



Středoškolská technika 2018

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

MODEL VLIVU PŮSOBENÍ KOUŘE NA KŮŽI JAKO SIMULACE POŠKOZENÍ ZNEČIŠTĚNÍ OVZDUŠÍ

Novotná Adéla

Gymnázium, Pardubice, Mozartova 449

Mozartova 449, Pardubice, 53009

Anotace

V mé práci jsem se zajímala o vliv cigaretového kouře na pleť. Cílem práce bylo zjistit, jaké látky lépe zabraňují pronikání kouře do pleti.

Dnes je velkým trendem antipollution kosmetika, která má chránit kůži před působením kouře. Neexistují však studie, které by ukazovali jejich skutečnou funkčnost. Moje studie byla prováděna ex vivo na ušních boltcích prasat, kde jsou reakce kůže nejpodobnější lidské pleti. Ochrannou funkci jsem zjišťovala na kyselině hyaluronové, která měla zastupovat látky s bariérovou funkcí a na vitamínu C, který je významným antioxidantem. První fázi výzkumu jsem optimalizovala vliv kouře na pleť pomocí testů zjišťujících expresi genů v kůži. Sledovala jsem obsah kolagenu a genů MMP-1 a MMP-2, které řídí rozpad buněk. Dále potom pomocí metody TBARS sledující množství peroxidovaných lipidů, které jsem měřila odděleně v epidermis a dermis. Na základě této metody jsem poté v druhé fázi posuzovala funkci jednotlivých látek ochraňujících kůži. Podle výsledků lépe vyšla kyselina hyaluronová, která brání expresi peroxidovaných lipidů průměrně o 40% oproti vzorku bez aplikované kosmetické suroviny.

Klíčová slova

Kyselina hyaluronová; lipidy; antipollution

Obsah

1	Úvod.....	5
2	Teoretická část.....	7
2.1	Cigaretový kouř	7
2.1.1	Charakteristika kouře	7
2.1.2	Působení na kůži.....	7
2.2	Metaloproteázy	7
2.2.1	MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)	8
2.2.2	MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)	8
2.3	COL1A1 (Collagen, type I, alpha 1)	9
2.4	Model.....	10
2.5	Testované látky.....	10
2.5.1	Kyselina hyaluronová.....	10
2.5.2	Vitamín C	11
3	Metody	13
3.1	Poškození cigaretovým kouřem.....	13
3.1.1	Specifikace cigaret: Marlboro red	13
3.1.2	Zpracování prasečích boltců.....	13
3.1.3	Aplikace kouře – zapojení aparatury.....	13
3.1.4	Zpracování vzorků po aplikaci kouře	14
3.2	Stanovení koncentrace proteinů-BCA metoda	14
3.2.1	Princip	14
3.2.2	Reakční směs.....	15
3.2.3	Postup.....	15
3.2.4	Výpočet	15
3.3	Kvantitativní analýza genové exprese-PCR	15
3.3.1	Princip	15
3.3.2	Postup.....	15
3.3.3	Výpočet	16
3.4	Stanovení peroxidace lipidů-TBARS	16
3.4.1	Princip	16
3.4.2	Postup.....	16
4	Výsledky.....	17

4.1	PCR.....	17
4.1.1	COL1A1 Dermis	17
4.1.2	MMP-1 Dermis	18
4.1.3	MMP-1 Epidermis.....	20
4.1.4	FLG2 Epidermis	21
4.2	TBARS	23
5	Závěr.....	24
6	Seznam použité literatury	25
7	Seznam použitých obrázků, grafů a tabulek.....	30

1 ÚVOD

V této práci jsem se zabývala působením polutantů z cigaretového kouře na pleť. Lidská kůže a především horní vrstva epidermis hraje roli bariéry, ale je také jedním z prvních a hlavních cílů látek znečišťujících ovzduší. Mezi látky znečišťující ovzduší patří látky ekologického původu, stejně tak i látky antropického původu [1]. Mezi hlavní znečišťující látky s účinky na pokožku patří ultrafialové záření (UVR), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), těkavé organické sloučeniny (VOC), oxidy dusíku (NO_x), částice polétavého prachu (PM) a kouř z cigaret. Účinky různých látek znečišťujících ovzduší mohou být zesíleny přítomností jiných látek znečišťujících ovzduší nebo interakcí s UVR a tvoří hlavní aktivní složky prooxidačního smogu [2,3,4].

V závislosti na povaze těchto znečišťujících látek a celistvosti pokožky se způsoby pronikání znečišťujících látek liší. Změny, které narušují funkci kožní bariéry, jíž je stratum corneum, v metabolismu lipidů nebo v proteinových složkách korneocytů, se podílejí na vývoji různých kožních onemocnění. Ochranná schopnost pokožky není neomezená a problémy vznikají, když abnormální expozice stresorů životního prostředí překračuje normální obranný potenciál pleti. Oxidační stres je spojen s vnějším stárnutím kůže a dalšími zdravotními problémy [1].

Znečištění ovzduší je v současné době celosvětovým problémem, který se dotýká zejména městských oblastí. Mezi hlavní faktory patří negativní vliv na kůži. Znečištění vzduchu způsobuje dehydrataci, zvýšenou produkci kožních olejů spojených se vznikem akné, pigmentových skvrn, podrážděním kůže, předčasným stárnutím, vráskami atd. Vzhledem k rostoucímu počtu lidí žijících v městských oblastech existuje stále větší počet potenciálních zákazníků, kteří hledají kosmetické přípravky s ochrannou funkcí proti znečištění. Z tohoto důvodu je účinek proti znečištění v současnosti jedním z hlavních trendů v oblasti kosmetiky na celém světě. Současně dnes neexistuje jednoduchá a jasná definice kosmetiky proti znečištění a způsoby jejího testování [5].

Znečištění ovzduší pochází z různých pevných, obvykle průmyslových nebo mobilních zdrojů, jako jsou silnice a letecká doprava. Tyto zdroje produkují primární znečišťující látky včetně částic, plynů a těkavých organických sloučenin. Sekundární znečišťující látky, jako ozon a peroxyacetylnitráty, jsou tvořeny reakcemi primárních polutantů, jako je teplo nebo UV záření. Tyto znečišťující látky zůstávají v nižších vrstvách atmosféry a vytvářejí smog [6].

Existují důkazy o účincích kouře na stárnutí pleti. V kožních pojivových tkáních kuřáků jsou vyšší hladiny metaloproteáz (MMP-1 a MMP-3) mRNA ve srovnání s nekuřáky. Metaloproteázy jsou zodpovědné za sníženou produkci kolagenu a degradaci elastických vláken [7]. Cigaretový kouř také snižuje expresi prozánětlivých genů, jako je CXCL8 (kódující IL-8) a IL18. Expresie strukturálních genů epidermis zodpovědných za terminální diferenciaci FLG a FLG2 je potlačena [8].

Přebytek reaktivních druhů kyslíku může vyvolat proces lipidové peroxidace pokožky [9].

Cigaretový kouř je vhodným modelem, který napodobuje komplexní směs životního prostředí, protože v něm je přítomna většina znečišťujících látek, které se vyskytují ve vzduchu. Jedná se o komplexní aerosol, který se skládá z mnoha chemických látek včetně reaktivních druhů kyslíku a dusíku, oxidu uhelnatého a elektrofilních aldehydů. Reaktivní oxidanty a volné radikály způsobují oxidační stres a inhibici antioxidantních mechanismů [5].

Chemickými látkami z cigaretového kouře je zvýšena také transepidermální ztráta vody, degenerace kožních pojivových tkání a zvýšená regulace matricových metaloproteináz 1 a 3.

Výrobci kosmetických přípravků používají širokou škálu testů týkajících se typu ochrany pleti, jako jsou antioxidantní účinky a zlepšení bariéry kůže. Modely jsou obvykle buněčné kultury, rekonstituovaná lidská kůže nebo dobrovolníci. Jako zdroj poškození kůže by mohly být použity těžké kovy, organické sloučeniny, polycyklické aromatické uhlovodíky, kouř z cigaret atd. Každý model má své vlastní výhody a nevýhody, ale zejména používání určitých zdrojů poškození *in vivo* na lidských dobrovolnících má svá etická omezení. V naší studii jsme proto zvolili prasečí aurikulární kůži zakoupenou jako odpadní materiál z masné produkce [10].

Cílem této práce bylo optimalizovat model vlivu cigaretového kouře na pokožku prasat *ex vivo* představující dostupnou a nákladově nenáročnou metodu v našich podmínkách. Byla měřena míra poškození lipidů, bílkovin a DNA. Byla vybrána nejvhodnější metoda pro detekci účinku kosmetických prostředků proti znečištění a nakonec byly vybrané kosmetické látky testovány na jejich účinek proti znečištění.

Vybranými kosmetickými surovinami byli kyselina hyaluronová a vitamín C. Kyselina hyaluronová je přední surovinou vyráběnou ve firmě Contipro. Dodává kůži s narušenou bariérovou funkcí hydrataci a ta se poté dokáže lépe bránit proti okolním vlivům znečištěného ovzduší tak, že brání průniku polutantů do hlubších vrstev pleti. Oproti tomu vitamín C je významným antioxidantem, který ničí volné radikály přicházející z ovzduší.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cigaretový kouř

2.1.1 Charakteristika kouře

Cigaretový kouř je vysoce komplexní aerosol složený z tisíců chemických látek, včetně reaktivních druhů dusíku a elektrofilních aldehydů [11,1]. Ekologický cigaretový kouř obsahuje karcinogeny jako benzo [a] pyren a 4- (methylnitrosoamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanon (NNK) a také velké množství látek vytvářejících radikály kyslíku, které, jak je známo, interagují s kůží [12]. Reaktivní oxidanty a volné radikály z cigaretového kouře jsou spojeny s oxidačním stresem nebo se sekundárními oxidačními reakcemi, jako je lipidová peroxidace [13]. Chemické látky z cigaretového kouře aktivují transepidermální ztrátu vody, degeneraci pojivové tkáně v kůži a zvýšení matricových metaloproteináz (MMP-1, MMP-3) [14,15,1]

2.1.2 Působení na kůži

Kouření souvisí s tvorbou hlubších periorbitálních vrásek [16,17]. Předčasné stárnutí pokožky obličeje u kuřáků je spojeno s charakteristickým vzorem vrásnění a změnou barvy kůže [18]. U kuřáků s těžkým kouřením byla zjištěna 4,7 krát vyšší pravděpodobnost vzniku vrásek tváře než u nekuřáků, nezávisle na expozici sluncem [19,17], i když kombinace kouření a expozice slunce může mít synergický účinek na stárnutí pokožky.

Cigaretový dým je spojen také s lupénkou [20,21,22,23]. Nedávná studie o prevalenci, která zahrnovala celkem 146.934 pacientů s lupénkou, hlásila souvislost mezi lupénkou a současným nebo bývalým kouřením dále také, že kouření je nezávislým rizikovým faktorem pro vznik lupénky [24]. Vznik lupénky by mohl být způsoben reaktivními druhy dusíku, ale zejména také narušením rovnováhy oxidantů a antioxidantů, která je zapříčiněna nízkou hladinou vitamínu C a glutathionu, jakožto i vysokými hladinami superoxidodismutázy a malonaldehydu v kožních tkáních [25,23,1]. Byla prokázána vyšší pravděpodobnost vzniku akné u kuřáků a přímá úměra mezi závažností akné a počtem vykouřených cigaret [26].

2.2 Metaloproteázy

Matrix metaloproteázy (MMPs) patří mezi proteolytické enzymy, jejichž katalytický mechanismus zahrnuje kov. Jednou z jejich funkcí je i štěpení bazálních membrán buněk a extracelulární matrice v normálních fyziologických procesech, jako je vývoj embrya, reprodukce a remodelace tkání, stejně tak v onemocněních, jako je artritida a metastáza. U těchto enzymů aktivuje molekula vody dvojmocný kationt, obvykle zinek. U maligních nádorů se tak mohou uplatnit v procesu invazivity a metastázování. Vznikají převážně ve stromálních buňkách (fibroblastech a endoteliích) reaktivně na přítomnost nádorových buněk [27].

2.2.1 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)

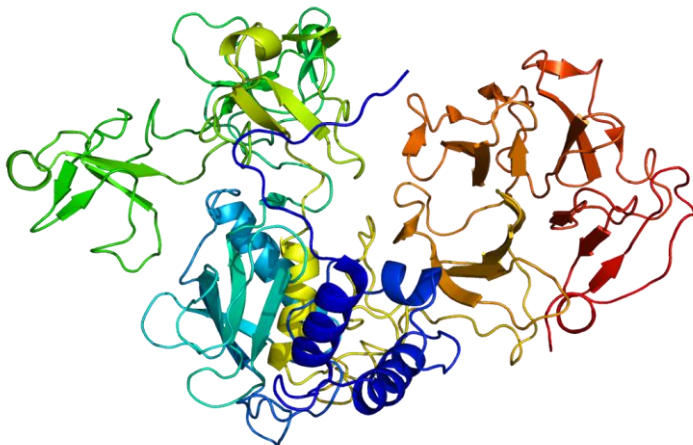
Tento gen je lokalizován na jedenáctém chromozomu v poloze 22.3. Rozkládá intersticiální kolageny typu I, II a III. Mechanická síla může zvýšit expresi MMP1 v lidských periodontálních vazných buňkách [28]. V případě infekce HIV interaguje a štěpí vylučovaný virový protein Tat, což vede k poklesu neurotoxicity [29].



Obrázek 1: MMP-1

2.2.2 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)

Enzym, který u lidí je kódován MMP-2 genem [30]. MMP-2 gen je umístěn na chromozomu 16 v poloze 12.2. [31]. Tento gen kóduje enzym, který degraduje kolagen typu IV, hlavní strukturní složku bazálních membrán. Enzym hraje roli v endometriálním menstruačním rozpadu, regulaci vaskularizace a zánětlivé odpovědi [32]. Mutace v genu MMP-2 jsou spojeny s Torg-Winchesterovým syndromem, multicentrickou osteolýzou a se vznikem artritidy [31]. Aktivita MMP-2 byla spojena se závažností chronických onemocnění dýchacích cest [33]. Změněné hladiny exprese a aktivity MMP byly silně zapleteny do progresu a metastáz mnoha forem rakoviny. Zvýšená aktivita MMP-2 byla také spojena se špatnou prognózou u různých forem rakoviny, například, melanomu, prsu, plic, vaječníků a prostaty [34].



Obrázek 2: MMP-2

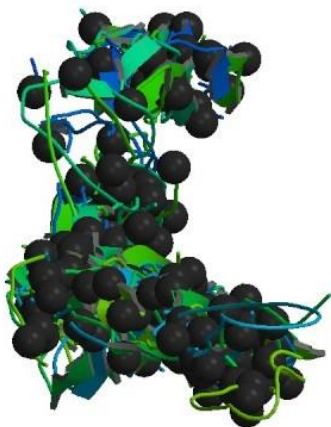
2.3 COL1A1 (Collagen, type I, alpha 1)

Kóduje hlavní složku fibrilárního kolagenu, který se nachází ve většině pojivových tkání. Kolagen je protein, který posiluje a podporuje mnoho tkání v těle, včetně chrupavky, kostí, šlachy, kůže a bílé části oka. Geny COL1A1 se nacházejí na dlouhém rameni chromozomu 17 mezi polohami 21.3 a 22.1. Molekuly prolikačního typu s trojvazným řetězcem musí být zpracovány enzymy mimo buňku. Jakmile jsou tyto molekuly zpracovány, uspořádají se do dlouhých tenkých vláken, které se navzájem propojují v mezerách kolem buněk. Křížové vazby vedou k tvorbě velmi silných zralých kolagenních vláken typu I. Kolagenní funkce zahrnuje tuhost a pružnost.

Nejčastější porucha způsobená mutacemi v tomto genu je osteogenesis imperfecta. Mutace, která inaktivuje jednu z dvou kopií genu COL1A1, způsobují osteogenesis imperfecta typu I. Mutovaná kopie genu nevytváří žádné kolagenové řetězce pro-alfa1 (I). Protože pouze jedna kopie genu směřuje buňku k vytváření řetězců pro-alfa1 (I), buňky lidí s touto poruchou tvoří pouze polovinu normálního množství kolagenu typu I, což má za následek křehkost kostí a další příznaky [35].

Osteoporóza je stav, díky němuž kosti postupně křehčí a jsou náchylnější k rozštěpení. Zvláštní variace (polymorfismus) v genu COL1A1 zřejmě zvyšuje riziko vzniku osteoporózy. Zvláštní odchylka v místě vazby Spl je prokázána jako spojená se zvýšeným rizikem nízké kostní hmoty a zlomeniny obratlů kvůli změnám proteinu COL1A1 produkovaného z jedné kopie genu. Několik studií ukázalo, že ženy s touto specifickou genetickou variací na místě Spl mají větší pravděpodobnost výskytu příznaků osteoporózy než ženy bez variability [36].

Ehlers-Danlosův syndrom, typ artrochalázie, je způsoben mutací genu COL1A1. Mutace v genu COL1A1, které způsobují tuto poruchu, instruuje buňku, aby vynechala část řetězce pro-alfa1 (I), která obsahuje segment používaný k připojení jedné molekuly k druhé. Pokud chybí tato část bílkoviny, je struktura kolagenu typu I ohrožena. Tkáně, které jsou bohaté na kolagen typu I, jako je kůže, kosti a šlachy, jsou touto změnou ovlivněny. Ehlers-Danlos typu IV je nejvíce přiřazen abnormalitám v retikulárních vláknech, kolagen typu III [37].



Obrázek 3: COL1A1

2.4 Model

Prasečí kůže má podobné histologické a fyziologické vlastnosti jako lidská kůže. Byla proto navržena jako dobrý model pro výzkum propustnosti stejně jako má lidská kůže. V této sérii experimentů byla in vitro porovnávána propustnost kůže ušního boltce prasete s lidskou (břišní) kůží a potkanem (dorzální) pokožkou s použitím hydrofilních (voda, mannitol, paraquat) a lipofilní (aldrin, karbaryl, fluazifoppenetrant). Bylo zjištěno se, že kůže prasete má více propustnou povahu než kůže potkaní a lidská pokožka, zejména pro lipofilní penetranty. Měření elektrické vodivosti přes membrány prasečí kůže ukázaly, že vodivost kůže může být užitečnou metodou pro posouzení integrity membrán, použitý ve spojení s hodnocením propustnosti vody. Z experimentu vyšlo, že prasečí kůže je svými vlastnostmi bližší lidské kůži než je kůže potkaní [38].

2.5 Testované látky

2.5.1 Kyselina hyaluronová

Jedná se o všudypřítomný uhlovodíkový polymer, který je součástí extracelulární matrice [39]. Kyselina hyaluronová je hlavní složkou synoviální tekutiny a bylo zjištěno, že zvyšuje viskozitu tekutiny.

Kyselina hyaluronová je také důležitou složkou kloubní chrupavky, kde je přítomna jako obal kolem každého chondrocytu. Když se monomery váží na hyaluronan v přítomnosti HAPLN1 (kyselina hyaluronanová a proteoglykanový vazebný protein 1), vytvářejí se velké, vysoce záporně nabitě agregáty. Tyto agregáty vsakují vodu a jsou odpovědné za odolnost chrupavky proti kompresi. Molekulová hmotnost hyaluronanu v chrupavce klesá s věkem, ale množství se zvyšuje [40].

Byla zjištěna lubrikační role hyaluronanu ve svalových pojivových tkáních, aby se zvýšila kluzkost mezi sousedními tkáňovými vrstvami. Zvláštní typ fibroblastů, obsažených v hustých fasciálních tkáních, byl navržen jako buňky specializované na biosyntézu matrice bohaté na hyaluronan. Jejich příbuzná aktivita by mohla být zapojena do regulace kluzné schopnosti mezi sousedními svalovými spojovacími tkáněmi [41].

Kyselina hyaluronová je také hlavní složkou pokožky, kde se podílí na opravě tkání. Když je kůže vystavena nadměrným UVB paprskům, dochází k jejímu zánětu (spálení slunce) a buňky v dermis přestanou vyrábět tolik hyaluronanu a zvyšují rychlost jeho degradace. Produkty degradace hyaluronanu se poté po vystavení UV záření akumulují v kůži [42].

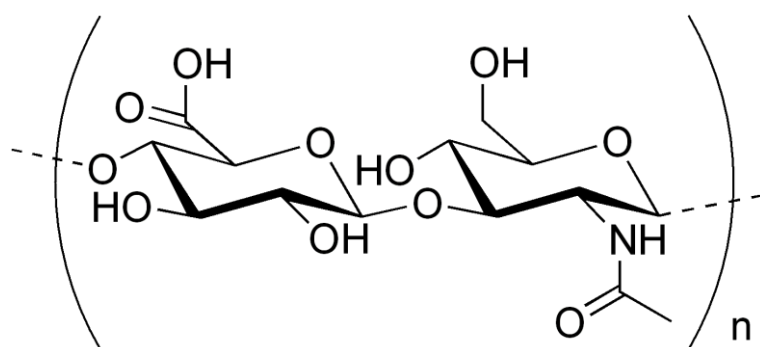
I když se hojně vyskytuje v extracelulárních maticích, hyaluronan také přispívá k hydrodynamice tkání, pohybu a proliferace buněk a podílí se na řadě interakcí buněčných povrchových receptorů.

Kyselina hyaluronová je běžnou složkou přípravků pro péči o pleť. Používá se jako kožní výplň v kosmetické chirurgii. Obvykle se injektuje buď klasickou ostrou hypodermickou jehlou nebo kanylou. Komplikace zahrnují oddělení nervů a cév, bolesti a podlitiny. V některých případech výplně kyseliny hyaluronové vedou k reakci granulomatózního cizího těla [43].

Je používána při léčbě atopické dermatitidy, kdy suchá, šupinatá pokožka, která je způsobena tímto onemocněním, může být léčena kožní emulzí obsahující jako aktivní složku hyaluronát sodný.

Kyselina hyaluronová je používána v různých formách k vytvoření umělých slz pro léčbu suchých [44].

Kůže poskytuje mechanickou bariéru pro vnější prostředí a zabraňuje pronikání infekčních agens. Jakmile je zraněna, tkáň pod ní jsou vystaveny infekci, proto je pro rekonstrukci funkce bariéry zásadní význam rychlé a účinné hojení. Hojení ran kůže je složitý proces a zahrnuje mnoho interakčních procesů iniciovaných hemostázou a uvolňování faktorů odvozených od trombocytů [45]. Následujícími stadii jsou zánět, tvorba granulační tkáně, reepithelizace a remodelování. Dále také usnadňuje migraci buněk do rány. To je zvláště důležité u jedinců s diabetem trpícím chronickými ranami [46].



Obrázek 4: Kyselina hyaluronová

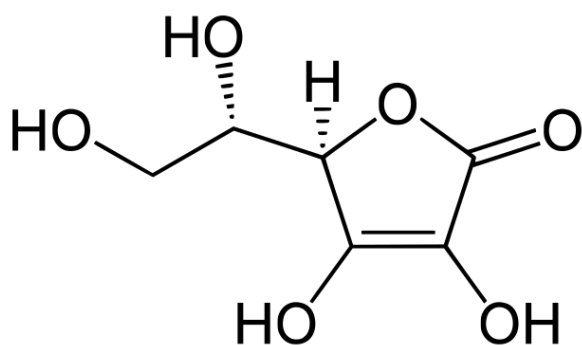
2.5.2 Vitamín C

Kyselina L-askorbová je kyselina slabě cukrová strukturně příbuzná s glukózou. V biologických systémech může být kyselina askorbová zjištěna pouze při nízkém pH, proto roztoky nad pH 5 jsou převážně nalezeny v ionizované formě, která se nazývá askorbát. Všechny tyto modifikované molekuly mají aktivitu srovnatelnou s vitamínem C, a proto se používají synonymně s vitamínem C, pokud není uvedeno jinak. Vitamin C je nezbytnou živinou pro některé živočichy včetně lidí. Jedná se o velmi silný antioxidant, který zároveň upevňuje imunitu těla. Je dobře rozpustný ve vodě. Je kofaktorem u alespoň osmi enzymatických reakcí u zvířat (a lidí) důležitým v mnoha základních funkcích, včetně hojení ran. U lidí má nedostatek vitamínu C kompromis syntézy kolagenu, což přispívá k závažnějším symptomům korytu [47]. Bez tohoto vitamínu je kolagen produkovaný tělem příliš nestabilní, aby mohl vykonávat svou funkci [48]. Zaujímá 80 % z celkového množství přijatých

mikronutrientů. Jedná se jako u většiny vitamínů o termolabilní látku. Za přístupu kyslíku oxiduje. Oxidace je urychlena přístupem mědi nebo železa. Během biosyntézy působí askorbát jako redukční činidlo, daruje elektrony a brání oxidaci, aby udržoval atomy železa a mědi ve svých redukováných stavech.

Dle standardních tabulek čítá doporučená denní dávka 90mg. Tato dávka by měla by být zvednuta u kuřáků, lidí s kardiologickým onemocněním nebo diabetem, ale také u lidí žijících ve městech nebo pokud se na denní bázi potýkají s virovým onemocněním. Například pokud kuřák vykouří 20 cigaret denně, jeho potřeba vitamínu C automaticky vzroste o 25 %. Vykouří-li pak cigaret 40, vzroste až o 50 %. Podobné je to také u konzumentů alkoholických nápojů. Játra, která produkují enzym usnadňující odsun alkoholu z krve, jsou zcela závislá na vitamínu C. Čím ho je méně, tím déle pak otrava alkoholem trvá [49].

Více než dva až tři gramy mohou způsobit poruchu trávení, zvláště když jsou užívány na prázdný žaludek. Avšak užívání vitamínu C ve formě askorbátu sodného a askorbátu vápenatého může tento účinek minimalizovat [50]. Mezi další příznaky hlášené u velkých dávek patří nevolnost, břišní křeče a průjem. Tyto účinky jsou přičítány osmotickému účinku neabsorbovaného vitamínu C, který prochází střevem [47]. Teoreticky může vysoký příjem vitamínu C způsobit nadměrnou absorpci železa. Může zvyšovat také riziko vzniku ledvinových kamenů. Má výsadní roli při léčbě kurděje, což je onemocnění způsobené nedostatkem vitamínu C [51].



Obrázek 5: Kyselina L-askorbová

3 METODY

3.1 Poškození cigaretovým kouřem

3.1.1 Specifikace cigaret: Marlboro red

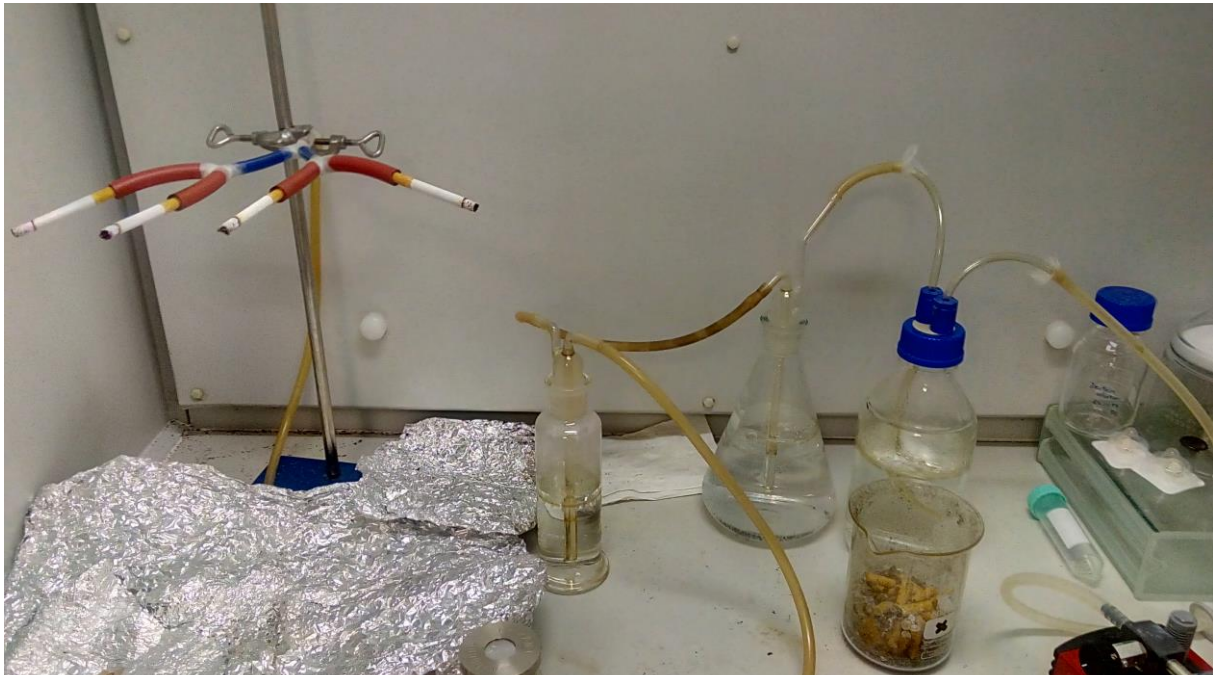
- Dehet: 10 mg/cigareta
- Nikotin: 0,8 mg/cigareta
- Oxid uhelnatý: 10mg/cigareta

3.1.2 Zpracování prasečích boltců

- Čerstvé, dovezené z jatek, nezamražené, očištěné obyčejnou vodou.
- Lehce přetřít desinfekcí.
- Odříznout plochou část ucha.
- Oholit žiletkou.
- Odříznout kůži od chrupavky skalpelem a zarovnat, aby všechny vzorky byly přibližně stejně silné.
- Vystříhnout na kolečka o průměru cca 4 cm.
- Oplach v kádince se sterilním PBS.
- Osušit vršek utěrkou z netkané textilie.
- Před aplikací kouře skladovat při pokojové teplotě.

3.1.3 Aplikace kouře – zapojení aparatury

- Pracovat v digestoři.
- 4 cigarety napojeny trubičkou na kouřovou celu – nechat působit deset minut.
- Kůži umístit na čistou, velkou, skleněnou Petriho misku, na ni přiložit kouřovou celu.
- Zatížit při aplikaci.
- Cigarety umístit jedním směrem, aby hořely všechny stejnou rychlostí.
- Přes tři promývačky:
 - 1. promývačka: 100 ml PBS
 - Ostatní obyčejná voda
- Mezi promývačkami: uheton (textilie).
- Na konci sériově zapojené: 2x nesterilní 1 µm filtry + 1x filtr 0,22 µm
- Vakuová pumpa



Obrázek 6: Aparatura pro aplikaci kouře

3.1.4 Zpracování vzorků po aplikaci kouře

- Vyrazit vyrážedlem kolečka 19 mm.
- Vložit do 6-jamkových panelů s agarem.
- Inkubovat ve 37 °C.

3.2 Stanovení koncentrace proteinů-BCA metoda

BCA = bicinchoninic acid assay (biochemický test pro stanovení celkové koncentrace proteinu v roztoku)

3.2.1 Princip

Jedná se o biochemický test pro stanovení celkové koncentrace proteinu v roztoku (0,5 ug / ml až 1,5 mg / ml). Celková koncentrace proteinu se projevuje změnou barvy roztoku vzorku ze zelené na fialovou v poměru ke koncentraci proteinu, která může být potom měřena pomocí kolorimetrických technik [52]. BCA test se primárně opírá o dvě reakce. Nejprve peptidové vazby v proteinu snižují ionty Cu_2^+ z měďnatého (II) sulfátu na Cu^+ (reakce je závislá na teplotě). Množství redukováného Cu_2^+ je úměrné množství bílkoviny přítomné v roztoku. Dále, dvě molekuly kyseliny bicinchoninové reagují s každým Cu^+ iontem, který tvoří purpurové zbarvené komplexu, který silně absorbuje světlo při vlnové délce 562 nm. Při vyšších teplotách (37 až 60 ° C) pomáhají peptidové vazby při tvorbě reakčního komplexu. Inkubace testu BCA při vyšších teplotách se doporučuje jako způsob, jak zvýšit citlivost testu při minimalizaci odchylek způsobených nerovnoměrným složením aminokyselin [53]. Množství proteinu přítomného v roztoku může být kvantifikováno měřením absorpčních spekter a porovnáním s roztoky bílkovin známé koncentrace.

3.2.2 Reakční směs

BCA roztok obsahuje následující složky ve vysoce zásaditém roztoku s pH 11,25: kyselina bicinchoninová, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, vinan sodný a síran měďnatý.

3.2.3 Postup

1. Do 96 jamkové průhledné destičky napipetujeme 2,5μl lyzačního pufru, který zde slouží jako blank, 2,5μl standardu (0,5μg/ml) ve stejném lyzačním pufru jako vzorky a 2,5μl vzorku.
2. Smícháme roztoky A:B = 50:1.
3. Přidáme do každé jamky 100μl reakční směsi.
4. Zavřeme víčkem a necháme promíchat 30 s na třepačce.
5. Vložíme do inkubátoru na 30 min při 37°C.
6. Necháme vychladnout 5 min.
7. Změříme absorbanci při 562 nm.

3.2.4 Výpočet

Od hodnot standardů i vzorků odečteme blank. Vytvoříme kalibrační křivku a spočítáme koncentraci vzorků.

3.3 Kvantitativní analýza genové exprese-PCR

PCR = Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce, při které dochází k rychlému zmnožení úseku DNA na základě replikace nukleových kyselin)

3.3.1 Princip

PCR je založena na detekci fluorescenčního signálu získávaného z množící se (amplifikované) cDNA (templátu). Obecně lze říci, že čím více cílové sekvence je v cDNA, tím vyšší hodnota fluorescenčního signálu je získána. Reakce se obvykle provádí v objemu 10-200μl v malých reakčních zkumavkách (objemy 0,2 až 0,5 ml) v termocyklu. Tepelný cyklus ohřívá a ochlazuje reakční zkumavky pro dosažení požadovaných teplot v každém kroku reakce.

3.3.2 Postup

1. Homogenizujeme epidermis i dermis na namražených blocích v kuličkovém homogenizátoru 10 min, poté skladujeme při -20°C.
2. Do 24 jamkové destičky přidáme 1ml MMT 0,5mg/ml v médiu.
3. Inkubace 3 h při 37 °C ve tmě, následuje heat separation.
4. Epidermis a dermis přendáme do ependorfeek na homogenizaci a přidáme 1 ml destilované vody + nastříháme.
5. Vložíme kuličky a 10 min homogenizujeme.
6. Stočíme 10 min na maximální otáčky.

7. Pipetou odsajeme veškerý supernatant.
8. Necháme sušit otevřené ependorfky přes noc, ve tmě a při pokojové teplotě.
9. Po úplném vysušení odvážit do nových 1,5 ml ependorfech a zapsat váhu.
10. Přidáme 1 ml solubilizačního roztoku.
11. Minimálně 2 hodiny (nebo přes noc) necháme ve třepačce, při pokojové teplotě, zabalené do alobalu (kvůli citlivosti MTT na světlo).
12. Stočit na maximální otáčky, 10 min.
13. Supernatant přepipetovat po 100 μ l do 96 jamkového panelu v triplikátech + blank (=solubilizační roztok).
14. Změřit absorbanci při 570 nm a 690 nm.

3.3.3 Výpočet

Odečteme výsledky absorbance při 690 nm od absorbance při 570 nm. Výsledky viability přepočítáme na váhu vzorku.

3.4 Stanovení peroxidace lipidů-TBARS

TBARS = Thiobarbituric acid reactive substances (reaktivní druhy thiobarbiturové kyseliny se tvoří jako vedlejší produkt peroxidace lipidů, testem je lze detekovat za použití kyseliny barbiturové jako činidla)

3.4.1 Princip

Vzhledem k tomu, že reaktivní druhy kyslíku (ROS) mají extrémně krátké poločasy, je obtížné měřit přímo. Peroxidaci lipidů můžeme zaznamenat měřením ztráty nenasycených mastných kyselin, tvorby primárních produktů peroxidace nebo tvorby sekundárních degradačních produktů (např. malondialdehyd – MDA). Produkty lipidové peroxidace můžeme snadno měřit pomocí spektrofotometrické metody využívající TBA (1,2-thiobarbituric acid reactive substances). Dvě molekuly 1,2-thiobarbiturové kyseliny (TBA) reagují s jednou molekulou MDA za vzniku červeného MDA-TBA komplexu s absorpčním maximem 532 nm. Tato reakce probíhá za nízkého pH a při vysokých teplotách.

Roztoky: 15% kyselina trichloroctová (TCA), 0,67% kyselina 1,2-thiobarbiturová (TBA)

3.4.2 Postup

1. Změříme koncentraci proteinů v buněčných lyzátech.
2. Naředíme vzorky na stejnou koncentraci.
3. Do 1,5 ml ependorfech odměříme 200 μ l vzorku.
4. Přidáme 160 μ l 15% TCA a 320 μ l 0,67% TBA.
5. Vortex
6. Necháme 20 min při 95 °C v termobloku s otevřenými víčky.
7. Zchladíme na ledu.
8. Centrifugace 10 min na maximální otáčky (14 000 rpm) při 4 °C.

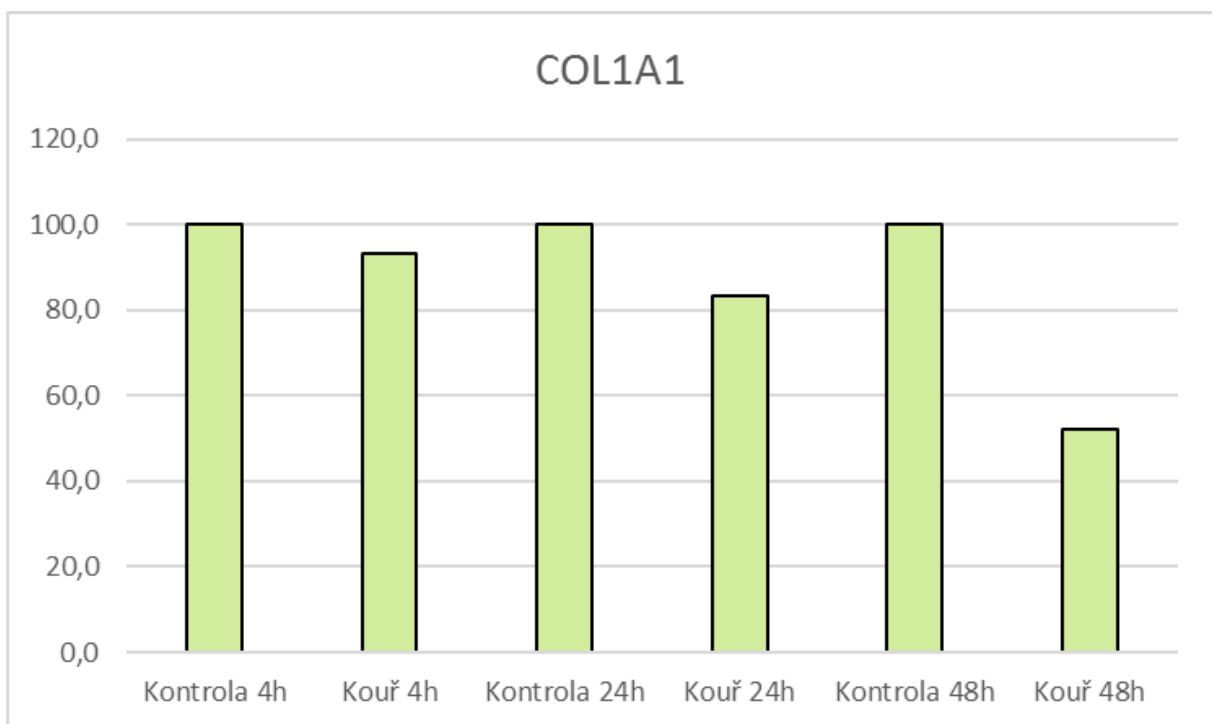
9. Do čistého 96 jamkového panelu přeneseme 100 µl supernatantu.
10. Změříme absorbanci při 532 nm nebo fluorescenci při Ex/Em = 532/553.

4 VÝSLEDKY

4.1 PCR

4.1.1 COL1A1 Dermis

Expresa kolagenu se po aplikaci kouře výrazně snížila a to i v závislosti na době inkubace, po kterou působil kouř na kůži. Po 30 minutách od aplikace kouře se zvýšilo množství kolagenu na 175,1 %, po čtyřech hodinách se jeho exprese snížila na 93,1 %, po 24 hodinách se se snížila na 83,4 % a po 48 hodinách na 52,2 %.



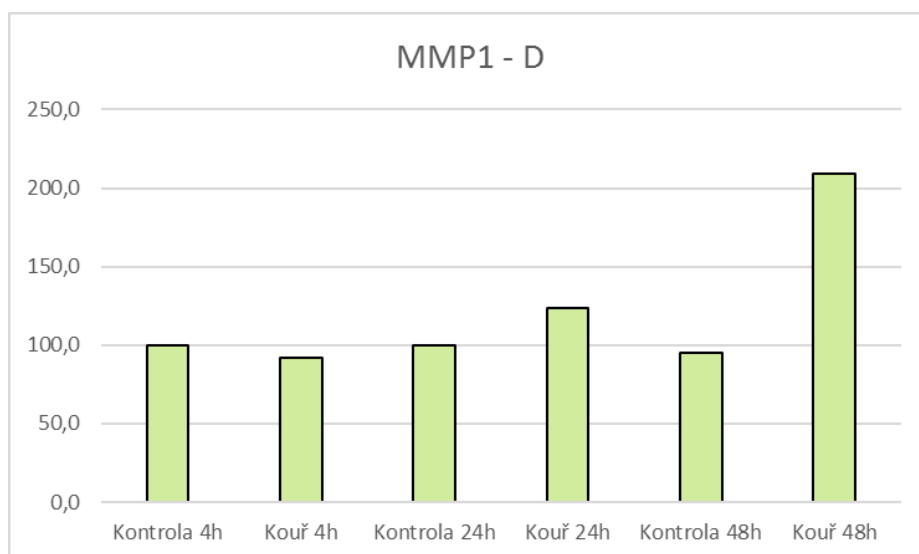
Graf 1: Expresa COL1A1

	Ex vivo 01	Ex vivo 02	Ex vivo 03	Ex vivo 04	Ex vivo 05	Ex vivo 06	Ex vivo 12	Průměr	SEM
Ko 4 h	0,90	1,03	0,98	1,03	0,99	0,86	0,53	100,0	3,63
	1,10	0,97	1,02	0,97	1,01	0,83	0,52		
				0,82	0,94	1,29	1,56		
				1,18	1,06	1,24	1,16		
				1,02	0,96	0,91	1,04		
				0,98	1,04	0,87	1,21		
Kouř 4 h	0,18	1,04	1,16	0,35	0,96	1,10	0,83	93,1	8,36
	0,17	0,97	1,20	0,35	0,96	1,07	0,92		
				0,43	0,69	1,44	1,76		
				0,32	0,72	1,32	1,88		
				1,50	0,81	1,34	0,44		
				1,49	0,89	1,21	0,46		
Ko 24 h	0,98	1,01	0,95	1,04	0,99	0,36	1,15	100,0	6,27
	1,02	0,99	1,05	0,96	1,01	0,45	1,08		
				0,84	1,00	0,69	0,68		
				1,16	1,00	0,63	0,64		
				1,03	0,97	2,30	1,19		
				0,97	1,03	1,57	1,27		
Kouř 24 h	0,60	1,26			1,25	0,46	0,87	83,4	9,01
	0,58	1,18			1,31	0,40	0,94		
				0,17	1,64	0,37	0,80		
				0,16	1,44	0,36	0,93		
				0,80	0,45	1,65	0,59		
				0,73	0,52	1,65	0,55		
Ko 48 h			1,09	1,00	0,98	0,02	2,42	100,00	15,44
			0,91	1,00	1,02		2,25		
					1,02	2,32	0,28		
					0,98	2,50	0,23		
				0,97	1,03	0,09	0,45		
				1,03	0,97	0,07	0,38		
Kouř 48 h			0,53	0,49	1,18	0,85	0,40	52,19	8,12
			0,52	0,61	1,14	0,78	0,37		
				1,50	0,58	0,08	0,14		
				1,49	0,56	0,04	0,16		
				0,31	0,42	0,05	0,31		
				0,34	0,38	0,04	0,30		

Tabulka 1: Expres COL1A1

4.1.2 MMP-1 Dermis

Expres genu MMP-1 nebyla po 30 minutách detekována, po 4 hodinách se jeho hladina snížila na 92 % kontrolní hodnoty, po 24 hodinách se zvýšila na 123,6 % a po 48 hodinách se zvýšila na 209,16 % ve vzorku ovlivněném kouřem a v kontrolním vzorku se snížila na 94,89 %.



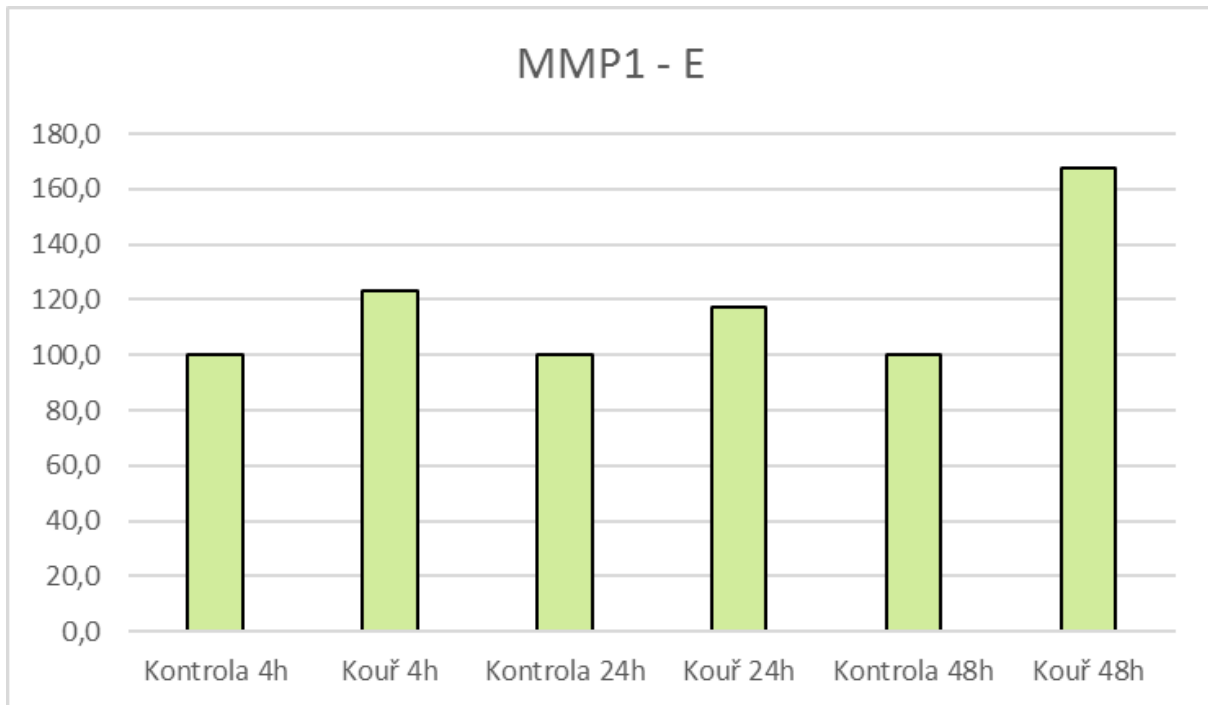
Graf 5: Expressé MMP-1 v dermis

	Ex vivo 01	Ex vivo 02	Ex vivo 03	Ex vivo 04	Ex vivo 05	Ex vivo 06	Ex vivo 12	Průměr	SEM
Ko 4 h	0,80	0,79	1,04	1,05	0,91	0,86	0,16	100,0	7,77
	1,20	1,21	0,96	0,95	1,09	0,83	0,19		
				0,95	1,05	1,29	0,62		
				1,05	0,95	1,24	0,55		
				0,96	1,01	0,91	2,10		
Kouř 4 h	1,00	2,42	1,97	2,53	0,06	1,10	0,11	92,0	14,11
	0,59	1,87	2,03	2,38	0,06	1,07	0,00		
				0,56	0,16	1,44	0,63		
				0,53	0,10	1,32	0,73		
				0,36	0,55	1,34	0,38		
Ko 24 h	0,87	1,04	0,86	1,09	0,91	0,36	1,46	100,0	6,85
	1,13	0,96	1,14	0,91	1,09	0,45	1,38		
				1,00	1,08	0,69	0,47		
				1,00	0,92	0,63	0,49		
				1,06	1,09	2,30	1,24		
Kouř 24 h	4,38	0,29	6,35	0,45	0,86	0,46	0,20	123,6	30,53
	3,75	0,25	6,17	0,43	1,03	0,40	0,20		
				0,92	1,03	0,37	0,26		
				0,91	0,82	0,36	0,24		
				1,25	0,33	1,65	0,25		
Ko 48 h			1,05	1,06	0,97	0,02	0,82	94,89	12,49
			0,95	0,94	1,03		0,56		
					1,02	2,32	1,23		
					0,98	2,50	1,46		
				0,96	1,09	0,09	0,36		
Kouř 48 h			1,80			0,85	0,34	209,16	98,06
			2,23			0,78	0,14		
					0,89	0,08	0,14		
					1,13	0,04	0,18		
				0,54	3,33	0,05	7,88		
			0,50	1,81	0,04	19,08			

Tabulka 2: Expressé MMP-1 v dermis

4.1.3 MMP-1 Epidermis

Po 4 hodinách se exprese zvýšila na 123 %, po 24 hodinách se oproti expresi po 4 h snížila, ale vůči kontrole se zvýšila na 117,4 % a po 48 hodinách se zvýšila na 167,7 %.



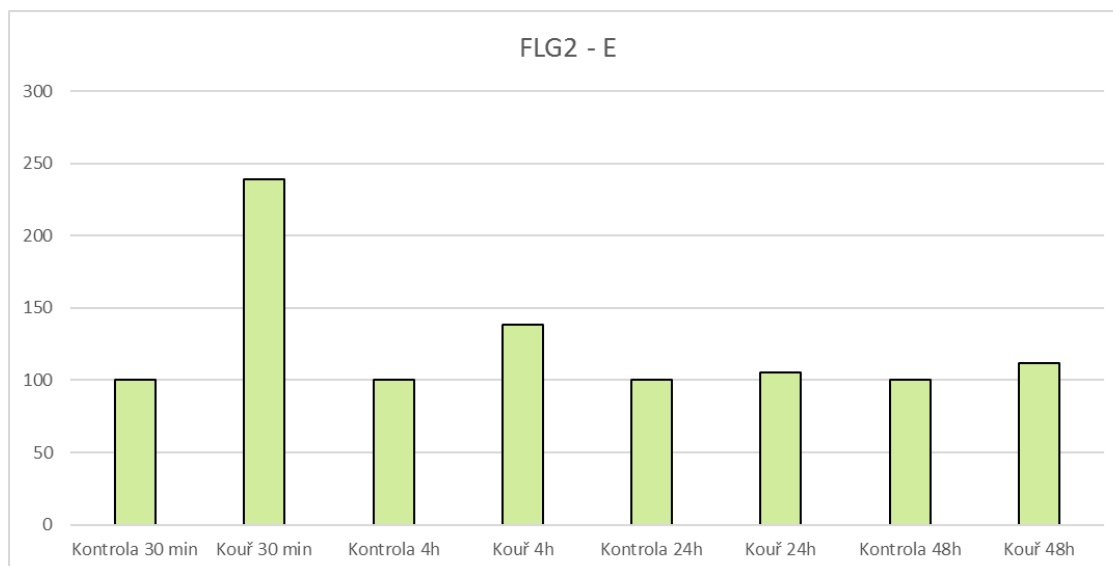
Graf 10: Expresie MMP-1 v epidermis

	Ex vivo 01	Ex vivo 02	Ex vivo 03	Ex vivo 04	Ex vivo 05	Ex vivo 06	Ex vivo 12	Průměr	SEM
Ko 4 h	0,86	0,93	1,00	0,99	1,18	2,10	0,24	100,0	10,64
	1,14	1,07	1,00	1,01	0,82	2,19	0,21		
					1,03	0,86	0,61		
					0,97	0,33	0,61		
				0,92	1,02	0,23	2,07		
				1,08	0,98	0,29	2,25		
Kouř 4 h	4,96	0,42		0,26	1,14	0,06	0,51	123,0	26,50
	3,23	0,41		0,25	1,38	0,08	0,62		
					0,10	1,37	1,00		
					0,12	1,30	0,95		
				4,12	0,85	0,21	1,84		
				3,73	0,80	0,17	2,11		
Ko 24 h	0,79	0,72	0,91	0,98	0,96	1,42	0,33	100,0	9,48
	1,21	1,28	1,09	1,02	1,04	1,79	0,44		
				0,97	1,06	0,39	0,36		
				1,03	0,94	0,39	0,32		
				1,04	0,99		2,12		
				0,96	1,01		2,44		
Kouř 24 h	5,18	0,54	0,21	0,69	1,57	0,29	0,67	117,4	28,75
	5,87	0,33	0,23	0,71	1,37	0,32	0,68		
				1,44	0,54		0,26		
				1,48	0,35		0,26		
				2,22		0,43	0,67		
				2,16			0,86		
Ko 48 h			1,03	0,95	0,92	0,40	1,50	100,00	10,88
			0,97	1,05	1,08		2,21		
				1,02	1,16	0,25	1,09		
				0,98	0,84	0,30	1,06		
				0,95	1,11	2,17	0,07		
				1,05	0,89	1,88	0,07		
Kouř 48 h			0,74	0,48	0,56	8,17	0,03	167,71	41,81
			0,89	0,41	0,75	5,16	0,03		
				5,03	1,61	0,19	0,08		
				5,40	1,46	0,28	0,08		
				3,59	1,80	0,09	0,83		
				3,31	1,74	0,06	0,84		

Tabulka 3: Expresí MMP-1 v epidermis

4.1.4 FLG2 Epidermis

Po třiceti minutách zvýšil FLG2 svou expresi na 238,7 %, po 4 hodinách na 138,4 %, po 24 hodinách na 105,4 % a po 48 hodinách na 111,8 %.



Graf 11: Exprese FLG2

	Ex vivo 01	Ex vivo 02	Ex vivo 03	Ex vivo 04	Ex vivo 05	Ex vivo 06	Ex vivo 12	Průměr	SEM
Ko 30 min	0,26 1,74	0,99 1,01						100,0	30,41
Kouř 30 min		2,50 2,27						238,7	11,45
Ko 4 h	1,03 0,97	1,07 0,93	0,84 1,16	1,22 0,78	1,07 0,93	2,10 2,19	1,93 1,78	100,0	9,95
				1,02 0,98	1,06 0,94	0,23 0,29	0,46 0,23		
Kouř 4 h	2,50 2,01	1,28 1,30	4,17 4,55	5,41 3,37	0,00 0,46	0,06 0,08	0,70 0,60	138,4	28,30
				0,98 0,89	1,37 1,30	0,63 0,61			
				2,78 2,56	0,001 0,001	0,21 0,17	0,35 0,39		
Ko 24 h	1,02 0,98	1,10 0,90	0,94 1,06	1,15 0,85	1,00 1,00	1,42 1,79	1,64 1,60	100,0	6,37
				1,10 0,90	1,10 0,90	0,39 0,39	0,37 0,51		
				1,04 0,96	1,01 0,99		0,93 0,96		
Kouř 24 h	2,75 2,18	1,93 1,85	1,25 1,06	0,25 0,15	1,60 2,28	0,29 0,32	0,20 0,18	105,4	19,36
				0,49 0,51 0,17 0,15	0,34 0,29		2,47 3,33 1,19 0,66		
Ko 48 h			1,04 0,96	1,21 0,79	1,10 0,90	0,40 0,25	0,60 0,67	100,00	9,66
				1,09 0,91 1,12 0,88	1,14 0,86 1,03 0,97	0,25 0,30 2,17 1,88	0,55 0,61 1,75 1,82		
Kouř 48 h				1,60 1,40 0,46 0,60 1,53 1,62	0,96 0,96 0,09 0,12 0,02 0,07	8,17 5,16 0,19 0,28 0,09 0,06	0,28 0,31 0,37 0,38 1,19 0,94	111,80	37,62

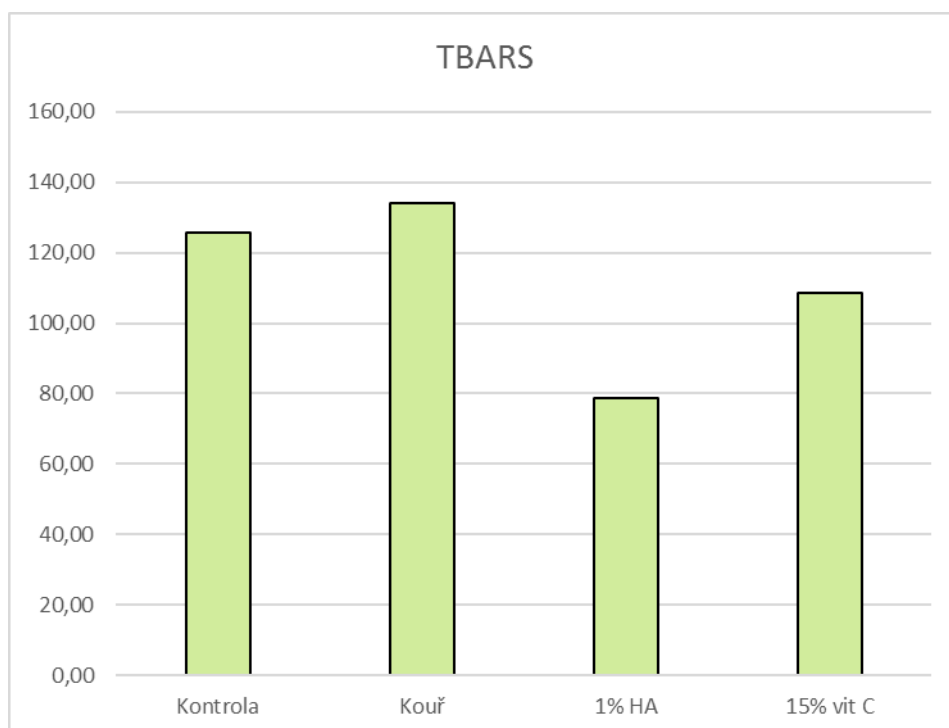
Tabulka 4: Exprese FLG2

4.2 TBARS

Množství peroxidovaných lipidů v kontrolním vzorku bylo 125,62. Ve vzorku, na který působil kouř se hodnota zvýšila na 134,23. Vzorek s aplikovanou kyselinou hyaluronovou měl 78,82 a s aplikovaným vitamínem C 108,63.

	Ex vivo 07	Ex vivo 08	Ex vivo 09	Ex vivo 10	Ex vivo 11	Ex vivo 13	Průměr	SEM
kontrola	103,45	101,75	271,00				125,62	19,82
	72,93	159,54	106,64					
	123,63	98,25	93,36					
Kouř	185,20	218,94	137,89				134,23	13,56
	116,09	115,55	107,84					
	114,42	99,00	113,17					
1% HA	149,35	58,22	67,99	87,51	120,75	69,31	78,82	8,76
				65,73	56,54	49,43		
				100,27	63,80	56,99		
15%vit C	305,56	164,56	55,31	84,05	99,14	56,72	108,63	19,79
				74,46	116,41	75,78		
				101,81	90,26	79,54		

Tabulka 5: Peroxidace lipidů



Graf 12: Peroxidace lipidů

5 ZÁVĚR

Pomocí metody PCR se nám podařilo zjistit, že gen MMP-1 svou expresí po aplikaci kouře zvyšuje v závislosti na době, po kterou necháme kůži s kouřem inkubovat a to jak v epidermis, tak v dermis. Dokázali jsme, že vlivem kouře dokáže svoji expresí po určité době až zdvojnásobit. Gen COL1A1 oproti genu MMP-1 svou hladinu v závislosti na délce inkubace snižuje. Tímto byla potvrzena hypotéza, že metaloproteázy snižují množství kolagenu v buňkách pleti. Zároveň jsme tím optimalizovali metodu pro výzkum exprese těchto genů po působení kouře na pleť.

Metodou TBARS jsme došli k závěru, že lépe proti vlivu kouře na pleť působí kyselina hyaluronová, která snižuje množství peroxidovaných lipidů o 41,3 % oproti vzorku bez aplikované kosmetické suroviny. Vitamín C snižuje tuto hodnotu o 19,1 %.

Do budoucího výzkumu bych zařadila více kosmetických surovin, které by potvrdili, že veškeré látky, které tvoří bariéru na pleti, působí proti vlivu prostředí lépe než antioxidanty. Dále bych zařadila do testů PCR analýzu vzorků s aplikovanými kosmetickými surovinami, abychom zjistili, jak dané látky působí na expresi genů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VALACCHI G., STICOZZI C., PECORELLI A., CERVELLATI F., CERVELLATI C., MAIOLI E.: Cutaneous responses to environmental stressors. *Ann. N.Y. Acad.* 2012. [cit. 2018-03-20]
- [2] BAUDOUIN C., CHARVERON M., TARROUX R., GALL Y.: Environmental pollutants and skin cancer. *Cell Biol. Toxicol.* 2002. [cit. 2018-03-20]
- [3] KAMPA M., CASTANAS E.: Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* 151, 362–367. 2008. [cit. 2018-03-20]
- [4] KATSOUYANNI K.: Ambient air pollution and health. *Br. Med. Bull.* 68, 143–156. 2003. [cit. 2018-03-20]
- [5] PURI P., NANDAR S.K., KATHURIA S., RAMESH V.: Effects of air pollution on the skin: A review. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 83:415-423. 2017. [cit. 2018-03-20]
- [6] KRUTMANN J., LIU W., LI L., PAN X., CRAWFORD M., SORE G., SEITE S.: Pollution and skin: From epidemiological and mechanistic studies to clinical implications, *J Dermatol Sci.* 76:163-168. 2014. [cit. 2018-03-20]
- [7] MORITA A., TORII K., MAEDA A., YAMAGUCHI Y.: Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging, *The Society for Investigative Dermatology.* 2009. [cit. 2018-03-20]
- [8] LECAS S., BOURSIER E., FITOUSSI R., VIE K., MOMAS I., SETA N.: Achard *Sin vitro* model adapted to the study of skin ageing induced by air pollution, *Toxicology Letters.* 259:60-68. 2016. [cit. 2018-03-20]
- [9] RINNERTHALER M., BISCHOF J., STREUBEL M.K., TROST A., RICHTER K.: Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules.* 5:545-589. 2015. [cit. 2018-03-20]
- [10] SCHICK S.F., FARRARO K.F., PERRINO C., SLEIMAN M., VAN DE VOSSENBERG G., TRINH M.P., HAMMOND S.K., JENKINS B.M., BALMES J.: Thirdhand cigarette smoke in an experimental chamber: evidence of surface deposition of nicotine, nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons and de novo formation of NNK. *Tob. Control.* 23:152-159. 2014. [cit. 2018-03-20]
- [11] DUBE M.F., GREEN C.R.: Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv. Tobacco Sci.* 8, 42–102. 1982. [cit. 2018-03-20]
- [12] GOTTIPATI K.R., POULSEN H., STARCHER B.: Passive cigarette smoke exposure inhibits ultraviolet light B-induced skin tumors in SKH-1 hairless mice by blocking the nuclear

factor kappa B signalling pathway. *Exp. Dermatol.* 17, 780–787. 2008. [cit. 2018-03-20]

[13] PRYOR W.A., DOOLEY M.M., CHURCH D.F.: Inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 676–681. 1984. [cit. 2018-03-20]

[14] JORGENSEN L.N.K., KALLEHAVE F., CHRISTENSEN E., SIANA J.E., GOTTRUP F.: Less collagen production in smokers. *Surgery* 123, 450–455. 1988. [cit. 2018-03-20]

[15] YIN L., MORITA A., TSUJI T.: Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 188–194. 2000. [cit. 2018-03-20]

[16] SOLLY S.: Clinical lectures on paralysis. *Lancet* 68, 641–643. 1856. [cit. 2018-03-20]

[17] FREIMAN A., BIRD G., METELITSA A.I., BARANKIN B., LAUZON G.J.: Cutaneous effects of smoking. *J. Cutan. Med. Surg.* 8, 415–423. 2004. [cit. 2018-03-20]

[18] O'HARE P.M., FLEISCHER A.B. JR., D'AGOSTINO R.B. JR., FELDMAN S.R., HINDS M.A., RASSETTE S.A., et al.: Tobacco smoking contributes little to facial wrinkling. *J. Bur. Acad. Dermatol. Venereol.* 122, 133–139. 1999. [cit. 2018-03-20]

[19] KADUNCE D.P., BURR R., GRESS R., KANNER R., LYON J.L., ZONE J.J.: Cigarette smoking: risk factor for premature facial wrinkling. *Ann. Intern. Med.* 114, 840–844. 1991. [cit. 2018-03-20]

[20] MILLS C.M., SRIVASTAVA E.D., HARVEY I.M., SWIFT G.L., NEWCOMBE R.G., HOLT P.J.A., et al.: Smoking habits in psoriasis: a case control study. *Br. J. Dermatol.* 271, 18–21. 1992. [cit. 2018-03-20]

[21] GUPTA M.A., GUPTA A.K., WATTEEL G.N.: Cigarette smoking in men may be a risk factor for increased severity of psoriasis of the extremities. *Br. J. Dermatol.* 135, 859–860. 1996. [cit. 2018-03-20]

[22] NALDI L., PELI L., PARAZZINI F.: Association of early stage psoriasis with smoking and male alcohol consumption: evidence from an Italian case-control study. *Arch. Dermatol.* 135, 1479–1484. 1999. [cit. 2018-03-20]

[23] ARMSTRONG A.W., ARMSTRONG E.J., FULLER E.N., SOCKOLOV M.E., VOYLES S.V.: Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms. *Br. J. Dermatol.* 165, 1162–1168. 2011. [cit. 2018-03-20]

[24] ARMSTRONG A.W., HARSKAMP C.T., DHILLON J.S., ARMSTRONG E.J.: Psoriasis and smoking: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 170, 304–314. 2014. [cit. 2018-03-20]

- [25] ISIK B., CEYLAN A., ISIK R.: Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhal. Toxicol.* 19, 767–769. 2007. [cit. 2018-03-20]
- [26] SCHÄFER T., NIENHAUS A., VIELUF D., BERGER J., RING J.: Epidemiology of acne in the general population: the risk of smoking. *Br. J. Dermatol.* 145, 100–104. 2001. [cit. 2018-03-20]
- [27] DRÁČ P., KLEIN J., TICHÝ T., KOLEK V., ŠKARDA J.: Prognostický význam matrix metaloproteáz 2,9 a 11 ve stromálních buňkách I. stadia nemalobuněčného karcinomu plic. *Čas. Lék. Čes.* 146: 45-47. 2007. [cit. 2018-03-20]
- [28] HUANG S.F., LI Y.H., REN Y.J., CAO Z.G., LONG X.: The effect of a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter on force-induced MMP-1 expression in human periodontal ligament cells. *Eur. J. Oral Sci.* 116 (4): 319–23. 2008. [cit. 2018-03-20]
- [29] RUMBAUGH J., TURCHAN-CHOLEWO J., GALEY D., ST HILLAIRE C., ANDERSON C., CONANT K., NATH A.: Interaction of HIV Tat and matrix metalloproteinase in HIV neuropathogenesis: a new host defense mechanism. [online]. 2006. [cit. 2018-03-20]. Dostupný z World Wide Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=16807369>
- [30] DEVARAJAN P., JOHNSTON J.J., GINSBERG S.S., VAN WART H.E., BERLINER N.: Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *J. Biol. Chem.* 1992. [cit. 2018-03-20]
- [31] MARTIGNETTI J.A., AQEEL A.A., SEWAIRI W.A., BOUMAH C.E., KAMBOURIS M., MAYOUF S.A., SHETH K.V., EID W.A., DOWLING O., HARRIS J., GLUCKSMAN M.J., BAHABRI S., MEYER B.F., DESNICK R.J.: Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet.* 2001. [cit. 2018-03-20]
- [32] SABBATINI A.R., BARBARO N.R., DE FARIA A.P., RITTER A.M.V., MODOLO R., CORREA N.B., BRUNELLI V., PINHO C., FONTANA V., MORENO H.: Matrix metalloproteinase-2-735C/T polymorphism is associated with resistant hypertension in a specialized outpatient clinic in Brazil. [online]. 2017. [cit. 2018-03-20]. Dostupný z World Wide Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28390988/>
- [33] SUGA M., IYONAGA K., OKAMOTO T., GUSHIMA Y., MIYAKAWA H., AKAIKE T., ANDO M.: Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2000. [cit. 2018-03-20]
- [34] BJÖRKLUND M., KOIVUNEN E.: Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 37–69. 2005. [cit. 2018-03-20]

- [35] KOCHER M.S., SHAPIRO F.: Osteogenesis imperfecta. *J Am Acad Orthop Surg*. 1998. [cit. 2018-03-20]
- [36] GRANT S.F., REID D.M., BLAKE G., HERD R., FOGELMAN I., RALSTON S.H.: Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat. Genet*. 1996. [cit. 2018-03-20]
- [37] KUIVANIEMI H., TROMP G., PROCKOP D.J.: Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum. Mutat*. 1997. [cit. 2018-03-20]
- [38] DICK I.P., SCOTT R.C.: Pig Ear Skin as an In-vitro model for Human Skin Permeability [online]. 1992. [cit. 2018-03-20]. Dostupný z World Wide Web: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.2042-7158.1992.tb05485.x?purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER&show_checkout=1&r3_referer=wol&purchase_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&tracking_action=p_review_click
- [39] TOOLE B.P.: Hyaluronan is not just a goo! *J. Clin. Invest*. 106 (3): 335–336. 2000. [cit. 2018-03-20]
- [40] HOLMES M.W.: Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J*. 250 (2): 435–441. 1988. [cit. 2018-03-20]
- [41] STECCO C., STERN R., PORZIONATO A., MACCHI V., MASIERO S., STECCO A., DE CARO R.: Hyaluronan within fascia in the etiology of myofascial pain. *Surg Radiol Anat*. 33 (10): 891–6. 2011. [cit. 2018-03-20]
- [42] AVERBECK M., GEBHARDT C.A., VOIGT S., BEILHARZ S., ANDEREGG U., TERMEER C.C., SLEEMAN J.P., SIMON J.C.: Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J. Invest. Dermatol*. 2007. [cit. 2018-03-20]
- [43] EDWARDS P.C., FANTASIA J.E.: Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clinical interventions in aging*. 2007. [cit. 2018-03-20]
- [44] PUCKER A.D., NG S.M., NICHOLS J.J.: Over the counter (OTC) artificial tear drops for dry eye syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016. [cit. 2018-03-20]
- [45] KENNEDY J. F.: HA, Volume 2 Biomedical, Medical and Clinical Aspects. Woodhead Publishing Limited. 2002. [cit. 2018-03-20]
- [46] SHU X.Z., GHOSH K., LIU Y., PALUMBO F.S., LUO Y., CLARK R.A., PRESTWICH G.D.: Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified

injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A*. 68 (2): 365–75. 2004. [cit. 2018-03-20]

[47] INSTITUTE OF MEDICINE: Vitamin C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, D.C.: The National Academies Press. 2000. [cit. 2018-03-20]

[48] MICRONUTRIENT INFORMATION CENTER: Vitamin C. Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis, OR. 2014. [cit. 2018-03-20]

[49] ŠVÉDOVÁ Z.: Vitamín C, jeho funkce a zdroje. [online]. 2015. [cit. 2018-03-20]. Dostupný z World Wide Web: <https://www.celostnimedicina.cz/vitamin-c-jeho-funkce-a-zdroje.htm>

[50] PAULING L.: Vitamin C, the Common Cold, and the Flu. W.H. Freeman and Company. 1976. [cit. 2018-03-20]

[51] GOODWIN J.S., TANGUM M.R.: Battling quackery: attitudes about micronutrient supplements in American academic medicine. *Archives of Internal Medicine*. 1998. [cit. 2018-03-20]

[52] SMITH P.K.; et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 1985. [cit. 2018-03-20]

[53] OLSEN B.J., MARKWELL J.: Assays for the Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*: 14–17. 2007. [cit. 2018-03-20]

7 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

Obrázek 1: MMP-1.....	8
Obrázek 2: MMP-2.....	8
Obrázek 3: COL1A1	9
Obrázek 4: Kyselina hyaluronová	11
Obrázek 5: Kyselina L-askorbová.....	12
Obrázek 6: Aparatura pro aplikaci kouře	14
Graf 1: Exprese COL1A1.....	17
Graf 2: Exprese MMP-1 v dermis	19
Graf 3: Exprese MMP-1 v epidermis	20
Graf 4: Exprese FLG2	22
Graf 5: Peroxidace lipidů	23
Tabulka 1: Exprese COL1A1	18
Tabulka 2: Exprese MMP-1 v dermis	19
Tabulka 3: Exprese MMP-1 v epidermis	21
Tabulka 4: Exprese FLG2	22
Tabulka 5: Peroxidace lipidů.....	23