada by som sa poĎakovala vedúcemu mojej práce, pánovi doc. Ing. Radimovi Vrzalovi, Ph.D., za jeho odborné vedenie, trpezlivosť, ochotu a čas, ktorý mi venoval. PodĎakovanie patrí aj všetkým pracovníkom kolektívu Laboratória molekulárnej farmakológie a toxikológie, najmä Mgr. Eliške Zgarbovej za jej ochotu pomáhať a cenné rady. Veľká vĎaka taktiež patrí mojej rodine, ktorá mi bola po celé štúdium veľkou oporou.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1.	Aryl uhľovodíkový receptor	3
3.1.1.	CYP1A1	5
3.2.	Koža	5
3.2.1.	Aryl uhľovodíkový receptor v koži	8
3.3.	Proteíny epidermálnej bariéry	9
3.3.1.	Hornerín (HRNR)	9
3.3.2.	Filagrin (FLG)	10
3.3.3.	Involukrin (IVL)	12
3.4.	Ochorenia kože	13
3.4.1.	Psoriáza	13
3.4.1.1.	Patogenéza psoriázy	14
3.4.2.	Atopická dermatitída	15
3.4.2.1.	Patogenéza atopickej dermatitídy	16
3.4.3.	Úloha aryl uhľovodíkového receptora pri psoriáze a atopickej dermatitíde	18
3.4.4.	Význam proteínov epidermálnej bariéry a CYP1A1 pri psoriáze a atopickej dermatitíde	19
3.5.	Triptány	20
3.5.1.	Signalizácia skrz 5-HT ₁ receptory	21
3.5.2.	Sumatriptán (1-[3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-5-yl]- <i>N</i> -methylmethanesulfonamide)	21
3.5.3.	Almotriptán (<i>N,N</i> -dimethyl-2-[5-(pyrrolidin-1-ylsulfonylmethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl]ethanamine)	22
3.5.4.	Eletriptán (5-[2-(benzenesulfonyl)ethyl]-3-[[<i>(2R)</i> -1-methylpyrrolidin-2-yl]methyl]-1 <i>H</i> -indole)	23
3.5.5.	Frovatriptán ((<i>6R</i>)-6-(methylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -carbazole-3-carboxamide)	24
3.5.6.	Zolmitriptán ((<i>4S</i>)-4-[[3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-5-yl]methyl]-1,3-oxazolidin-2-one)	24
3.5.7.	Rizatriptán (<i>N,N</i> -dimethyl-2-[5-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl]ethanamine)	25
3.5.8.	Naratriptán (<i>N</i> -methyl-2-[3-(1-methylpiperidin-4-yl)-1 <i>H</i> -indol-5-yl]ethanesulfonamide)	26
3.5.9.	Avitriptán (1-[3-[3-[4-(5-methoxypyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl]propyl]-1 <i>H</i> -indol-5-yl]- <i>N</i> -methylmethanesulfonamide)	27
3.5.10.	Donitriptán (4-[4-[2-[[3-(2-aminoethyl)-1 <i>H</i> -indol-5-yl]oxy]acetyl]piperazin-1-yl]benzotrile)	27

4	MATERIÁL A METÓDY	29
4.1.	Materiál	29
4.1.1.	Biologický materiál	29
4.1.2.	Použitý materiál	29
4.1.3.	Prístroje	32
4.1.4.	Počítačové programy	32
4.2.	Metodika práce	32
4.2.1.	Príprava kultivačného média	33
4.2.2.	Pasážovanie buniek	33
4.2.2.1.	Pasážovanie buniek HaCaT a AhaRaCaT bunkovej línie	33
4.2.3.	Počítanie buniek a vysatie na kultivačnú doštičku pre MTT a Reporter Gene Assay	34
4.2.4.	Vysatie buniek na kultivačnú doštičku pre izoláciu RNA	34
4.2.5.	Treatment pre MTT	34
4.2.6.	Treatment pre RGA	35
4.2.7.	Treatment pre izoláciu RNA	35
4.2.8.	MTT test viability	35
4.2.9.	Reporter Gene Assay	36
4.2.10.	Izolácia mRNA	37
4.2.11.	Reverzná transkripcia	38
4.2.12.	RT-qPCR	38
5	VÝSLEDKY	40
5.1.	MTT test viability	40
5.2.	Reporter Gene Assay	42
5.3.	Expresia na úrovni RNA v AhR-responzívnej bunkovej línii AhaRaCaT	43
6	DISKUSIA	48
7	ZÁVER	51
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	52

Zoznam symbolov a skratiek

AD	atopická dermatitída
AhR	aryl uhl'ovodíkový receptor
AhRC	aryl uhl'ovodíkový receptorový komplex
AhRR	AhR represorový gén
ALM	almotriptán
AMPs	antimikrobiálne peptidy
AP-1	aktivačný proteín 1
ARNT	aryl uhl'ovodíkový receptorový jadrový translokátor
AVI	avitriptán
BaP	benzo(a)pyrén
bHLH-PAS	basic Helix-Loop-Helix, Per-Arnt-Sim
CD	cluster of differentiation
CpG	cytozín-fosfát-guanozín
CYP	cytochróm P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dymetylsulfoxid
DONI	donitriptán
DRE	dioxín-responzívne elementy
EDTA	kyselina etyléndiaminotetraoctová
ELE	eletriptán
FBS	fetálne bovinné sérum
FI	fold induction
FICZ	6-formylindolo(3,2-b) karbazolu
FLG	filagrín

FRO	frovatriptán
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
Gi/o	G-proteíny s inhibujúcou funkciou
GIRKs	dovnútra-smerujúce draslíkové kanály spojené s G-proteínom
GR	glukokortikoidný receptor
HAHs	halogénované aromatické uhľovodíky
HLA-DR	ľudský leukocytový antigén, izotyp DR
HRNR	hornerín
hsp90	heat-shock proteín 90
HygB	hygromycín B
IFN	interferón
IL	interleukín
IVL	involukrín
KLK	kallikrein
LL37	katelicidínový proteín
LXR	pečeňový X receptor
MAOs	monoaminoxidázy
mDCs	myeloidné dendritické bunky
MHC	major histocompatibility complex
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NARA	naratriptán
NHEK	normálne ľudské epidermálne keratinocyty
OVOL1	ovo-like 1 transkripčný faktor
PAHs	polyaromatické uhľovodíky
PBS	fosfátový pufor

pDCs	plazmacytoïdné dendritické bunky
PGD2	prostaglandín D2
PPAR	receptory aktivované proliferátormi peroxizómov
proFLG	pro-filagrin
RGA	reporter gene assay
RIZA	rizatriptán
STAT6	signálny transduktor a aktivátor transkripcie 6
SUMA	sumatriptán
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nádorovej nekrózy
TSLP	týmusový stromálny lymfopoetín
UGT1A1	UDP-glukuronozyltransferáza 1A1
UT	untreated – negatívna kontrola
UVB	ultrafialové žiarenie B
XAP2	X-asociovaný proteín 2
ZOL	zolmitriptán

Zoznam obrázkov a grafov

Obrázok č. 1: Aryl uhľovodíkový receptor.....	4
Obrázok č. 2: Prierez zdravou ľudskou epidermis a dermis.....	6
Obrázok č. 3: Chemická štruktúra sumatriptánu.....	22
Obrázok č. 4: Chemická štruktúra almotriptánu.....	23
Obrázok č. 5: Chemická štruktúra eletriptánu.....	23
Obrázok č. 6: Chemická štruktúra frovatriptánu.....	24
Obrázok č. 7: Chemická štruktúra zolmitriptánu.....	25
Obrázok č. 8: Chemická štruktúra rizatriptánu.....	26
Obrázok č. 9: Chemická štruktúra naratriptánu.....	27
Obrázok č. 10: Chemická štruktúra avitriptánu.....	27
Obrázok č. 11: Chemická štruktúra donitriptánu.....	28
Graf č. 1: Výsledky MTT testu na HaCaT bunkovej línii.....	41
Graf č. 2: Výsledky MTT testu na AhaRaCaT bunkovej línii.....	41
Graf č. 3: Výsledky Gene Reporter Assay na AhaRaCaT bunkovej línii po 24 hodinovom pôsobení triptánov.....	42
Graf č. 4: Výsledky Gene Reporter Assay na AhaRaCaT bunkovej línii po 48-hodinovom pôsobení triptánov.....	43
Graf č. 5: Expresia génu CYP1A1 na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii.....	44
Graf č. 6: Expresia génu HRNR na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii.....	45
Graf č. 7: Expresia génu FLG na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii.....	46
Graf č. 8: Expresia génu IVL na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii.....	47

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.....	38
Tabuľka č. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre GAPDH a CYP1A1 pre RT-qPCR.....	39
Tabuľka č. 3: Zloženie reakčnej zmesi pre HRNR, FLG a IVL pre RT-qPCR.....	39
Tabuľka č. 4: Nastavenie RT-qPCR reakcie.....	39

1 ÚVOD

Psoriáza a atopická dermatitída patria medzi najrozšírenejšie kožné zápalové ochorenia a ich liečba je možná aj cez aktiváciu aryl uhl'ovodíkového receptora (AhR) jeho agonistami. Aryl uhl'ovodíkový receptor je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, nachádzajúci sa pred jeho aktiváciou ligandom v cytoplazme rôznych typov buniek. Po jeho aktivácii ligandom translokuje do jadra, kde sa viaže do dioxín-responzívnych elementov (DRE) a ovplyvňuje transkripciu cieľových génov. Aryl uhl'ovodíkový receptor je esenciálnym biosenzorom, ktorý reaguje na xenobiotické podnety zvonka aj zvnútra organizmu, reguluje metabolické isoenzy my cytochrómu P450, imunitu a bunkovú diferenciáciu. Je exprimovaný aj v bunkách kože, kde sa podieľa na udržiavaní integrity epidermálnej bariéry. Ide o sirotsky receptor, medzi ktorého ligandy patria hlavne polyaromatické a halogénované aromatické uhl'ovodíky, ktoré ovplyvňujú jeho transkripčnú aktivitu. Pre udržanie integrity epidermálnej bariéry kože je nutná správna expresia hornerínu (HRNR), filagrínu (FLG) a involukrínu (IVL). AhR začína byť v poslednej dobe cieľom mnohých výskumov, ktoré sa zaoberajú problematikou kožných zápalových ochorení. Triptány sú klinicky rozšírené farmakoterapeutiká využívané pri liečbe akútnych migrenových stavov. Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium vplyvu triptánov na aktivitu AhR a expresiu génov proteínov epidermálnej bariéry HRNR, FLG a IVL na úrovni mRNA.

2 CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Vypracovanie rešerše k téme bakalárskej práce

Vypracovanie bakalárskej práce a multimediálnej prezentácie

Experimentálna časť

Stanovenie cytotoxického pôsobenia triptánov na AhR- responzívnu AhaRaCaT bunkovú líniu MTT testom viability

Stanovenie transkripčnej aktivity aryl uhl'ovodíkového receptora v prítomnosti triptánov metódou Gene Reporter Assay

Stanovenie expsie cieľových cieľových génov aryl uhl'ovodíkového receptora metódou RT-qPCR

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1. Aryl uhl'ovodíkový receptor

Aryl uhl'ovodíkový receptor (AhR), inak nazývaný aj dioxínový receptor, je ligandom aktivovaný transkripčný faktor, ktorý kontroluje expresiu rozličných skupín génov. Bol objavený v roku 1976 a popísaný ako dioxín-viažuci proteín (Poland et al., 1976). AhR a aryl uhl'ovodíkový receptorový jadrový translokátor (ARNT) spolu tvoria aryl uhl'ovodíkový receptorový komplex AhRC (Beischlag et al., 2008). AhR a ARNT patria do bHLH-PAS (basic-Helix-Loop_Helix, Per-Arnt-Sim) rodiny transkripčných regulačných proteínov. Tento receptor reguluje gény pre enzýmy metabolizujúce xenobiotiká, ako napríklad formy cytochrómu P450 1A a 1B (Chiaro et al., 2007). Ďalšie gény regulované AhR sú napríklad aj aldehyddehydrogenáza 3 (Asman et al., 1993), UGT1A1 (UDP-glukuronozyltransferáza) (Yueh et al., 2003), AhR represorový gén AhRR (Baba et al., 2001) alebo OVOL1 gén regulujúci expresiu filagrínu (Tsuji et al., 2017). Ide o sirotsky receptor, ktorý môže byť aktivovaný veľkým množstvom štrukturálne rozličných chemikálií. Medzi ligandy s najvyššou afinitou pre AhR patria polyaromatické uhl'ovodíky (PAHs) ako napríklad 3-metylcholantren a benzo(a)pyrén (Shimada a Guengerich, 2006) alebo halogénované aromatické uhl'ovodíky (HAHs) ako napríklad 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxín (TCDD) – obe skupiny vyskytujúce sa hlavne ako kontaminanty životného prostredia (Beischlag et al., 2008). Medzi ďalšie identifikované ligandy AhR patria napríklad indoly (Hahn, 1998), metabolity tryptofánu vrátane indol-3-acetátu, indol-3-acetaldehydu, tryptamínu (Cheng *et al.*, 2015), serotoninu (Manzella *et al.*, 2018) a kyseliny kynurenovej (DiNatale *et al.*, 2010).

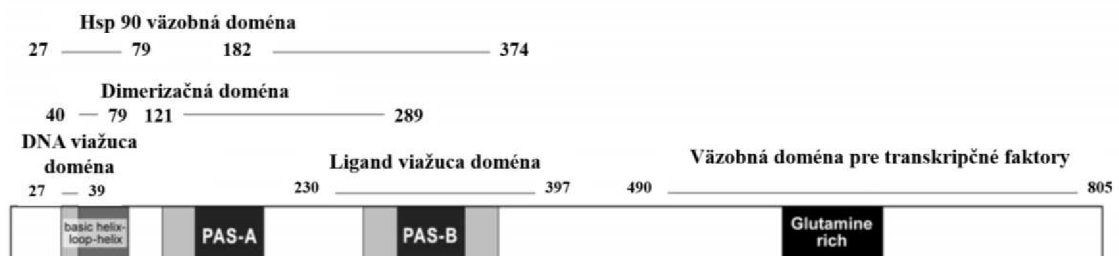
Prakticky aktivácia AhR funguje tak, že najskôr chemikália indukujúca odpoveď AhR difunduje skrz plazmatickú membránu a naviaže sa na cytozolický AhR, ktorý existuje ako multiproteínový komplex obsahujúci dve molekuly hsp90 (heat-shock protein), X-asociovaný proteín 2 (XAP2) a kochaperón p23 (Petrulis a Perdew, 2002). Po naviazaní ligandu AhR podstúpi konformačnú zmenu, čím uvoľní N-koncovú jadrovú lokalizačnú sekvenciu, čo vedie k translokácii komplexu AhR-ligand do jadra (Hord a Perdew, 1994). Disociácia AhR z AhRC a jeho dimerizácia s ARNT premenia aryl uhl'ovodíkový receptorový komplex na jeho vysoko afinitnú DNA-viažucu sa formu (Hankinson, 1995). Naviazanie ligand-AhR-ARNT komplexu do dioxín-responzivných elementov (DRE) v DNA vedie k zvýšenej transkripcii génov pod jeho kontrolou (Ma, 2001). Niektoré z týchto génov kódujú enzýmy zúčastňujúce sa metabolickej aktivácie

PAHs na ich mutagénne deriváty. HAHs sami o sebe nie sú génotoxické, ich patogenicita závisí na AhRC. Napríklad toxicita TCDD je takmer výlučne daná len skrz tento receptor (Hankinson, 1995).

AhR proteín je exprimovaný s najvyšším počtom v pľúcach, pečeni, týmuse, semenníkoch, črevách a obličkách (Gasiewicz a Rucci, 1984). Niektoré štúdie identifikujú najvyššie levely exprimovanej AhR mRNA v placentе, pečeni a pľúcach, zatiaľ čo najnižšia expresia bola sledovaná v mozgu, obličkách a priečne-pruhovanom svalstve (Jiang *et al.*, 2010).

Vďaka charakterizácii AhR-null myši bolo zistené, že AhR vykazuje nevyhnutnú fyziologickú funkciu, no dodnes jeho endogénny ligand nebol objavený (Beischlag *et al.*, 2008). Expresia AhR je podľa niektorých štúdií nevyhnutná aj pre správny embryonálny vývin, pretože je schopný aktivovať mechanizmy modulujúce pluripotenciu kmeňových buniek (Ko a Puga, 2017).

U ľudí je gén pre AhR lokalizovaný na chromozóme 7 a skladá sa z 12 exónov, ktoré kódujú proteín s 848 aminokyselinami a hmotnosťou 96,147 Daltonov (Obrázok č. 1) (Le Beau *et al.*, 1994).



Obrázok č. 1: Aryl uhl'ovodíkový receptor. Funkčné domény aryl uhl'ovodíkového receptoru sú vysoko konzervatívne pre celú rodinu týchto receptorov. Na N-konci sa nachádza bHLH DNA-väzobná doména, za ňou nasledujú domény PAS-A (proteín-proteín interakcie) a PAS-B doména (väzba ligandu). C-koniec je charakteristický doménou bohatou na glutamín, interagujúcou s transkripčnými koaktivátormi (obrázok prevzatý z Malorni *et al.*, 2012; upravený).

bHLH doména, nachádzajúca sa v regióne na N-konci, je zodpovedná za naviazanie DNA a dimerizáciu proteínu. PAS doména, skladajúca sa z PAS-A a PAS-B domén (Gu *et al.*, 2000) sa nachádza vedľa bHLH domény a medzi jej funkcie patrí viazanie ligandov (PAS-B doména) a proteín-proteínové interakcie (PAS-A doména) (Schmidt *et al.*, 1996). Na C-konci sa nachádza oblasť bohatá na glutamín, ktorá je nevyhnutná pre aktiváciu cieľového génu, hlavne vďaka jej interakcii s transkripčnými koaktivátormi (Rowlands

et al., 1996). Spolu teda domény bHLH, PAS a oblasť bohatá na glutamín predstavujú konzervatívnu štruktúru AhR (Wang *et al.*, 2018).

3.1.1. CYP1A1

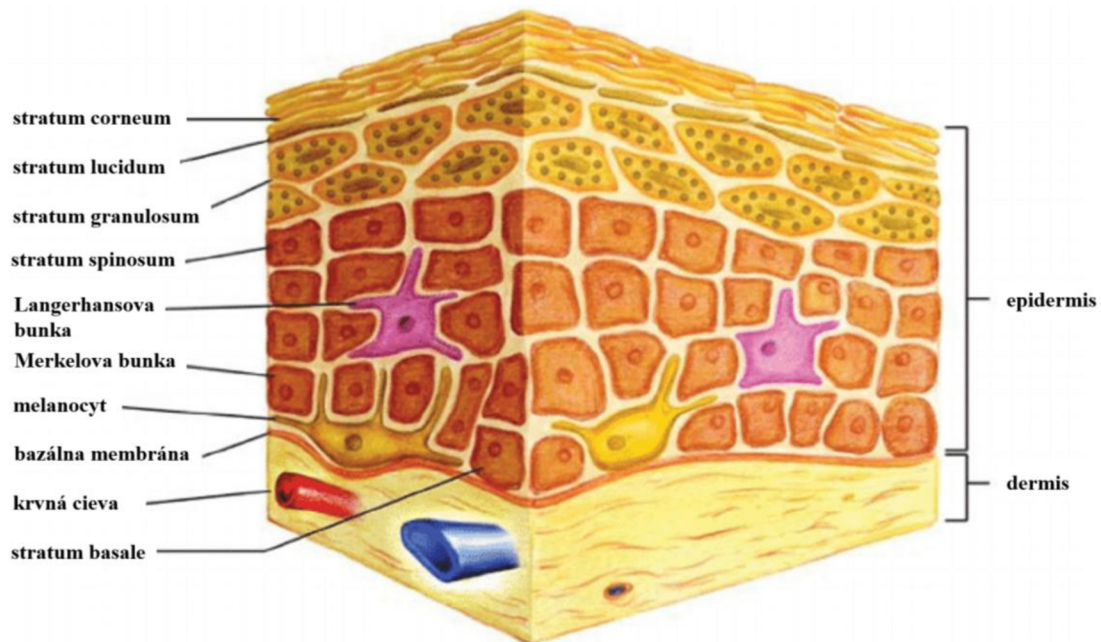
CYP enzýmy patria do hém-tiolátovej proteínovej rodiny a katalyzujú fázu 1 metabolizmu xenobiotík. Ich primárnou funkciou je monooxygenázová reakcia (Coon *et al.*, 1996). V eukaryotických bunkách existujú ako membránové hémproteíny. Každý z nich obsahuje približne 500 aminokyselín s železom naviazaným na protoporfyrín IX ako prostetickú skupinu enzýmu (Hasler *et al.*, 1999). Objavené boli v roku 1958 Martinom Klingenbergom, ktorý pri štúdiu pigmentov v mikrozomálnej frakcii pripravenej z potkaních pečeni objavil látky s unikátnou maximálnou absorbanciou 450 nm po väzbe s oxidom uhoľnatým (Klingenberg, 1958).

Ľudský gén pre cytochróm P450 1A1 kóduje enzým, ktorý hrá dôležitú úlohu v metabolizme polycyklických aromatických uhl'ovodíkov ako napríklad benzo(a)pyrén (BaP) a aktivácii prokarcinogénov na ich konečný reaktívny karcinogénny medziprodukt (Petersen *et al.*, 1991). Enzým CYP1A1 patrí do superrodiny enzýmov cytochrómov P450, ktoré boli zatiaľ objavené v každom živom systéme a všeobecne sa zúčastňujú metabolizmu mastných kyselín, steroidov a oxidácie mnoho xenobiotík (Beresford, 1993). Zvýšená expresia CYP1A1 je používaná ako marker aktivácie aryl uhl'ovodíkového receptora (AhR) (Hu *et al.*, 2007).

3.2. Koža

Koža pokrýva celý vonkajší povrch ľudského organizmu, a je jeho najväčším orgánom. Zastáva radu funkcií, najvýznamnejšími z ktorých sú obrana pred fyzikálnymi, chemickými a biologickými škodlivinami z prostredia, hospodárenie s vodou, termoregulácia, syntéza vitamínu D a detekcia podnetov z okolia.

Pozostáva z troch základných vrstiev: hypodermis, dermis a epidermis, a kožných adnex. **Hypodermis**, podkožné väzivo, je najvnútornejšou vrstvou kože, ktorá sa nachádza medzi dermis a hlbšie uloženými orgánovými sústavami. Jedná sa o zmes tukového a areolárneho väziva, ktoré tkanivám poskytujú mechanickú oporu a izoláciu (Kim a Dao, 2021).



Obrázok č. 2: Prierez zdravou ľudskou epidermis a dermis. (obrázok prevzatý z Farage *et al.*, 2007; upravený).

Dermis, zamša, je väzivová štruktúra uložená medzi hypodermis a epidermis (Obrázok č. 2). Základ tejto bohato vaskularizovanej a inervovanej vrstvy predstavujú kolagénne a elastické vlákna, suspendované v extracelulárnej matrix obsahujúcej glykosaminoglykany, proteoglykany a glykoproteíny (Brown a Krishnamurthy, 2021).

Epidermis, pokožka, je najvrchnejšou vrstvou kože (Obrázok č. 2). Dominantnú populáciu buniek tvoria keratinocyty, na základe štádia dozrievania ktorých delíme epidermis do piatich vrstiev. Sú nimi stratum basale, spinosum, granulosum, lucidum a corneum. Keratinocyty postupne vytláčané k povrchu tela postupne rohovatejú, až dôjde k ich deskvamácii (Yousef *et al.*, 2021).

Stratum basale obsahuje mitoticky aktívne bunky hemidesmozómami ukotvené k bazálnej membráne oddeľujúcej epidermis od dermis (Obrázok č. 2). Bunky stratum basale sa delia asymetricky, teda jedna dcérska bunka ostane v stratum basale, zatiaľ čo druhá započne produkciu keratínových tonofilament a je postupne vytláčaná apikálne. Kmeňové bunky tejto vrstvy sú kvádrového až stĺpcovitého tvaru, mitoticky aktívne a konštantne produkujúce nové keratinocyty. V stratum basale sa okrem keratinocytov nachádzajú melanocyty (Obrázok č. 2) - bunky neuroektodermového pôvodu zodpovedné za produkciu melanínu, pigmentu, ktorý vo forme granúl dlhými výbežkami odovzdávajú susedným keratinocytom (Cichorek *et al.*, 2013). Keratinocyty vznikajúce v stratum basale produkujú keratín a sú zodpovedné za tvorbu epidermálnej vodnej bariéry

syntézou a vylučovaním lipidov. Taktiež regulujú vstrebávanie vápnika skrz aktiváciu cholesterolových prekursorov UVB žiarením za vzniku vitamínu D. Prítomné sú aj oválne modifikované epidermálne bunky, ktoré sa nachádzajú hneď na bazálnou membránou a nazývajú sa Merkelove bunky (Obrázok č. 2). Tieto bunky fungujú ako mechanoreceptory pre svetlo a dotyk a najviac sa ich nachádza v končekoch prstov. So susediacimi keratinocytmi sú spojené desmozómami a obsahujú intermediárne keratínové filamenty. Ich membrány interagujú s voľnými nervovými ukončeniami v koži (Yousef *et al.*, 2021).

Stratum spinosum (Obrázok č. 2) dostalo svoje meno pre charakteristický mikroskopický obraz pripomínajúci tŕňovité výbežky z buniek tejto vrstvy. Táto časť sa skladá z asi 8–10 bunkových vrstiev. Keratinocyty sú nepravidelné a polyedrické. Vo vyšších vrstvách *stratum spinosum* už keratinocyty produkujú keratohyalínové granuló obsahujúce proteíny trichohyalin a filaggrín, napomáhajúce s organizáciou filament keratínu do fibríl. Keratinocyty okrem prekursorov keratínu produkujú lamelárne telieska, obsahujúce glykolipidy. Tieto glykolipidy budú neskôr secernované na povrch buniek, kde budú slúžiť na zachovanie súdržnosti buniek. Okrem keratinocytov tu nachádzame dendritické bunky inak nazývané aj Langerhansove bunky (Obrázok č. 2). V koži fungujú ako prvá obranná línia a sú dôležité aj pri prezentovaní antigénu. Patria medzi jednojadrový fagocytický systém a obsahujú Birbeckove granuló – cytoplazmatické organely so špecifickým tvarom tenisovej rakety. Langerhansove bunky exprimujú MHC I a MHC II molekuly, vychytávajú antigény v koži a transportujú ich do lymfatických uzlín (Yousef *et al.*, 2021).

Bunky v *stratum granulosum*, časti epidermis tvorenej asi 3–5 vrstvami buniek, sa oplošťujú a nadobúdajú kosoštvorcový tvar (Obrázok č. 2). Táto vrstva sa vyznačuje granulárne imponujúcim mikroskopickým obrazom, zapríčineným prítomnosťou vysokého množstva keratohyalínových granúl, akumulujúcich sa medzi intracytoplazmatickými tonofibrilami. Keratohyalínové granuló obsahujú prekursorov keratínu, zatiaľ čo lamelárne granuló obsahujú glykolipidy, ktoré po sekrécii na povrch držia bunky pohromade.

Stratum lucidum (Obrázok č. 2) je vrstvou, ktorú nachádzame na dlaniach a chodidlách nôh, teda v oblastiach s hrubšou kožou. Za mikroskopicky svetlý obraz je zodpovedná

prítomnosť eleidínu, ktorý je transformačným produktom keratohyalínu (Yousef *et al.*, 2021).

Najapikálnejšou vrstvou je *stratum corneum*, pozostávajúce z dvadsiatich až tridsiatich vrstiev buniek, ktoré stratili organely a jadrá (Obrázok č. 2). Obsah keratohyalínových granúl premenil tonofibrily na homogénnu keratínovú matrix. Medzi oploštené keratinocyty sa tu vmedzeruje abundantná, na lipidy bohatá, extracelulárna matrix, ktorá spolu s nimi zodpovedá za vznik epidermálnej bariéry (Boer *et al.*, 2016). Mŕtve keratinocyty uvoľňujú defenzíny, antimikrobiálne peptidy, ktoré sú súčasťou prirodzenej imunity (Seo *et al.*, 2001)

Na úplnom povrchu pokožky je nízkym pH aktivovaná KLK - serinová peptidáza zodpovedná za degradáciu dezmozómov a deskvamáciu keratinocytov (Yousef *et al.*, 2021).

3.2.1. Aryl uhl'ovodíkový receptor v koži

AhR je exprimovaný vo všetkých typoch buniek kože. Odpovedá na exogénne a endogénne chemikálie buď indukciou alebo represiou expresie viacerých génov, ktoré majú toxické alebo ochranné účinky. V zdravej koži AhR signalizácia prispieva k diferenciacii keratinocytov, funkcii kožnej bariéry, pigmentácii kože a sprostredkováva oxidatívny stres (Esser *et al.*, 2013). AhR má v koži taktiež špeciálnu úlohu pri fotostarnutí, fotokarcinogéne a zápaloch (Napolitano a Patruno, 2018).

Expresia AhR v bariérových epiteliálnych bunkách kože a jeho úloha v bunkovej diferenciacii pravdepodobne vedie k zlepšeniu bariérovej funkcie. Dôkazom sú štúdie, ktoré pri sledovaní AhR^{-/-} pozorovali zvýšenú transepidermálnu stratu vody v porovnaní s AhR^{+/+} myšami (Haas *et al.*, 2016). V kultúre AhR^{-/-} myšských keratinocytov alebo AhR^{+/+} keratinocytov ošetrených AhR antagonistom je epidermálna diferenciácia narušená (van den Bogaard *et al.*, 2015). AhR antagonizmus v kultúrach ľudských keratinocytov inhibuje expresiu bariérových proteínov, epidermálnu stratifikáciu a tvorbu stratum corneum (van den Bogaard *et al.*, 2013). Niekoľko štúdií sledovalo schopnosť AhR zvyšovať expresiu proteínov epidermálnej bariéry ako napríklad filagrínu (Tsuji *et al.*, 2017) a lorikrínu (Hashimoto-Hachiya *et al.*, 2018) skrz aktiváciu OVOL1 (OVO-like 1 transkripčný faktor) a priamo zvyšovať expresiu involukrínu väzbou ligandu na AhR (van den Bogaard *et al.*, 2013). AhR aktivácia v koži môže viesť aj k zvýšenej produkcii

T buniek exprimujúcich IL22, čo môže zhoršovať príznaky atopickej dermatitídy (Trifari *et al.*, 2009).

V epidermis je UVB časť UV (ultrafialového) žiarenia absorbovaná tryptofánom, čo vedie k tvorbe fotoproduktov ako napríklad 6-formylindolo(3,2-b) karbazolu (FICZ), ktorý sa s vysokou afinitou viaže na AhR a indukuje expresiu CYP1A1 (Fritsche *et al.*, 2007).

Kvôli svojej lipofilnej štruktúre, vďaka ktorej môžu voľne difundovať skrz bunkové membrány, PAH prítomné v tabakovom dyme, znečistenom ovzduší alebo strave, nie len že môžu prenikať skrz odhalené bariérové orgány a aktivovať AhR takýmto spôsobom, môžu sa taktiež dostať do obehu a sekundárnych orgánov a aktivovať AhR v koži (Kao *et al.*, 1985; VanRooij *et al.*, 1993).

AhR je zapojený aj do patogenézy iných kožných chorôb, ako sú napríklad vitiligo alebo rakovina. Na základe rôznych faktorov a zámeru využitia AhR, dĺžka a intenzita vystavenia AhR environmentálnym, pracovným a stravovacím faktorom, genetické predispozície alebo typ kožného ochorenia určujú či bude prospešná AhR aktivácia alebo inhibícia (Haarmann-Stemann *et al.*, 2015).

Zatiaľ čo blokovanie AhR signálnej aktivity by mohlo napomôcť prevencii alebo liečbe rakoviny kože, aktivácia sa zdá byť výhodná pri riešení zápalových kožných ochorení ako napríklad psoriáza alebo atopická dermatitída (Furue *et al.*, 2019).

3.3. Proteíny epidermálnej bariéry

3.3.1. Hornerín (HRNR)

Proteín hornerín bol objavený a popísaný v roku 2001, ako nový pro-filaggrin-like proteín izolovaný z kože embryí myši (Makino *et al.*, 2001). Ľudský gén pre hornerín (HRNR) bol identifikovaný na chromozóme 1q21.3, medzi génom pre trichohyalín a filagrín. Exprimovaný proteín hornerín patrí medzi S100 fúzne proteíny, s počtom aminokyselín v sekvencii stanoveným na 2850 a predpokladanou molekulárnou hmotnosťou 280 kDa. S100 fúzne proteíny majú na N-konci EF-hand domény, kde sa viažu vápenaté ióny, za ktorými nasledujú spacer sekvencie a veľké repetitívne domény. C-koniec obsahuje iba jedinečné sekvencie. Konkrétne repetitívna doména hornerínu je bohatá na serín, glycín a glutamín (Takaishi *et al.*, 2005). Vápenaté ióny sú pre kožu obzvlášť dôležité, pretože spúšťajú procesy rohovania (Hennings *et al.*, 1980).

Na rozdiel od myšieho hornerínu, expresia ľudského hornerínu nebola v skorších štúdiách detekovaná v zdravej koži trupu, no bol exprimovaný v regenerujúcej sa a psoriatickej koži (Takaishi *et al.*, 2005). Ľudský hornerín má teda podobnú no v istom rozmere líšiacu sa funkciu ako profilagrín, prekursor filagrínu (Takaishi *et al.*, 2005). Neskoršie štúdie dokázali, že HRNR je exprimovaný v ľudských epidermálnych keratinocytoch a je súčasťou zrohovatených bunkových obalov, nie je prítomný len v hyperproliferatívnych ľudských keratinocytoch. HRNR je teda exprimovaný v zdravej epidermis, nezávisle na etnickom pôvode. Nachádza sa v cytoplazme granulárnych keratinocytov v prítomnosti s pro-filagrinom, detekovaný je hlavne na ich periférii, čo naznačuje, že pro-filagrin je v procese diferenciácie keratinocytov syntetizovaný skôr ako hornerín. Túto hypotézu potvrdzuje aj fakt, že nižšie uložené granulárne keratinocyty síce obsahujú profilagrín, no hornerín vôbec (Henry *et al.*, 2011). Množstvo exprimovaného HRNR v zdravých bunkách kože bolo však aspoň o štyri rády nižšie ako množstvo exprimovaného FLG. S100 fúzne proteíny, medzi ktoré patrí aj HRNR, sú pravdepodobne prepájané transglutaminázami, aby udržiavali neporušenú fyzikálnu bariéru kože, ktorá je charakteristicky rezistentná a nepriepustná (Wu *et al.*, 2009). HRNR je teda zapojený do procesov organizácie zrohovatených bunkových obalov – keratinizácie (Henry *et al.*, 2011) a správnej funkcie kožnej bariéry (Pellerin *et al.*, 2013). Jeho zvýšená expresia je indukovaná UVB žiarením (Makino *et al.*, 2014).

3.3.2. Filagrín (FLG)

Gén pre filagrín (FLG, filamenty-agregujúci proteín) sa, ako mnohé ostatné gény zapojené do terminálnej diferenciácie, nachádza v epidermálnom diferenciačnom komplexe na chromozóme 1q21. Prvým produktom FLG génu je jeho prekursor proteín pro-filagrin (proFLG) - 400 kDa polyproteín skladajúci sa z 10–12 tandemových repetícií filagrínu (Irvine a McLean, 2006). Je to vysoko fosforylovaný polypeptid syntetizovaný v granulárnych keratinocytoch, ktorý je bohatý na histidín. Na N-konci má S100 väzobnú doménu pre vápenaté ióny, v strede obsahuje veľkú repetitívnu doménu filagrínu a na C-konci sa nachádza unikátna doména. Jednotlivé peptidy filagrínu o hmotnosti približne 37 kDa sú proteolyticky uvoľnené a následne defosforylované, čo napomáha agregácii keratínových filamentov. Názov filagrínu teda pochádza z jeho funkcie: filamenty-agregujúci proteín (McGrath, 2008). Agregáciou keratínu vzniká vláknitá matica korneocytov. Vo vyššie uložených granulárnych bunkách sú peptidy filagrínu pevne zakotvené do bunkovej membrány zvýšením množstva desmozomálnych

proteínov. Filagrín teda rúti cytoskelet keratinocytov, čím vznikajú ploché šupiny paralelné k vonkajšej vrstve epidermis. Tento komplex je prepojený transglutaminázami čím je vytvorená kožná bariéra (Irvine a McLean, 2006). V najvyššej vrstve stratum corneum je FLG proteolyzovaný na voľné aminokyseliny, ktoré sú nevyhnutné pre fotoochranu kože a pre acidifikáciu (Pellerin *et al.*, 2013) a hydratáciu stratum corneum (Rawlings a Harding, 2004). Naopak, nedostatok FLG je spojený s klinickými prejavmi kože postihnutej atopickou dermatitídou, napríklad nedostatok voľných aminokyselín v stratum corneum (Kezic *et al.*, 2008), nárast pH stratum corneum a suchosť (Mlitz *et al.*, 2012). Filagrín a keratín, hlavné proteíny keratinocytov, tvoria približne 80–90% celkovej hmotnosti epidermis (McGrath, 2008). FLG je exprimovaný v koži, týmuse, žalúdku, mandliach, semenníkoch, placentе, obličkách, pankrease, mliečnych žľazách, močovom mechúre, štítnej žľaze a priedušnici. Nebol detekovaný v srdci, mozgu, pečeni, pľúcach, kostnej dreni, tenkom čreve, prostate, slepom čreve alebo nadobličkách (Wu *et al.*, 2009). V koži je FLG exprimovaný hlavne v stratum corneum pokožky (Presland *et al.*, 1992).

Jeho expresia je v koži pri zápalových ochoreniach pozitívne regulovaná GATA3 transkripčným faktorom (Zeitvogel *et al.*, 2017), zvýšená expresia bola zaznamenaná aj po aktivácii AhR (Furue *et al.*, 2015). Značne expresiu FLG skrz AhR zvyšuje konkrétne v HaCaT immortalizovaných keratinocytoch aj FICZ (Kiyomatsu-Oda *et al.*, 2018) alebo TCDD (Loertscher *et al.*, 2002). Medzi ďalšie známe ligandy AhR, ktoré zvyšujú expresiu FLG a iných proteínov epidermálnej bariéry patrí napríklad uhľový decht (Bogaard *et al.*, 2013), ketokonazol (Tsuji *et al.*, 2012) alebo Glyteer – decht zo sójových bôbov, ktorý obnovoval expresiu FLG po jej inhibícii Th2 cytokínmi (Takei *et al.*, 2015). Ďalšie štúdie preukázali, že pozitívne expresiu profilagrínu v kultúre ľudských keratinocytov alebo v myšacích keratinocytoch ovplyvňujú aj aktivátory receptorov aktivovaných proliferátormi peroxizómov (PPAR) a pečňových X receptorov (LXR), napríklad GW1514 (selektívny PPAR- β/δ agonista) (Schmuth *et al.*, 2004; Kömüves *et al.*, 2002).

Naopak, IL17 expresiu filagrínu znižuje (Gutowska-Owsiak *et al.*, 2012) a jedným z hlavných genetických faktorov znižujúcich expresiu FLG sú mutácie v gène pre filagrín, ktoré vedú k strate jeho funkcie a vývinu atopickej dermatitídy (Paternoster *et al.*, 2015).

3.3.3. Involukrín (IVL)

Involukrín je dôležitým markerovým proteín-kódujúcim génom, ktorý slúži ako model pri snahe pochopiť mechanizmy regulujúce procesy diferenciácie kožných buniek (Eckert *et al.*, 2004). Gén pre involukrín sa nachádza na chromozóme 1q21-22 (Simon *et al.*, 1989). Involukrín je proteín keratinocytov, ktorý je najskôr prítomný v bunkovom cytosole a neskôr prepojený s bunkovou membránou transglutaminázami za vzniku kožnej bariéry (Eckert a Green, 1986). Ide o 68kDa prekursor zrohovatej obálky keratinocytov, s počtom aminokyselín odhadnutým na 460. Involukrín je vďaka jeho predĺženej molekulárnej štruktúre tyčinky schopný spájať viacero prekursorových molekúl v zrohovatej keratinocytovej obálke (Yaffe *et al.*, 1992). Približne 46% aminokyselinových zvyškov involukrínu je tvorených glutamínom alebo kyselinou glutámovou. Involukrín nie je syntetizovaný v bazálnej vrstve, no pár vrstiev nad ňou. Nástup syntézy involukrínu teda naznačuje, že započína rané štádium terminálnej diferenciácie, pretože začína až keď sa keratinocyty prestávajú deliť (Rice a Green, 1979). V zdravej ľudskej koži je involukrín charakteristicky distribuovaný – prítomný je hlavne v hornej vrstve stratum spinosum a v granulárnej vrstve (Murphy *et al.*, 1984).

Viacero fytochemikálií je schopných aktivovať AhR alebo OVOL1 a tým zvyšovať expresiu bariérových proteínov kože, medzi ktoré patrí aj IVL. Extrakty z koreňov rastliny *Rhodiola crenulata* majú silné antioxidantné účinky a sú známe tým, že dokážu inhibovať oxidatívny stres, ktorý bol v epidermálnych keratinocytoch indukovaný ultrafialovým a γ -žiarením. Hashimoto-Hachiya *et al.* vo svojej štúdií zistili, že tieto extrakty zvyšujú expresiu IVL a FLG skrz AhR a OVOL1, zatiaľ čo expresia IVL nebola závislá na OVOL1, ale len na AhR (Hashimoto-Hachiya *et al.*, 2018). V štúdií s HaCaT keratinocytmi s nadmerne exprimovanými glukokortikoidnými receptormi (GR) bola pozorovaná vyššia expresia involukrínu, avšak bez nutnej prítomnosti GR ligandov (Yoon *et al.*, 2014).

GNF351 a SGA360 (antagonisti AhR) majú po naviazaní na receptor schopnosť potláčať expresiu IVL (van den Bogaard *et al.*, 2015). Rovnako expresiu IVL *in vitro* znižujú aj cytokíny IL4 a IL13, pravdepodobne cez signalizáciu signálneho transduktora a aktivátora transkripcie 6 (STAT6) (Kim *et al.*, 2008). Pre správnu aktivitu promotora ľudskeho IVL je nevyhnutná prítomnosť DNA-väzobného miesta pre aktivačný proteín

1 (AP-1). Inhibícia AP-1 funkcie vedie k strate funkcie promotora IVL, čo vedie k zníženej expresii IVL (Adhikary *et al.*, 2004).

3.4.Ochorenia kože

3.4.1. Psoriáza

Psoriáza je chronické zápalové ochorenie s hyperproliferatívnym účinkom a genetickým základom. Medzi jej základné prejavy patria epidermálna hyperplazia a pozmenená diferenciácia keratinocytov (Gudjonsson a Elder, 2007). Psoriáza vulgaris je zatiaľ najlepšie preštudovanou ľudskou chorobou, ktorá je sprostredkovaná T bunkami a dendritickými bunkami. Patrí medzi najčastejšie formy psoriázy (85–95% pacientov postihnutých psoriázou) a zapájajú sa do jej patogenézy obe formy imunitného systému – vrodená aj získaná. Je charakteristická prítomnosťou začervenaných oblastí kože s jasne definovanými okrajmi a bielymi šupinkami, často sa nachádzajúcimi na lakt'och, kolenách, pokožke hlavy a chrbte. Medzi menej časté, no napriek tomu prítomné typy psoriázy patria psoriáza guttata, pustulosa, inverzná psoriáza, erytrodermická psoriáza alebo palmoplantárna psoriáza (Griffiths a Barker, 2007).

Biele šupinky sú spôsobené hyperproliferatívnou epidermis s predčasným dozrievaním keratinocytov a neúplným rohovatením so zachovanými jadrami v stratum corneum. Začervenanie je spôsobené zvýšeným množstvom dilatovaných kapilár, ktoré dosahujú až na povrch kože skrz stenčený epitel (Nestle *et al.*, 2009). Histologicky ide o zhrubnutie živých vrstiev epidermis (akantóza) v dôsledku až desaťkrát vyššej mitotickej rýchlosti bazálnych keratinocytov (Lowe *et al.*, 2014), zhrubnutie zrohovatených vrstiev epidermis (hyperkeratóza) a prítomnosť bunkových jadier v zrohovatej vrstve (parakeratóza). Dilatované a skrútené krvné cievy zasahujú až do vrcholov dermálnych papíl. V dermis a epidermis je prítomné zvýšené množstvo makrofágov, mastocytov, neutrofilných granulocytov a tzv. zápalový infiltrát obsahujúci T-lymfocyty. Hromadenie týchto buniek v epidermis vedie k vzniku Kogojových pustúl alebo subkorneálnych mikroabscesov tiež známych ako Munroove mikroabscesy (Boehncke a Schön, 2015). Keďže nedochádza k prirodzeným procesom diferenciácie buniek, dochádza k strate normálnej granulárnej vrstvy a hromadeniu keratínu v epidermis. V dermis sú hojne prítomné jednojadrové myeloidné bunky a T bunky (Lowe *et al.*, 2014).

3.4.1.1. Patogenéza psoriázy

Charakteristickým znakom psoriázy je zápal, ktorý vedie k nekontrolovanej proliferácii a nefunkčnej diferenciacii keratinocytov. Nad vyššie spomínaným zápalovým infiltrátom ležia psoriatické šupinky zhrubnutej epidermis (Rendon a Schäkel, 2019).

Za rozvoj a pretrvávanie psoriatického zápalu sú zodpovedné poruchy v kožných imunitných odpovediach získanej a vrodenej formy imunity (Harden *et al.*, 2015). Patogenéza psoriázy môže byť zhrnutá do dvoch bodov: iniciačná fáza pravdepodobne vyvolaná určitou kožnou traumou (známe tiež ako Koebnerov fenomén) (Thorarensen *et al.*, 2017), infekciou (Fry a Baker, 2007) alebo liečivami (Abel *et al.*, 1986) a fáza manifestného ochorenia charakteristická chronickou progresiou s klinickými prejavmi (Rendon a Schäkel, 2019).

Antigén-prezentujúce bunky (dendritické bunky) hrajú dôležitú úlohu v počiatkových štádiách psoriázy, no ich aktivácia nie je dodnes úplne jasná. Jeden z navrhnutých mechanizmov zahŕňa rozpoznanie antimikrobiálnych peptidov (AMPs) sekretovaných keratinocytmi ako odpoveď na zranenie, ktorých expresia je zvýšená v psoriatickej koži. Medzi najpreštudovanejšie z nich patria LL37 (katelicidínový proteín), β -defenzíny a S100 proteíny, medzi ktoré patrí aj profilagrín (Morizane *et Gallo*, 2012; Eckert *et al.*, 2004).

LL37 uvoľnený poškodenými keratinocytmi tvorí komplexy s genetickým materiálom z iných poškodených buniek. Po naviazaní na DNA stimuluje toll-like receptory (TLR) 9 v plazmacytoidných dendritických bunkách (pDCs) (Lande *et al.*, 2007). Aktivácia pDCs je kľúčová pri rozvoji psoriatických šupiniek a je charakteristická produkciou interferónov (IFN) typu I – IFN- α a IFN- β (Nestle *et al.*, 2005; Gregorio *et al.*, 2010). IFN typ signalizácie podporuje fenotypické dozrievanie myeloidných dendritických buniek (mDC) a podieľa sa na diferenciacii a funkcii Th1 a Th17, vrátane produkcie IFN- γ a interleukínu 17 (IL-17) (Santini *et al.*, 2011).

LL37-DNA komplexy stimulujú pDCs skrz TLR9, no LL37-RNA komplexy stimulujú pDCs skrz TLR7 a mDCs skrz TLR8 (Ganguly *et al.*, 2009). Aktivované mDCs migrujú do lymfatických uzlín, kde sekretujú faktory nádorovej nekrózy α (TNF- α), IL-23 a IL12. IL23 a IL12 modulujú diferenciaciu a proliferáciu Th17 a Th1 buniek. Medzi ďalšie pro-zápalové bunky nachádzané v léziách psoriatickej kože patria slan⁺ monocyty, ktoré

na LL37-RNA aktiváciu odpovedajú sekréciou veľkého množstva TNF- α , IL12 a IL23 (Hänsel *et al.*, 2011).

Aktivácia odpovede získanej imunity skrz T-bunky udržuje fázu manifestného ochorenia psoriázy (Nestle *et al.*, 1994). Th17 cytokíny, hlavne IL17, IL21 a IL22 aktivujú proliferáciu keratinocytov v epidermis (Lai *et al.*, 2018). Zápalové prostredie aktivuje proliferáciu keratinocytov skrz TNF- α , IL17 a IFN- γ , ktoré po aktivovaní komplexom LL37-DNA zvyšujú produkciu IFN typu I (Morizane *et al.*, 2012).

Psoriáza má však aj genetické zložky – u blízkych príbuzných pacientov s psoriázou je zvýšený výskyt vzniku ochorenia, kde jednovaječné dvojčatá v porovnaní s dvojevaječnými majú dva až trikrát vyššiu šancu byť postihnuté (Farber *et al.*, 1974).

3.4.2. Atopická dermatitída

Atopická dermatitída (AD), inak nazývaná aj atopický ekzém, je svrbivé zápalové ochorenie vyskytujúce sa prevažne v kožných záhyboch (Aoki *et al.*, 1992). Je charakteristická slabou ohraničeným začervenaním kože sprevádzaným opuchmi, prítomnosťou pľuzgierov, mokvaním v akútnom štádiu a hrubnutím kože v chronickom štádiu ochorenia (Williams, 2005). Približne 70 % prípadov ochorenia začína u detí mladších ako 5 rokov (Williams, 2000) zatiaľ čo asi 10 % prípadov v nemocničnom prostredí začína u dospelých ľudí (Bannister a Freeman, 2000).

U približne 30 % detských pacientov s atopickou dermatitídou sa vyvinie aj astma alebo alergická rinitída s frekvenciou 35 % (Luoma *et al.*, 1983).

Koža pacientov s atopickou dermatitídou obsahuje infiltrát T buniek, indikujúci prítomnosť zápalu (Mihm *et al.*, 1976). Akútne papulárne lézie kože sú charakteristické vnútrobunkovými opuchmi (spongióza) epidermis, mokvaním a začervenaním (Girolomoni *et al.*, 2021). Langerhansove bunky v koži s léziami a menej v koži bez lézií na svoj povrch viažu IgE molekuly v IgE-asociovej forme. V dermis akútnych lézií je prítomný infiltrát T buniek s makrofágmi. Lymfocytický infiltrát sa skladá hlavne z aktivovaných pamäťových T buniek nesúcich CD3 (cluster of differentiation 3), CD4 (cluster of differentiation 4), HLA-DR (ľudský leukocytový antigén, izotyp DR), CD25 (cluster of differentiation 25) a CD45RO (cluster of differentiation 45, kratšia izoforma) (Bieber, 2010). Prítomné sú aj eozinofily, no bazofily a neutrofilové sa v akútnych léziách

nachádzajú len vzácné. Rovnako sú prítomné aj mastocyty v rôznych štádiách degranulácie (Mihm *et al.*, 1976).

Chronické lézie sú charakteristické hyperplastickou epidermis, značnou hyperkeratózou, minimálnou spongiózou, dyspigmentáciou, suchosťou kože a lichenifikáciou (Girolomoni *et al.*, 2021). V epidermis sa nachádza viac dendritických buniek nesúcich IgE a v dermis je prítomný infiltrát skladajúci sa hlavne z makrofágov. Počet mastocytov je vyšší, no všeobecne ide o plne granulované bunky. Neviditeľné histologicky, no pravdepodobne prítomné v dermis sú aj eozinofily, ktorých produkty ako napríklad eozinofilný kationický proteín alebo toxíny odvodené od eozinofilov boli detekované imunofarbením. Eozinofily teda pravdepodobne prispievajú k alergickému zápalu kože vylučovaním cytokínov a mediátorov, ktoré zápal rozširujú a indukujú poranenie tkaniva pri atopickej dermatitíde skrz produkciu reaktívnych foriem kyslíka a uvoľnenie toxických granulárnych proteínov (Bieber *et al.*, 2010).

3.4.2.1. Patogenéza atopickej dermatitídy

Deti rodičov s históriou alergických ochorení majú vyššie riziko byť postihnuté atopickou dermatitídou (Apfelbacher *et al.*, 2011). Pokiaľ je postihnutý len jeden z rodičov, riziko, že jeho dieťa bude postihnuté tiež je trikrát vyššie, zatiaľ čo pokiaľ sú postihnutí obaja rodičia, riziko je vyššie až päťkrát (Torres *et al.*, 2019).

Za patogenézou tohto ochorenia stojí viacero spolupracujúcich génov, no nejde o jednoduchú Mendelovskú dedičnosť. Medzi ďalšie faktory spadajú aj epigenetické zmeny alebo dysregulácia vrodenej a získanej formy imunitného systému. Susceptibilné gény pre AD boli lokalizované na 31 rôznych chromozómových lokusoch (Paternoster *et al.*, 2015). Medzi najdôležitejšie z nich patria gény kódujúce štruktúrne a funkčné proteíny epidermis - ako napríklad FLG - a gény kódujúce proteíny, ktoré regulujú odpovede získanej a vrodenej formy imunity (Nedoszytko *et al.*, 2020). Génové mutácie v štruktúrnych a funkčných proteínoch epidermis vedú k poškodeniu bariérovej funkcie epidermis, ako napríklad o mutáciu vo *flagrine* (Sroka-Tomaszewska a Trzeciak, 2021). FLG 2282del4 a R501X mutácie sú hlavnými Európskymi variáciami a nevedú k produkcii celého proteínu kódovaného génom. Obe mutácie vedú k skráteniu translácie FLG tvorbou predčasných terminačných kodónov (Smith *et al.*, 2006). FLG mutácie sú vysoko rizikovým faktorom pre atopickú dermatitídu a väčšinou súvisia so skorým

nástupom a ťažkým prejavom ochorenia. Avšak, neprítomnosť mutácie neznamená, že k ochoreniu nemôže dôjsť (Weidinger *et al.*, 2006).

Mutácie vedú k zvýšenej transepidermálnej strate vody, nadmernej suchosti pokožky, vyššiemu pH na povrchu kože a porušeniu rovnováhy voľných mastných kyselín, ceramidov a triglyceridov. Bariérový defekt vedie k degradácii vnútrobunkových spojení, vyššej aktivite proteáz, vyššej epidermálnej priepustnosti, infiltrácii a prezentácii antigénov na Langerhansových bunkách a stimulácii prozápalových cytokínov (Sroka-Tomaszewska a Trzeciak, 2021; De Benedetto *et al.*, 2011).

Avšak, genetické zmeny samotné nemôžu vysvetliť taký rapidný nárast prípadov AD za posledné dekády. Zodpovedné sú aj meniace sa environmentálne faktory, západný životný štýl, industrializácia, znečistenie ovzdušia, zmena stravy, obezita, zvýšené používanie antibiotík alebo fajčenie. Najpravdepodobnejšie je, že tieto faktory ovplyvňujú bunky skrz epigenetické zmeny, ktoré mimo iné ovplyvňujú schopnosť buniek produkovať cytokíny (Bin a Leung, 2016).

S vysokou pravdepodobnosťou bolo potvrdené, že epigenetická regulácia je jedným z determinantov rozvoja AD, rovnako ako polymorfizmus FLG génu a génov spojených s imunitným systémom a epidermálnou bariérou (Martin *et al.*, 2020). Pri epigenetickej štúdií dospelých pacientov s AD boli objavené značné rozdiely v metylácii CpG oblastí (cytozín-fosfát-guanozín) v porovnaní s kontrolami zdravých ľudí. Ide hlavne o gény zapojené do diferenciácie keratinocytov, proliferácie a odpovede vrodenej imunity, vrátane S100 génov (Rodríguez *et al.*, 2014). Aktivácia GATA3 transkripčného faktoru v Th2 lymfocytoch spôsobuje produkciu IL4, IL5 a IL13 demetyláciou promótorov génov pre IL13 a IL4 a metyláciou H3 histónov tohto regiónu. Ďalej dochádza k zvýšenej metylácii promótoru génu pre IFN- γ a zníženiu acetylácie H3 histónov v tomto regióne (Nedoszytko *et al.*, 2020).

Ďalším mechanizmom je miRNA-sprostredkovaná post-transkripčná regulácia. Pri AD sú miRNA zapojené do regulácie expresie génov určujúcich Th2 polarizáciu, funkcie regulačných T lymfocytov, zápalových procesov, tesných spojení, proliferácie a apoptózy epidermálnych keratinocytov a syntézy cytokínov a chemokínov (Nedoszytko *et al.*, 2020). Pri porovnaní zdravej a AD kože bolo zistené, že miR-155 vykazuje značne vyššiu expresiu v infiltrujúcich T-lymfocytoch v AD kožných léziách (Sonkoly *et al.*, 2010). Hlavný typ bunky zodpovedný za zvýšené množstvo miR-155 v kožných léziách

boli CD4⁺ T bunky. MiR-155 môže aktivovať T bunky, čo vedie k udržovaniu chronického zápalu (Chang a Lu, 2020).

Pri AD sú dôležité aj poškodenia imunitnej regulácie. Navrhnuté boli dve hypotézy, ktoré popisujú vznik ochorenia. Prvou je, že imunologické chyby sú primárnou udalosťou v rozvoji AD a stimulácia alergénmi vedie k oslabeniu epidermálnej bariéry. Druhou hypotézou je, že prvým krokom pri patogenéze AD je poškodenie epidermálnej bariéry, ktoré je nevyhnutné pre priebeh imunitnej dysregulácie (Silverberg a Silverberg, 2015).

V akútnej fáze AD, vysoké množstvo alergénov vstupuje skrz poškodenú epidermálnu bariéru a stimuluje mastocyty. Mastocyty degranulujú a uvoľňujú zápalové mediátory ako histamín, prostaglandín D2 (PGD2), IL6, IL8, TNF- α a IL31. Poškodené epiteliálne bunky kože uvoľňujú týmusový stromálny lymfopoetín (TSLP), ktorý podporuje kožný zápal sprostredkovaný Th2. Ako odpoveď na vniknuté alergény a antigény kožné lymfoidné bunky a keratinocyty uvoľňujú zápalové cytokíny IL12, IL18 a chemokíny privolávajúce ďalšie typy imunitných buniek ako bazofily, eozinofily, neutrofilny a T bunky. Th2 odpovede sprostredkujú druhé štádium zápalu kože (Peng a Novak, 2015).

Do patogenézy chronickej AD sú zapojené Th1, Th2, Th17 a Th22 lymfocyty. Prozápalové cytokíny IL12 a IL18 sekrétované kožnými dendritickými bunkami podporujú aktiváciu Th1. IFN- γ sekrétovaný Th1 bunkami indukuje apoptózu keratinocytov. Aktivácia Th22 indukuje prestavbu kože a charakteristickú hrúbku kože pri chronickej AD (Gittler *et al.*, 2012).

3.4.3. Úloha aryl uhl'ovodíkového receptora pri psoriáze a atopickej dermatitíde

Koža je ako najväčší vonkajší orgán tela citlivá na veľké množstvo exogénnych chemikálií a vnútorných látok. Pre udržanie homeostázy musia kožné bunky – keratinocyty, sebocyty, fibroblasty, dendritické bunky a iné imunitné bunky – exprimovať niekoľko chemických senzorov, ako napríklad AhR (Jones a Reiners, 1997), pregnanový X receptor (Bikle, 2015), konštitutívny androstanový receptor (Avouac *et al.*, 2014) a receptory aktivované proliferátormi peroxizómov (Rivier *et al.*, 1998).

AhR, pri vysoko-afinitnej väzbe na environmentálne polyaromatické uhl'ovodíky a dioxíny indukuje oxidatívny stres generovaním reaktívnych foriem kyslíka

(Furue *et al.*, 2014). AhR reguluje hlavne imunitnú rovnováhu Th17/22 a T buniek, čiže hrá pri psoriáze a atopickkej dermatitíde dôležitú úlohu (Kimura *et al.*, 2008). V modele psoriázy indukovanej imikvimidom, nedostatok AhR zhoršuje kožné zápalý u myši zvýšením expresie IL22, IL17a a IL23. Rovnako je nedostatkom AhR zvýraznená aj oneskorená bunková reakcia (hypersenzitivita typu 4) (Di Meglio *et al.*, 2014). Tapinarof a 6-formylindolo(3,2-b)karbazol (FICZ) redukovali kožné zápalové príznaky psoriázy indukovanej imikvimidom inhibíciou expresie génov IL17a, IL17f, IL19, IL22, IL23a a IL1b (Smith *et al.*, 2017). Dôkaz, že terapeutický efekt tapinarofu a FICZ-u bol závislý na AhR je, že tento efekt nebol sledovaný v myšiach, ktoré boli AhR-deficientné. V *ex vivo* experimentoch s ľudskou kožou síce tapinarof znižoval expresiu IL17a o približne 50%, no zvyšoval expresiu IL22 (Smith *et al.*, 2017). Expresia AhR, ARNT a CYP1A1 je v psoriatickej koži zvýšená (Kim *et al.*, 2020).

AhR je taktiež vysoko exprimovaný v Th17 bunkách, kde hrá dôležitú úlohu pri ich tvorbe *in vivo* a *in vitro*. Th17 bunky bez AhR majú porušenú schopnosť produkovať IL17A a takmer neprítomnú schopnosť produkovať IL22 (Veldhoen *et al.*, 2008).

3.4.4. Význam proteínov epidermálnej bariéry a CYP1A1 pri psoriáze a atopickkej dermatitíde

Podľa starších štúdií sa u ľudí hornerín v zdravej dospeljej a fetálnej koži trupu neexprimuje. Jeho expresia sa spája hlavne s kožou regenerujúcou sa po zranení alebo v psoriatickej a AD koži, čo naznačuje, že je pravdepodobne závislá na hyperproliferatívnom štádiu epidermis pri chronickom a akútnom zápalovom ochorení (Takaishi *et al.*, 2005). Avšak, neskoršie štúdie potvrdzujú prítomnosť HRNR aj v zdravej koži, na základe jeho izolácie zo stratum corneum. Ďalej bol nájdený aj v koži v iných oblastiach tela, ako napríklad hlave, nohách, rukách a chodidlách. V bunkovej kultúre epidermálnych ľudských keratinocytov bola expresia HRNR mRNA indukovaná počas Ca^{2+} -dependentnej diferenciacie (Wu *et al.*, 2009).

V zdravej koži bol filagrín nájdený v stratum granulosum a stratum corneum, jeho distribúcia však nebola kontinuálna. Stratum basale a stratum spinosum boli na prítomnosť filaggrínu negatívne. Psoriatická koža prítomnosť filaggrínu v stratum corneum a stratum granulosum nevykazovala vôbec. Jeho absencia alebo redukované množstvo teda potvrdzujú neprítomnosť typickej granulárnej vrstvy zdravej kože (Watanabe *et al.*, 1991).

Výsledky imunohistochemického farbenia odhalili špecifickú distribúciu involukrínu v zdravej a psoriatickej epidermis. V zdravej koži sa involukrín nachádzal výlučne v granulárnej vrstve, zatiaľ čo v psoriatickej koži involukrín vychádzal až z polovice stratum spinosum do vrstvy zrohovatených buniek. V psoriatických zrohovatených bunkách bola prítomnosť involukrínu prominentná hlavne v periférii buniek, na rozdiel od zdravých buniek. Na základe výsledkov imunoelektrónovej mikroskopie je možné povedať, že v zdravej koži je involukrín difúzne distribuovaný v cytoplazme granulárnych buniek a nižšie uložených zrohovatených buniek. V psoriatickej pokožke sa involukrín nachádzal vo vrstve živých buniek, v zrohovatej vrstve sa involukrín nachádzal v zrohovatej obálke a vnútrobunková prítomnosť bola zriedkavá (Ishida-Yamamoto a Izuka, 1995).

CYP1A1 enzymatická aktivita bola identifikovaná ako kritický regulátor prospešnej AhR signalizácie pri kožných zápalových ochoreniach. Zvýšená expresia a enzymatická aktivita CYP1A1 v koži myši viedla k zhoršenej aktivácii imunitných buniek a k patologickému stavu kože. Inhibícia enzymatickej aktivity CYP1A1 zlepšila kožnú imunopatológiu hlavne tým, že v nej obnovila prospešnú AhR signalizáciu. Pacienti s psoriázou vykazujú redukovanú aktiváciu AhR dráhy a zvýšenú enzymatickú aktivitu CYP1A1 v porovnaní so zdravými pacientami (Kyoreva *et al.*, 2021).

3.5. Triptány

Triptány sú liečivá na báze tryptamínu s indolovým jadrom, ktoré sú dnes považované za liečbu prvej voľby pri riešení migrén. Konkrétne frovatriptán (FRO) a naratriptán (NARA) veľmi pomáhajú pri uvoľnení bolesti pri menštruačných migrénach (Maccone a Perloff, 2017). Ide o skupinu liekov, ktoré sa chovajú ako potentní agonisti serotonínových receptorov 5-HT_{1B} a 5-HT_{1D} v krvných cievach a na nervových zakončeniach. Spôsobujú konštrikciu bolestivých dilatovaných kraniálnych ciev skrz 5-HT_{1B} receptory inhibíciou inervácií ciev dury mater. Vykazujú rýchly nástup účinku a nízky výskyt nepriaznivých účinkov (Tepper *et al.*, 2002). Všeobecne sú triptány metabolizované monoaminoxidázami fázy I (MAOs) a rôznymi enzýmami cytochrómami P450. Každý triptán má však unikátny metabolický profil. Všetky triptány majú veľmi podobnú farmakodynamickú charakteristiku, líšia sa však hlavne farmakokineticky (Armstrong a Cozza, 2002). Väčšina triptánov je derivovaná z N,N-dimetyltryptamínu.

3.5.1. Signalizácia skrz 5-HT₁ receptory

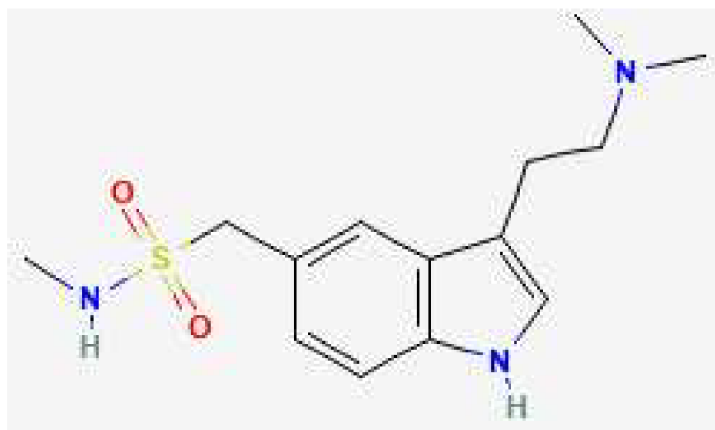
5-HT₁ receptory sú metabotropné receptory spojené s G-proteínmi s inhibujúcou funkciou (Gi/o) (De Vivo a Maayani, 1986). Po väzbe agonistu na receptor, je GDP zamenený za GTP na α podjednotke Gi/o (Birnbaumer, 2007), adenylát cykláza je inhibovaná, čo vedie k zníženej produkcii cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP), zníženej aktivite proteínkinázy A (PKA) (Cooper a Londos, 1982) a celkovému zníženiu neuronálnej aktivity (Hannon a Hoyer, 2008).

Aktivácia 5-HT₁ receptorov taktiež aktivuje dovnútra-smerujúce draslíkové kanály spojené s G-proteínom (GIRKs) (Lüscher *et al.*, 1997), čo znižuje rýchlosť prenosu vzruchu neurónov rafeálnych jadier (Blair *et al.*, 1998).

V tejto práci bola sledovaná biologická aktivita nasledujúcich triptánov.

3.5.2. Sumatriptán (1-[3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1H-indol-5-yl]-N-methylmethanesulfonamide)

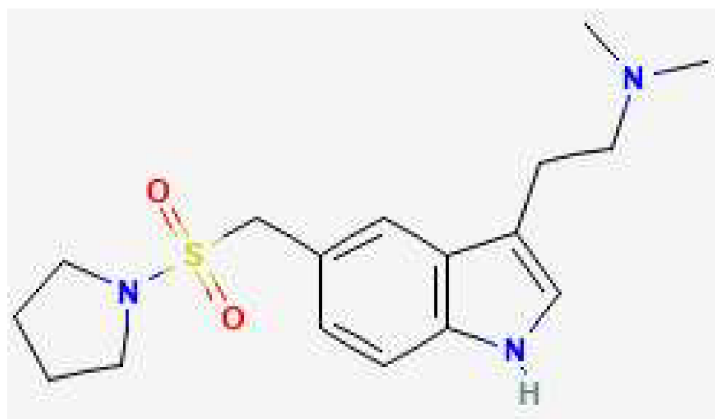
Sumatriptán (SUMA) je triptánom prvej generácie, ktorý bol objavený ako prvý, no kvôli jeho slabej orálnej biologickej dostupnosti a lipofilite boli vyvíjané triptány druhej generácie (Armstrong a Cozza, 2002). Ide o sulfonamid skladajúci sa z N,N-dimetyltriptamínu, ktorý nesie N-metylmetánsulfoamidovú skupinu v pozícii 5. Zaraduje sa do tryptamínov a funguje ako selektívny serotonergický agonista a vazokonštriktívne agens. Vo forme práškovej sukcinátovej soli sa používa ako akútna liečba migrény u dospelých (Cady *et al.*, 1991). Patrí do farmakoterapeutickej skupiny analgetík a selektívnych agonistov 5-HT_{1D} receptora. Ku klinickej odpovedi dochádza približne 30 minút po perorálnom podaní 100 mg dávky. Odporúčaná perorálna dávka pre tablety je 50 mg. Po perorálnom podaní 100 mg dávky je maximálna koncentrácia v plazme v priemere 54 ng/ml (Deleu a Hanssens, 2000), u pacientov s insuficienciou pečene je koncentrácia vyššia. Polčas eliminácie je približne 2 hodiny a ide primárne o vylučovanie oxidačným metabolizmom sprostredkovaným monoaminoxidázou A. Hlavným metabolitom je kyselina indolctová, ktorá je do moču vylučovaná vo forme voľnej kyseliny alebo glukuronidových konjugátov. Dávky prevyšujúce 400 mg perorálne a 16 mg subkutánne sú spojené s častými nežiaducimi reakciami ako závraty, ospalosť, prechodné zvýšenia krvného tlaku, návaly tepla alebo dyspnoe. Sumatriptán nemal genotoxický ani karcinogénny účinok v *in vitro* systémoch a štúdiách na zvieratách (ŠÚKL).



Obrázok č. 3: Chemická štruktúra sumatriptánu. Prvý objavený triptán - sumatriptán, ktorý funguje ako selektívny serotonergický agonista (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.3. Almotriptán (*N,N*-dimethyl-2-[5-(pyrrolidin-1-ylsulfonylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]ethanamine)

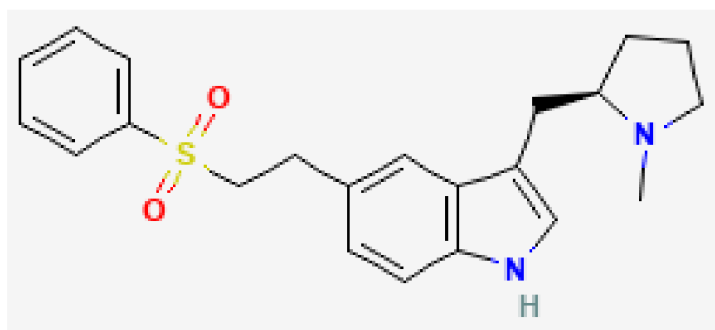
Almotriptán (ALM) je zlúčenina, nesúca v tretej pozícii 2-(dimetylamino)etylovú skupinu a (pyrrolidin-1-ylsulfonyl)metylovú skupinu v pozícii 5. Zaraduje sa medzi indoly, sulfonamidy a terciárne amíny. Je to triptán druhej generácie. Vo forme tabliet almotriptán malátu sa používa ako antimigrenikum a analgetikum. Odporúčaná dávka je 12,5 mg almotriptánu, no druhú dávku je možno podať ak je medzi jednotlivými dávkami interval najmenej dve hodiny. Maximálna odporúčaná dávka je teda dve tablety v priebehu 24 hodín. Pacienti s ťažkou poruchou obličiek nesmú užiť viac ako 12,5 mg almotriptánu v priebehu 24 hodín. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky pri terapeutickej dávke patria závraty, somnolencia, nauzea, vracanie a únava. Najvyššia podávaná dávka liečiva je 150 mg. Almotriptán je selektívny agonista 5-HT_{1B/D} receptorov a počas eliminácie bol stanovený na 3,5 hodiny. Maximálna plazmatická koncentrácia sa po užití 12,5mg dávky dosiahne približne po 1,5 až 3,0 hodinách od podania a činí približne 44,3 ± 10,9 ng/ml (Fleishaker *et al.*, 2001). Hlavným spôsobom biotransformácie je oxidatívna deaminácia monoaminoxidázou A na kyselinu indoloctovú. Nevykazuje žiadnu mutagenickú aktivitu v štandardných *in vitro* a *in vivo* štúdiách genotoxicity a karcinogenity (SÚKL).



Obrázok č. 4: Chemická štruktúra almotriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.4. Eletriptán (5-[2-(benzenesulfonyl)ethyl]-3-[[*(2R)*-1-methylpyrrolidin-2-yl]methyl]-1*H*-indole)

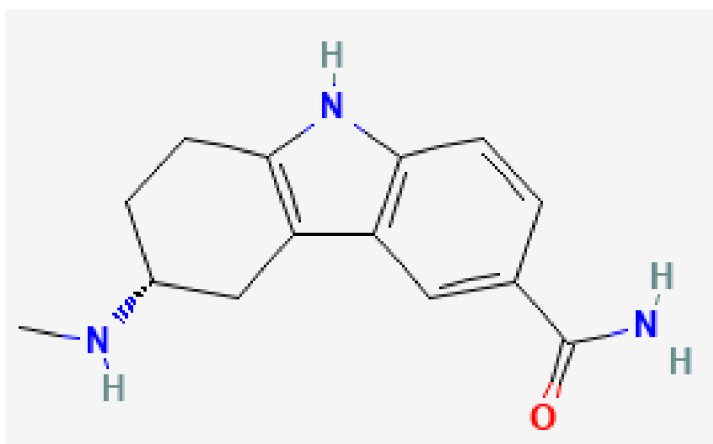
Eletriptán (ELE) je triptánom druhej generácie a vo svojej druhej pozícii nesie {5-[2-(fenylsulfonyl)etyl]-1*H*-indol-3-yl}metylovú skupinu. Patrí medzi *N*-alkylpyrrolidíny, indoly a sulfóny. Je selektívnym agonistom 5-HT_{1B/D} receptorov, no vyznačuje sa aj afinitou k receptoru 5-HT_{1F}. Ako liečivo sa podáva v tablekách vo forme práškového eletriptánium-hydrobromidu. Podáva sa v dávkach 20 alebo 40 mg. Najvyššia denná dávka by nemala prekročiť 40 mg. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patria somnolencia, bolesť havy, závraty alebo nauzea. K predávkovaniu dochádza po požití viac ako 120 mg v jednorazovej dávke, avšak bez významných vedľajších účinkov. Polčas eliminácie bol stanovený na približne 4 hodiny a maximálna plazmatická koncentrácia eletriptánu po podaní 60 mg dávky bola stanovená na 127 ng/ml a bolo jej dosiahnuté približne po 1,5 hodine od podania (ŠÚKL). *In vitro* štúdie dokazujú, že metabolizmus eletriptánu prebieha primárne v pečeni enzýmom CYP3A4. Jediným známym aktívnym metabolitom eletriptánu je jeho *N*-demetylovaná forma (ŠÚKL).



Obrázok č. 5: Chemická štruktúra eletriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.5. Frovatriptán ((6*R*)-6-(methylamino)-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-carbazole-3-carboxamide)

Frovatriptán (FRO), ako tryptán druhej generácie, patrí medzi karbazoly a je extra účinný pri liečbe migrén asociovaných s menštruačným cyklom (Macone a Perloff, 2017). Patrí medzi karbazoly a tryptamíny. Je selektívnym agonistom 5-HT_{1B/D} receptorov. Ako liečivo je v tabletách prítomný vo forme práškoveho sukcinátu monohydrátu. Odporúčaná denná dávka by nemala prekročiť 5 mg, s 2,5 mg na jednu dávku. Najčastejšie sa vyskytujúce nežiaduce účinky sú závraty, únava, bolesť hlavy, nauzea a sčervenanie pokožky. O predávkovaní frovatriptánom je obmedzené množstvo údajov, no maximálna jednorazová dávka bola 100 mg a nebola spojená s inými výraznými vedľajšími účinkami ako sú spomenuté vyššie. Polčas eliminácie bol stanovený na približne 26 hodín. Po aplikácii jednorazovej 2,5 mg dávky bola stredná maximálna koncentrácia frovatriptánu v krvi dosiahnutá medzi 2–4 hodinou po podaní a bola stanovená na 4,2 ng/ml u mužov a 7,0 ng/ml u žien (Deleu a Hanssens, 2000). Po *in vitro* štúdiách bolo preukázané, že primárny enzým zapojený do biotransformácie frovatriptánu je CYP1A2 (ŠÚKL).

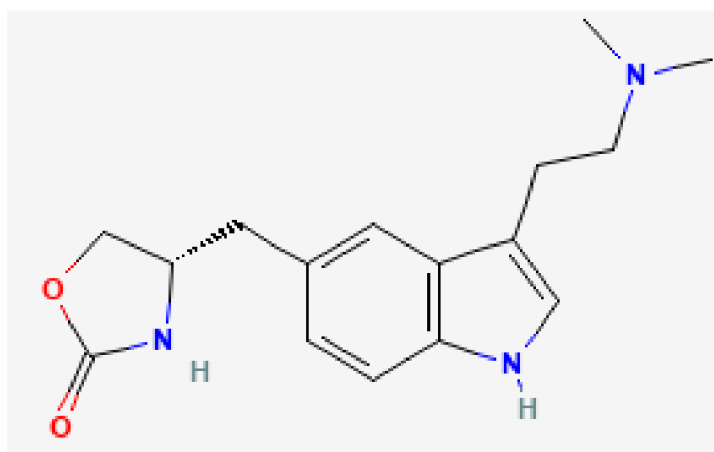


Obrázok č. 6: Chemická štruktúra frovatriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.6. Zolmitriptán ((4*S*)-4-[[3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1*H*-indol-5-yl]methyl]-1,3-oxazolidin-2-one)

Zolmitriptán (ZOL) je N,N-dimethyltriptamín, ktorý v pozícii 5 indolového jadra nesie [(4*S*)-2-oxo-1,3-oxazolidín-4-yl]metylovú skupinu. Patrí medzi tryptamíny a indoly, je to oxazolidinón a je triptánom druhej generácie. Je selektívnym agonistom 5-HT_{1B/D} receptorov no s menšou afinitou sa viaže aj na 5-HT_{1A} receptory. Ako liečivo je podávaný

v tabletech obsahujúcich práškový zolmitriptán. Celková denná dávka nesmie presiahnuť 10 mg podávaním jednorazových 5 mg a 2,5 mg dávok. Medzi časté nežiaduce účinky patria závraty, bolesti hlavy, somnolencia, návaly tepla, palpitácia, nauzea a zvracanie. Predávkovanie nastáva po jednorazovej perorálnej dávke 50 mg a obvykle ho sprevádza útlm. Maximálna plazmatická koncentrácia bola dosiahnutá po 3 hodinách od užitia. Polčas eliminácie zolmitriptánu bol stanovený na 2,5–3 hodiny. Eliminuje sa hlavne biotransformáciou v pečeni za vzniku troch hlavných metabolitov – kyseliny indolactovej a N-oxidových a N-desmetylovaných metabolitov. Metabolizovaný je hlavne skrz CYP1A2, za vzniku N-desmetylzolmitriptánu, ktorý je ďalej metabolizovaný MAO-A systémom (Emc – electronic medicines compendium; medicines.org.uk).

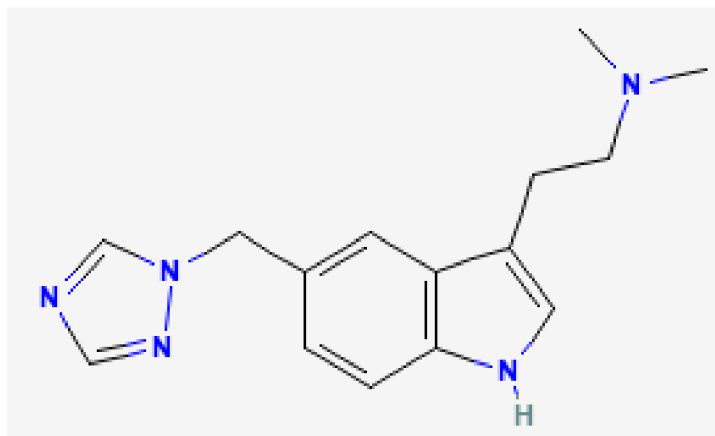


Obrázok č. 7: Chemická štruktúra zolmitriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.7. Rizatriptán (*N,N*-dimethyl-2-[5-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]ethanamine)

Rizatriptán (RIZA) je triptánom druhej generácie a patrí medzi triptamíny. Je to zlúčenina derivovaná z *N,N*-dimetyltryptamínu. Ako liečivo býva vo forme tabliet ako prášková benzoátová soľ. Patrí do farmakoterapeutickej skupiny analgetík, antimigreník a selektívnych agonistov 5-HT_{1B/D} receptorov. Odporúčaná dávka je 10 mg a interval medzi jednotlivými dávkami by mal byť minimálne 2 hodiny. Pacienti s nedostatočnosťou pečene alebo obličiek majú odporúčané užívať dávku 5 mg. Najčastejšie vedľajšie účinky identifikované počas klinických štúdií boli závraty, fyzická slabosť a únava, nespavosť, palpitácia a nauzea. Po predávkovaní rizatriptánom v celkovej kumulatívnej dávke 80 mg v priebehu štyroch hodín bola pozorovaná bradykardia, závraty a vracanie. Po perorálnom podaní 5 mg dávky sa rýchlo a úplne absorbuje a priemerné maximálne plazmatické koncentrácie činia 21,5 ng/ml ak bola

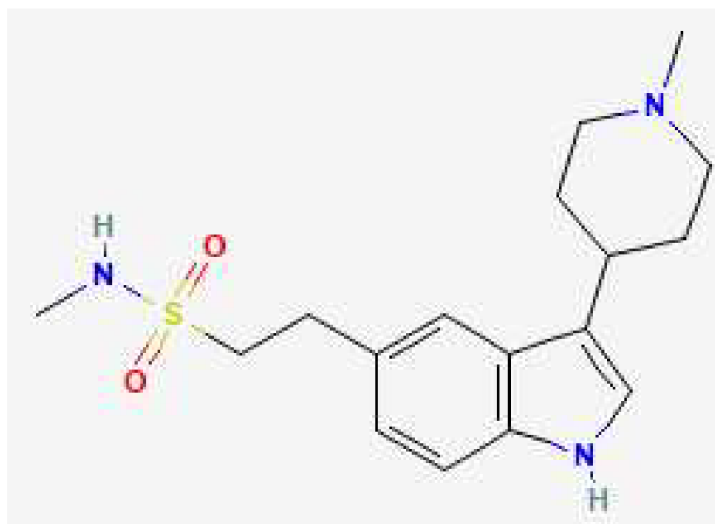
dávka podaná počas migrénového stavu a 15,0 ng/ml ak bola dávka podaná medzi migrénovými stavmi (Cutler *et al.*, 1999). Maximálnej koncentrácie je dosiahnuté približne za 1,58 hodiny od podania dávky. Primárne sa metabolizuje oxidatívnou deamináciou monoaminoxidázou A na metabolit kyselinu indolactovú (ŠÚKL).



Obrázok č. 8: Chemická štruktúra rizatriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.8. Naratriptán (*N*-methyl-2-[3-(1-methylpiperidin-4-yl)-1*H*-indol-5-yl]ethanesulfonamide)

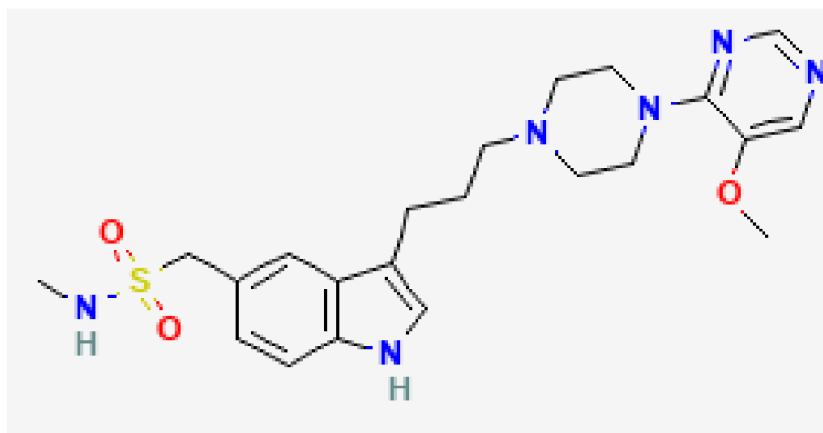
Naratriptán (NARA), triptán druhej generácie, patrí medzi triptamíny a heteroarylpiperidíny. Liečivo je podávané vo forme tabliet obsahujúcich naratriptán hydrochlorid. Patrí do farmakoterapeutickej skupiny antimigreník. Najvyššiu afinitu má k 5-HT_{1B/D} receptorom. Doporučená dávka je jedna 2,5 mg tableta, zatiaľ čo celková denná dávka by nemala presiahnuť dve 2,5 mg tablety. U pacientov s poruchami pečene je maximálna celková denná dávka stanovená na 2,5 mg. Medzi časté nežiaduce účinky patria závraty, ospalosť, brnenie, nauzea, zvracanie a návaly tepla. Podanie jednorazovej 25 mg dávky zdravému dobrovoľníkovi, čo je považované ako predávkovanie, viedlo k zvýšeniu krvného tlaku až o 71 mmHg a k pocitom na omdlenie, zvýšeniu únavy a strate koordinácie. Maximálna účinnosť býva dosiahnutá za 4 hodiny po užití a maximálnej plazmatickej koncentrácie je dosiahnuté po dvoch až troch hodinách od užitia. Po podaní 2,5 mg tablety bola pozorovaná maximálna plazmatická koncentrácia približne 7,8–14,4 ng/ml (Deleu a Hanssens, 2000). Počas eliminácie bol stanovený na približne 6 hodín. *In vitro* je metabolizovaný hlavne skrz izoenzy my Cytochrómu P450 (SÚKL).



Obrázok č. 9: Chemická štruktúra naratriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.9. Avitriptán (1-[3-[3-[4-(5-methoxypyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl]propyl]-1H-indol-5-yl]-N-methylmethanesulfonamide)

Avitriptán (AVI) patrí medzi triptány druhej generácie a 5-HT_{1B/1D} receptorových selektívnych agonistov vykazujúcich antimigrénovú aktivitu, no nikdy sa nedostal na trh (Saxena *et al.*, 1997). Dodávaný je vo forme práškového avitriptán fumarátu.

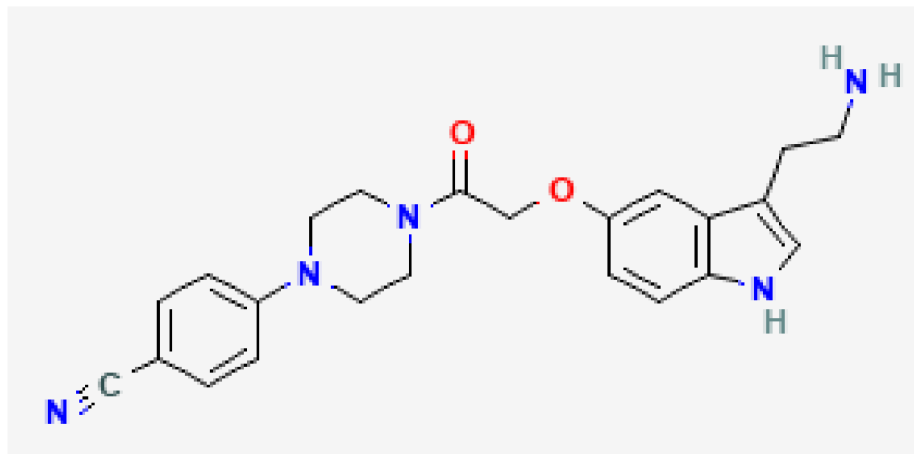


Obrázok č. 10: Chemická štruktúra avitriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

3.5.10. Donitriptán (4-[4-[2-[[3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-yl]oxy]acetyl]piperazin-1-yl]benzotrile)

Donitriptán (DONI) patrí medzi 5-HT_{1D} receptorových selektívnych agonistov vykazujúcich antimigrénovú aktivitu. Výsledky výskumu naznačujú, že by mohlo ísť o selektívnejšie liečivo ako sumatriptán no ultimátne sa na trh nikdy nedostal. Toto liečivo bolo vyvíjané vo Francúzsku firmou bioMérieux-Pierre Fabre a dostalo sa

v Európe do druhej fázy klinického testovania (Dukat, 2001), predtým ako bol jeho vývin zrušený (Fleischhacker a Brooks, 2011).



Obrázok č. 11: Chemická štruktúra donitriptánu. (obrázok prevzatý z PubChem)

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

- Adherentná bunková línia ľudských imortalizovaných keratinocytov HaCaT (darované P. Boukampovou, IUF Düsseldorf, Nemecko)
- AhR-responzívna bunková línia AhaRaCaT odvodená z HaCaT bunkovej línie transfekovaním reportérového plazmidu pGL-4.27-DRE. Plazmid bol pripravený pridaním dvoch kópií sekvencií F miesta a jednej kópie sekvencie B a D miesta myšieho CYP1A1 génu nasyntetizovanými a vloženými pomocou KpnI-XhoI enzýmov do klonovacieho miesta pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro] vektora (Promega, E8451) pred promótor a luc2P sekvenciu reportérového génu (Novotná *et al.*, 2011).

4.1.2. Použitý materiál

- 6 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- 96 jamkové biele doštičky pre meranie luminiscencie (NUNC)
- 96 jamkové biele doštičky pre PCR (Roche)
- 96 jamkové kultivačné doštičky (TPP)
- automatické pipety 0,1–2,5µl; 0,5–10µl; 2–20µl; 20–200µl; 10–100µl; 100–1000µl (Eppendorf)
- buničina (Tork)
- Bürkerova komôrka (Assistent)
- fólie pre PCR (Roche)
- krycie sklíčka 22x22mm (Menzel Gläser)
- kultivačná fľaša o obsahu 150 cm² (TPP)
- kultivačná fľaša o obsahu 25 cm² (TPP)
- kultivačná fľaša o obsahu 75 cm² (TPP)
- multikanálové pipety 0,5–10µl; 30–300µl; 20–200µl (Eppendorf)
- nitrilové rukavice (Mercator Medical)
- papierová krabička na vzorky do –80 °C (Biologix)
- Petriho misky (TPP)
- plastové mikroskúmavky o objemoch 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml (BIOplastics)

- plastové skúmavky o objemoch 15 a 50 ml (TPP)
- plastové stojany na skúmavky a mikroskúmavky (TPP)
- plastové špičky 0,1–10 μ l; 10–200 μ l; 10–1000 μ l
- sérologické pipety 0,1–2ml; 1–5ml; 1–10ml; 1–25ml (TPP)
- sklenená kadička (Simax)
- škrabka na bunky (TPP)
- 0,25% trypsín-EDTA (Sigma Aldrich, T4049)
- almotriptán malát (Sigma Aldrich, SML1210)
- avitriptán fumarát (Sigma Aldrich, BM0009)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- deoxynukleozidtrifosfáty (Takara)
 - dATP (4026)
 - dCTP (4028)
 - dGTP (4027)
 - dTTP (4029)
- dimetylsulfoxid DMSO (Sigma Aldrich, D8418)
- DNase/RNase free water (Invitrogen, 10977-035)
- donitriptán monohydrochlorid (Sigma Aldrich, D9071)
- eletriptán hydrobromid (Sigma Aldrich, SML3032)
- etanol (Sigma Aldrich, 459844)
- fetálne boviné sérum FBS (Sigma Aldrich, F6178)
- FICZ (Sigma Aldrich, SML 1489)
- fosfátový Dulbecco's pufo PBS (Serana, BDL-001)
- frovatriptán sukcinát monohydrát (Sigma Aldrich, SML1291)
- Hygromycín B 50 mg/ml, na bunky aplikované 4 tisíciny objemu média, finálna koncentrácia 0,2 mg/l (ChemCruz, SC-29067)
- chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- inhibitor ribonukleáz (New England BioLabs, M0307L)
- Isorapid Spray (Schafferová s.r.o., OC21025)
- izopropanol (Lach-Ner, 20037-AT0)
- komerčné médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Sigma Aldrich, D6546)
- L-glutamín (Serana, RGL-001)
- LightCycler 480 Probes Master, 2x koncentrovaný (Roche, 04 887 301 001)

- MTT činidlo - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (Sigma Aldrich, M2128)
- naratriptán hydrochlorid (Sigma Aldrich, N1415)
- neesenciálne aminokyseliny (Gibco, 11140-035)
- primery pre PCR, 100µM zásobný roztok (Generi Biotech)
 - CYP1A1
 - forward: 5' GGTC AAGGAGCACTACAAAACC 3'
 - reverse: 5' TGGACATTGGCGTTCTCAT 3'
 - GAPDH
 - forward: 5' CTCTGCTCCTCCTCTTCGA 3'
 - reverse: 5' ACGACCAAATCCGTTCACTC 3'
- próby Custom Assay (Roche)
 - FLG (144206)
 - HRNR (144207)
 - IVL (149204)
- próby Universal Probe Library (Roche)
 - próba č. 33 – CYP1A1 (04 687 663 001)
 - próba č. 60 – GAPDH (04 688 589 001)
- random primers 6 (New England BioLabs, S1230S)
- reakčný pufor pre M-MuLV reverznú transkriptázu (New England BioLabs, B0253S)
- Reporter Lysis Buffer (Promega, E397A)
- reverzná transkriptáza M-MuLV (New England BioLabs, M0253L)
- rizatriptán benzoátová soľ (Sigma Aldrich, SML0247)
- substrát pre Firefly luciferázu (5 mg D-luciferínu; 10 mg ATP; 5 mg koenzýmu A; 168 mg DTT; 1,32 ml Tris-acetátu (1M, pH 7,8); 1,23 mg/6,6 µl 0,5 M EDTA; 3,03 mg/1,23 ml 100 mM MgSO₄ · 7 H₂O)
- sumatriptán sukcinát (Sigma Aldrich, S1198)
- TriReagent (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- Tritón X-100 (Serva, 37240)
- trypanová modrá (0,4% Trypan blue v PBS, Sigma Aldrich, T6146-25G)
- zolmitriptán (Sigma Aldrich, SML0248)

4.1.3. Prístroje

- analytické váhy ABS 80-4N (Kern)
- centrifúga 5418 R (Eppendorf)
- centrifúga Spectrafuge mini (Labnet)
- hlbokomraziaci box MDF-U53V
- chladnička (Gorenje)
- inkubátor CO₂ NB-203XL (N-Biotek)
- inverzný mikroskop (Novel Optics)
- kývačka MR-12 (Biosan)
- laminárny box Labculture® (ESCO)
- Light Cyclor 480 II (Roche)
- mikrocentrifúga 5414 R (Eppendorf)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- odsávač Flask-Trap 1 (Biosan)
- prístroj na výrobu ľadu F100 Compact (Icematic)
- spektrofotometer Infinite M200 (Tecan Trading AG)
- termoblok Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- vodná kúpeľ LCB22D (Daihan LabTech)
- vortex Reax top (Heidolph)

4.1.4. Počítačové programy

- i-control 2.0
- LightCycler® 480 SW 1.5

4.2. Metodika práce

V prvej polovici experimentálnej časti bola pomocou metódy MTT zisťovaná hodnota cytotoxického pôsobenia triptánov na HaCaT alebo AhaRaCaT bunkové línie. Ďalej bola stanovená transkripčná aktivita AhR v prítomnosti triptánov metódou Reporter Gene Assay. HaCaT a AhaRaCaT bunky boli v natívnom stave udržiavané v kultivačných fľašiach pri 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti.

4.2.1. Príprava kultivačného média

Pre bunky je nutné pripraviť živné médium. Do komerčného DMEM o objeme 500 ml pridáme 5 ml L-glutamínu (uchovávaný pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), 5 ml neesenciálnych aminokyselín a 50 ml FBS (uchovávané pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po premiešaní je nutné takto pripravené médium predhriať vo vodnej kúpeli na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po celú dobu prípravy média pracujeme v sterilnom laminárnom boxe.

4.2.2. Pasážovanie buniek

Pasážovanie je proces, ktorý sa využíva k redukovaniu populácie udržiavaných buniek, čím sa zabráňuje ich premnoženiu v kultivačnom médiu. Skontrolovanie bunkovej konfluencie v kultivačnej fľaši sa robí mikroskopicky. K rozrušeniu medzibunkových kontaktov a kontaktu buniek s povrchom kultivačnej fľaše sa využíva špecifická proteáza trypsín. Pasážovanie sa opakuje obvykle každé 2–3 dni. Počet a dátum pasáže sú zaznamenávané. HaCaT bunky boli udržiavané do 20 – 25 pasáží, pričom sa ich aktivita s vyššou pasážou výrazne nemenila.

4.2.2.1. Pasážovanie buniek HaCaT a AhaRaCaT bunkovej línie

Pred pasážovaním boli vo vodnom kúpeli zohriate zásobné fľaše s kultivačným médiom DMEM a PBS na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kultivačná fľaša s bunkovou suspenziou bola z inkubátoru prenesená na mikroskop a bola skontrolovaná konfluencia buniek. Ďalej bola fľaša prenesená do laminárneho boxu a všetky nasledujúce kroky prebiehali za sterilných podmienok. Staré kultivačné médium bolo pomocou odsávačky z kultivačnej fľaše odsaté a bunky na povrchu kultivačnej fľaše boli premyté 5 ml roztoku PBS. Po premytí bol odsávačkou odstránený aj roztok PBS a k bunkám bol pridaný 1 ml 0,25% trypsínu. Kultivačná fľaša sa zavrela a bola prenesená naspäť do inkubátoru. Bunky boli pôsobeniu trypsínu vystavené po dobu 10–15 minút. Kultivačná fľaša bola premiestnená do laminárneho boxu a pôsobenie trypsínu bolo zastavené pridaním 9 ml DMEM. Vzniknuté viditeľné zhluky buniek boli resuspendované sérologickou pipetou, čím bola dosiahnutá homogénnosť bunkovej suspenzie v celom objeme. Takáto bunková suspenzia bola prenesená do sterilnej 15 ml skúmavky. Pre potreby počítania buniek bolo do plastovej mikroskúmavky prenesených 10 μl bunkovej suspenzie. Po vypočítaní množstva buniek potrebných na výsev bola zvyšková bunková suspenzia vrátená do kultivačnej fľaše a doplnená DMEM na 15 ml. Kultivačná fľaša bola vložená do inkubátoru, kde bola vystavená teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 a vlhkosti 95 %.

V prípade transfekovanej bunkovej línie AhaRaCaT bolo k bunkám raz za týždeň pridané antibiotikum hygromycín B (HygB) v množstve 4 tisíciny média, čiže jeho výsledná koncentrácia v bunkovej suspenzii bola 0,2 mg/l.

4.2.3. Počítanie buniek a vysatie na kultivačnú doštičku pre MTT a Reporter Gene Assay

Bunky sa počítajú za použitia Bürkerovej komôrky a proces prebieha mimo sterilný laminárny box. Z HaCaT a AhaRaCaT bunkovej suspenzie bolo v laminárnom boxe odobraných 10 μ l, ktoré boli zmiešané s 90 μ l 0,4% (w/v) roztoku trypanovej modrej v PBS. Do vrchnej a spodnej časti Bürkerovej komôrky bolo nanosených spolu približne 10 μ l bunkovej suspenzie premiešanej s trypanovou modrou. Pomocou mikroskopu bol spočítaný počet živých buniek (mŕtve bunky boli sfarbené namodro, kvôli nefunkčnej membráne, ktorá dovnútra prepúšťa farbivo) v desiatich štvorcoch. Tento počet bol prepočítaný na množstvo živých buniek v 1 ml bunkovej suspenzie. HaCaT bunky pre MTT a transfekovaná línia AhaRaCaT pre RGA boli vysiate tak, aby sa v každej jamke 96 jamkovej doštičky nachádzalo približne 20 000 buniek v objeme 100 μ l. Jednotlivé koncentrácie boli vysievané v triplikáte, čiže na celý MTT experiment bolo treba približne 2,5 milióna buniek v 12,5 ml DMEM s pripočítanou rezervou a na RGA experiment bolo treba približne 1,92 milióna buniek v 10 ml DMEM s pripočítanou rezervou.

Po vysatí nasledovala inkubácia doštičiek pre MTT po dobu 48 hodín a pre RGA po dobu 24 a 48 hodín pri 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti 95 %.

4.2.4. Vysatie buniek na kultivačnú doštičku pre izoláciu RNA

Transfekované AHaRaCaT bunky boli na 6 jamkové doštičky vysievané tak, aby sa v každej jamke nachádzalo približne pol milióna buniek v 2 ml DMEM. Na celý experiment teda bolo treba približne 48 miliónov buniek v 195 ml DMEM s pripočítanou rezervou.

Po vysatí nasledovala inkubácia doštičiek po dobu 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti 95 %.

4.2.5. Treatment pre MTT

Po inkubácii boli doštičky prenesené z inkubátoru do laminárneho boxu, staré médium bolo odsaté a nahradené novým, v ktorom boli rozpustené testované látky v daných

koncentráciách. Testované boli triptány o výsledných koncentráciách v roztoku pre eletriptán, almotriptán, zolmitriptán, frovatriptán, naratriptán, rizatriptán a sumatriptán 1 μM , 10 μM , 50 μM a 100 μM a pre avitriptán a donitriptán 1 μM , 10 μM a 50 μM . Ako negatívna kontrola označená UT (untreated) bolo použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000. Ako pozitívna kontrola bol použitý Triton X-100 v DMEM v konečnej koncentrácii 4 %.

Po pridaní rozpustených chemikálií k bunkám boli doštičky prenesené späť do inkubátoru, kde boli bunky vystavené pôsobeniu testovaných látok po dobu 48 hodín pri 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti 95 %.

4.2.6. Treatment pre RGA

Testované boli triptány o výsledných koncentráciách v roztoku pre eletriptán, almotriptán, zolmitriptán, frovatriptán, naratriptán, rizatriptán a sumatriptán 1 μM , 10 μM , 50 μM a 100 μM a pre avitriptán a donitriptán 1 μM , 10 μM a 50 μM . Ako UT bolo použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000. Ako pozitívna kontrola bol používaný FICZ v konečnej koncentrácii 22,6 μM . Po pridaní rozpustených chemikálií k bunkám boli doštičky prenesené späť do inkubátoru, kde boli bunky vystavené pôsobeniu testovaných látok po dobu 24 a 48 hodín pri 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti 95 %.

4.2.7. Treatment pre izoláciu RNA

Použité boli triptány o výsledných koncentráciách v roztoku pre eletriptán, avitriptán a donitriptán 1 μM , 10 μM a 50 μM a pre rizatriptán a naratriptán 1 μM , 10 μM a 100 μM . Ako UT bolo použité DMSO v DMEM v pomere 1:1000. Ako pozitívna kontrola bol používaný FICZ v konečnej koncentrácii 22,6 μM . Po pridaní rozpustených chemikálií k bunkám boli doštičky prenesené späť do inkubátoru, kde boli bunky vystavené pôsobeniu testovaných látok po dobu 24 hodín pri 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti 95 %.

4.2.8. MTT test viability

MTT test viability je kolorimetrický test založený na správnom fungovaní špecifických dehydrogenáz v mitochondriách metabolicky aktívnych – živých buniek. Dehydrogenázy mitochondrií redukujú žlté rozpustné MTT činidlo (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) na nerozpustný formazan modrého sfarbenia.

Cytotoxické pôsobenie triptánov bolo pomocou MTT testu sledované na HaCaT bunkách a transfekovaných AhaRaCaT bunkách. Po treatmente boli kultivačné dosky vyňaté z inkubátoru a staré médium bolo opatrne vyklepnuté. Doštičky boli osušené na buničine a do každej jamky bolo pridaných 100 μ l pripraveného MTT činidla v PBS pufri s konečnou koncentráciou 0,3 mg/ml. Kultivačné doštičky boli uzavreté a umiestnené späť do inkubátoru. Inkubácia s pôsobiacim MTT činidlom prebiehala po dobu 30 minút, pokým nedošlo k vytvoreniu modrých kryštálov formazanu. Prebytočné MTT činidlo bolo z doštičiek opatrne odstránené a doštičky boli osušené na buničine. Do každej jamky bolo pridaných 100 μ l DMSO na približne 5 minút, čím boli rozpustené kryštály formazanu. Výsledky boli hodnotené spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 565 nm pomocou prístroja Tecan Infinite M200.

4.2.9. Reporter Gene Assay

V tejto metóde bola testovaná transkripčná aktivita AhR skrz meranie aktivity luciferázy. Reportérový plazmid má vo svojej štruktúre zakódovanú špecifickú väzobnú sekvenciu pre AhR a gén pre luciferázu. Takto upravený plazmid je následne vložený do bunky. Sekvencia reportérového génu býva umiestnená za promótor študovaného génu, aby mohla byť ľahšie detekovateľná a kvantitatívne vyhodnotiteľná expresia študovaného génu. Po pridaní Firefly substrátu pre luciferázu k takto ošetreným bunkám dochádza k enzymatickej reakcii, ktorej výsledkom je viditeľné luminiscenčné žiarenie zaznamenávané luminometrom. Emisia svetla stanovuje aktivitu luciferázy, pričom miera aktivity reportérového génu je priamo úmerná transkripčnej aktivite (v tomto prípade) AhR.

Po treatmente bola vykonaná lýza buniek. Kultivačné doštičky boli vyňaté z inkubátora, staré médium bolo opatrne odstránené a doštičky boli osušené na buničine. Jamky boli opatrne premyté PBS pufrom o objeme 30 μ l na každú jamku. Pufor bol opatrne odstránený a doštičky znova osušené na buničine. Do každej jamky doštičiek bolo pridaných 25 μ l pripraveného 1x lyzačného pufru (5x Reporter Lysis Buffer riedený dH₂O v pomere 1:4). Doštičky boli uzavreté, prelepené lepiacou páskou a umiestnené do -80 °C na dobu približne 20 minút. Následne boli doštičky umiestnené na kývačku, kde boli ponechané pri laboratórnej teplote až do úplného roztopenia bunkového lyzátu. Po zhomogenizovaní lyzátu v jamkách bolo 6 μ l z každej jamky prenesených do 96 jamkovej bielej doštičky, kde bolo následne pridaných 30 μ l substrátu na jednu

jamku. Luminiscencia stanovujúca aktivitu luciferázy bola meraná pomocou prístroja Tecan Infinite M200.

4.2.10. Izolácia mRNA

Izolácia mRNA bola vykonávaná za použitia TRI Reagent®. Po 24 hodinovej inkubácii buniek s pôsobiacimi chemikáliami bolo z jamiek opatrne vyklepnuté staré médium a doštičky boli osušené na buničine. Následne bol do každej jamky pridaný 1 ml TRI Reagent® a pomocou škrabky boli adherované bunky oddelené od povrchu jamky. Homogenát bol ďalej prenesený do pripravených a popísaných plastových mikroskúmaviek o objeme 1,5 ml. Ku každej vzorke bolo pridaných 200 µl chloroformu a mikroskúmavky boli dôkladne pretrepávané po dobu jednej minúty. Následne boli vzorky ponechané stáť pri laboratórnej teplote po dobu 10 minút, aby došlo k oddelení jednotlivých fáz. Vzorky boli ďalej centrifugované pri najvyšších otáčkach za minútu pri 4 °C po dobu 15 minút. Mikroskúmavky boli opatrne vyňaté z centrifúgy a vrchná vodná fáza z každej vzorky bola prenesená do nových pripravených označených mikroskúmaviek o objeme 1,5 ml. Prenášaný objem činil všeobecne okolo 500 µl. Precipitácia RNA pokračovala pridaním 0,5 ml vychladeného izopropanolu do každej vzorky a každá mikroskúmavka bola zvortexovaná po dobu 10 sekúnd. Vzorky boli takto ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 7 minút a následne znova centrifugované pri maximálnych otáčkach za minútu a 4 °C po dobu 13 minút. Týmto došlo k vyzrážaniu RNA na dne mikroskúmaviek. Supernatant bol opatrne odliaty, tak aby v mikroskúmavkách ostal pelet, ktorý bol následne premytý 1 ml 75% etanolu vychladeného na -20 °C. Vzorky boli opäť centrifugované pri maximálnych otáčkach za minútu a 4 °C po dobu 5 minút, supernatant znova opatrne odliaty a pelet premytý 1 ml 75% etanolu. Znova boli vzorky centrifugované pri maximálnych otáčkach za minútu a 4 °C po dobu 5 minút a supernatant odstránený. Pre úplné odstránenie zvyškového etanolu boli otvorené mikroskúmavky inkubované v termobloku pri 65 °C po dobu jednej minúty. K peletu každej vzorky bolo pridaných 30 µl ultračistej vody zbavenej nukleáz. Pre zvýšenie rozpustnosti peletu boli vzorky znova inkubované v termobloku pri 65 °C, tentokrát so zavretými mikroskúmavkami a po dobu 5 minút. Po inkubácii boli vzorky mierne zvortexované a okamžite presunuté na ľad. Nakoniec bola pomocou prístroja NanoDrop Lite spektrofotometricky zmeraná čistota a koncentrácia izolovanej RNA.

4.2.11. Reverzná transkripcia

Na základe zmeraných koncentrácií RNA vo vzorkách boli ultračistou vodou bez nukleáz nariadené vzorky pre reverznú transkripciu tak, aby každá o objeme 5 μ l obsahovala 1000 ng izolovanej RNA. Do každej vzorky bol následne pridaný 1 μ l roztoku Random Primers 6 (koncentrácia 100 pmol/l) a vzorky boli inkubované pri 65 °C na termobloku po dobu 5 minút. Po inkubácii boli vzorky prenesené na ľad a centrifugované (short spin). Reakčná zmes pre reverznú transkripciu bola pripravená podľa tabuľky č. 1 a 6 μ l z nej bolo pridaných ku každej vzorke. Takto pripravené vzorky boli znova centrifugované (short spin) a inkubované pri 42 °C v termobloku po dobu jednej hodiny. Následne boli prenesené na inkubáciu pri 65 °C do termobloku po dobu 10 minút. Po oboch inkubáciách boli vzorky prenesené na ľad, kde sa chladili po dobu 2 minút. Do každej vzorky získanej cDNA bolo pridaných 108 μ l ultračistej vody bez nukleáz, čím bola vzniknutá cDNA nariadená 10x.

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

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

4.2.12. RT-qPCR

Príprava reakčných zmesí pre RT-qPCR bola vykonávaná dvoma spôsobmi. Pre sledovanie expresie génov GAPDH a CYP1A1 boli využité špecifické UPL sondy. Zmes primerov pre tieto gény bola pripravené zmiešaním 10 μ l forward primeru (F), 10 μ l reverse primeru (R) a 180 μ l ultračistej vody zbavenej nukleáz. Pre štúdium expresie génov HRNR, FLG a IVL boli použité komerčne pripravené zmesi primerov a špecifickej UPL sondy (Custom Assay). Reakčné zmesi boli pripravené podľa tabuliek č. 2 (CYP1A1 a GAPDH) a 3 (HRNR, FLG a IVL). 96 jamková biela mikrotitračná doštička bola umiestnená na ľad a do každej jamky bolo napipetovaných 8 μ l reakčnej

zmesi a 2 μ l cDNA vzorky. Každá z vzoriek bola pipetovaná v triplikáte. Doštička bola prelepená priehľadnou fóliou a centrifugovaná pri 1500 otáčkach za minútu pri 4 °C po dobu 3 minút. Doštička s vzorkami bola opatrne vyňatá z centrifúgy a vložená do prístroja Light Cycler, podmienky PCR boli nastavené podľa tabuľky č. 4 a reakcia bola spustená.

Tabuľka č. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre GAPDH a CYP1A1 pre RT-qPCR.
Uvedené objemy sú pre reakčnú zmes pre 1 vzorku.

Reagencie	Objem [μ l]
Probes Master (2x koncentrovaný)	5,0
Ultračistá voda zbavená nukleáz	2,0
Zmes primerov F+R	0,8
Špecifická UPL próba	0,2
Celkom	8,0

Tabuľka č. 3: Zloženie reakčnej zmesi pre HRNR, FLG a IVL pre RT-qPCR.
Uvedené objemy sú pre reakčnú zmes pre 1 vzorku.

Reagencie	Objem [μ l]
Probes Master (2x koncentrovaný)	5,0
Ultračistá voda zbavená nukleáz	2,5
Real-Time Ready Custom Assay (primery + UPL próba)	0,5
Celkom	8,0

Tabuľka č. 4: Nastavenie RT-qPCR reakcie.

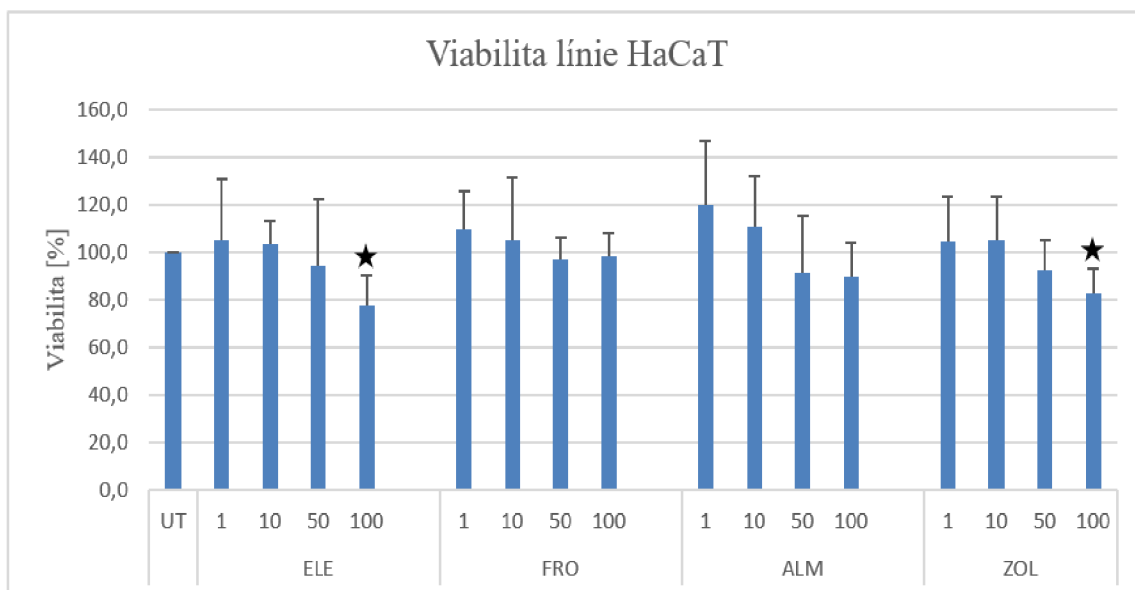
Formát detekcie	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe		
Celkový objem reakcie	10 μ l		
Cyklus	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Preinkubácia	95	10 min	1
Amplifikácia	95	10 s	45
	60	30 s	
Chladenie	40	30 s	1

5 VÝSLEDKY

5.1.MTT test viability

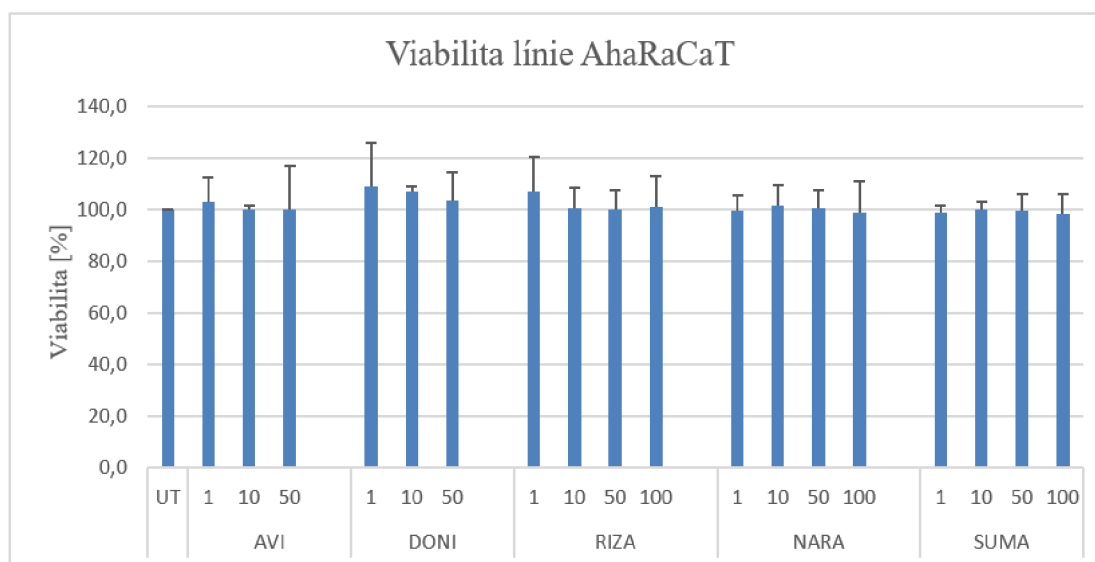
Pomocou MTT testu viability bola stanovená cytotoxicita skúmaných koncentrácií jednotlivých triptánov. Testované boli HaCaT bunky a bunky AhR-responzívnej línie AhaRaCaT, ktoré boli vystavené koncentráciám jednotlivých triptánov – eletriptán, frovatriptán, almotriptán, zolmitriptán, naratriptán, rizatriptán a sumatriptán v koncentráciách 1 μM , 10 μM , 50 μM a 100 μM a avitriptán a donitriptán v koncentráciách 1 μM , 10 μM a 50 μM (koncentrácia 100 μM nebola testovaná z dôvodu obmedzenej rozpustnosti AVI a DONI). Spektrofotometrické vyhodnotenie experimentu pri vlnovej dĺžke 565 nm bolo vykonané po 48-hodinovom pôsobení látok na bunky. Z výsledkov jednotlivých experimentov bola stanovená percentuálna viabilita buniek.

Výsledky naznačujú, že prvá skupina triptánov (ELE, FRO, ALM, ZOL) najvýraznejšie ovplyvnila viabilitu buniek pri najvyššej koncentrácii 100 μM . Pri niektorých triptánoch bola pozorovaná viabilita pri koncentráciách 1 μM a 10 μM vyššia ako 100%, no nešlo o štatisticky významný výsledok. Najvýraznejší pokles viability bol sledovaný pri 100 μM koncentrácii ELE, kde dosahoval hodnotu pod 80 % (Graf č. 1). Hodnotu 100 % predstavuje negatívna kontrola (v grafe označená ako UT – untreated) – čisté DMEM s DMSO. Aj napriek štatisticky významnému poklesu viability pri ELE a ZOL boli všetky testované koncentrácie ďalej využité pre posúdenie aktivácie AhR metódou Gene Reporter Assay.



Graf č. 1: Výsledky MTT testu na HaCaT bunkovej línii. Tento graf znázorňuje percentuálnu viabilitu buniek HaCaT po vystavení účinku sledovaných triptánov po dobu 48 hodín. Výsledky sú vzťahované k negatívnej kontrole (DMEM a DMSO), ktorá predstavuje 100% hodnotu viability. Pomocou štatistického T-testu boli určené aj štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$), ktoré boli označené symbolom ★. Koncentrácie použitých triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

Výsledky experimentu s druhou skupinou triptánov (AVI, DONI, RIZA a NARA) na AhaRaCaT línii naznačujú, že pri žiadnom z triptánov nedošlo k výraznému cytotoxickému pôsobeniu (Graf č. 2). Z výsledkov teda môžeme usúdiť, že všetky môžu byť ďalej použité pri metóde Gene Reporter Assay.

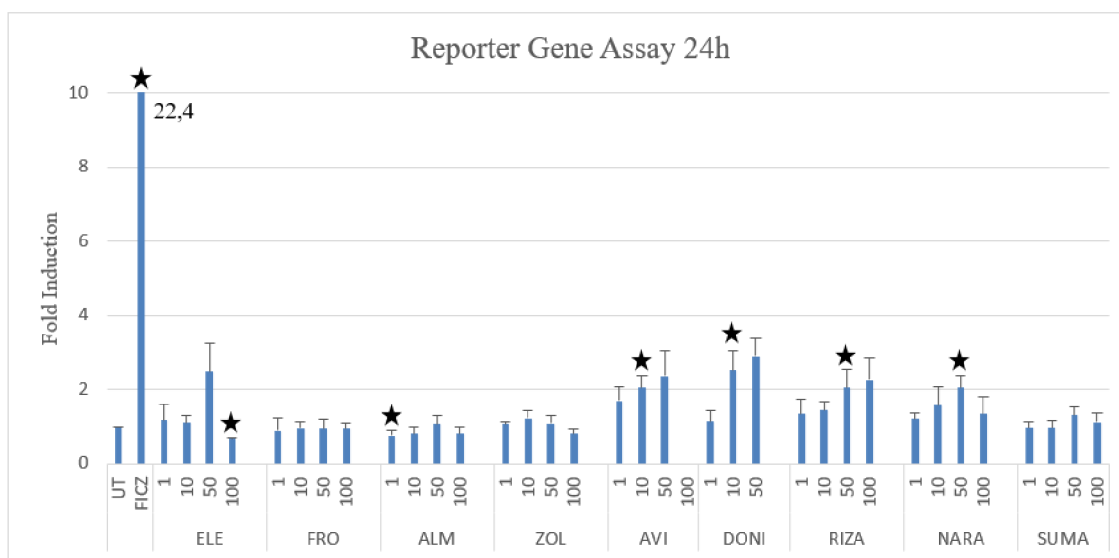


Graf č. 2: Výsledky MTT testu na AhaRaCaT bunkovej línii. Tento graf znázorňuje percentuálnu viabilitu buniek AhaRaCaT po vystavení účinku sledovaných triptánov po dobu 48 hodín. Výsledky sú vzťahované k negatívnej kontrole (DMEM a DMSO), ktorá

Graf č. 2 (pokračovanie): predstavuje 100% hodnotu viability. Koncentrácie použitých triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

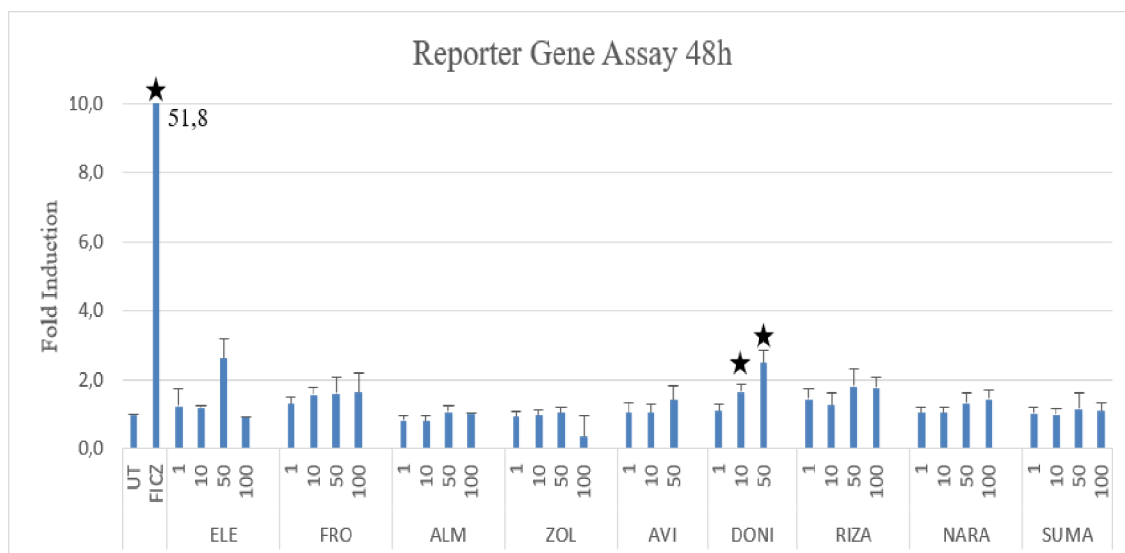
5.2. Reporter Gene Assay

Výsledky 24 a 48-hodinových Reporter Gene Assays boli vyhodnotené, spriemerované a vynesené do grafov č. 3 a č. 4. Ďalej bol vykonaný štatistický T-test, aby bolo zistené, ktoré hodnoty môžu byť považované za štatisticky významné a značne ovplyvňujúce aktivitu AhR.



Graf č. 3: Výsledky Gene Reporter Assay na AhaRaCaT bunkovej línii po 24 hodinom pôsobení triptánov. AhR-responzivná bunková línia AhaRaCaT bola vystavená pôsobení triptánov o rôznych koncentráciách po dobu 24 hodín. Výsledky sú násobkom (fold induction; FI) negatívnej kontroly UT (DMEM a DMSO). Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie použitých triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

Z výsledkov 24-hodinového experimentu je možné usúdiť, že signifikantne ovplyvňujú funkciu AhR len niektoré triptány. Eletriptán v koncentrácii 100 μM AhR aktivoval menej ako UT, pričom podľa výsledkov MTT testu viability ide pravdepodobne o výsledok daný toxicitou 100 μM koncentrácie ELE. Najviac eletriptán aktivoval AhR v koncentrácii 50 μM , takmer 2,5 krát viac ako samotné UT. Hodnoty aktivácie AhR pri koncentráciách eletriptánu 1 μM a 10 μM sa pohybovali približne okolo hodnoty UT. Frovatriptán, almotriptán, zolmitriptán a sumatriptán nevyvolali koncentračne závislý nárast AhR-kontrolovanej luciferázovej aktivity. Signifikantnú indukciu aktivity som zaznamenala pre AVI, DONI, RIZA a NARA (Graf č. 3).



Graf č. 4: Výsledky Gene Reporter Assay na AhaRaCaT bunkovej línii po 48-hodinovom pôsobení triptánov. AhR-responzívna bunková línia AhaRaCaT bola vystavená pôsobení triptánov o rôznych koncentráciách po dobu 48 hodín. Výsledky sú násobkom (fold induction; FI) negatívnej kontroly UT (DMEM a DMSO). Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie použitých triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

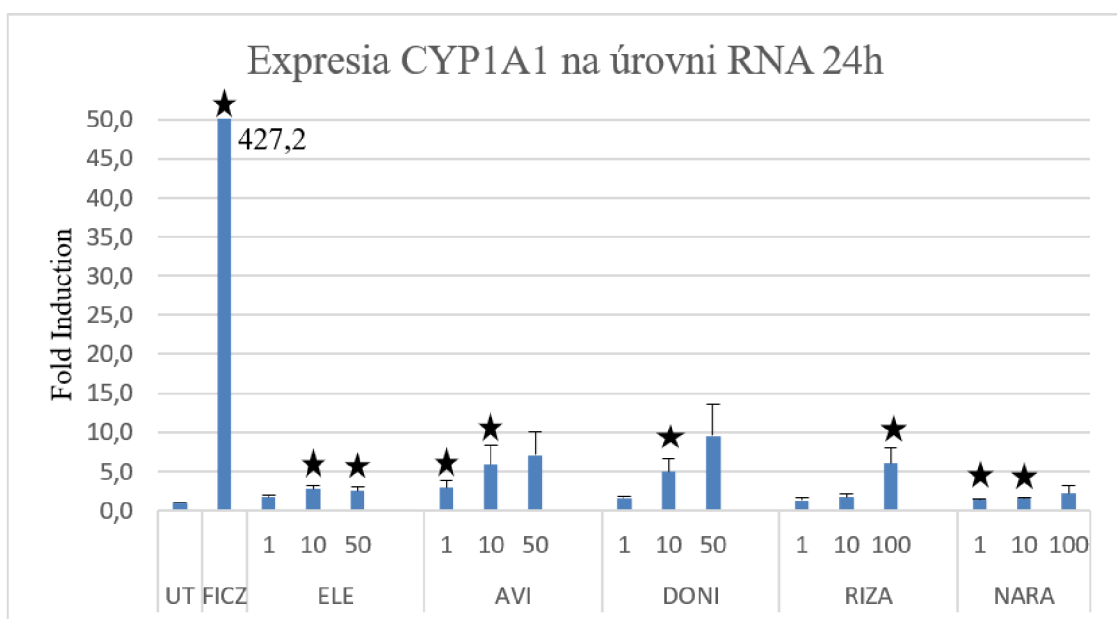
Z výsledkov 48-hodinového experimentu je možné usúdiť, že signifikantne ovplyvňuje funkciu AhR z triptánov už len donitriptán. Ostatné triptány nemali signifikantný vplyv na AhR-sprostredkovanú aktivitu luciferázy (Graf č. 4).

Na základe výsledkov Reporter Gene Assay boli pre ďalšiu experimentálnu metódu použité eletriptán, avitriptán a donitriptán v koncentráciách $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$ a rizatriptán a naratriptán v koncentráciách $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$ s dobou inkubácie 24 hodín.

5.3. Expresia na úrovni RNA v AhR-responzívnej bunkovej línii AhaRaCaT

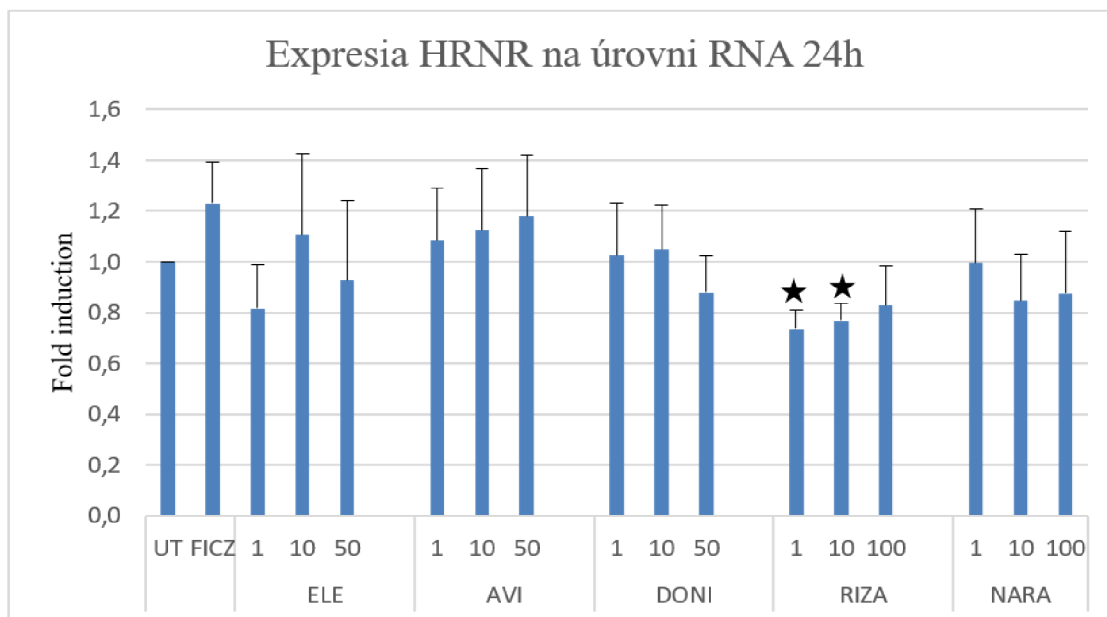
Indukcia expresie CYP1A1, meraná ako fold induction (FI) negatívnej kontroly, ligandom aryl uhl'ovodíkového receptora FICZ-om bola približne 427 krát vyššia ako UT, čo naznačuje aktiváciu AhR. Výsledky naznačujú, že s rastúcou koncentráciou avitriptánu, donitriptánu, rizatriptánu a naratriptánu rastie aj expresia CYP1A1 (Graf č.5). Pri eletriptáne najviac indukovala expresiu CYP1A1 koncentrácia $10 \mu\text{M}$, ktorá bola s koncentráciou $50 \mu\text{M}$ vyhodnotená ako štatisticky významná. Avitriptán indukoval CYP1A1 mRNA koncentračne-závislo, pričom v koncentráciách $1 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$ bola

indukcia vyhodnotená ako štatisticky významná. Podobný trend bol zaznamenaný aj pre donitriptán, pričom indukcia exprese donitriptánom v koncentrácii 10 μM bola vyhodnotená ako štatisticky významná. Najvyššia koncentrácia donitriptánu (50 μM) indukovala expresiu CYP1A1 približne 9,5 krát viac ako UT. Rizatriptán indukoval expresiu CYP1A1 (cca 6x) štatisticky len v 100 μM koncentrácii (Graf č. 5). Hodnota indukcie exprese CYP1A1 naratriptánom bola pri koncentráciách 1 μM a 10 μM vyhodnotená ako štatisticky významná. Najvyššia koncentrácia naratriptánu (100 μM) indukovala expresiu CYP1A1 približne len 2,1 krát viac ako UT, no bez štatistickej významnosti.



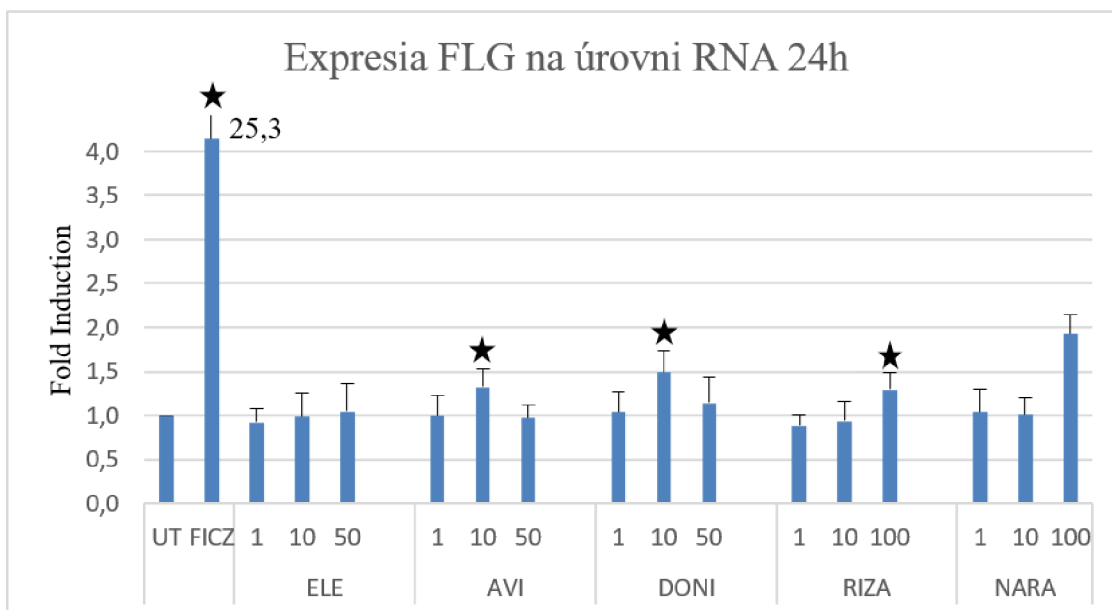
Graf č. 5: Expresia génu CYP1A1 na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii. Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení triptánov o koncentráciách pre eletriptán, avitriptán a donitriptán 1 μM , 10 μM a 50 μM a rizatriptán a naratriptán 1 μM , 10 μM a 100 μM . Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

Indukcia exprese HRNR ligandom aryl uhl'ovodíkového receptora FICZ-om bola približne 1,2 krát vyššia ako negatívna kontrola, avšak nebola štatisticky významná. S výnimkou rizatriptánu, ktorý štatisticky znížil expresiu HRNR, nemali ostatné triptány vplyv na jeho expresiu (Graf č. 6).



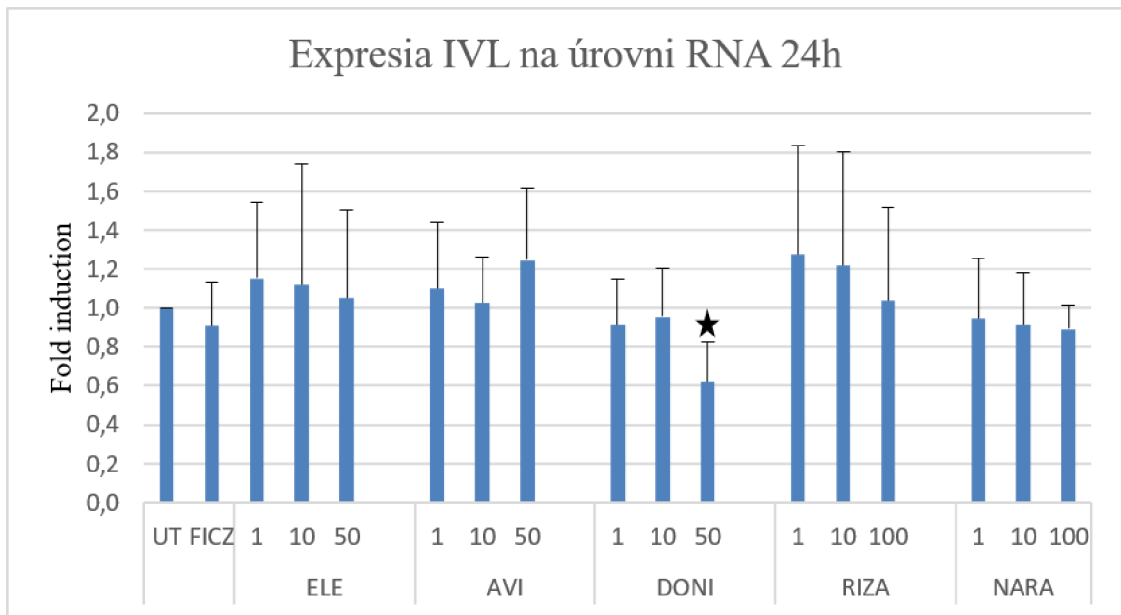
Graf č. 6: Expresia génu HRNR na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii. Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení triptánov o koncentráciách pre eletriptán, avitriptán a donitriptán 1 μM, 10 μM a 50 μM a rizatriptán a naratriptán 1 μM, 10 μM a 100 μM. Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie triptánov sú uvedené v jednotkách μM.

Indukcia expresie FLG ligandom aryl uhl'ovodíkového receptora FICZ-om bola približne 4,1 krát vyššia ako negatívna kontrola a dosiahla štatistickej významnosti. Mierny nárast indukcie bol zaznamenaný pre všetky testované triptány s výnimkou eletriptánu (Graf č. 7). Signifikantnej zmeny dosiahli koncentrácie 10 μM pre AVI a DONI a 100 μM pre RIZA.



Graf č. 7: Expresia génu FLG na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii. Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení triptánov o koncentráciách pre eletriptán, avitriptán a donitriptán 1 μM, 10 μM a 50 μM a rizatriptán a naratriptán 1 μM, 10 μM a 100 μM. Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie triptánov sú uvedené v jednotkách μM.

V prípade IVL, ligand aryl uhľovodíkového receptora FICZ nemal vplyv na jeho expresiu. Zo všetkých testovaných triptánov vykazovali koncentračne závislý pokles expresie IVL len DONI a NARA, ktorý bol signifikantný len pre DONI v koncentrácii 50 μM (Graf č. 8).



Graf č. 8: Expresia génu IVL na úrovni RNA v AhaRaCaT bunkovej línii. Bunková línia bola po dobu 24 hodín vystavená pôsobení triptánov o koncentráciách pre eletriptán, avitriptán a donitriptán 1 μM , 10 μM a 50 μM a rizatriptán a naratriptán 1 μM , 10 μM a 100 μM . Výsledky sú vyjadrené ako násobok negatívnej kontroly (UT). Získané výsledky boli normalizované vzhľadom k referenčnému génu GAPDH a sú priemerom 4 nezávislých experimentov. Pomocou štatistického T-testu boli určené štatisticky významné hodnoty ($p < 0,05$) označené symbolom ★. Koncentrácie triptánov sú uvedené v jednotkách μM .

6 DISKUSIA

Táto práca sa zaoberá účinkom triptánov na aktiváciu aryl uhl'ovodíkového receptora (AhR). V bunkách kože zaujíma AhR významnú úlohu biosenzora – je asociovaný s odpoveďami organizmu na environmentálne kontaminanty. Medzi jeho ďalšie dôležité fyziologické funkcie patrí napríklad podpora bunkovej diferenciácie alebo rastu v rôznych tkanivách. Testované boli účinky deviatich triptánov o rôznych koncentráciách (1 μM , 10 μM , 50 μM a 100 μM) na AhR-responzívnu líniu AhaRaCaT imortalizovaných ľudských keratinocytov. Cieľom práce bolo dokázať či dané triptány, potenciálne ligandy AhR, môžu ovplyvniť funkciu tohto receptora a tým aj expresiu proteínov epidermálnej bariéry kože – hornerínu, filagrínu a involukrínu.

Sledované triptány (s výnimkou avitriptánu a donitriptánu) sa v klinickej praxi ako selektívni agonisti 5-HT_{1B/1D} receptorov využívajú k liečbe akútnych migrén.

V štúdií Smith *et al.*, (2017) bolo potvrdené, že Tapinarof, topikálne liečivo využívané pri liečbe psoriázy a atopickej dermatitídy, sprostredkúva svoje protizápalové vlastnosti skrz aktiváciu AhR. Tapinarof aktivuje AhR v bunkách rôznych tkanív, vrátane buniek ľudskej kože, moderuje expresiu prozápalových cytokínov a ovplyvňuje expresiu epidermálnych bariérových génov v primárnych ľudských keratinocytoch. Dôkazom, že skutočne išlo o protizápalové vlastnosti Tapinarofu sprostredkované cez AhR je, že toto liečivo nevykazovalo žiadny účinok pri použití na AhR-deficientných myšiach s príznakmi kožného zápalu.

Na základe faktu, že AhR je v bunkách kože abundantne exprimovaný a hrá dôležitú úlohu aj pri vývoji a udržiavaní integrity kožnej epidermálnej bariéry (Furue *et al.*, 2015) a medzi jeho agonistov patria aj látky s indolovým jadrom (Vyhlídalová *et al.*, 2020) bola navrhnutá hypotéza tejto bakalárskej práce. Triptány sú liečivá obsahujúce indolové jadro, potenciálne teda môžu aktivovať aj AhR v koži.

V štúdií Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018) bol pozorovaný nárast expsie CYP1A1 po 3 a 5-hodinovom pôsobení FICZ-u v koncentrácii 100 nM na HaCaT bunkovú líniu, ktorá bola takmer 35 krát vyššia ako negatívna kontrola. Po vyhodnotení RT-qPCR som zistila, že po 24-hodinovom pôsobení FICZ-u na AhR responzívnu bunkovú líniu AhaRaCaT odvodenú od HaCaT bunkovej línie, aj keď vo vyššej koncentrácii aká bola prítomná v štúdií Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018), FICZ indukoval expresiu CYP1A1 až 427 krát viac v porovnaní s negatívnou kontrolou, čo nie je v rozpore s výsledkami štúdie Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018). Pri porovnaní doby pôsobenia FICZ-u v mojich experimentoch

so štúdiou Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018) je pravdepodobné, že dlhšia doba pôsobenia vyústila do vyššej hodnoty expresie CYP1A1. Dôležitým faktorom, ktorý túto hodnotu expresie mohol zvýšiť v porovnaní so štúdiou Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018) bola aj vyššia použitá koncentrácia FICZ-u v mojich experimentoch (22,6 μ M).

Kiyomatsu-Oda *et al.*, (2018) taktiež sledovali vplyv aktivácie AhR pomocou FICZ-u na hladiny expresie FLG v HaCaT bunkovej línii. Zatiaľ čo FICZ neindukoval expresiu HRNR a IVL, pri pozorovaní expresie FLG bol odsledovaný jej nárast. HaCaT bunková línia bola po dobu 5 hodín vystavená 3 koncentráciám FICZ-u (1, 10 a 100 nM) a bolo zistené, že indukoval expresiu FLG koncentračne závisle a štatisticky signifikantne pri koncentráciách 10 a 100 nM. V mojich experimentoch FICZ taktiež vykazoval indukciu expresie FLG, no po 24-hodinovom pôsobení a pri vyššej použitej koncentrácii. Kolektív van den Bogaard *et al.*, (2015) priniesli jeden z dôkazov, že AhR je aktívny počas epidermálnej diferenciácie. Po ošetrovaní kultúry ľudských diferencujúcich primárnych keratinocytov AhR antagonistami GNF351 a CH223191 pozorovali v porovnaní s negatívnou kontrolou štatisticky významne zredukovanú expresiu FLG a HRNR. Pri použití AhR agonistu indirubínu v koncentrácii 50 nM pozorovali približne dvojnásobný nárast expresie HRNR v porovnaní s negatívnou kontrolou, avšak nešlo o štatisticky signifikantný výsledok.

Kennedy *et al.* (2013) vo svojej štúdii mimo iné sledovali aj moduláciu expresie HRNR aktiváciou AhR jeho ligandom TCDD v koncentrácii 10 nM po dobu 24 hodín. Pozorovaná štatisticky významná expresia HRNR v NHEK bunkovej línii (normálne ľudské epidermálne keratinocyty) bola približne 2 krát vyššia v porovnaní s negatívnou kontrolou.

Vo výsledkoch z mojich experimentov som pri expresii HRNR ligandom aryl uhlíkového receptora FICZ-om pozorovala minimálnu indukciu expresie HRNR – len 1,2 krát vyššiu ako tomu bolo pri negatívnej kontrole. Ďalej, pri triptánoch nebol sledovaný žiadny nárast expresie HRNR, jedine pri RIZA bol sledovaný jej signifikantný pokles. Moje výsledky a výsledky van den Bogaard *et al.*, (2015) a Kennedy *et al.*, (2013) sa môžu líšiť aj z dôvodu, že pri mnou vykonaných experimentoch boli používané immortalizované ľudské keratinocyty, zatiaľ čo van den Bogaard *et al.*, (2015) a Kennedy *et al.*, (2013) pracovali s primárnymi ľudskými keratinocytmi.

Lee *et al.*, (2019) pri aktivácii AhR v HaCaT bunkovej línii botanickým extraktom z *Actinidia arguta* a *Perilla frutescens* pozorovali, že nedochádzalo k zvýšenej expresii IVL. Rovnaký výsledok bol pozorovaný aj v mojich experimentoch, kde FICZ taktiež

nemal vplyv na expresiu IVL, aj napriek tomu, že v experimente Lee *et al.*, (2019) bola doba pôsobenia botanického extraktu na HaCaT bunky dvakrát vyššia ako v mojich experimentoch.

Na základe porovnania výsledkov predošlých a mojich experimentov je pravdepodobné, že aktivácia AhR je síce spojená s expresiou FLG a do istej miery aj HRNR, no nie s IVL. Pre lepšie posúdenie aktivácie AhR a expresie HRNR, FLG a IVL pomocou triptánov sú nutné ďalšie výskumy, ktoré by mali zahŕňať napr. primárne ľudské keratinocyty.

7 ZÁVER

V mojej bakalárskej práci som sa zaoberala moduláciou expresie bariérových génov v kožných bunkách rôznymi triptánmi, ktoré sa v súčasnosti používajú k liečbe akútnych migrén. Prvým krokom bolo zistenie cytotoxického účinku skúmaných triptánov po 48-hodinovom pôsobení pomocou MTT testu viability. Experimenty prebiehali s použitím HaCaT bunkovej línie imortalizovaných keratinocytov a AhR-responzívnej AhaRaCaT bunkovej línie odvodenej od HaCaT, na ktoré boli aplikované triptány (eletriptán, almotriptán, zolmitriptán, frovatriptán, rizatriptán, naratriptán, sumatriptán) v koncentráciách 1 μM , 10 μM , 50 μM a 100 μM a avitriptán a donitriptán v koncentráciách 1 μM , 10 μM a 50 μM . Pri stanovovaní vplyvu triptánov na transkripčnú aktivitu AhR pomocou Gene Reporter Assay bola stanovená doba ich pôsobenia na 24 a 48 hodín. Avitriptán, donitriptán, rizatriptán a naratriptán prejavili po 24 hodinách signifikantnú koncentračne závislú zvýšenú aktiváciu AhR, ktorá po 48 hodinách síce vykazovala rovnaký trend, no štatisticky významne už len pre donitriptán. Expresia génov bariérových proteínov (HRNR, FLG, IVL) a CYP1A1 na úrovni mRNA bola stanovená pomocou RT-qPCR. V prípade CYP1A1 došlo po 24 hodinách pôsobenia triptánov k štatisticky významnému nárastu expresie, konkrétne pri avitriptáne, donitriptáne, rizatriptáne a naratriptáne. Pri géne HRNR nedošlo k významnému nárastu expresie. Výnimkou bol rizatriptán, ktorý expresiu HRNR signifikantne znížil. Expresia FLG bola štatisticky významne pozitívne ovplyvnená FICZ-om, avitriptánom, donitriptánom a rizatriptánom. Mierny nárast indukcie bol sledovaný pri použití všetkých triptánov, okrem eletriptánu. V prípade IVL bol sledovaný koncentračne závislý pokles expresie pri donitriptáne a naratriptáne, ktorý bol pri donitriptáne signifikantný. Pre jednoznačnú odpoveď na otázku či triptány ovplyvňujú expresiu bariérových proteínov kože je potrebný ďalší výskum. Ciele bakalárskej práce boli naplnené.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Abel, E. A., DiCicco, L. M., Orenberg, E. K., Fraki, J. E., & Farber, E. M. (1986). Drugs in exacerbation of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15(5, Part 1), 1007–1022.
- Adhikary, G., Crish, J., Lass, J., & Eckert, R. L. (2004). Regulation of Involucrin Expression in Normal Human Corneal Epithelial Cells: A Role for Activator Protein One. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(4), 1080–1087.
- ALMOZEN, 12,5MG TBL FLM 12, Státní ústav pro kontrolu léčiv. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0179092&tab=texts>
- Aoki, T., Fukuzumi, T., Adachi, J., Endo, K., & Kojima, M. (1992). Re-evaluation of skin lesion distribution in atopic dermatitis. Analysis of cases 0 to 9 years of age. *Acta Dermato-Venereologica Supplementum*, 176, 19–23.
- Apfelbacher, C. J., Diepgen, T. L., & Schmitt, J. (2011). Determinants of eczema: Population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy*, 66(2), 206–213.
- Armstrong, S. C., & Cozza, K. L. (2002). Triptans. *Psychosomatics*, 43(6), 502–504.
- Asman, D. C., Takimoto, K., Pitot, H. C., & Lindahl, R. (1993). Preliminary characterization of the rat class 3 aldehyde dehydrogenase gene. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 328, 81–86.
- Avouac, J., Palumbo-Zerr, K., Ruzehaji, N., Tomcik, M., Zerr, P., Dees, C., Distler, A., Beyer, C., Schneider, H., Distler, O., Schett, G., Allanore, Y., & Distler, J. H. W. (2014). The Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor/NR1I3 Enhances the Profibrotic Effects of Transforming Growth Factor β and Contributes to the Development of Experimental Dermal Fibrosis. *Arthritis & Rheumatology*, 66(11), 3140–3150.
- Baba, T., Mimura, J., Gradin, K., Kuroiwa, A., Watanabe, T., Matsuda, Y., Inazawa, J., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 33101–33110.
- Bannister, M. J., & Freeman, S. (2000). Adult-onset atopic dermatitis. *Australasian Journal of Dermatology*, 41(4), 225–228.

- Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., & Perdew, G. H. (2008). The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*, 18(3), 207–250.
- Beresford, A. P. (1993). CYP1A1: Friend or Foe? *Drug Metabolism Reviews*, 25(4), 503–517.
- Bieber, T. (2010). Atopic Dermatitis. *Annals of Dermatology*, 22(2), 125–137.
- Bikle, D. D. (2015). Pregnane X receptor expression in skin: The good and the bad. *Experimental Dermatology*, 24(11), 829–830.
- Bin, L., & Leung, D. Y. M. (2016). Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 12, 52.
- Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: From 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1768(4), 772–793.
- Blier, P., Piñeyro, G., el Mansari, M., Bergeron, R., & de Montigny, C. (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 861, 204–216.
- Boehncke, W.-H., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983–994.
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 33(1), 1–5.
- Bogaard, E. H. van den, Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., Vlijmen-Willems, I. M. J. J. van, Hato, S. V., Valk, P. G. M. van der, Schröder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L. J. M., & Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2).
- Brown, T. M., & Krishnamurthy, K. (2021). Histology, Dermis. V *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Cady, R. K., Wendt, J. K., Kirchner, J. R., Sargent, J. D., Rothrock, J. F., & Skaggs, H., Jr. (1991). Treatment of Acute Migraine With Subcutaneous Sumatriptan. *JAMA*, 265(21), 2831–2835.

- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii*, 30(1), 30–41.
- Coon, M. J., Vaz, A. D., & Bestervelt, L. L. (1996). Cytochrome P450 2: Peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(4), 428–434.
- Cooper, D. M., & Londos, C. (1982). GTP-dependent stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Horizons in Biochemistry and Biophysics*, 6, 309–333.
- Cutler, N. R., Jhee, S. S., Majumdar, A. K., McLaughlin, D., Brucker, M. J., Carides, A. D., Kramer, M. S., Matzura-Wolfe, D., Reines, S. A., & Goldberg, M. R. (1999). Pharmacokinetics of Rizatriptan Tablets During and Between Migraine Attacks. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 39(4), 264–269.
- De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., Berger, A. E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T. H., Leung, D. Y. M., ... Beck, L. A. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 773–786.e1-7.
- De Vivo, M., & Maayani, S. (1986). Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1a} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 238(1), 248–253.
- Deleu, D., & Hanssens, Y. (2000). Current and Emerging Second-Generation Triptans in Acute Migraine Therapy: A Comparative Review. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 40(7), 687–700.
- Detail lieku* | ŠÚKL. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=5727A
- Detail lieku* | ŠÚKL. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=8464C

- Detail lieku* | ŠÚKL. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=42661
- Detail lieku* | ŠÚKL. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=81551
- Di Meglio, P., Duarte, J. H., Ahlfors, H., Owens, N. D. L., Li, Y., Villanova, F., Tosi, I., Hirota, K., Nestle, F. O., Mrowietz, U., Gilchrist, M. J., & Stockinger, B. (2014). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity*, *40*(6), 989–1001.
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J., & Perdew, G. H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *115*(1), 89–97.
- Dukat, M. (2001). Donitriptan (Pierre Fabre). *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, *2*(3), 415–418.
- Eckert, R. L., & Green, H. (1986). Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell*, *46*(4), 583–589.
- Eckert, R. L., Broome, A.-M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D., & Lee, K. (2004). S100 Proteins in the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(1), 23–33.
- Eckert, R. L., Crish, J. F., Efimova, T., Dashti, S. R., Deucher, A., Bone, F., Adhikary, G., Huang, G., Gopalakrishnan, R., & Balasubramanian, S. (2004). Regulation of Involucrin Gene Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(1), 13–22.
- Esser, C., Bargaen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., & Krutmann, J. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars in Immunopathology*, *35*(6), 677–691.
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2007). Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, *26*(4), 343–357.

- Farber, E. M., Nall, M. L., & Watson, W. (1974). Natural History of Psoriasis in 61 Twin Pairs. *Archives of Dermatology*, *109*(2), 207–211.
- Fleishaker, J. C., Ryan, K. K., Carel, B. J., & Azie, N. E. (2001). Evaluation of the Potential Pharmacokinetic Interaction between Almotriptan and Fluoxetine in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *41*(2), 217–223.
- Fleischhacker, W. W., & Brooks, D. J. (2011). *Neuropsychopharmacology*. Springer Science & Business Media.
- Fritsche, E., Schäfer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hübenthal, U., Cline, J. E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L.-O., Rannug, A., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J., & Krutmann, J. (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(21), 8851–8856.
- Fry, L., & Baker, B. S. (2007). Triggering psoriasis: The role of infections and medications. *Clinics in Dermatology*, *25*(6), 606–615.
- Furue, M., Hashimoto-Hachiya, A., & Tsuji, G. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21), E5424.
- Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., & Uchi, H. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Archives of Dermatological Research*, *306*(9), 769–779.
- Furue, M., Tsuji, G., Mitoma, C., Nakahara, T., Chiba, T., Morino-Koga, S., & Uchi, H. (2015). Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Dermatological Science*, *80*(2), 83–88.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., & Gilliet, M. (2009). Self-RNA–antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(9), 1983–1994.
- Gasiewicz, T. A., & Rucci, G. (1984). Cytosolic receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Evidence for a homologous nature among various mammalian species. *Molecular Pharmacology*, *26*(1), 90–98.

- Girolomoni, G., de Bruin-Weller, M., Aoki, V., Kabashima, K., Deleuran, M., Puig, L., Bansal, A., & Rossi, A. B. (2021). Nomenclature and clinical phenotypes of atopic dermatitis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, *12*, 20406223211002980.
- Gittler, J. K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K. J., Wang, C. Q. F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2012). Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(6), 1344–1354.
- Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Di Nardo, A., Homey, B., Lauerma, A., Arai, N., Gallo, R. L., DiGiovanni, J., & Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(13), 2921–2930.
- Griffiths, C. E., & Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*, *370*(9583), 263–271.
- Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2000). The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *40*, 519–561.
- Gudjonsson, J. E., & Elder, J. T. (2007). Psoriasis: Epidemiology. *Clinics in Dermatology*, *25*(6), 535–546.
- Gutowska-Owsiak, D., Schaupp, A. L., Salimi, M., Selvakumar, T. A., McPherson, T., Taylor, S., & Ogg, G. S. (2012). IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Experimental Dermatology*, *21*(2), 104–110.
- Haarmann-Stemann, T., Esser, C., & Krutmann, J. (2015). The Janus-Faced Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in the Skin: Consequences for Prevention and Treatment of Skin Disorders. *The Journal of Investigative Dermatology*, *135*(11), 2572–2576.
- Haas, K., Weighardt, H., Deenen, R., Köhrer, K., Clausen, B., Zahner, S., Boukamp, P., Bloch, W., Krutmann, J., & Esser, C. (2016). Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity. *The Journal of Investigative Dermatology*, *136*(11), 2260–2269.

- Hahn, M. E. (1998). The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. This article was invited by Guest Editors Dr John J. Stegeman and Dr David R. Livingstone to be part of a special issue of CBP on cytochrome P450 (Comp. Biochem. Physiol. 121 C, pages 1–412, 1998). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1), 23–53.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 307–340.
- Hannon, J., & Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 198–213.
- Harden, J. L., Krueger, J. G., & Bowcock, A. M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, 66–73.
- Hashimoto-Hachiya, A., Tsuji, G., Murai, M., Yan, X., & Furue, M. (2018). Upregulation of FLG, LOR, and IVL Expression by *Rhodiola crenulata* Root Extract via Aryl Hydrocarbon Receptor: Differential Involvement of OVOL1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1654.
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E., & Beaune, P. (1999). Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(1), 1–137.
- Hänsel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., Meurer, M., Rieber, E. P., & Schäkel, K. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong Th17/Th1 T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 787-794.e9.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., & Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19(1), 245–254.
- Henry, J., Hsu, C.-Y., Haftek, M., Nachat, R., Koning, H. D. de, Gardinal-Galera, I., Hitomi, K., Balica, S., Jean-Decoster, C., Schmitt, A.-M., Paul, C., Serre, G., & Simon, M. (2011). Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *The FASEB Journal*, 25(5), 1567–1576.

- Hord, N. G., & Perdew, G. H. (1994). Physicochemical and immunocytochemical analysis of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: Characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Molecular Pharmacology*, *46*(4), 618–626.
- Hu, W., Sorrentino, C., Denison, M. S., Kolaja, K., & Fielden, M. R. (2007). Induction of cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: Results of large scale screening of pharmaceuticals and toxicants in vivo and in vitro. *Molecular Pharmacology*, *71*(6), 1475–1486.
- Chang, C., & Lu, Q. (Ed.). (2020). *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity* (Roč. 1253). Springer Singapore.
- Cheng, Y., Jin, U.-H., Allred, C. D., Jayaraman, A., Chapkin, R. S., & Safe, S. (2015). Aryl Hydrocarbon Receptor Activity of Tryptophan Metabolites in Young Adult Mouse Colonocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, *43*(10), 1536–1543.
- Chiaro, C. R., Patel, R. D., Marcus, C. B., & Perdew, G. H. (2007). Evidence for an Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Cytochrome P450 Autoregulatory Pathway. *Molecular Pharmacology*, *72*(5), 1369–1379.
- Irvine, A. D., & Irwin McLean, W. H. (2006). Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a Major Gene for Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(6), 1200–1202.
- Ishida-Yamamoto, A., & Iizuka, H. (1995). Differences in Involucrin Immunolabeling Within Cornified Cell Envelopes in Normal and Psoriatic Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*(3), 391–395.
- Jiang, Y., Wang, K., Fang, R., & Zheng, J. (2010). Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *58*(8), 679–685.
- Jones, C. L., & Reiners, J. J. (1997). Differentiation Status of Cultured Murine Keratinocytes Modulates Induction of Genes Responsive to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *347*(2), 163–173.
- Kao, J., Patterson, F. K., & Hall, J. (1985). Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: An in vitro study with

- benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 81(3 Pt 1), 502–516.
- Kennedy, L. H., Sutter, C. H., Leon Carrion, S., Tran, Q. T., Bodreddigari, S., Kensicki, E., Mohny, R. P., & Sutter, T. R. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Mediated Production of Reactive Oxygen Species Is An Essential Step in the Mechanism of Action to Accelerate Human Keratinocyte Differentiation. *Toxicological Sciences*, 132(1), 235–249.
- Kezic, S., Kemperman, P. M. J. H., Koster, E. S., de Jongh, C. M., Thio, H. B., Campbell, L. E., Irvine, A. D., McLean, W. H. I., McLean, I. W. H., Puppels, G. J., & Caspers, P. J. (2008). Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(8), 2117–2119.
- Kim, B. E., Leung, D. Y. M., Boguniewicz, M., & Howell, M. D. (2008). Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 126(3), 332–337.
- Kim, H. R., Kang, S. Y., Kim, H. O., Park, C. W., & Chung, B. Y. (2020). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Autophagy in Psoriasis-Related Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2195.
- Kim, J. Y., & Dao, H. (2021). Physiology, Integument. V *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9721–9726.
- Kiyomatsu-Oda, M., Uchi, H., Morino-Koga, S., & Furue, M. (2018). Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, 90(3), 284–294.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(2), 376–386.

- Ko, C.-I., & Puga, A. (2017). Does the Aryl Hydrocarbon Receptor Regulate Pluripotency? *Current Opinion in Toxicology*, 2, 1–7.
- Kömüves, L. G., Schmuth, M., Fowler, A. J., Elias, P. M., Hanley, K., Man, M.-Q., Moser, A. H., Lobaccaro, J.-M. A., Williams, M. L., Mangelsdorf, D. J., & Feingold, K. R. (2002). Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(1), 25–34.
- Kyoreva, M., Li, Y., Hoosenally, M., Hardman-Smart, J., Morrison, K., Tosi, I., Tolaini, M., Barinaga, G., Stockinger, B., Mrowietz, U., Nestle, F. O., Smith, C. H., Barker, J. N., & Di Meglio, P. (2021). CYP1A1 Enzymatic Activity Influences Skin Inflammation Via Regulation of the AHR Pathway. *Journal of Investigative Dermatology*, 141(6), 1553-1563.e3.
- Lai, R., Xian, D., Xiong, X., Yang, L., Song, J., & Zhong, J. (2018). Proanthocyanidins: Novel treatment for psoriasis that reduces oxidative stress and modulates Th17 and Treg cells. *Redox Report*, 23(1), 130–135.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., & Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162), 564–569.
- Le Beau, M. M., Carver, L. A., Espinosa, R., Schmidt, J. V., & Bradfield, C. A. (1994). Chromosomal localization of the human AHR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21—>p15. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 66(3), 172–176.
- Lee, W., Jeong, Y., Park, J.-H., Lee, C. H., Yun, N., Lee, D. S., Nam, I.-J., Kim, J.-D., Yoon, K. D., Son, M., & Kim, S. (2019). Water-Soluble Extract from *Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. Ex Miq. And *Perilla frutescens* (L.) Britton, ACTPER, Ameliorates a Dry Skin-Induced Itch in a Mice Model and Promotes Filaggrin Expression by Activating the AhR Signaling in HaCaT Cells. *Nutrients*, 11(6), 1366.
- Loertscher, J. A., Lin, T.-M., Peterson, R. E., & Allen-Hoffmann, B. L. (2002). In Utero Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Causes Accelerated Terminal Differentiation in Fetal Mouse Skin. *Toxicological Sciences*, 68(2), 465–472.

- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of Psoriasis. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 227–255.
- Luoma, R., Koivikko, A., & Viander, M. (1983). Development of Asthma, Allergic Rhinitis and Atopic Dermatitis by the Age of Five Years: A Prospective Study of 543 Newborns. *Allergy*, 38(5), 339–346.
- Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 19(3), 687–695.
- Ma, Q. (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: Transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Current Drug Metabolism*, 2(2), 149–164.
- Macone, A. E., & Perloff, M. D. (2017). Triptans and migraine: Advances in use, administration, formulation, and development. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(4), 387–397.
- Makino, T., Takaishi, M., Morohashi, M., & Huh, N. (2001). Hornerin, a Novel Profilaggrin-like Protein and Differentiation-specific Marker Isolated from Mouse Skin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47445–47452.
- Makino, T., Yamakoshi, T., Mizawa, M., & Shimizu, T. (2014). Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornerin in xenotransplanted human skin. *Acta Histochemica*, 116(1), 20–24.
- Malorni, L., Cozzolino, R., Boscaino, F., Castaldo, D., & Malorni, A. (2012). *Biological and Toxicological responses to dioxins exposures*. 2012, 20–30.
- Manzella, C., Singhal, M., Alrefai, W. A., Saksena, S., Dudeja, P. K., & Gill, R. K. (2018). Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Scientific Reports*, 8(1), 6103.
- Martin, M. J., Estravís, M., García-Sánchez, A., Dávila, I., Isidoro-García, M., & Sanz, C. (2020). Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis: An Updated Systematic Review. *Genes*, 11(4), E442.
- McGrath, J. A. (2008). Filaggrin and the great epidermal barrier grief. *Australasian Journal of Dermatology*, 49(2), 67–74.

- Mihm, M. C., Soter, N. A., Dvorak, H. F., & Austen, K. F. (1976). The Structure Of Normal Skin And The Morphology Of Atopic Eczema. *Journal of Investigative Dermatology*, 67(3), 305–312.
- Mlitz, V., Latreille, J., Gardinier, S., Jdid, R., Drouault, Y., Hufnagl, P., Eckhart, L., Guinot, C., & Tschachler, E. (2012). Impact of filaggrin mutations on Raman spectra and biophysical properties of the stratum corneum in mild to moderate atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 26(8), 983–990.
- Morizane, S., & Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of Dermatology*, 39(3), 225–230.
- Morizane, S., Yamasaki, K., Mühleisen, B., Kotol, P. F., Murakami, M., Aoyama, Y., Iwatsuki, K., Hata, T., & Gallo, R. L. (2012). Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 in Psoriasis Enables Keratinocyte Reactivity against TLR9 Ligands. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(1), 135–143.
- Murphy, G. F., Flynn, T. C., Rice, R. H., & Pinkus, G. S. (1984). Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: A marker for keratinocyte differentiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 82(5), 453–457.
- Napolitano, M., & Patrino, C. (2018). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) a possible target for the treatment of skin disease. *Medical Hypotheses*, 116, 96–100.
- NARAMIG, 2,5MG TBL FLM 6 I, Státní ústav pro kontrolu léčiv. (n.d.). Cit 25. júl 2021, z <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0238017&tab=texts>
- Nedoszytko, B., Reszka, E., Gutowska-Owsiak, D., Trzeciak, M., Lange, M., Jarczak, J., Niedozytko, M., Jablonska, E., Romantowski, J., Strapagiel, D., Skokowski, J., Siekierzycka, A., Nowicki, R. J., Dobrucki, I. T., Zaryczańska, A., & Kalinowski, L. (2020). Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), E6484.
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., & Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 135–143.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., & Barker, J. (2009). Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 496–509.

- Nestle, F. O., Turka, L. A., & Nickoloff, B. J. (1994). Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(1), 202–209.
- Paternoster, L., Standl, M., Waage, J., Baurecht, H., Hotze, M., Strachan, D. P., Curtin, J. A., Bønnelykke, K., Tian, C., Takahashi, A., Esparza-Gordillo, J., Alves, A. C., Thyssen, J. P., den Dekker, H. T., Ferreira, M. A., Altmaier, E., Sleiman, P. M., Xiao, F. L., Gonzalez, J. R., ... Weidinger, S. (2015). Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, *47*(12), 1449–1456.
- Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C.-Y., Balica, S., Jean-Decoster, C., Méchin, M.-C., Hansmann, B., Rodriguez, E., Weindinger, S., Schmitt, A.-M., Serre, G., Paul, C., & Simon, M. (2013). Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(4), 1094–1102.
- Peng, W., & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*, *45*(3), 566–574.
- Petersen, D. D., McKinney, C. E., Ikeya, K., Smith, H. H., Bale, A. E., McBride, O. W., & Nebert, D. W. (1991). Human CYP1A1 gene: Cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *American Journal of Human Genetics*, *48*(4), 720–725.
- Petruilis, J. R., & Perdew, G. H. (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-Biological Interactions*, *141*(1–2), 25–40.
- Poland, A., Glover, E., & Kende, A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, *251*(16), 4936–4946.
- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunskisiri, W., & Dale, B. A. (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(33), 23772–23781.
- PubChem. (n.d.). *Almotriptan*. Cit 08. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/123606>

- PubChem. (n.d.). *Avitriptan*. Cit 25. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/133081>
- PubChem. (n.d.). *Donitriptan*. Cit 25. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/197706>
- PubChem. (n.d.). *Eletriptan*. Cit 25. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77993>
- PubChem. (n.d.). *Frovatriptan*. Cit 25. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77992>
- PubChem. (n.d.). *Naratriptan*. Cit . august 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4440>
- PubChem. (n.d.). *Rizatriptan*. Cit 31. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5078>
- PubChem. (n.d.). *Sumatriptan*. Cit 28. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5358>
- PubChem. (n.d.). *Zolmitriptan*. Cit 08. júl 2021, z
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60857>
- Rawlings, A. V., & Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, *17*(s1), 43–48.
- Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1475.
- Rice, R. H., & Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*, *18*(3), 681–694.
- Rivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Michel, S., Griffiths, C. E. M., & Ailhaud, G. (1998). Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtypes During the Differentiation of Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *111*(6), 1116–1121.
- Rodríguez, E., Baurecht, H., Wahn, A. F., Kretschmer, A., Hotze, M., Zeilinger, S., Klopp, N., Illig, T., Schramm, K., Prokisch, H., Kühnel, B., Gieger, C., Harder, J., Cifuentes, L., Novak, N., & Weidinger, S. (2014). An integrated epigenetic and transcriptomic

- analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 1873–1883.
- Rowlands, J. C., McEwan, I. J., & Gustafsson, J. A. (1996). Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: Direct interactions with basal transcription factors. *Molecular Pharmacology*, 50(3), 538–548.
- Santini, S. M., Lapenta, C., Donati, S., Spadaro, F., Belardelli, F., & Ferrantini, M. (2011). Interferon- α -Conditioned Human Monocytes Combine a Th1-Orienting Attitude with the Induction of Autologous Th17 Responses: Role of IL-23 and IL-12. *PLOS ONE*, 6(2), e17364.
- Saxena, P. R., De Vries, P., Wang, W., Heiligers, J. P., Maassen vandenBrink, A., Bax, W. A., & Yocca, F. D. (1997). Effects of avitriptan, a new 5-HT 1B/1D receptor agonist, in experimental models predictive of antimigraine activity and coronary side-effect potential. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 355(2), 295–302.
- Seo, S. J., Ahn, S. W., Hong, C. K., & Ro, B. I. (2001). Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *Journal of Dermatological Science*, 27(3), 183–191.
- Shimada, T., & Guengerich, F. P. (2006). Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, 19(2), 288–294.
- Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C., & Bradfield, C. A. (1996). Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6731–6736.
- Schmuth, M., Haqq, C. M., Cairns, W. J., Holder, J. C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A. J., Chuang, G., Moser, A. H., Brown, B. E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T. M., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- β/δ Stimulates Differentiation and Lipid Accumulation in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(4), 971–983.

- Silverberg, N. B., & Silverberg, J. I. (2015). Inside out or outside in: Does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis? *Cutis*, *96*(6), 359–361.
- Simon, M., Phillips, M., Green, H., Stroh, H., Glatt, K., Burns, G., & Latt, S. A. (1989). Absence of a single repeat from the coding region of the human involucrin gene leading to RFLP. *American Journal of Human Genetics*, *45*(6), 910–916.
- Smith, F. J. D., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P., & McLean, W. H. I. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nature Genetics*, *38*(3), 337–342.
- Smith, S. H., Jayawickreme, C., Rickard, D. J., Nicodeme, E., Bui, T., Simmons, C., Coquery, C. M., Neil, J., Pryor, W. M., Mayhew, D., Rajpal, D. K., Creech, K., Furst, S., Lee, J., Wu, D., Rastinejad, F., Willson, T. M., Viviani, F., Morris, D. C., ... Cote-Sierra, J. (2017). Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans. *Journal of Investigative Dermatology*, *137*(10), 2110–2119.
- Sonkoly, E., Janson, P., Majuri, M.-L., Savinko, T., Fyhrquist, N., Eidsmo, L., Xu, N., Meisgen, F., Wei, T., Bradley, M., Stenvang, J., Kauppinen, S., Alenius, H., Lauerma, A., Homey, B., Winqvist, O., Ståhle, M., & Pivarcsi, A. (2010). MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(3), 581-589.e1-20.
- Sroka-Tomaszewska, J., & Trzeciak, M. (2021). Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(8), 4130.
- Takaishi, M., Makino, T., Morohashi, M., & Huh, N. (2005). Identification of Human Hornerin and Its Expression in Regenerating and Psoriatic Skin *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(6), 4696–4703.
- Takei, K., Mitoma, C., Hashimoto-Hachiya, A., Uchi, H., Takahara, M., Tsuji, G., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T., & Furue, M. (2015). Antioxidant soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Dermatology*, *42*(2), 171–180.

- Tepper, S. J., Rapoport, A. M., & Sheftell, F. D. (2002). Mechanisms of Action of the 5-HT_{1B/1D} Receptor Agonists. *Archives of Neurology*, *59*(7), 1084.
- Thorarensen, S. M., Lu, N., Ogdie, A., Gelfand, J. M., Choi, H. K., & Love, T. J. (2017). Physical trauma recorded in primary care is associated with the onset of psoriatic arthritis among patients with psoriasis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*(3), 521–525.
- Torres, T., Ferreira, E. O., Gonçalo, M., Mendes-Bastos, P., Selores, M., & Filipe, P. (2019). Update on Atopic Dermatitis. *Acta Medica Portuguesa*, *32*(9), 606–613.
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T_H-17, T_H1 and T_H2 cells. *Nature Immunology*, *10*(8), 864–871.
- Tsuji, G., Hashimoto-Hachiya, A., Kiyomatsu-Oda, M., Takemura, M., Ohno, F., Ito, T., Morino-Koga, S., Mitoma, C., Nakahara, T., Uchi, H., & Furue, M. (2017). Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death & Disease*, *8*(7), e2931–e2931.
- Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H., Matsuda, T., Chiba, T., Takeuchi, S., Yasukawa, F., Moroi, Y., & Furue, M. (2012). Identification of Ketoconazole as an AhR-Nrf2 Activator in Cultured Human Keratinocytes: The Basis of Its Anti-Inflammatory Effect. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(1), 59–68.
- van den Bogaard, E. H. van den, Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., Vlijmen-Willems, I. M. J. J. van, Hato, S. V., Valk, P. G. M. van der, Schröder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L. J. M., & Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(2).
- van den Bogaard, E. H., Podolsky, M. A., Smits, J. P., Cui, X., John, C., Gowda, K., Desai, D., Amin, S. G., Schalkwijk, J., Perdew, G. H., & Glick, A. B. (2015). Genetic and Pharmacological Analysis Identifies a Physiological Role for the AHR in Epidermal Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(5), 1320–1328.
- VanRooij, J. G., De Roos, J. H., Bodelier-Bade, M. M., & Jongeneelen, F. J. (1993). Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons through human skin: Differences between anatomical sites and individuals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *38*(4), 355–368.

- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links T H 17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, *453*(7191), 106–109.
- Vyhřídálová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., Mani, S., & Dvořák, Z. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), E2614.
- Wang, Q., VonHandorf, A., & Puga, A. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor. V S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (s. 437–451). Springer International Publishing.
- Watanabe, S., Wagatsuma, K., Ichikawa, E., & Takahashi, H. (1991). Abnormal Distribution of Epidermal Protein Antigens in Psoriatic Epidermis. *The Journal of Dermatology*, *18*(3), 143–151.
- Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H., Irvine, A. D., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Palmer, C. N. A., Jenneck, C., Maintz, L., Hagemann, T., Behrendt, H., Ring, J., Nothen, M. M., McLean, W. H. I., & Novak, N. (2006). Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(1), 214–219.
- Williams, H. C. (2000). Epidemiology of atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology*, *25*(7), 522–529.
- Williams, H. C. (2005). Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine*, *352*(22), 2314–2324.
- Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R., & Schröder, J.-M. (2009). Molecular Identification and Expression Analysis of Filaggrin-2, a Member of the S100 Fused-Type Protein Family. *PLoS ONE*, *4*(4), e5227.
- Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Reithmayer, K., Paus, R., Hansmann, B., He, Y., Bartels, J., Gläser, R., Harder, J., & Schröder, J.-M. (2009). Highly Complex Peptide Aggregates of the S100 Fused-Type Protein Hornerin Are Present in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *129*(6), 1446–1458.

- Yaffe, M. B., Beegen, H., & Eckert, R. L. (1992). Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(17), 12233–12238.
- Yoon, H. K., Li, Z. J., Choi, D.-K., Sohn, K.-C., Lim, E.-H., Lee, Y. H., Kim, S., Im, M., Lee, Y., Seo, Y.-J., Lee, J.-H., & Kim, C. D. (2014). Glucocorticoid receptor enhances involucrin expression of keratinocyte in a ligand-independent manner. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 390(1), 289–295.
- Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2021). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. V *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Yueh, M.-F., Huang, Y.-H., Hiller, A., Chen, S., Nguyen, N., & Tukey, R. H. (2003). Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 15001–15006.
- Zeitvogel, J., Jokmin, N., Rieker, S., Klug, I., Brandenberger, C., & Werfel, T. (2017). GATA3 regulates FLG and FLG2 expression in human primary keratinocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 11847.
- Zomig Tablets 2.5mg—Summary of Product Characteristics (SmPC)—(Emc). (n.d.). Cit 25. júl 2021, z <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1372/smpc#gref>