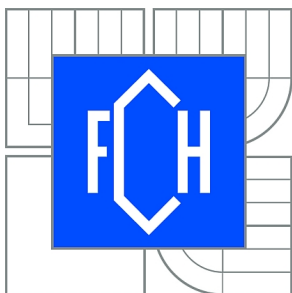


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOAKTIVNÍ PEPTIDY - NADĚJNÁ SLOŽKA KOSMETICKÝCH PRODUKTŮ.

BIOACTIVE PEPTIDES AS A COMPONENT OF ANTI-AGING COSMETICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. KATARÍNA JATZOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0593/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Mgr. Katarína Jatzová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název diplomové práce:

Bioaktivní peptidy - nadějná složka kosmetických produktů.

Zadání diplomové práce:

Práce bude řešena ve spolupráci s podnikem Contipro Group, s.r.o., Dolní Dobrouč Na Oddělení lékárenských a kosmetických aplikací budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární přehled - přehled problematiky týkající se vztahu peptidů a stárnutí kůže, zejména v oblasti epidermis a dermo-epidermálního spojení.
2. Práce s proteinovými databázemi, návrh konkrétních sekvencí peptidů s předpokládaným účinkem na podporu epidermální a dermo-epidermální integrity
3. Syntéza peptidů na pevné fázi
4. Analýza peptidických sekvencí pomocí LC/MS
5. Analýza přítomnosti endotoxinů
6. Stanovení viability buněk MTT testem a obsahu proteinů Lowryho metodou
7. Stanovení bezpečné in vitro koncentrace peptidů

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Mgr. Katarína Jatzová
Student(ka)

Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Stárnutie je prirodzenou súčasťou životného cyklu každého človeka, počas ktorého dochádza v organizme ku mnohým zmenám. Jedným z hlavných pilierov kozmetického priemyslu je vývoj aktívnych zlúčenín bojujúcich s príznakmi stárnutia kože. Za nádejné zložky *anti- ageing* výrobkov sú považované bioaktívne peptidy, predovšetkým z dôvodu možnosti presnej definície ich chemickej štruktúry a teda účinnejšieho nasmerovania biologického efektu.

Jedným z príznakov stárnucej kože je oslabenie v epidermálnych spojeniach medzi jednotlivými bunkami a extracelulárnou matrix, pokles exprese adhézných molekúl i molekulárnych zložiek dermo- epidermálnych spojení. Dominantnými adhezívnymi receptormi sú integríny, ktorých ligandami sú molekuly extracelulárnej matrix, napr. laminín alebo fibronektín. Minimálnou rozpoznávajúcou sekvenciou mnohých integrínov je aminokyselinový motív arginín- glycín- kyselina asparágová. Tento motív je veľmi zaujímavý aj z pohľadu kozmetických aplikácií, nakoľko poskytuje možnosť vytvoriť nové a účinné bioaktívne peptidy.

V predkladanej práci boli základnému bezpečnostnému testovaniu podrobené štyri peptidy s uvedeným motívom. Sekvencia troch peptidov bola pozmenená pridaním aminokyselín glycínu, príp. alanínu s predpokladaným účinkom na zlepšenie interakcie s integrínovým receptorom. Z dôvodu vylúčenia možného interferujúceho vplyvu na viabilitu buniek, bola v jednotlivých vzorkách stanovená hladina endotoxínov. Následne bola na NIH/3T3 myších fibroblastoch sledovaná viabilita MTT testom a morfológia. Na lepšiu interpretáciu získaných výsledkov bol nakoniec vo vzorkách stanovený obsah proteínov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

kozmetika, peptidy, koža, integrita, RGD, stárnutie

ABSTRACT

Ageing is a natural part of every human life cycle. During ageing there are lots of changes in the organism. One of the main pillars of the cosmetics industry is the development of active compounds that are fighting ageing signs of skin. The components as bioactive peptides are considered promising anti-ageing products, mainly because it is possible to precisely define their chemical structure and therefore achieve more effective targeting of the biological effect.

One of the signs of skin ageing is the weakening of the connections between epidermal cells and the extracellular matrix, decreasing expression of adhesion molecules and molecular components of dermo-epidermal connection. The most abundant adhesive receptors in the skin are integrins. Their ligands are extracellular matrix molecules, e. g. laminin or fibronectin. The minimal recognition sequence of integrins receptors is the amino acid motif arginine- glycine- aspartic acid. This sequence is also very interesting in terms of cosmetic applications because it provides the ability to create new and effective bioactive peptides.

The subject of present work is basic safety testing of four peptides with this basic motif. A sequence of three peptides was modified by addition of glycine amino acids, or. alanine. The expected effect was to improve interaction with integrin receptors. In each of the sample, levels of endotoxin was determined in order to exclude any possible interfering effects on the viability of cells. Subsequently, in NIH/3T3 mouse fibroblasts viability was monitored by MTT assay and morphology. The quantity of obtained protein had been determined to better interpret the results.

KEY WORDS

cosmetic, peptides, skin, integrity, RGD, ageing

JATZOVÁ, K. *Bioaktivní peptidy- nadějná složka kosmetických produktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 75 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Tomáš Muthný, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje boli správne a úplne citované. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá pre komerčné účely iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

PodĎakovanie

Moje vrúcne poďakovania patrí predovšetkým firme Contipro BIOTECH s.r.o. a rovnako aj celému Ústavu potravinárskej chémie a biotechnológie VUT Brno. Vedeniu firmy Contipro by som rada poďakovalo za to, že mi umožnilo pracovať na veľmi zaujímavej a môjmu srdcu blízkej téme a pani doc. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za jej rady a ochotu pri riešení formálnych záležitostí. Moje poďakovanie patrí aj celému oddeleniu výskumu firmy Contipro za vytvorenie príjemnej a pohodovej atmosféry nielen v laboratóriach ale aj mimo nich. Za trpezlivosť a ochotu pomôcť a poradiť v akejkoľvek situácii by som rada svoje poďakovanie vyslovila Mgr. Tomášovi Muthnému, Ph.D.

Rada by som poďakovala aj mojím spolužiakom za to, že ma priali do kolektívu a za ich ochotu a pomoc nielen počas skúškového obdobia. Obrovské ďakujem patrí aj celej mojej rodine, ktorá ma zo všetkých síl podporovala a verila mi.

Všetkým tu uvedením, ale samozrejme aj ostatným, ktorí akýmkoľvek spôsobom pomohli k tomu, aby táto práca vznikla, by som rada ešte raz vyslovila svoje ĎAKUJEM.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Koža.....	9
2.1.1 Epidermis.....	9
2.1.2 Dermo- epidermálne rozhranie	11
2.1.3 Dermis.....	12
2.1.4 Hypodermis.....	13
2.2 Stárnutie kože	13
2.2.1 Vnútorné stárnutie	14
2.2.2 Vonkajšie stárnutie	14
2.3 Bunkové spojenia v epidermálnej vrstve a dermo- epidermálnom rozhraní	16
2.4 Bunkové spojenia v dermálnej vrstve.....	18
2.4.1 Integríny.....	18
2.4.2 Extracelulárna matrix.....	20
2.4.2.1 Vláknité proteíny	20
2.4.2.1.1 Kolagén.....	20
2.4.2.1.2 Elastín	21
2.4.2.2 Multiadhezívne molekuly	21
2.4.2.2.1 Laminín.....	21
2.4.2.2.2 Fibronektín.....	22
2.4.2.3 Glykozaminoglykany a proteoglykany	23
2.5 Bioaktívne peptidy	24
2.5.1 Peptidy a kozmetika.....	25
2.5.1.1 Signálne peptidy	26
2.5.1.2 Neuropeptidy	27
2.5.1.3 Prenášačové (<i>carrier</i>) peptidy	28
2.5.1.4 Peptidy ako inhibítory enzýmov	28
2.6 Výber konkrétnych peptidických sekvencií	29
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	30
3.1 Chemikálie.....	30
3.2 Bunkové kultúry	31
3.3 Média.....	31

3.4 Základné roztoky	31
3.5 Spotrebný materiál.....	32
3.6 Prístrojové vybavenie	33
3.7 Metódy.....	33
3.7.1 Kultivácia NIH/3T3 myších fibroblastov	33
3.7.2 Pasážovanie NIH/3T3 myších fibroblastov	34
3.7.3 Počítanie buniek v Bürkerovej komôrke	35
3.7.4 Stanovenie endotoxínov LAL testom	37
3.7.5 Odstraňovanie endotoxínov kolónkami	42
3.7.6 Meranie viability buniek MTT metódou	43
3.7.7 Stanovenie obsahu proteínov	44
4 VÝSLEDKY	47
4.1 Charakterizácia peptidov	47
4.2 Stanovenie obsahu endotoxínov vo vzorkách peptidov	47
4.3 Určenie optimálnej testovacej koncentrácie peptidov	48
4.4 Sledovanie viability NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi.....	49
4.5 Sledovanie vplyvu zníženia nasadzovacej hustoty na rast NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi	51
4.6 Zhodnotenie morfológie buniek ovplyvnených peptidmi	52
4.7 Sledovanie vplyvu jednotlivých peptidov na akumuláciu proteínov v bunkovej kultúre NIH/3T3 myších fibroblastov.....	54
5 DISKUSIA.....	56
5.1 Vplyv koncentrácie endotoxínov na viabilitu fibroblastov	56
5.2 Stanovenie bezpečnej koncentrácie peptidov	57
5.4 RGD peptidy a kozmetika	58
6 ZÁVER.....	61
7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	62
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	70
9 ZOZNAM PRÍLOH	72
Príloha A: Fotodokumentácia k použitým metódam.....	72
Príloha B: Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov nasadzovaných v hustote 90 000 buniek/ 9,6 cm ²	73
Príloha C: Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov nasadzovaných v hustote 45 000 buniek/ 9,6 cm ²	73

1 ÚVOD

Na poli prípravkov v starostlivosti o pleť majú svoje neodmysliteľné miesto *anti-aging* výrobky. Existuje široká škála aktívnych látok na prírodnej aj syntetickej báze. Za nádejnú zložku sú považované syntetické peptidy, ktoré sú populárne v kozmetike.

Stárnutie kože je fyziologický proces, ktorého štúdiom sa zaoberá veľa laboratórií po celom svete už niekoľko desaťročí. Viditeľnými prejavmi stárnutia je objavenie sa vrások, zmeny v hydratácii, textúre, mastnosti, elasticite a farbe kože spôsobené zmenami v *in vitro* mechanizmoch (menovite v oxidačnom či energetickom metabolizme, epidermálnych a dermálnych mechanizmoch, komunikácii, imunite, pigmentácii). Perspektívnym smerom vo vývoji nových aktívnych zlúčenín bojujúcich s príznakmi stárnutia kože je aj podpora jej integrity.

Literárny prehľad predkladanej práce je teda orientovaný okrem problematiky stárnutia kože aj na bunkové spojenia v jednotlivých vrstvách kože a samozrejme poskytuje zhrnutie poznatkov o kozmeticky aktívnych peptidoch. Podrobnejšie sú v ňom opísané aj receptory integríny, ktoré sú zodpovedné za bunkovú signalizáciu a adhéziu v koži. Nakoľko hlavnými ligandami týchto receptorov sú molekuly extracelulárnej matrix dermis, napr. fibronektín či vitronektín, je jedna kapitola venovaná aj dermálnej vrstve. Niektoré integrínové receptory interagujú s molekulami extracelulárnej matrix obsahujúcimi minimálny rozpoznávací motív zložený z aminokyselín arginín- glycín- kyselina asparágová (v jednopísmenkovom kóde RGD). Vysoká selektivita tejto troj- aminokyselinovej sekvencie ju predurčuje ako potenciálneho kandidáta na vytvorenie kozmeticky aktívnych peptidov.

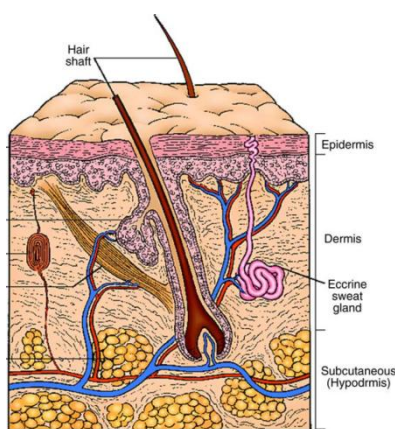
Experimentálna časť práce je venovaná základnému bezpečnostnému testovaniu štyroch peptidov so spomínanou aminokyselinovou sekvenciou RGD. Konkrétne jedného peptidu RGD a ďalších troch modifikovaných peptidov. Uvedené modifikácie boli vytvorené pridávaním glycínov, príp. alanínov na N- koniec základného RGD peptidu alebo nahradením hydroxylovej skupiny karboxylu amidom. Na začiatku biologického testovania bola v jednotlivých vzorkách sledovaná hladina endotoxínov. Stanovenie konkrétneho množstva endotoxínov v peptidoch je esenciálnou informáciou. Je totiž známe, že prítomnosť endotoxínov môže ovplyvniť akékoľvek testovanie biologickej aktivity. Za najvhodnejšiu bunkovú kultúru boli zvolené NIH/3T3 myšie fibroblasty, nakoľko tieto obsahujú na svojom povrchu integrínové receptory rozpoznávajúce skúmanú RGD sekvenciu. Samotné testovanie bolo zložené zo sledovania viability MTT testom a zhodnotením morfológie buniek po ovplyvnení jednotlivými peptidmi. Na lepšiu interpretáciu výsledkov bol v jednotlivých vzorkách paralelne s MTT testom stanovovaný aj obsah proteínov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Koža

Koža je najväčším orgánom človeka. S prihliadnutím na individuálnu telesnú výšku a hmotnosť činí jej plocha 1,5 – 2 m². Hmotnosť kože sa pohybuje v rozmedzí 3,5 – 10 kg, čo je približne 16 % telesnej hmotnosti človeka.

Koža je zložená z troch hlavných vrstiev: epidermis, dermis a hypodermis (Obr. 1). Nielen z pohľadu funkcie je dôležitá oblasť medzi epidermálnou a dermálnou vrstvou, ktorá sa nazýva dermo- epidermálne rozhranie.



Obr. 1 Štruktúra normálnej kože znázorňujúca vrstvy epidermis, dermis a hypodermis [1].

Koža produkuje niekoľko špecializovaných štruktúr nazývaných kožné doplnky alebo adnexe (vlasové folikuly, potné žľazy, mazové žľazy, apokriné žľazy). Každá vrstva je charakteristická odlišným typom buniek, obsahuje heterogénne extracelulárne zložky [2] a plní inú funkciu.

Koža je zároveň cieľovým orgánom kozmetickej starostlivosti a zaoberá sa ňou kozmetológia. Kozmetológia je veda, ktorá sa orientuje na vývoj nových kozmetických výrobkov. Rovnako sa venuje aj skúmaniu ich funkčných vlastností a dôsledkov ich pôsobenia na zdravú kožu ľudského organizmu v snahe ju chrániť, spomaliť príznaky stárnutia či ju skrášliť [3]. Jej primárny záujem je teda odlišný od kožného lekárstva, dermatológie. Dermatológia totiž študuje chorobné zmeny na koži vyvolané v dôsledku rôznych vonkajších či vnútorných príčin a venuje sa ich liečbe, príp. prevencii [4].

2.1.1 Epidermis

Epidermis je najvrchnejšia vrstva kože a je hrubá približne 50 µm². Je zložená zo štyroch hlavných typov buniek (Obr. 2). Niekoľko vrstiev diferencovaných keratinocytov zaberá viac

ako 90 až 95 % epidermis. Keratinocyty cytoskeleton je zložený z intermediálnych filamentov (keratínov), mikrofilamentov (aktínu a s ním asociovaných proteínov) a mikrotubúl (tubulín). Dominantnými cytoskeletárnymi cytoplazmatickými molekulami sú keratíny (od nich odvodený názov keratinocyty). Keratíny sa delia do dvoch rodín (typ I a typ II), ktoré sa odlišujú sekvenciou aminokyselín aj biochemickými vlastnosťami. Sú exprimované v epitelových tkanivách v pároch zložených vždy z jedného keratínu typu I a druhého typu II [5] [6] v závislosti na type buniek a štádiu diferenciácie. Vytvárajú 3D sieť filamentov, ktorá prechádza od jadra až k bunkovej periférii. Sú esenciálne z pohľadu udržania tvaru a bunkovej viability. V prípade absencie vhodného partnera na vytvorenie páru sú keratíny vysoko nestabilné a náchylné na proteolytickú degradáciu [7].

S keratinocyty interaguje ďalší typ buniek, melanocyty. Melanocyty sú pigment melanín produkujúce bunky, ktoré zohrávajú hlavnú úlohu v ochrane kože pred nebezpečným ultrafialovým žiarením. Tretím typom buniek sú Langerhansove bunky. Langerhansove bunky sú tkanivové antigén produkujúce bunky a sú súčasťou imunitného systému. Posledným typom buniek sú oválne senzorické Merkelove bunky [8].

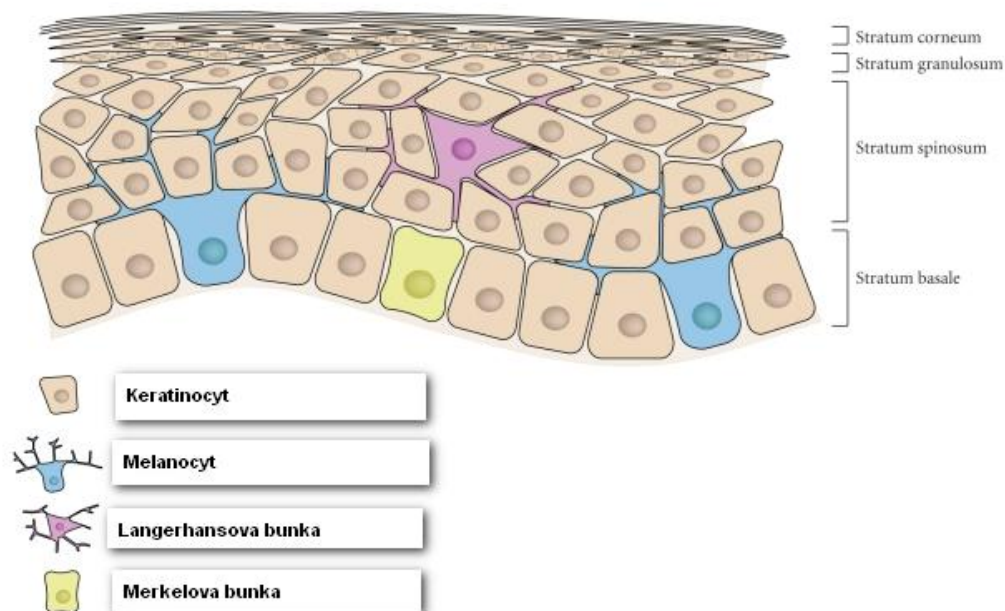
Epidermálna vrstva je príkladom keratinizovanej alebo zrohovatelej vrstvy. Podlieha procesu terminálnej diferenciácie (keratinizácie). Výsledkom tohto procesu je vznik zrohovateľných (mŕtvych) buniek vyplnených keratínmi bez jadier a ostatných organel. Okolie každej zrohovatelej bunky tvorí zrohovateľná obálka zložená zo vzájomne prepojených proteínov a lipidov, ktorá nahrádza plazmatickú membránu a tvorí dôležitú časť epiteliálnej bariéry [9].

Epidermálna vrstva je kontinuálne obnovovaná. Jedinou mitoticky aktívnou vrstvou je bazálna vrstva (lat. *stratum basale*, Obr. 2). Táto vrstva je zložená z pluripotentných kmeňových buniek [10]. Bunky mukóznej (lat. *stratum spinosum*), granúlárnej alebo slizničnej (lat. *stratum granulosum*) a zrohovatelej vrstvy (lat. *stratum corneum*) sú post-mitotické a podliehajú diferenciácii (Obr. 2) [9].

Keratinocyty v bazálnej vrstve interagujú s extracelulárnou matrix dermis. Adhézia epidermis ku dermis je sprostredkovaná hemidezmozómami a fokálnymi kontaktami [11]. Spojenie bazálnych buniek ku keratinocytom vo vrchnejších vrstvách a rovnako aj medzi keratinocyty navzájom zabezpečuje iný typ bunkových spojení, dezmozómy [12]. Bunky v epidermálnej vrstve sú spájané aj ďalšími typmi bunkových spojení: komunikačnými, adherentnými a tesnými spojeniami.

Funkcie epidermálnej vrstvy sú spájané predovšetkým so zrohovateľnou vrstvou *stratum corneum*. Konkrétne sa jedná o nasledovné funkcie [13]: 1. permeabilná, 2. anti-mikrobiálna, 3. anti-oxidačná, 4. kohézna, 5. mechanická/ reologická, 6. chemická (epidermis slúži ako miesto na uskladnenie chemických mediátorov, liečiv, *cosmeceuticals* a kozmetiky), 7. psychosenzorická, 8. hydratačná (tvorba prirodzeného zvlhčujúceho faktoru; zmes nízko molekulárnych hygrokopických zlúčenín ako sú močovina, aminokyseliny, glycerol [14]), 9. ochranná (ochrana pred elektromagnetickým žiarením), 10. zápalovo- iniciačná (dochádza ku aktivácii cytokínov). Táto vrstva je zároveň považovaná aj za orgán sociálnej komunikácie,

slúži ako biosenzor meteorologických podmienok (predovšetkým vlhkoti), predstavuje regulátor vnútornej a adaptívnej imunity a v neposlednom rade zabezpečuje ochranu pred karcinogenezou a fotostárnutím [14].



Obr. 2 Prierez epidermálnou vrstvou [8].

2.1.2 Dermo- epidermálne rozhranie

Hranica medzi dermis a epidermis v koži je zložená zo špecializovaných agregátov molekúl, ktoré sa označujú ako bazálna membrána (Obr. 3) [15] [16]. Medzi hlavné zložky bazálnej membrány patria kolagén typu IV i XVII a laminíny (1, 5, 6, 7). Laminíny tvoria homotypické polyméry stabilizované väzobnými interakciami s nidogénom a heparánsulfátovým proteoglykanom perlecanom [17].

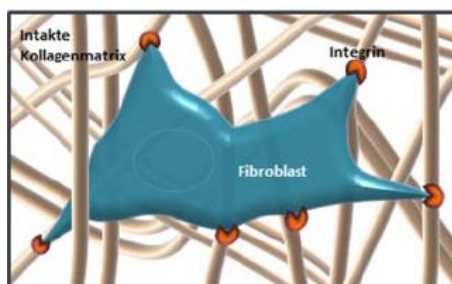
Hlavnými mediátormi signalizácie bazálnej membrány sú receptory integríny. Integríny sú heterodimérické transmembránové glykoproteinové receptory, ktoré sú súčasťou dvoch typov už spomínaných bunkových spojení- hemidezmozómov a fokálnych adhézií. V ľudskej koži boli na rozhraní epidermálnej a dermálnej vrstvy identifikované integríny $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ a $\alpha_6\beta_4$. $\alpha_2\beta_1$ je receptorom kolagénu IV, $\alpha_3\beta_1$ je hlavný receptor laminínu-5. Integrín $\alpha_6\beta_4$ je receptorom laminínu-5 a laminínu-1 [18].

Bazálna membrána slúži ako selektívna bariéra medzi spomínanými kompartmentami a tiež poskytuje pevnú podporu pre germinujúce bazálne vrstvy buniek. Medzi jej ďalšie funkcie patrí migrácia, diferenciácia, proliferácia a udržiavanie tkanivovej homeostázy [20] [21]. Bazálna membrána striktne kontroluje premávku (*traffic*) buniek a bioaktívnych molekúl v oboch smeroch, t.j. z epidermálnej vrstvy do dermálnej a naopak [15]. Na druhej strane je bazálna membrána schopná viazať množstvo cytokínov a rastových faktorov. Slúži

Dermálne vrstvy ďalej obsahujú cievny dendritický bunky, makrofágy a lymfocyty. V teite

Illegálna funkcia derivácie vstupu je udržiavanie štruktúrnej integrity kože, jej elasticity

ku hypodermis. V tejto vrstve kože vznikajú vrásky, ktoré sú jedným z hlavných cieľov *anti-ageing* starostlivosti o stárnucu pleť.



Obr. 4 Ukážka predstavy zachytenia fibroblastov v sieti extracelulárnej matrix [24].

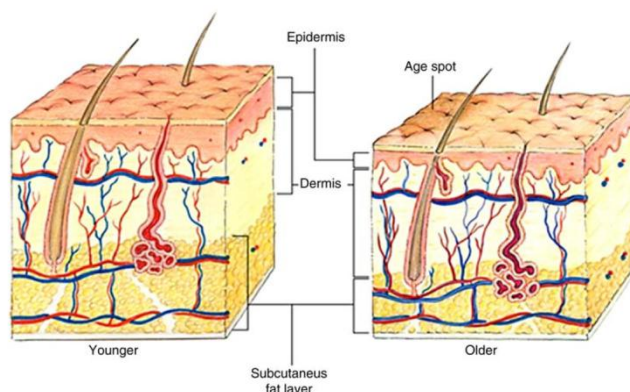
2.1.4 Hypodermis

Hypodermis alebo podkožné tkanivo je najspodnejšia vrstva kože. Táto je lokalizovaná pod dermálnou vrstvou (Obr. 1) a z podstatnej miery obsahuje tukové bunky adipocyty, ktoré sú obrovskou zásobárňou energie. Práve vďaka adipocytom má táto vrstva tlmiacu, izolačnú i termoregulačnú funkciu [25] a chráni spodné vrstvy od chladu a mechanického poškodenia. V hypodermis sa taktiež nachádzajú krvné cievy, podkožné žľazy a vychádzajú z nej aj vlasové folikuly.

2.2 Stárnutie kože

Stárnutie kože je komplexný proces, v ktorom simultánne operuje mnoho mechanizmov. Medzi tieto mechanizmy patria akumulácia mutácií v genóme [26], akumulácia toxických metabolitov či pokles hladiny hormónov (estrogénu, testosterónu, dehydroepiandrosterónu a tiež aj melatonínu, inzulínu, kortizolu a rastových hormónov) [27]. Rovnako bolo sledované aj zníženie množstva signálnych molekúl (cytokínov a chemokínov) a ich receptorov, zvýšená tvorba voľných radikálov vyvolávajúca oxidatívny stres, vzájomné zviazanie makromolekúl glykáciou [28] a skracovanie telomér [29].

Stárnutie kože je výsledkom pôsobenia vnútorného (chronologického) a vonkajšieho stárnutia indukovaného prostredím, predovšetkým ultrafialovým žiarením [30]. Najvýraznejšie zmeny v hrúbke a ďalších parametroch epidermálnej a dermálnej vrstvy počas procesu stárnutia sú znázornené na Obr. 5.



Obr. 5 Odlišnosti v štruktúre mladej a stárnucej kože [31].

2.2.1 Vnútorne stárnutie

Prvým typom stárnutia je chronologické stárnutie, počas ktorého dochádza v jednotlivých vrstvách kože ku početným zmenám.

Najvýraznejšími zmenami v procese stárnutia epidermálnej vrstvy je pokles počtu buniek [32]. Vekom dochádza ku zníženiu počtu Langerhansových buniek [29] aj enzymaticky aktívnych melanocytov [33]. Na základe experimentálnych štúdií bolo dokázané, že každých 10 rokov dôjde k zníženiu melanocytov o 8–20 %. Výsledkom tohto poklesu je oslabenie ochrannej bariéry tela proti ultrafialovému žiareniu [34]. Zmeny z pôvodne uniformného tvaru a rovnako nárast veľkosti je možné sledovať aj u buniek bazálnej vrstvy [35].

S rastúcim vekom dochádza aj ku zníženiu rýchlosti epidermálneho metabolizmu o približne 30 až 50 % [36]. Taktiež bolo odhalená aj zvýšená variabilita hrúbky tejto vrstvy a nárast veľkosti individuálnych keratinocytov [37].

Jednou z najnápadnejších štruktúrnych zmien v stárnucej koži je porušenie dermo-epidermálnych spojení, ktoré je výsledkom zníženého množstva a veľkosti dermálnej papily. Tento jav vedie k redukovanej výmene živín a metabolitov a k celkovému oslabeniu komunikácie medzi epidermálnou a dermálnou vrstvou [37].

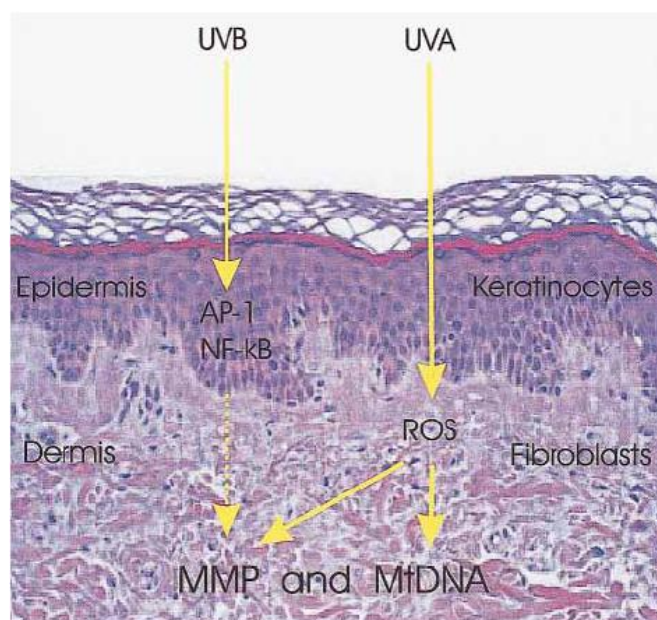
Pri štúdiu vnútorného stárnutia bolo zistené aj zníženie množstva zložiek extracelulárnej matrix a vybraných cytoskeletálnych proteínov, predovšetkým zložiek dezmozomálnych spojení (napr. plakoglobín) [38].

2.2.2 Vonkajšie stárnutie

Medzi hlavné faktory vonkajšieho stárnutia patria ionizujúce žiarenie, fyzický a psychický stres, príjem alkoholu, nedostatočná výživa alebo naopak nadmerná konzumácia potravín, znečistenie životného prostredia a predovšetkým vystavenie UV (z angl. *ultraviolet*) žiareniu.

Najväčší príspevok (až 80 %) ku stárnutiu kože predstavuje jednoznačne UV žiarenie. Tento jav býva označovaný ako fotostárnutie a charakterizovaný zmenami v klinických, histologických a funkčných črtách kože vystavenej pravidelnému slnečnému žiareniu (Obr. 6).

Medzi časté zmeny pozorovateľné vo fotostárnucej koži patrí hyperkeratóza vrstvy *stratum corneum*. Typickým znakom je aj stenčenie bazálnej membrány [39] niekedy spájané s poškodením bazálnych keratinocytov a nepravidelnou distribúciou, veľkosťou a pigmentáciou melanocytov pozdĺž tejto membrány. Miera a vážnosť zmien v dermálnej vrstve z veľkej časti závisí na stupni poškodenia jej jednotlivých súčastí. Najvýraznejšia je elastóza, pre ktorú je charakteristická rôznorodá distribúcia pozmenených elastických vlákien. Medzi ďalšie charakteristiky fotostárnucej kože patrí nahradenie kolagénových vlákien kolagénom s inými bazofilnými vlastnosťami, ukladanie glykosaminoglykánov a fragmentovaných vlákien elastínu či intersticiálneho kolagénu [40].



Obr. 6 Zjednodušená predstava mechanizmov spôsobujúcich fotostárnutie ľudskej kože. UVB lúče sú z veľkej miery absorbované v epidermálnej vrstve zloženej z keratinocytov. Ich vplyvom dochádza v epidermis ku indukcii transkripčných faktorov ako sú AP-1 a NF-kB a následne ku indukcii matrixových metaloproteináz. UVA lúče prenikajú až do hlbších vrstiev dermis, kde dochádza ku ich absorpcii fibroblastami. Vplyvom týchto lúčov dochádza aj ku indukcii tvorby ROS, ktorá vedie ku expresii už zmieňovaných matrixových metaloproteináz a indukcii mutácii v mtDNA [40].

Za zmeny fenotypu exponovanej kože sú zodpovedné jednak UVB (290- 320 nm) a tiež UVA (320- 400 nm) žiarenie. Majoritná časť UVB lúčov je absorbovaná v úrovni epidermálnej vrstvy, pričom maximálne zasahuje po bazálnu membránu. Po zachytení UVB lúčov v koži dochádza ku poškodeniu DNA v keratinocytoch a melanocytoch (vznik timínových dimérov, tzv. “UV fingerprints”), indukcii produkcie rozpustného epidermálneho faktoru ESF (angl. *soluble epidermal factor*) a proteolytických enzýmov či aktivácii

matrixových metaloproteináz (Obr. 6) [41]. UVB žiarenie má biologický efekt 1000- krát silnejší ako UVA a v súvislosti s ním sa objavujú ochorenia ako hyperpigmentácia alebo rakovina kože.

UVA lúče sú 10- až 100- krát viac abundantné v atmosfére ako UVB. Tento typ lúčov preniká až do hlbších vrstiev dermis a dochádza ku súčasnému poškodeniu epidermálnej aj dermálnej vrstvy. Tento typ žiarenia teda výraznejším podielom participuje na patogenéze fotostárnutia. UVA žiarenie tiež môže tvoriť kyslíkové radikály (ROS, z angl. *reactive oxygen species*), ktoré ovplyvňujú štruktúru kolagénov typu IV a VII, peroxidáciu lipidov a tvoria zlomy v DNA reťazcoch (Obr. 6) [42].

Zhrnutím, z pohľadu vonkajšieho stárnutia je pre epidermálnu vrstvu charakteristické zvýšenie alebo zníženie jej hrúbky, strata polarita keratinocytov a zmena ich tvaru. Zreteľné je aj UV žiarením indukované zvýšenie matrixových metaloproteináz a XPF faktoru (z angl. *xeroderma pigmentosum factor*). Práve prítomnosť XPF indukuje tvorbu epidermálno-dermálnych invaginácií, ktoré sú začiatočným štádiom tvorby vrások. V spomínaných miestach bol najviac zistený aj znížený výskyt kolagénu typu IV a VII. Zvýšenie hladiny UV-aktivovaných matrixových metaloproteináz spolu s uvoľňovaním cytokínov z keratinocytov môže v konečnom dôsledku viesť až ku chronickému zápalu v dermálnej vrstve [43].

2.3 Bunkové spojenia v epidermálnej vrstve a dermo- epidermálnom rozhraní

Ako už bolo naznačené, v priebehu procesu stárnutia dochádza ku zmenám v integrite kože. Jedným z cieľov *anti- ageing* starostlivosti je preto podporiť tvorbu väzieb medzi bunkami v epidermálnej vrstve aj medzi bunkami a bazálnou membránou v dermo-epidermálnom rozhraní. Jednotlivé bunkové spojenia sú tvorené transmembránovými proteínmi a viažu sa ku zložkám cytoskeletonu. V súvislosti so spojeniami je známych aj veľké množstvo cytoplazmatických molekúl, ktoré sú zahrnuté v procesoch transkripcie, proliferácie, bunkovej polarita a tvorbe difúznej bariéry [44].

Cieľom tejto kapitoly je podať stručný prehľad o jednotlivých typoch bunkových spojení v epidermis a na jej rozhraní s dermis. Tento je spracovaný vo forme tabuľky (Tab. 1), v ktorej sú zhrnuté najpodstatnejšie informácie o zložení, funkciách, regulácii a známych ochoreniach asociovaných s defektami v príslušnom bunkovom spoji vo forme hesiel. Nakoľko je táto práca venovaná RGD peptidom, ktorých biologické testovanie bolo realizované na bunkách dermálnej vrstvy, nebudú jednotlivé spojenia rozoberané podrobnejšie. V tabuľke sú však zvýraznené hemidezmozómy a fokálne adhérie ako bunkové spojenia s integrínovými receptormi. Je totiž pravdepodobné, že RGD peptidy ako potencionálne ligandy týchto receptorov by mohli ovplyvniť biologické charakteristiky epidermálnych buniek pri *in vitro* testovaní a v konečnom dôsledku viesť ku zlepšeniu parametrov kože aj v reálnych podmienkach.

Tab.1: Bunkové spojenia v epidermálnej vrstve a dermo- epidermálnom rozhraní.

Typy spojení	Podtriedy	Zloženie	Funkcia	Regulácia	Ochorenia
Tesné		Okludín, klaudíny, zonula occludens (ZO) proteíny	Paracelulárna bariéra, bunková polarita, vezikulárny transport	Spojenie s adherent- nými spojeniami	<i>Psoriasis,</i> <i>ichtyosis</i> <i>vulgaris,</i> <i>lichen</i> <i>planus</i>
Komunikačné		Konexín43, konexón, vnútrobunkový kanál	Výmena rôznych molekúl, bunková synchronizácia, diferenciácia	Úloha kadherínov, posttrans- lačné modifikácie	<i>Erythroke-</i> <i>ratoderma</i> <i>variabilis,</i> Vohwinke- lov syndróm
Zakotvujúce	adherentné	Nektín- afadínový komplex, kadherín- katenínový komplex	Tvorba tkanív, signalizácia, endocytóza	Cdc42, fosforylácia β -katenínu	Delécia α - katenínu, EDSS syndróm
	dezmozómy	dezmogleíny, dezmokolíny, plakoglobín	Adhézia, apoptóza, signalizácia	Fosforylá- cia, koncentácia vápnika, asemblácia dezmozó- mov	<i>Pemphigus,</i> <i>bullous</i> <i>impetigo,</i> Dariérová choroba
	Hemidez- mozómy	Integrín $\alpha 6 \beta 4$, BP180, BP230	integrita, signalizácia integrínmi	Plektín, laminín-5, fosforylácia	<i>Epidermo-</i> <i>lysis</i> <i>bullosa,</i> <i>bullous</i> <i>pemphigoid</i>
	Fokálne adhézie	$\alpha 3 \beta 1$ integrín, $\alpha 2 \beta 1$ integrín, fokálne adhézne kinázy (FAK)	Fyzické pripojenie, signalizácia integrínmi	Asembácia, <i>Rac,</i> fosforylácia	Kindlerov syndróm

2.4 Bunkové spojenia v dermálnej vrstve

Adhézia ku substrátu je nevyhnutnou proliferačnou podmienkou pre väčšinu typov buniek, pričom výnimku netvorí ani hlavný typ buniek dermálnej vrstvy- fibroblasty. Táto vlastnosť býva často v literatúre označovaná ako závislosť na zakotvení. Viacero výskumných skupín sa preto venovalo opisu dejov prebiehajúcich vo vnútri buniek počas proliferácie. Medzi zaujímavé výsledky patria poznatky, že adhézia je nevyhnutnou podmienkou pre účinnú odpoveď buniek ku rastovým faktorom spojenú s aktiváciou proteín kinázy C, Na/H antiportéru či mitogén aktivovanej proteín kinázy MAPK (z angl. *mitogen- activated protein kinase*). Adhézia ku substrátu je taktiež žiaduca v G1 fázy bunkového cyklu, kedy dochádza ku expresii cyklínu A a v neposlednom rade je základným predpokladom ku rýchlej fosforylácii fokálnymi adhéznyimi kinázami FAK (z angl. *focal adhesion kinases*) [45].

Prvá podkapitola bude preto zameraná na integríny, ako dominantné receptory z pohľadu adhézie. Druhá časť bude venovaná jednotlivým zložkám extracelulárnej matrix (ECM) s dôrazom na ligandy integrínových receptorov.

2.4.1 Integríny

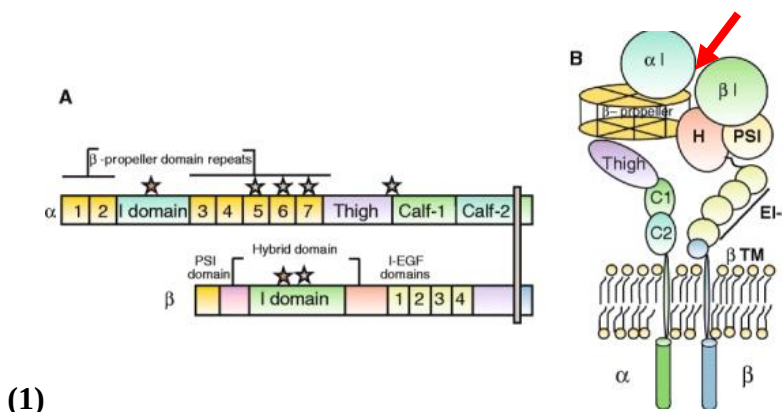
Integríny sú povrchové receptory buniek. Z pohľadu štruktúry sa jedná o heterodiméry, ktoré sú zložené z nekovalentne spojených α a β podjednotiek. U cicavcov bolo celkovo identifikovaných 18 α a 8 β podjednotiek, ktoré môžu asemblovať do 24 rôznych heterodimérov [47].

α podjednotka integrínových receptorov je zložená z β - propeleru zoskladaného zo siedmich častí, ktorý je pripojený k ďalším doménam. Posledné tri alebo štyri časti β -propeleru obsahujú domény viažuce Ca^{2+} . Naviazanie Ca^{2+} k týmto doménam alostericky ovplyvňuje väzbu ligandu. α podjednotka integrínov obsahuje aj domény pre väzbu iónov Mg^{2+} , tzv. MIDAS (z angl. *metal- ion- dependent adhesion site*) motívy. Deväť z osemnástich α reťazcov integrínov obsahuje αI doménu (Obr. 7 A) [48].

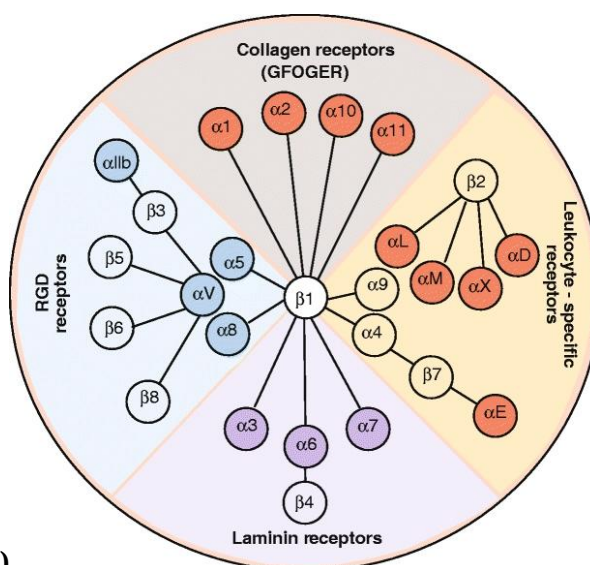
β podjednotka integrínov je tvorená PSI (z angl. *plexin- semphorin- integrin*) doménou, hybridnou a βI doménou i štyrmi na cysteín bohatými EGF (z angl. *epidermal growth factor*) opakovaniami. βI doména tiež obsahuje Mg^{2+} koordinujúce MIDAS motívy a miesto susediace s MIDAS (ADMIDAS) viažuce inhibičné Ca^{2+} ióny. Ku ADMIDAS miestu sa viažu aj ióny Mn^{2+} , ktorých väzba vedie ku konformačnej zmene na aktívnu formu integrínu (Obr. 7 A) [48].

Ligand väzobné miesta sú lokalizované v oblasti medzi α -reťazcom β -propeleru a βI doménou (Obr. 7 A). Centrálné postavenie v určovaní ligandovej špecificity má α -reťazec. Integríny s αI doménou viažu ligandy cez túto doménu. Naviazanie ligandu vedie k odlišným konformačným zmenám, ktoré následne ovplyvňujú konformáciu β podjednotky. Pre niektoré αI domény je interakcia s β reťazcom potrebná pre správne zoskladanie αI domény [49].

Adhézia buniek ku extracelulárnej matrix cez integrínové receptory môže mať odlišný charakter v závislosti od veľkosti buniek, ich morfológie a subcelulárnej distribúcie. Z molekúl ECM sú do týchto interakcií zapojené rôzne kolagény, laminíny a multiadhezívne molekuly [50]. Tieto interagujú s integrínovými receptormi prostredníctvom konzervovaných motívov RGD, GFOGER a LDV. GFOGER je minimálna integrínmi rozpoznávaná sekvencia v kolagénach a LDV v alternatívnom splicingom zostrihanutom fibronektíne. RGD sekvencia je minimálna sekvencia rozpoznávaná integrínmi a zároveň primárny adhezívny motív mnohých molekúl extracelulárnej matrix, napr. fibronektínu, vitronektínu či tenascínu A (Obr. 7 B) [48] [51].



(1)



(2)

Obr. 7 (1) Integrínový heterodimér obsahujúceho $\alpha 1$ doménu. **a** reprezentácia domén v integríne s $\alpha 1$ doménou (hviezdičky označujú väzobné miesta pre divalentné kationy). **b** Znáznornenie usporiadanie domén v $\alpha 1$ - doménu obsahujúcom integríne v membráne. Červenou šípkou je vyznačené potencionálne miesto pre naviazanie ligandu. (2) Schématická reprezentácia rodiny integrínových receptorov [48].

2.4.2 Extracelulárna matrix

Extracelulárna matrix je komplexná sieť zložená z kolagénu, glykoproteínov, proteoglykanov a elastínov. Tieto makromolekuly sú produkované fibroblastami a epitelovými bunkami.

Adhézia a asemblácia ECM ovplyvňuje bunky v mnohých smeroch. ECM vytvára mikroprostredie pre jednotlivé bunky, slúži ako substrát pre ich ukotvenie, vytvára akési tkanivové lešenie (po angl. *scaffold*), vplýva na migráciu buniek počas embryogenézy a procesu hojenia rán a taktiež plní aj mnohé ďalšie kľúčové úlohy v tkanivovej morfogénéze. Esenciálnou funkciou ECM je aj účasť v prenose signálu do bunky, ktorý ovplyvňuje všetky kľúčové deje od proliferácie, diferenciácie, už zmieňovanej migrácie až po riadenú bunkovú smrť- apoptózu. Z pohľadu funkcie však nie je dôležité len zloženie ECM ale aj jeho mechanické vlastnosti a topografia [48].

Je teda zrejmé, že interakcia molekúl ECM medzi sebou aj s ostatnými bunkami je nevyhnutným predpokladom pre udržanie štruktúrnej integrity kože. Zhrnutie poznatkov o vybraných zložkách ECM bude preto predmetom nadchádzajúcich statí.

2.4.2.1 Vlákňité proteíny

Vlákňité (fibrilárne) bielkoviny sú zložené z dlhých úsekov periodicky usporiadaných polypeptidových reťazov, ktoré sú spájané vodíkovými väzbami. V dermálnej vrstve sú typickými zástupcami tejto skupiny proteínov kolagén a elastín, ktorých podrobnejšej charakterizácii budú venované nasledujúce dve podkapitoly.

2.4.2.1.1 Kolagén

Kolagény sú najviac zastúpenými zložkami extracelulárnej matrix. Táto rodina je tvorená 27 odlišnými členmi rozdelenými do viacerých podskupín, napr. vlákňité kolagény (typ I, III, V), FACIT kolagény (príkladom typ XII, XIV a XVI) či kolagénu VI [52] [53]. Z pohľadu štruktúry polypeptidového reťaca je každou treťou aminokyselinou Gly, ktorý pomáha udržať reťazce pohromade. Dominantným motívom je Gly-X-Y (X je najčastejšie prolín a Y hydroxyprolín). V endoplazmatickom retikule dochádza aj ku iným postranlačným modifikáciám.

V dermálnej vrstve sa v dominantnej miere vyskytujú vlákňité kolagény typu I (85 % ± 90%) a typu III (10 % ± 15 %). Prekursorickými molekulami maturovaných kolagénov sú jednotlivé polypeptidové reťazce typu I a III s názvom prokolagény, ktoré sú syntetizované

fibroblastami. Pri tvorbe nerozpustných kolagénových vlákien dochádza ku štiepeniu prokolagénov na N a K konci špecifickými proteázami. Takýmto spôsobom vznikajú pN (prokolagén bez C terminálneho propeptidu) a pC kolagény (prokolagén bez N terminálneho propeptidu). V konečnom dôsledku, hladina pN a pC prekursorických molekúl maturovaného kolagénu odráža hladinu samotnej kolagénovej biosyntézy [54].

2.4.2.1.2 Elastín

Elastické spojivové vlákna v koži majú vysokú pružnosť a sú zložené z amorfného jadra elastínu a mikrofibríl, pričom obsahujú aj iné makromolekuly [55]. Elastín je na rozdiel od kolagénu kódovaný len jedným génom. Je to 750 aminokyselín dlhý polypeptid, ktorý je dominantne zložený z glycínu a hydroxyprolínu. Prekurzorom ľudského elastínu je tropoelastín, ktorý obsahuje dva typy domén. Prvým typom sú hydrofóbne domény, ktoré sú bohaté na nepolárne aminokyseliny obyčajne sa vyskytujúce v opakujúcich sa sekvenciách. Druhým sú hydrofilné domény obsahujúce vo zvýšenej miere alanín a lyzín. Aminokyselina lyzín navyše podlieha oxidácii lyzyl oxidázou [56]. Ku vytvoreniu krížových väzieb a ku zosieťovaniu dochádza v blízkosti membrány pomocou proteínu dezmozínu.

2.4.2.2 Multiadhezívne molekuly

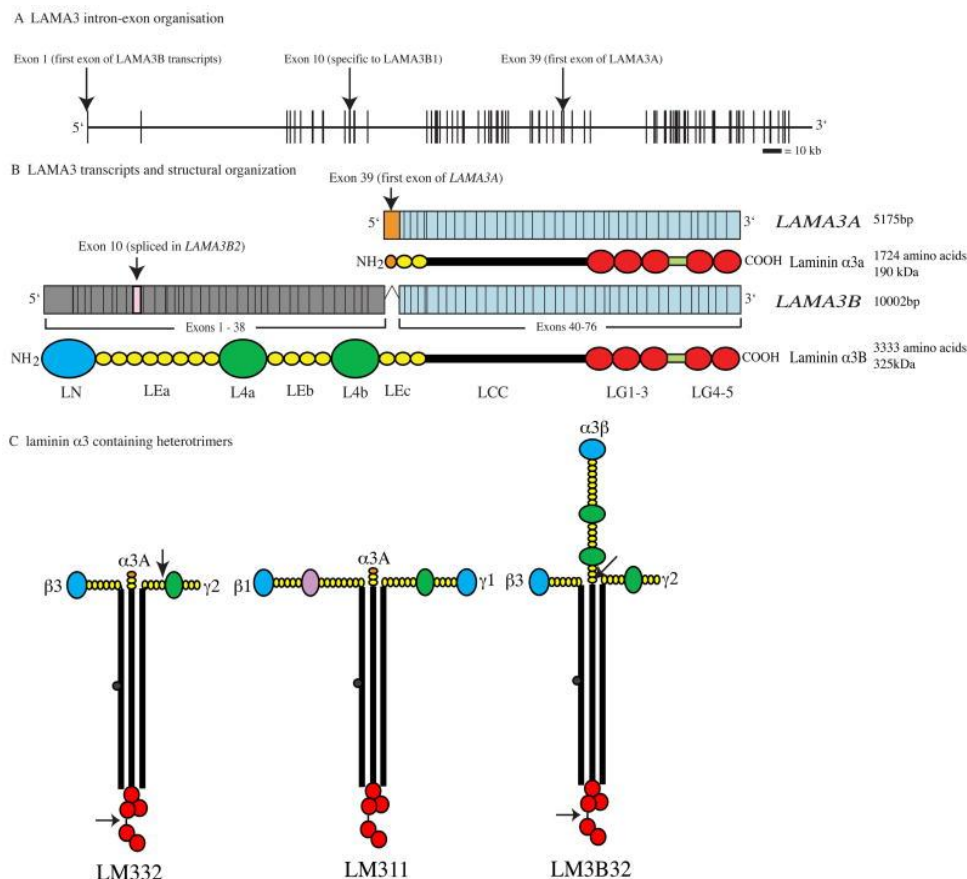
V ECM sa nachádza niekoľko multiadhezívnych molekúl. Jedná sa o molekuly, ktoré obsahujú niekoľko rôznych domén. Tieto domény im umožňujú viazať sa k integrínovým povrchovým receptorom buniek a rovnako aj ku iným molekulám ECM. Medzi takéto molekuly patria napr. laminín, fibronektín, tenascin C či vitronektín. Nasledujúce dve podkapitoly budú venované prvým dvom spomínaným molekulám.

2.4.2.2.1 Laminín

Laminíny sú sekrétovaná rodina heterotrimérických molekúl nevyhnutných pre tvorbu, štruktúru a funkciu bazálnej membrány [57]. Po chemickej stránke sa jedná o glykoproteíny. Každá izoforma je zložená z jedinečnej kombinácie troch reťazcov (α , β a γ) s jednou alebo viacerými doménami. Spolu s kolagénom IV tvoria laminíny 5, 6 a 10 základ sieťovanej štruktúry epidermálnej bazálnej membrány. Hlavným laminínom bazálnej membrány je laminín 332 (Obr. 8) a menej abundantným je laminín 331 [58]. Vysoko špecializovaná funkcia laminínov je možná vďaka diverzite v štruktúrnom zložení laminínových reťazcov. Niektoré izoformy laminínov v bazálnej membráne obsahujú aj RGD rozpoznávacie sekvencie.

Hlavným epidermálnym laminínom je laminín 5. Predpokladá sa, že laminín 5 môže byť zakotvený k bazálnej membráne väzbou ku laminínu 6. Tieto diméry sa môžu viazať aj ku

iným lamininovým dimérom a vytvárať veľké komplexy. Laminíny majú navyše aj početné globulárne domény, ktoré im umožňujú väzbu ku viacerým molekulám. Napr. laminíny 6 a 10 sa viažu ku nidogénu a nepriamo ku kolagénu IV, laminín 5 okrem nidogénu aj ku kolagénu VII [59].

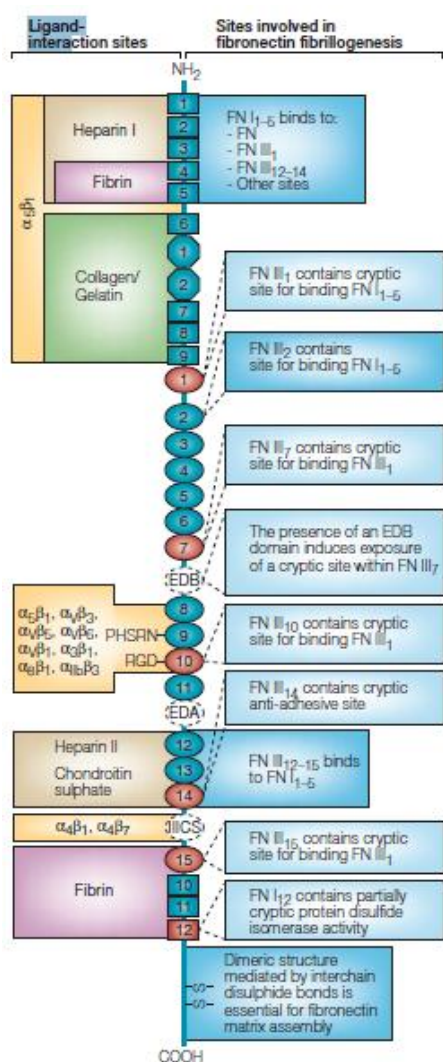


Obr. 8 (A) Genomická organizácia LAMA3 génu, vertikálne čiary znázorňujú exóny, horizontálne intróny. (B) Organizácia transkriptov LAMA3A a LAMA3B; modré exóny – bežné pre oba transkripty, oranžové – špecifické pre LAMA3A, šedé – špecifické pre LAMA3B, ružové – špecifické pre LAMA3B2, za každým transkriptom je schématická reprezentácia architektúry domén; LN – laminínová N terminálna doména, LE – opakovanie laminín- like a EGF- like, L4 – globulárne domény, LCC – laminínové helikálne domény, LG – laminínové globulárne domény. (C) Laminín α3 obsahujúca heterotrimérická štruktúra. Schémy konzervovaných domén ako v (B), fialovou je znázornená Lβ- laminínová β globulárna doména [57].

2.4.2.2.2 Fibronektín

Fibronektín je rozpustný multifunkčný glykoproteín. Z pohľadu chemickej štruktúry sa jedná o dimér, ktorého monomérické podjednotky sú spojené disulfidickými väzbami. Každý monomér je zložený z troch typov opakovaní (nazývané FN opakovania): typ I (v počte 12), II (v počte 2) a III (v počte 15- 17). Fibronektín zohráva dôležitú úlohu pri vytváraní väzieb

medzi rôznymi molekulami extracelulárnej matrix, menovite kolagénom, heparínom, fibrínom, proteoglykanmi a predovšetkým integrínmi.



V polypeptidickom reťazci sa nachádza aj sekvencia zložená z arginínu- glycínu- kyseliny asparágovej (v jednopísmenkovom aminokyselinovom kóde RGD). Tento tripeptidický motív je rozpoznávaný špecifickými integrínovými receptormi na povrchu buniek. Väzba fibronektínu ku integrínovým receptorom na bunkách vedie ku stimulácii signálnych dráh vedúcich ku prichyteniu buniek, migrácii a diferenciácii. Práve vďaka tejto vlastnosti sú fibronektínové molekuly esenciálnymi v bunkovej adhézii a umožňujú komunikáciu medzi bunkami a zložkami ECM [60].

Ako už bolo spomínané, fibronektín je významnou zložkou extracelulárnej matrix. Väčšina interakcií medzi fibronektínom a integrínovými receptormi sa odohráva cez RGD sekvenciu v opakovaní III₁₀. Pre $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrín je sekvencia RGD dostačujúca pre adhéziu. Pre väzbu ku integrínom $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ je potrebná ešte prítomnosť iných domén. Pre adhéziu buniek ku fibronektínu cez $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ integrín je nevyhnutná prítomnosť nielen RGD miesta ale aj druhého synergického miesta prislúchajúceho sekvencii prolín-histidín- serín- arginín-kyselina asparagová (PHSRN) v opakovaní III₉ (Obr. 9) [61].

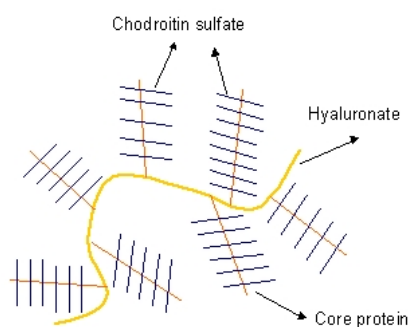
Obr. 9 Ligand väzobné oblasti a miesta pre interakciu fibronektínu. Fibronektín je zložený z troch typov opakujúcich sa jednotiek: typ I (obdĺžnik 1- 12), typ II (trojuholníky 1- 2) a typ III (ovály 1- 15). Bodkované ovály znázorňujú jednotky, v ktorých dochádza ku alternatívnemu splicingu mRNA, do ktorej je vložený modul označený ED-A (EDA) a ED-B (EDB) alebo časť variabilnej IIICS oblasti. Značky pozdĺž pravej strany molekuly vyznačujú kryptické alebo vystavené miesta interakcie zahrnuté vo fibrinogenéze fibrinogénu. Značky na ľavej strane naopak oblasti zahrnuté vo väzobných interakciách s rôznymi členmi integrínovej rodiny alebo molekulami ECM. Rovnako sú na obrázku vyznačené aj primárne adhezívne RGD a synergické PHSRN miesto [62].

2.4.2.3 Glykozaminoglykany a proteoglykany

Hlavnou funkciou glykozaminoglykanov a proteoglykanov je podpora štruktúrnych elementov kože. Z pohľadu chemickej štruktúry sú glykozaminoglykany dlhé nerozvetvené polysacharidy, v ktorých alternujú disacharidické jednotky. Vo svojom reťazci navyše obsahujú aj jeden z dvoch aminocukrov: N- acetylglukozamín alebo N- acetylglaktozín a

na terminálnom konci buď sulfátovú alebo karboxylovú skupinu. Táto dodáva bunkám negatívny náboj, prostredníctvom ktorého dochádza ku priťahovaniu osmoticky aktívneho Na^+ a vedie ku väzbe veľkého množstva vody. Uvedená vlastnosť umožňuje týmto molekulám vytvárať gélové prostredie extracelulárnej matrix dermis už pri ich veľmi nízkych koncentráciách. Vďaka svojmu negatívnemu náboju viažu glykozaminoglykany nešpecificky aj rastové faktory alebo cytokíny. V koži sa vyskytujú predovšetkým heparansulfát (prednostne v bazálnej membráne), heparín, dermatansulfát a kyselina hyalurónová. Kyselina hyalurónová je významnou zložkou ECM a je zložená z opakujúcich sa jednotiek kyseliny glukurónovej a N- acetyl- glukozamínu, neobsahuje teda terminálnu skupinu nesúcu záporný náboj (Obr. 10) [63].

Lineárne nerozvetvené reťazce proteoglykanov (v minulosti označovaných aj ako mukopolysacharidy) sú zložené z glykozaminoglykanov a proteínového jadra. Cukorná zložka je tvorená pravidelne sa opakujúcimi hexózaamínmi a kyselinou urónovou (D- glukozamínom, D- galaktozamínom, D- glukurónovou kyselinou, L- idurónovou kyselinou), niekedy sa vyskytujú aj N- acetylácie, N- sulfonylácie a U- sulfatácie hexózaamínových či idurónových zvyškov. Spojenie ku proteínovej časti býva väčšinou uskutočňované cez O- niekedy N- glykozidické spojenie na konkrétnych bodoch [64].



Obr. 10 Schématické znázornenie väzby hyaluronanu a proteoglykanu chondroitín sulfátu [65].

Proteoglykany patria medzi hlavné zložky ECM a predstaviteľmi sú napr. agrekan, dekorín či versican. Proteoglykany sa vyskytujú aj v bazálnej membráne (perlekan) či na povrchu buniek (napr. syndekan, glypikan).

2.5 Bioaktívne peptidy

V súčasnej dobe je kladená stále väčšia pozornosť na to, aby človek vyzeral aj vo vyššom veku stále mladý a fit. S týmto trendom úzko súvisí vývoj nových kozmetických surovín. Veľký *boom* na trhu zaznamenali bioaktívne peptidy.

Z pohľadu chemickej štruktúry sú peptidy organické zlúčeniny, ktorých molekuly sú podobné proteínom, ale sú menšie. Peptidy sú zložené z dvoch alebo viacerých aminokyselín (AMK) v L- konfigurácii, ktoré sú spojené prostredníctvom tvorby amidu medzi karboxylovou skupinou jednej AMK a amino skupinou druhej AMK. Chemická väzba medzi uhlíkom a dusíkom každej amidickej skupiny sa nazýva peptidová väzba. Počet AMK prítomných v peptidoch je identický s predponou. Medzi používaný pojem patrí oligopeptid, ktorý označuje peptid zložený z dvoch AMK (dipeptid) až ôsmich AMK (oktapeptid). Maximálna veľkosť polypeptidu nebola exaktne stanovená [66].

Peptidickým charakterom disponuje mnoho antibiotík, hormónov a ďalších aktívnych zlúčenín. Peptidy sú zapojené do širokého spektra prirodzených procesov. V kontexte starostlivosti o kožu sa jedná o účasť v modulácii bunkovej proliferácie či migrácie, melanogenéze, angiogenéze, zápalových reakciách, *de novo* syntéze proteínov, atď. [67].

2.5.1 Peptidy a kozmetika

Kozmetologický priemysel prešiel od začiatku 19. storočia, kedy sa používali iba prírodné zložky, dlhú cestu. Od éry rozkvetu priemyselnej chémie sa jeho portfólio rozšírilo o suroviny syntetickej povahy a rôzne chemické modifikácie látok získavaných z prírody. Tieto sú často výhodnejšie z pohľadu ceny, kvality, bezpečnosti či stability.

Nádejnými biologicky aktívnymi látkami syntetickej povahy sú aj peptidy. Od roku 1963, kedy Robert Bruce Merrifield objavil metódu chemickej syntézy peptidov na pevnej fáze, bol zaznamenaný výrazný pokrok v peptidickej chémii. Tento je spojený predovšetkým s optimalizáciou syntézy umožňujúcou vytvorenie rôznych peptidov bez obmedzení v dĺžke ich reťazca či zloženia až po metódy, ktoré potvrdzujú štruktúru a zabezpečujú ich vysokú čistotu.

Veľké množstvo bioaktívnych peptidov sa však naďalej vyrába aj fermentačnými technológiami alebo sa získava z prírodných zdrojov. Najčastejšie sa jedná o rastlinné materiály ako sú napr. ryža. V niektorých prípadoch však kozmeticky účinné peptidy môžu pochádzať aj zo živočíšneho zdroja, napr. zo žliaz priadky morušovej.

Použitie peptidov ako aktívnych látok do kozmetických produktov má veľké množstvo výhod. Peptidy sú účinné už v nízkych koncentráciách a vďaka presnej chemickej štruktúre môže byť ich účinok veľmi selektívne zacielený. Ďalšou výhodou peptidov je ich nízka molekulová hmotnosť, ktorá umožňuje ich penetráciu aj do hlbších vrstiev kože. Medzi prednosti peptidov patrí aj široká škála modifikácií, ktorými je možné zvýšiť ich lipofilný charakter (napr. pridanie mastnej kyseliny, obľúbenými sú palmitoylácie) či zavedenie netradičných aminokyselín (napr. D- aminokyselín). Druhá modifikácia zvyšuje stabilitu peptidov a teda pravdepodobnosť ich dopravenie na želané miesto v koži, nakoľko ich chráni pred skorým rozpoznaním a zničením bunkovými proteázami.

Bioaktívne peptidy stoja na pomedzí medzi farmaceutickým a kozmetickým produktom. Pre lepšie pochopenie rozdielov medzi kozmetikou a liečivom sú preto vysvetlené pojmy kozmetika a liečivo, ktoré sú používané v EU aj USA úradom FDA (z angl. *Food and Drug Administration*) [68]:

- Kozmetika je definovaná ako: *"látko alebo prípravok určený na vonkajšie časti ľudského tela (pokožku, pery, nechty, vonkajšie pohlavné orgány), sliznicu ústnej dutiny a zuby s cieľom výhradne alebo prevažne ich očistiť, parfumovať, meniť ich vzhľad, chrániť ich, udržiavať ich v dobrom stave alebo korigovať ľudské pachy"*.
- Liečivo je definované ako: *"výrobok určený na použitie pri diagnostikovaní, vyliečení, zmiernení, liečení alebo prevencii chorôb"* a *"výrobok (iný ako jedlo) určený na ovplyvnenie štruktúry alebo inej funkcie tela človeka alebo zvierat."*

Bioaktívne peptidy spolu s inými aktívnymi zlúčeninami (napr. vitamínmi, rastlinnými výťažkami a extraktami, kyselinou hyalurónovou, lipidmi, atď.) sa preto zaraďujú do samostatnej skupiny označovanej ako *cosmeceuticals*. Tento termín bol popularizovaný Albertom Kligmanom, ktorý spozoroval, že samotná voda môže zmeniť štruktúru a funkciu kože [69]. Od roku 1984 sa využíva na označenie látok, ktorých prínos je nielen kozmetický ale aj terapeutický [70]. *Cosmeceuticals* sú v princípe funkčnou kozmetikou.

Dôležitým kritériom pri vývoji nových bioaktívnych peptidov je bezpečnosť. Pred ich použitím vo finálnom produkte musia prejsť sériou testov, v ktorých sa hodnotí ich toxicita, aktivita a stabilita. V minulosti používané testy na zvieratách sú už dnes nahradené *in vitro* metódami a *in vivo* testami na dobrovoľníkoch. Neexistujú však žiadne exaktné nariadenia. V zákone nie je rovnako opatrená ani účinnosť. Biologický efekt peptidov môže byť prisudzovaný k ich schopnosti zvyšovať produkciu kolagénu, relaxovať vrásky, zlepšovať hydratáciu kože a jej bariérovú funkciu [71]. Na základe vybraných spoločných vlastností je možné biologicky aktívne peptidy rozdeliť do štyroch kategórií [71] [72]:

1. Signálne peptidy,
2. Neuropeptidy,
3. Prenášačové peptidy,
4. Inhibítory enzýmových procesov.

Nasledujúca kapitola bude venovaná stručnej charakterizácii jednotlivých skupín.

2.5.1.1 Signálne peptidy

Hlavnou funkciou signálnych peptidov je stimulácia rastu fibroblastov a zvýšenie produkcie kolagénu alebo naopak potlačenie štiepenia už existujúceho kolagénu kolagenázami [71] [72]. Signálne peptidy taktiež stimulujú produkciu matrixových proteínov. Rovnako môžu zvyšovať tvorbu proteoglykanov, glykozaminoglykanov, elastínu,

či fibronektínu [1]. Viditeľným znakom používania kozmetických prípravkov s obsahom signálnych peptidov ako aktívnych zlúčenín by mala byť pevnejšia a mladšie vyzerajúca koža.

Medzi komerčne dostupné signálne peptidy patria napr. GHK (Gly-L-His-L-Lys), Syn[®]-Coll (palmitoylovaný tripeptid-3/5), Decorinyl[™] (tripeptid-10 citrulín), Biopeptide-EL (pal-Val-Gly-Val-Val-Ala-Pro-Gly), pentapeptide-4 (pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), pal-Lys-Thr, pal-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, hexapeptide-11, SECMA 1[®] a mnoho ďalších [1].

2.5.1.2 Neuropeptidy

Neuropeptidy (neurotransmitter inhibičné peptidy) inhibujú uvoľňovanie acetylcholínu na neuromuskulárnych spojeniach a majú účinok podobný jedu kurare. Bolo identifikovaných sedem sérotypov botulotoxínu (BTX A- G), pričom organizáciou FDA bolo schválené používanie len botulotoxínu A (BTX-A) [73]. Tento typ toxínu proteolyticky degraduje SNAP-25 proteín (z angl. *Synaptosomal-associated protein 25*), ktorý je nevyhnutný pre uvoľňovanie neurotransmitterov z axónov. Výsledkom tohto špecifického štiepenia je zabránenie zakotvenia neurosekrečných vezikúl a fúzie s nervovými synapsami plazmatickej membrány [74]. Vplyvom pôsobenia jednotlivých typov botulotoxínov dochádza ku selektívnej proteolýze aj ďalších zložiek ako sú syntaxín 1, synaptobrevín (známy aj ako VAMP, z angl. *vesicle-associated membrane protein*) či rozpustného SNARE (z angl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) komplexu. Hlavným viditeľným prejavom používania kozmetických prípravkov s obsahom neuropeptidov je vyhladenie vrások.

Medzi známe neuropeptidy patrí Argireline[®] (acetyl hexapeptid-3) či Leuphasyl[®] (pentapeptid-18). Prvý menovaný je syntetický peptid mimikujúci N-terminálny koniec SNAP-25 proteínu, ktorý inhibuje zakotvovanie vezikúl zabránením tvorby ternárneho SNARE komplexu. Druhý menovaný je peptid mimikujúci prirodzené mechanizmy enkaphalínov. Výsledkom pôsobenia Leuphasyl[®] v kozmetických prípravkoch je inhibícia neuronálnej aktivity a uvoľňovania katecholamínov. Medzi neuropeptidy je možné zaradiť aj Syn[®]-Ake (tripeptid 3) mimikujúci účinok Waglerínu 1. Waglerín 1 je jed zmiže *Tropidolaemus wagleri*. Populárny je aj Vialox[®] (pentapeptid-3), ktorý je kompetitívnym antagonistom acetylcholínového receptora. Mechanizmus účinku tohto peptidu je docieľený blokováním uvoľňovania iónov sodíka na synaptickej membráne, čím je obmedzená príliš častá kontrakcia svalov [1].

2.5.1.3 Prenášačové (*carrier*) peptidy

Prenášačové peptidy uľahčujú transport dôležitých zlúčenín. Ich hlavnou úlohou je dopravenie významných stopových prvkov (ako je meď a mangán), ktoré sú nevyhnutné pre hojenie rán a enzymatické procesy v bunkách [71].

Prenášačové peptidy sú známe aj ako penetrujúce peptidy alebo membránovo transportné peptidy. Vo svojej štruktúre obsahujú základnú transdukčnú doménu [75]. Na uľahčenie transportu do živých buniek sú vhodné najmä krátke, na arginín bohaté peptidy [76].

Významnými predstaviteľmi tejto kategórie bioaktívnych peptidov sú peptidy na stabilizáciu a dopravenie medi do buniek. Známym predstaviteľom tejto skupiny je GHK- Cu [77]. Meď je jedným z elementárnych prvkov, ktorý je významný pre procesy hojenia rán, urýchlenie enzymatických procesov a podporu angiogenézy. Prospešnosť medi na kožu je možné prisúdiť pôsobeniu niekoľkých odlišných mechanizmov. Jeden z nich je založený na skutočnosti, že meď je nevyhnutná pre aktivitu lysyl oxidázy, ktorá je esenciálnym enzýmom v produkcii kolagénu a elastínu [78]. Rovnako meď vyžadujú aj tyrozináza, cytochróm c oxidáza a antioxidačne pôsobiaca superoxid dizmutáza. Meď je taktiež aj esenciálnym kofaktorom tvorby kolagénu a elastínu, *down-* reguluje matrixové metaloproteinázy a redukuje aktivitu enzýmu kolagenázy [72]. Zaujímavým je aj zistenie, že peptid GHK- Cu zvyšuje expresiu oboch zložiek integrínu $\alpha\beta 4$, a teda pozitívne ovplyvňuje proliferáciu bazálnych keratinocytov [79].

Viditeľným prejavom používania kozmetických prípravkov obsahujúcich prenášačové peptidy je nielen zjednotenie farby kože ale aj zvýšenie jej pružnosti a elasticity.

2.5.1.4 Peptidy ako inhibítory enzýmov

Niektoré peptidy môžu buď priamo alebo nepriamo inhibovať enzýmy. Jedným z komerčne vyrábaných peptidov je Eyeseryl[®] (acetyl tetrapeptid-5), ktorý inhibuje glykáciu kolagénu a zvyšuje cievnu permeabilitu [1]. Používanie kozmetických prípravkov s obsahom tejto aktívnej zložky vedie ku zamedzeniu akumulácie tekutín v očných väčkách a zvýšeniu elasticity kože.

Rozsiahlym rastlinným zdrojom peptidov patriacich do tejto skupiny sú sója a ryža. Vplyvom proteínov zo sóje a z nich odvodených peptidov dochádza ku inhibícii tvorby proteináz. Známe sú aj proteíny/ aminokyseliny z ryže (Colhibin[®]), ktoré inhibujú aktivitu matrixových metaloproteináz a indukujú expresiu génu pre hyaluronan syntázu 2 v keratinocytoch [80].

Do tejto skupiny je možné zaradiť aj sericín. Jedná sa o proteín získavaný zo žliaz priadky morušovej (*Bombyx mori*). Okrem antioxidačných vlastností sa vyznačuje aj inhibičným účinkom na peroxidáciu lipidov, aktivitu tyrozinázy a apoptózu keratinocytov [81].

2.6 Výber konkrétnych peptidických sekvencií

Z pohľadu *anti- ageing* starostlivosti o kožu je veľmi perspektívnym smerom podpora jej štruktúrnej integrity. V epidermálnej vrstve, na dermo- epidermálnom rozhraní aj v dermálnej vrstve sa nachádza obrovské množstvo buniek, ktorých adhézia a komunikácia je sprostredkovaná rozmanitými spojeniami.

Za bunkovú adhéziu sú zodpovedné aj receptory integríny. Ako už bolo spomínané, jedná sa o rozsiahlu rodinu bunkových povrchových receptorov. Ich spojenie s okolitým prostredím je zabezpečené interakciou s molekulami extracelulárnej matrix cez konzervované motívy. Jedným z týchto motívov je tripeptidická sekvencia RGD, ktorá je prítomná v molekulách ako fibronektín, vitronektín aj v niektorých izoformách laminínu. Integrínových receptorov, ktoré rozpoznávajú uvedenú sekvenciu je niekoľko a nachádzajú sa na rôznych typoch buniek. Veľmi zaujímavá a lákavá z pohľadu kozmetických aplikácií je skutočnosť, že jednotlivé interakcie môžu vyvolávať odlišné odozvy vo vnútrobunkovej signalizácii. Dôležitým bolo aj zistenie, že len RGD sekvencia je schopná interakcie s niektorými receptormi. U iných je nutná buď prítomnosť synergicky pôsobiacich sekvencií či exaktne zoskladaný interagujúci polypeptid.

Z vyššie zmienených a rovnako aj z mnohých ďalších dôvodov bola RGD sekvencia vybraná ako peptid, ktorého štúdiom z pohľadu kozmetických aplikácií by bolo zaujímavé sa zaoberať. Nielen samotná sekvencia, ale aj usporiadanie v priestore je nevyhnutné z pohľadu správnej interakcie s receptorom. Boli preto navrhnuté tri modifikované peptidy pridaním glycínov a v jednom prípade aj alanínu do sekvencie. V článku Beer a kol. [82] a tiež Hersel a kol. [83] sú uvedené modifikácie peptidov študované v spojení so stimuláciou adhézie buniek.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Chemikálie

Používané chemikálie pochádzali od firiem:

- FlukaChemie AG, Švajčiarsko- chlorid sodný, chlorid draselný;
- LachNer s.r.o, Neratovice, Česká republika- chlorid draselný, dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného, dihydrogénfosforečnan draselný, D-glukóza, EDTA Chelaton II, dimetyl sulfoxid;
- Penta, Chrudim, Česká republika- dihydrogénfosforečnan draselný, kyselina chlorovodíková;
- Sigma- Aldrich, Praha, Česká republika- Trisma base, Triton X-100, D-MEM, L- glutamín, D-glukóza, trypanová modrá, deoxychlát sodný, thiazolyl blue tetrazolium bromid- MTT, Trypsín/EDTA 10x, dodecyl sulfát sodný, penicilín/ streptomycín, albumín z bovinneho séra- BSA, etanol, 2- propanol;
- Roche s.r.o., Praha, Česká republika- Complete mini protease inhibitor;
- Gibco, Life Technologies Czech Republic s.r.o., Praha - BOFES, gentamicín.

Kity využívané v tejto práci boli zakúpené od firiem:

- Bio-Rad spol. s.r.o, Praha, Česká republika- RCDC protein assay kit;
- Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika- Detoxi- gel™ Endotoxin Removing columns;
- Associates of Cape Cod incorporated Inc., East Falmouth, Massachusetts- stanovenie endotoxínov.

Peptidy (Tab. 2) boli nasyntetizované vo firme Contipro Biotech s.r.o. v laboratóriách oddelenia chemických syntéz. Syntéza prebiehala pomocou modifikovanej metódy na pevnej fáze [184]. Na oddelení inštrumentálnej analýzy, rovnako vo firme Contipro Biotech s.r.o., bol vykonaný ich rozbor pomocou kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS metóda) a boli prečistené s využitím vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Tab. 2 Testované peptidy. Prvým trom peptidom s konkrétnou sekvenciou vyjadrenou v jednopísmenkovom aminokyselinovom kóde (2. Stĺpec) bolo pre ľahšiu orientáciu pridelená skratka (1. Stĺpec). Táto skratka nemá žiadnu súvislosť s ich aminokyselinovou sekvenciou ani vlastnosťami. Označenie peptidu v poslednom riadku zodpovedá jeho sekvencii. V poslednom stĺpci je uvedená molekulová hmotnosť jednotlivých peptidov

Označenie peptidu	Sekvencia peptidu	Molekulová hmotnosť (M_w)
R2	H-GGGAGGRGD-OH	702,69
R4	H-G6RGD-NH ₂	687,67
R6	H-G6RGD-OH	688,66
RGD	RGD-NH ₂	345

3.2 Bunkové kultúry

Na viabilité testovanie bola použitá spontánne imortalizovaná bunková línia NIH/3T3 zárodočných myších fibroblastov. Táto bola zakúpená od firmy Sigma- Aldrich, spol. s.r.o., Praha, Česká republika.

3.3 Média

Kultivačné médium na NIH/3T3 myšie fibroblasty bolo pripravované pri dodržovaní zásad sterilnej práce zmiešaním 87 % D-MEM (z angl. *Dulbecco minimum essential medium*, základné médium s obsahom glukózy 1000 µg/ml, bez L- glutamínu a pyruvátu), 10 % bovinneho fetálneho séra (BOFES), 1 % L- glutamínu, 1 % glukózy a 1 % penicilínu/streptomycínu. V chladničke bolo uschovávané po dobu maximálne 3 mesiacov.

Pod zásadami sterilnej práce sa rozumie práca v laminárnom boxe vyčistenom s dostupnými dezinfekčnými prostriedkami a vysvietenom minimálne 15 minút UV svetlom. UV svetlom je taktiež potrebné nechať vysvietiť aj všetok potrebný materiál.

3.4 Základné roztoky

Roztok glukózy: 40 % (w/v) glukóza.

Roztok Glutamínu: 2mM L-Glutamín.

PBS: 0,800 % NaCl ; 0,020 % KCl; 0,285 % Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,020 % KH₂PO₄.

Trypsín/EDTA 1x: 10% trypsin/EDTA 10x, 90% PBS.

Lyzačný pufo: 0,088 % NaCl; 0,010 % SDS a 0,061 % Trisma base. Za stálého miešania pridať 1 ml TRITON X-100. Zmerať pH a upraviť na hodnotu 8 pridaním 35 % HCl.

Lyzačný pufo s inhibítormi proteáz: na 10 ml lyzačného pufru použiť 1 tabletu Complete mini protease inhibitor.

Solubilizačný roztok (MTT): 50 % (v/v) 2-propanol (IPA) a 50 % (v/v) DMSO. K tejto zmesi pridať 1/9 objemu Tritonu X-100 a 0,990 % 37% HCl.

Roztok MTT: 5 mg/ml MTT v kultivačnom médiu.

Regeneračný roztok: 1% deoxycholát sodný.

Skladovací roztok: 25 % (v/v) 96 % etanol.

RCDC protein assay kit: Kit obsahuje hotové roztoky označené ako DC reagent A, DC Reagent B, DC Reagent S, RC Reagent I a RC Reagent II.

Injekčná voda bola získaná z oddelenia farmaceutickej výroby v sídle firmy Contipro Pharma s.r.o. a sterilizovaná v autokláve za štandardných podmienok: 35 minút pri 121°C (tlak 221 kPa). Z tejto vody boli pripravené roztoky glukózy, glutamínu a rovnako aj roztoky na odstraňovanie endotoxínov kolónkami Detoxi- gelTM Endotoxin Removing columns od firmy Thermo Scientific (t.j. PBS , regeneračný a skladovací roztok).

Ostatné roztoky boli pripravené z demineralizovanej vody a sterilizované buď cez 0,2 µm injekčný filter (glukóza, glutamín) alebo v autokláve.

U väčšiny roztokov bolo potrebné vyhnúť sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu a ich expiračná doba bola štandardne 3 mesiace pri skladovacej teplote 5- 15°C.

3.5 Spotrebný materiál

Materiál na kultiváciu buniek, stanovenie viability a proliferácie (napr. 96- a 24- jamkové mikrotitračné platničky, špičky, ependorfové skúmavky, 15 ml aj 50 ml skúmavky, atď.) pochádzal preferenčne od firiem Schoeller Pharma Praha s.r.o., Česká republika príp. Schoeller Instruments, s.r.o., Praha, Česká republika.

Materiál na stanovenie endotoxínov (sterilné apyrogénne jednorázové špičky, sterilné apyrogénne reakčné aj riediace skúmavky, sterilné apyrogénne 96- jamkové mikrotitračné

platničky) pochádzal od firmy Associates of Cape Cod incorporated Inc., East Falmouth, Massachusetts, USA.

3.6 Prístrojové vybavenie

Termostat na bunkové kultúry: Jouan IGO150 CELLlife CO2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika).

Laminárny box na prácu s bunkovými kultúrami: Jouan, Nordic A/s (Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika).

Laminárny box na stanovovanie proteínov: Jouan MSC 12 (Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika).

Centrifúgy: Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika), IEC CL31R Multispeed centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Praha, Česká republika).

Microplate Readeru: Versa Max so softwarom SOFT max PRO.

Termoblok: od firmy Falc Instruments s.r.l, Treviglio, Italy.

Mikroskop na rutinné sledovanie bunčných kultúr: Olympus CX30.

Mikroskop na počítanie buniek: Olympus CX40.

Fluorescenčný mikroskop na získavanie obrazovej dokumentácie: Nikon Eclipse Ti (program NIS-Elements AR 3.1).

Váha na sterilné navažovanie peptidov: XP205 (Mettler- Toledo s.r.o., Praha, Česká republika).

Doplňkové vybavenie: stolné trepačky, vortex s prídavným nastavcom, automatické pipetory, stojany na skúmavky, stopky na meranie času.

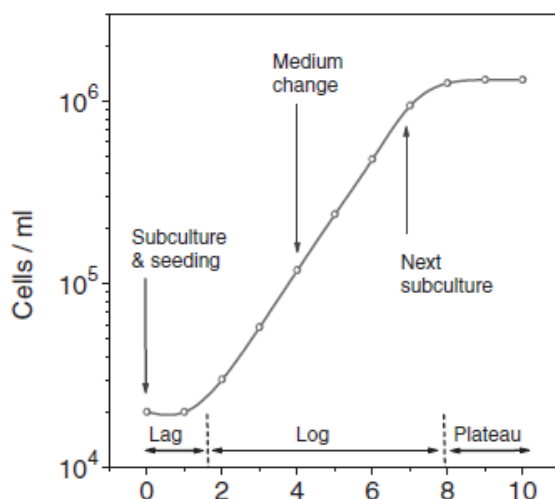
3.7 Metódy

3.7.1 Kultivácia NIH/3T3 myších fibroblastov

Princíp: Správanie subkultúry myších fibroblastov počas kultivácie vyjadruje rastová krivka (Obr. 11). Okamžite po nasadení buniek do kultivačného média sú bunky v latentnej, tzv. lag fáze, ktorá trvá najčastejšie od 12 do 24 hodín. Počas tejto fázy dochádza ku adaptácii na nové prostredie. Bunky fibroblastov sa obnovujú po zásahu proteázami, dochádza ku obnove ich cytoskeletu a ku sekrécii matrixových molekúl. Dochádza ku prichyteniu buniek na dno kultivačnej nádoby a k ich postupnému šíreniu a nakoniec vstupu do bunkového cyklu.

Bunky postupne vchádzajú do exponenciálnej, alebo log fázy. *Dubling time* NIH/3T3 myších fibroblastov je približne 20 hodín, tzn. že počas tejto periódy dôjde k zdvojnásobeniu nasadených buniek. Po obsadení väčšej časti dna kultivačnej nádoby, príp. vyčerpaní časti živín, bunky vstupujú do stacionárnej (plató) fázy [85] [86].

Postup: Bunky boli kultivované v 75 cm² kultivačných fľaškách v inkubátore s 7,5 % CO₂ pri 37 °C a pri zvýšenej vlhkosti. Kultivačné médium bolo vymieňané každé 2 až 3 dni a bunky boli pasážované po dosiahnutí stavu konfluencie (interval 4- 6 dní).



Obr. 11 Rastová krivka s vyznačenými fázami (lag, log a plató) a úkonmi- od nasadenia buniek, výmeny média až po ďalšie pasážovanie [85].

3.7.2 Pasážovanie NIH/3T3 myších fibroblastov

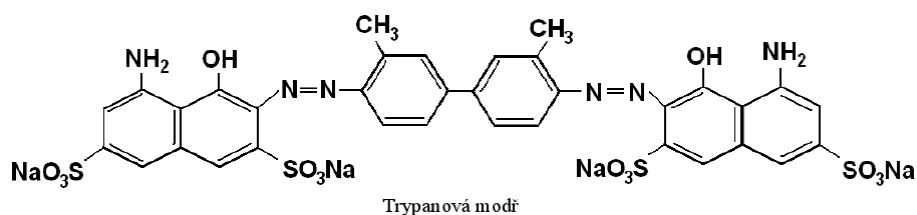
Princíp: Pri udržiavaní bunkovej kultúry myších fibroblastov po dosiahnutí konfluentného stavu na povrchu kultivačnej nádoby je potrebné ich tzv. pasážovať. Pod týmto pojmom sa rozumie vytváranie subkultúr po uvoľnení adherentných buniek zo dna fľašky i od seba navzájom, ich nariadenie na vhodnú koncentráciu a prenesenie do novej nádoby s čerstvým médiom. Na oddelenie buniek od kultivačného povrchu sa využíva proteáza trypsín, ktorá natravuje adhezne molekuly. Nakoľko adhézia fibroblastov je modulovaná aj prítomnosť dvoj- mocných iónov (predovšetkým Ca²⁺ a Mg²⁺), do roztoku trypsínu sa pridávajú aj chelatačné činidlá, predovšetkým kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA). Po určení koncentrácie buniek je presný objem bunkovej suspenzie prenesený do čerstvého kultivačného média so sérom, ktoré obsahuje antiproteázy. Z nich je dôležitý predovšetkým antitrypsín, ktorý inaktivuje zvyšky trypsínu [85] [86] [87].

Postup: Na začiatku bolo dno nádoby opláchnuté starým médiom, ktoré bolo následne odsaté. Potom bolo prepláchnuté asi 5 ml roztoku PBS, ktorý bol opätovne odsatý. Po pridaní 1 ml Trypsínu/ EDTA 1x na plochu 75 cm² bolo uvoľňovanie buniek priebežne sledované mikroskopicky (v prípade potreby boli kultivačné fľašky umiestnené na chvíľu do termostatu na 37°C). Zaguľatnené bunky boli následne sklepaním uvoľnené zo dna nádoby. Po následnom pridaní 5 ml kompletného média boli bunky pipetovaním opláchnuté zo dna

nádoby a suspendované. Adekvátny objem bunečnej suspenzie bol prenesený do 1,5 ml skúmavky na počítanie a centrifugovaný na 1200 rpm (200x g) pri 28 °C po dobu 10 minút na centrifúge Jouan BR4i. Medzitým bol pomocou Bürkerovej komôrky určený počet buniek vo vzorke (viď. Kapitola 3.7.3). Po centrifugácii bolo médium v supernatante odsaté a usadené bunky boli nakoniec suspendované v známom objeme nového média. Bunky boli na novú kultivačnú fľašku nasadzované v hustote 300 000 buniek/ 75 cm² fľaška.

3.7.3 Počítanie buniek v Bürkerovej komôrke

Princíp: Pri pasážovaní buniek za účelom buď udržiavania bunkovej línie NIH/3T3 myších fibroblastov alebo pri nasadzovaní buniek na 96- jamkové (sledovanie viability MTT testom, podrobnejšie v kapitole 3.7.6), príp. 6- jamkové panely (stanovenie obsahu proteínov, podrobnejšie v kapitole 3.7.7) je potrebné poznať presné množstvo buniek v bunkovej suspenzii. Na priame stanovenie počtu buniek sa bežne využívajú dve metódy- ručné počítanie buniek po pridaní vhodného farbiva v kalibrovannej komôrke pod svetelným mikroskopom alebo poloaautomatické počítanie s využitím prietokového cytometra. V tejto práci boli bunky počítané prvým spôsobom, pomocou Bürkerovej komôrky. Na rozlíšenie medzi živými a mrtvými bunkami a na ich kvantifikáciu bola použitá trypanová modrá (Obr. 12), ktorá sa vo vhodnom pomere pridáva do bunkovej suspenzie. Diskriminácia medzi živými a mrtvými bunkami je založená na neschopnosti tohto farbiva penetrovať cez membrány živých buniek alebo jeho aktívnym odstraňovaním pomocou transportných mechanizmov metabolicky aktívnych buniek. Živé bunky sú teda pod svetelným mikroskopom pozorovateľné ako bezfarebné, kým mŕtve bunky s porušenou membránou a defektnými transportnými mechanizmami ako modré [88].



Obr. 12 Chemická štruktúra trypanovej modrej [89].

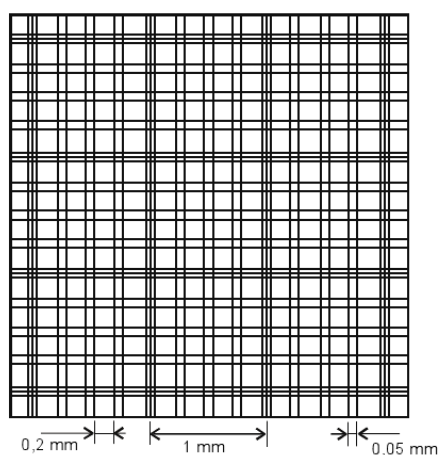
Postup: Po dôkladnom premiešaní bunečnej suspenzie bol želaný objem prenesený do 1,5 ml skúmavky, do ktorej bol následne pridaný konkrétny objem farbičky trypanová modrá. Najčastejšie využívané objemy spolu so zriedovacími faktormi sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3 Riedenia bunečnej suspenzie vhodné na počítanie buniek

Objem suspenzie (μl)	Objem trypanovej modrej (μl)	Zried'ovací faktor (ZF)
20	180	10*
20	80	5

* Vhodnejší pre hustejšie bunečné suspenzie.

Po premiešaní suspenzie buniek s farbičkou nasledovalo opatrné nanášanie pipetou na Bürkerovu komôrku (Obr. 13) prikrytú krycím sklíčkom. Tekutina sa nanášala na obe polovice skla rovnakým postupom, pričom nadbytočná suspenzia odtiekla postrannými kanálikmi. Živé bunky boli počítané pod mikroskopom s fázovým kontrastom pri zväčšení 100x v minimálne piatich štvorcoch ohraničených trojitou čiarou pri dodržiavaní nasledujúcich pravidiel: Vybrané štvorce nesmeli spolu susediť stranami. Počítané boli iba bunky ležiace celým svojím objemom vo vnútri štvorcov a na ich vrchnej a ľavej strane. Bunky ležiace na spodnej a pravej strane sa nezapočítavali.



Obr. 13 Pohľad na počítacie pole Bürkerovej komôrky [89].

Celkový počet buniek vo vzorke bol nakoniec získaný výpočtom zo vzorca:

$$X = ZF \cdot R \cdot V \cdot 10^4 \text{ [b/ ml]}, \text{ kde}$$

R- priemerný počet buniek v jednom štvorci,

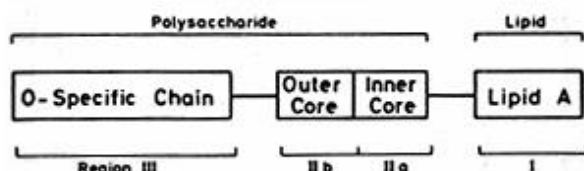
ZF- zried'ovací faktor,

V- celkový objem bunečnej suspenzie.

3.7.4 Stanovenie endotoxínov LAL testom

Bakteriálne endotoxíny (BET), v staršej literatúre označované aj ako lipopolysacharidy (LPS), sú zvyšky vonkajšej membrány bunkovej steny gramnegatívnych baktérií (Obr. 14). Ich prítomnosť v bunkových kultúrach môže ovplyvňovať výsledky biologického testovania a preto je nevyhnutné poznať ich koncentráciu v sledovaných vzorkách peptidov.

Pri stanovovaní množstva BET vo vzorkách peptidov bol použitý LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) test. Existujú rôzne varianty tohoto testu, ktoré sa líšia účinnosťou, deklarovanou citlivosťou lyzátu či technikou prevedenia skúšky. Účinnosť endotoxínov býva vyjadrená v medzinárodných jednotkách IU vyhlasovaných Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO). Jedna IU vyjadruje účinnosť endotoxínu vzťahnutú na 1 ml, prípadne 1 g (1 IU = 0,1 ng endotoxínu *E. coli* 0113: H10) a rovná sa jednej endotoxínovej jednotke (EU). Množstvo endotoxínov sa teda vyjadruje v jednotkách IU/ ml alebo EU/ ml. Deklarovaná citlivosť λ sa najčastejšie vyjadruje v jednotkách EU/ ml (g) alebo IU/ ml (g) [90] [91] [92].



Obr. 14 Štruktúra lipopolysacharidu [93].

Na testovanie prítomnosti endotoxínov vo vzorkách sú v súčasnosti dostupné nasledujúce techniky:

1. Gélová (limitná skúška alebo semi- kvantitatívna metóda)- založená na tvorbe gélovej zrazeniny,
2. turbidimetrická (kinetická metóda alebo metóda koncového bodu)- založená na rozvoji turbidity po štiepení endogénneho substrátu,
3. chromogénna (kinetická metóda alebo metóda konečného bodu)- založená na rozvoji farebnej reakcie po štiepení chromogénneho komplexu [90] [91] [92].

V predkladanej práci bola prítomnosť hladiny endotoxínov detekovaná najskôr pomocou gélovej metódy a kvantifikácia prebehla s využitím chromogénnej metódy.

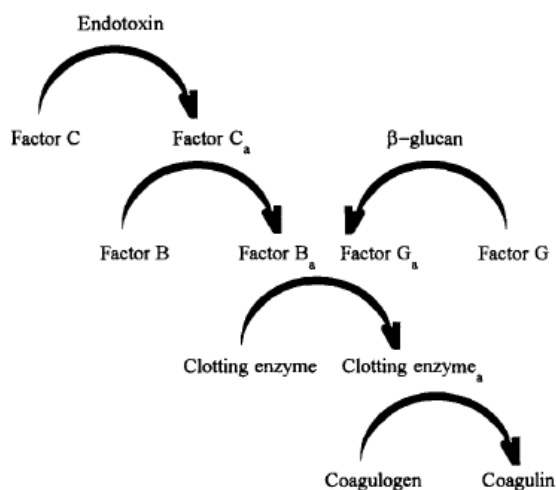
A: Gélová metóda

Na tento test bol využitý kit s deklarovanou citlivosťou 0,06 IU/ ml od firmy Associates of Cape Cod incorporated Inc., East Falmouth, Massachusetts. Ako kontrolný štandardný endotoxín (so skratkou CSE) je v uvedenom kite využitý purifikovaný extrakt z kmeňa *E. coli* 0113:H10. Tento kmeň je rovnaký ako kmeň využívaný v Americkej a Európskej

Pharmacopoeia ako referenčný štandardný endotoxín [90] [91]. Prítomnosť endotoxínov s týmto kitom bola sledovaná vo vzorke RGD peptidu rozpustenom na koncentráciu 1 mg/ ml LAL reakčnou vodou (LRW, z angl. *LAL reagent water*).

Gélová metóda stanovenia endotoxínov je limitnou skúškou, ktorou je možné detekovať prítomnosť BET vo vzorke v koncentrácii rovnakej alebo vyššej ako je deklarovaná citlivosť lyzátu $\lambda = 0,06$ IU/ml. V prípade prítomnosti BET v koncentrácii $\geq 0,06$ IU/ml dochádza v skúmavkách po uplynutí reakčnej doby ku vytvoreniu celistvého kompaktného gélu.

Princíp metódy: Lyzát amebocytov pacifického kraba *Limulus polyphemus* obsahuje proteíny zahrnuté v koagulačných mechanizmoch. K spusteniu kaskády zrážacích reakcií dochádza po aktivácii endotoxínmi. Konečným krokom je rozštiepenie proteínu koagulogénu. Nerozpustný koagulín sa na základe iónových interakcií zlučuje a vytvára tak zrazeninu, ktorej objavenie sa v teste je dôkazom prítomnosti endotoxínov v sledovanej vzorke (Obr. 15) [94] [95].



Obr. 15 Schématické znázornenie reakcií vedúcich ku tvorbe zrazeniny v gélovom LAL teste so znázornením alternatívnej β -glukánovej dráhy (prevzaté z [96]).

Postup:

Príprava BET s koncentráciou 4 λ : Na začiatku bolo potrebné pripraviť štandardný roztok bakteriálneho endotoxínu (CSE) s $c=1000$ IU/ml podľa priloženého certifikátu. CSE bol rekonštituovaný sterilnou LRW vodou.

V priložených apyrogénnych skúmavkách bol BET nariedený na 4 λ zo zásobného roztoku CSE (viď. Tab. 4). Koncentrácia štandardného roztoku 4 λ je koncentrácia, ktorá sa pridáva do pozitívnej produktovej kontroly (PPC) v množstve 50 μ l, čím sa získa roztok o koncentrácii 2 λ , teda dvojnásobok citlivosti lyzátu. Výsledok po prídavku 4 λ musí byť v uvedených prípadoch vždy pozitívny.

Tab. 4 Riedenie BET na koncentráciu 4- násobku citlivosti (4λ)

Objem (μl) a koncentrácia (IU/ ml)riedených roztokov	Objem riediacej LRW (μl)	Získaná koncentrácia roztoku (IU/ ml)
200 (1000)	1800	100
200 (100)	1800	10
200 (10)	1800	1
500 (1)	1500	0,25 (4λ)

Príprava lyzátu: Z nádoby s lyzátom bola opatrne odstránená zátka a bol do nej napipetovaný výrobcom predpísaný objem pufru. Ku vzorkám a kontrolám bol lyzát pridávaný v množstve 100 μl.

Vlastné prevedenie skúšky: Na začiatku boli prichystané dva stojany, do ktorých bol vložený vhodný počet apyrogénnych skúmaviek. Do prvého boli umiestnené štyri skúmavky určené na riedenie štandardného roztoku endotoxínu (vid'. príprava BET s koncentráciou 4λ). Do druhého stojanu bolo prichystané dvojnásobné množstvo reakčných skúmaviek ako je počet vzoriek určených na analýzu (jedna skúmavka na vzorku a jedna pre PPC). Rovnako aj pre negatívnu a pozitívnu kontrolu boli do rovnakého stojanu vložené dve reakčné skúmavky.

Následne bol na základe postupného riedenia (Tab. 4) v príslušných skúmavkách pripravený roztok endotoxínu CSE s koncentráciou 4 λ. Do reakčných skúmaviek radených za sebou bolo napipetovaných 100 μl vzorky a do ďalších reakčných skúmaviek 50 μl roztoku vzorky. Do reakčných skúmaviek určených pre PPC bolo navyše pridaných 50 μl štandardného roztoku BET s koncentráciou 4 λ. Do dvoch reakčných skúmaviek určených pre negatívnu kontrolu bolo napipetovaných 100 μl LRW a do ďalších dvoch reakčných skúmaviek určených pre pozitívnu kontrolu bolo okrem 50 μl LRW pridaných aj 50 μl štandardného roztoku BETs koncentráciou 4 λ. Do všetkých skúmaviek (t. j. pre vzorky, PPC, pozitívnu aj negatívnu kontrolu) bol rýchlo pridaný objem 100 μl LAL. Nakoniec sa stojanom mierne zatriaslo, čím sa docielilo premiešanie jednotlivých zložiek. Stojan sa umiestnil do termobloku vytemperovaného na teplotu $37,0 \pm 1,0$ °C, kde sa skúmavky inkubovali po dobu 60 ± 2 minúty.

Po uplynutí reakčnej doby bol stojan vybraný z termobloku a všetky skúmavky boli opatrne a zároveň čo najrýchlejšie otočené o 180°. Pokiaľ sa vytvoril pevný gél, ktorý po otočení skúmavky zostal na mieste neporušený, hodnotil sa výsledok skúšky ako pozitívny (plus). Výsledok sa hodnotil ako negatívny (mínus), pokiaľ nevznikol celistvý gél. Výsledky boli zaznamenávané do pripravenej tabuľky pomocou znamienok plus a mínus.

B: Chromogénna metóda

Tento postup bol optimalizovaný pre kit s deklarovanou citlivosťou 0,01 IU/ml od firmy Associates of Cape Cod incorporated Inc., East Falmouth, Massachusetts. a pri použití pufru Glucashield. Uvedený pufr bol špeciálne navrhnutý na blokovanie interferencie (1->3)- β -D-glukanov, ktorá býva často príčinou falošne pozitívnych výsledkov v dôsledku aktivácie glukan senzitívneho faktoru (faktoru G) v LAL (Obr. 15) [97]. Chromogénnou metódou bola stanovovaná koncentrácia endotoxínov vo vzorkách všetkých peptidov.

Princíp: Mechanizmus umožňujúci kvantifikáciu endotoxínov v chromogénnej metóde je založený na aktivácii enzýmov v sérii reakcií v LAL, ku ktorým dochádza v prítomnosti BET. Po aktivácii posledného enzýmu v kaskáde dochádza ku štiepeniu chromogénneho substrátu na peptidy a paranitro anilín (pNA) za objavenia sa žltého zafarbenia. Množstvo uvoľneného pNA a nameraná absorbancia pri 405 nm je úmerná množstvu endotoxínu v systéme. V tomto systéme je vidieť závislosť medzi koncentráciou endotoxínu a rýchlosťou reakcie, t.j. čím je koncentrácia endotoxínu vyššia, tým je reakcia rýchlejšia [98].

Postup:

Príprava BET: Na začiatku bolo potrebné pripraviť štandardný roztok bakteriálneho endotoxínu CSE s $c=1000$ IU/ml podľa priloženého certifikátu. Základný roztok bol uchovávaný pri teplote 2- 8°C maximálne po dobu 4 týždňov. Pri každom ďalšom použití bol kontrolný štandardný roztok CSE najskôr vytemperovaný na laboratórnu teplotu a vortexovaný v špeciálnom nástavci aspoň 20 minút pri otáčkach približne 600– 900 ot/min.

Príprava Pyrochrome LAL reagentie: Z nádoby s Pyrochrome LAL reagentiou bola opatrne odstránená zátk a bolo do nej napipetovaných 3,2 ml Glucashied pufru.

Skúška citlivosti kitu: Do prichystanej mikrotitračnej platničky bola postupne napipetovaná kalibračná rada (Tab. 5) v definovanom rozložení (Tab. 6). Do každej jamky bolo následne pridaných 50 μ l Pyrochrome LAL reagentie rozpustenej v pufre Glucashied. Po inkubácii 1 hodinu pri teplote 37 °C v ELISA readeri bola reakcia zastavená pridaním 25 μ l 50% kyseliny octovej. Nakoniec bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 405 nm.

Vlastné prevedenie skúšky: Do mikrotitračnej platničky bola najskôr napipetovaná kalibračná rada (Tab. 7). Následne boli do jednotlivých jamiek pipetované vzorky v objeme 50 μ l a PPC (25 μ l vzorky a 25 μ l BET). Do všetkých zaplnených jamiek bolo potom rýchlo a presne napipetovaných 50 μ l Pyrochrome LAL reagentie rozpustenej v pufre Glucashied. Mikrotitračná platnička bola umiestnená do ELISA readeru a inkubovaná po dobu 1 hodiny (prípadne dlhšie, až do zafarbenia najnižšieho bodu kalibračnej krivky) a pri teplote 37°C. Po inkubácii bola reakcia zastavená pridaním 25 μ l 50 % kyseliny octovej a následne bola okamžite zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 405 nm.

Tab. 5 Príprava kalibračnej rady na overenie citlivosti lyzátu pri chromogénnej metóde stanovovania endotoxínov.

Objem (µl) a koncentrácie (IU/ml) riedených roztokov	Objem riediacej LRW vody (µl)	Získané koncentrácie roztokov (IU/ml)
20 (1000)	1980	10
200 (10)	1800	1
200 (1)	1800	0,1
200 (0,1)	1800	0,01
200 (0,01)	1800	0,001
200 (0,001)	1800	0,0001

Tab. 6: Rozmiestnenie bodov kalibračnej krivky (vyjadrených v jednotkách IU/ ml) na mikrotitračnej platničke pri overovaní citlivosti lyzátu pri chromogénnej metóde stanovenia endotoxínov.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						X	X					
B						10	10					
C						1	1					
D						0,1	0,1					
E						0,01	0,01					
F						0,001	0,001					
G						0,0001	0,0001					
H						LRW	LRW					

Tab. 7 Príprava kalibračnej rady na stanovenie endotoxínov chromogénnou metódou.

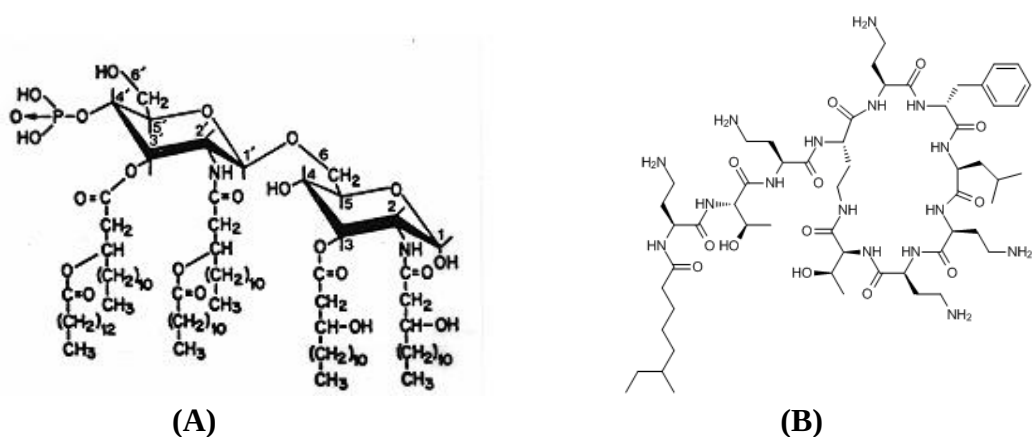
Objem (µl) a koncentrácie (IU/ ml) riedených roztokov	Objem riediacejLRW vody (µl)	Získané koncentrácie roztokov (IU/ ml)
100 (5)	1900	0,5
200 (1)	1800	0,1
100 (0,5)	1900	0,05
20 (0,1)	1800	0,01
100 (0,05)	1900	0,005
200 (0,01)	1800	0,001

3.7.5 Odstraňovanie endotoxínov kolónkami

Na odstraňovanie endotoxínov zo vzorky RGD peptidu rozpusteného v kultivačnom médiu na koncentráciu 1 mg/ml boli využité kolónky Detoxi- gelTM Endotoxin Removing columns od firmy Thermo Scinetific, Inc.

Princíp: Endotoxíny (lipopolysacharidy) sú zvyšky vonkajšej membrány bunkovej steny gramnegatívnych baktérií. Kolónky na odstraňovanie endotoxínov sú naplnené imobilizovaným polymixínom B, ktorý je vhodný na naväzovanie a odstraňovanie pyrogénov z roztoku. Polymixíny sú zaradované medzi antibiotiká obsahujúce kationický cyklopeptid s reťazcom mastnej kyseliny. Ku neutralizácii biologickej aktivity endotoxínov dochádza po naviazaní ich lipidickej časti A na polymixínovú náplň (Obr. 16 A a B) [99].

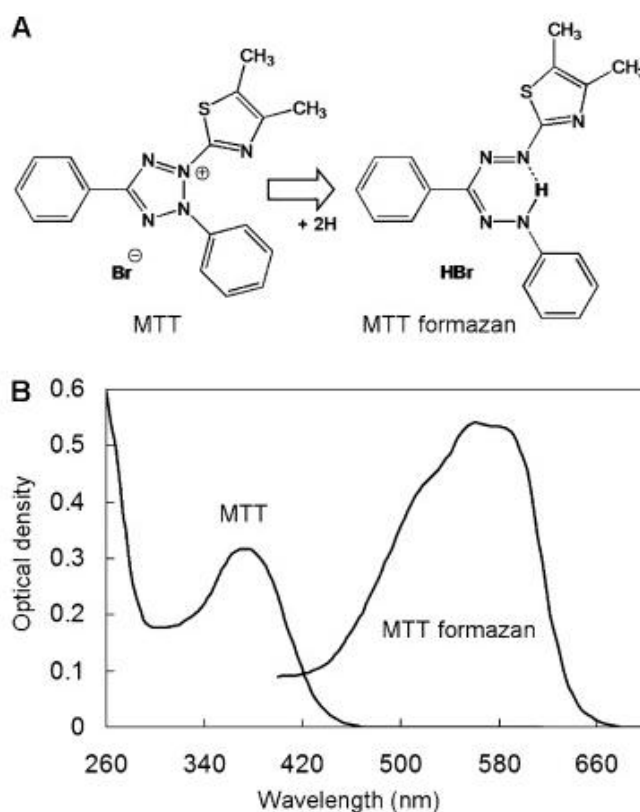
Postup: Na začiatku experimentu boli kolónky zvonku opláchnuté izopropanolom, zo spodnej časti boli odstránené uzávery a umiestnené do 15 ml skúmavky. Po pretečení skladovacieho roztoku do skúmavky nasledovalo postupné pipetovanie 5 ml regeneračného roztoku. Počas celého procesu bol kontrolovaný odtok v skúmavke a v prípade potreby bol vylievajú do pripraveného odpadu. Nasledovalo prepláchnutie 5 ml injekčnej vody a 5 ml PBS. Po stečení oboch roztokov bola kolónka premiestnená do novej 15 ml skúmavky a postupne bolo pridávané 5 ml média sterilizovaného za použitia 0,22 µm bakteriálneho filtru. Po odtečení média bola kolónka opätovne premiestnená do pôvodnej 15 ml skúmavky a postupne bolo pridávaných najskôr 5 ml regeneračného roztoku a potom 5 ml injekčnej vody. Nakoniec bola zaliata skladovacím roztokom a na spodnú časť bola umiestnená zátk. Počas celého procesu bolo nutné dbať o neustále dopĺňanie roztokov do kolónky. Jej vyschnutie by mohlo viesť ku znehodnoteniu, čím by sa znemožnilo opakovane ju použiť.



Obr. 16 (A) Štruktúra zvyšku lipidickej časti A lipopolysacharidu [93], (B) Štruktúra polymixínu B [100].

3.7.6 Meranie viability buniek MTT metódou

Princíp: MTT esej je založená na redukcii žltého rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný modrý MTT- formazan (Obr. 17 A). Reakcia je lokalizovaná na mitochondriálnej membráne živých buniek a kľúčovými sú enzými mitochondriálne dehydrogenázy. Ku rozpusteniu formazanu dochádza po pridaní silného detergentu. Výsledok tejto reakcie sa detekuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 540 nm (Obr. 17 B). Nameraná hodnota absorbancie vypovedá o zastúpení živých buniek vo vzorke (čím tmavšia farba a teda vyššia absorbancia, tým vyššie percento živých buniek) [101].



Obr. 17 (A) Chemická štruktúra MTT a MTT- formazanu. (B) Absorpčné spektrum MTT a MTT- formazanu [102].

Postup: Mikrotitračné platničky boli vytiahnuté z termostatu a v laminárnom boxe bol pridaný do jamiek čerstvo pripravený roztok MTT v objeme 10 %, tj. v prípade 96 jamkového panelu k 200 μ l média 20 μ l roztoku MTT. Po miernom premiešaní boli platničky inkubované v termostate pri teplote 37 $^{\circ}$ C po dobu 2,5 hodiny zabalené v alobale. Po vytiahnutí z termostatu bolo nad výlevkou opatrne sklepané médium s MTT roztokom (prípadne bolo odsané pipetou) a osušené s pripravenými utierkami. Následne bol pridaný solubilizačný

roztok v objeme 220 μ l a panel bol inkubovaný po dobu 30 minút na stolnej trepačke opäť zabalený v alobale. Nakoniec bol odňatý kryt z panelu, umiestnený do Microplate Readeru Versa Max so softwarom SOFT max PRO a absorbancia bola zmeraná pri vlnových dĺžkach 570 nm a 690 nm (pozadie) metódou konečného bodu. Výsledná absorbancia je rozdielom A(570)- A(690). V priebehu celého experimentu je nutné pracovať pri vypnutom svetle!

Ovplyvňovanie adherentných buniek: Adherentné bunky boli ovplyvňované po 24-hodinovej kultivácii v kompletnom rastovom médiu po nasadení na 96 jamkové panely (nasadzovacie hustoty vid'. Tab. 8). Viabilita bola meraná v štyroch časoch, konkrétne ihneď po ovplyvnení (čas t_0) a následne v 24 hodinových intervaloch po dobu troch dní (tj. časy t_{24} , t_{48} a t_{72}). Nasadené bunky boli v pilotnom experimente ovplyvňované piatimi rôznymi koncentraciami peptidov (50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml a 1000 μ g/ml), vo všetkých ostatných prípadoch boli ovplyvňované len tromi rôznymi koncentraciami peptidov (50 μ g/ml, 100 μ g/ml a 250 μ g/ml). Peptidy boli vážené v sterilnej váhovni, rozpustené vo vhodnom objeme kultivačného média a sterilizované cez 0,2 μ m filter pri dodržiavaní zásad sterilnej práce v laminárnom boxe. Rovnako boli do všetkých testovaní zahrnuté aj kontroly (neovplyvnené bunky) a slepé vzorky bez buniek (blank). Najčastejšie sa jednalo o tri paralely pre každú vzorku.

Pri vyhodnocovaní výsledkov boli získané hodnoty absorbancie korigované hodnotou slepých vzoriek. Následne bol vypočítaný priemer z paralelných vzoriek a stredná chyba priemeru (SEM). Nakoniec bol do grafu vynášaný percentuálny prírastok (úbytok) vzhľadom ku hodnote neovplyvnených buniek v čase 0 hodín a zostrojené chybové úsečky zo získaných SEM. Na určenie signifikancie výsledkov bol využitý *on-line* Studentov t test pre dve vzorky.

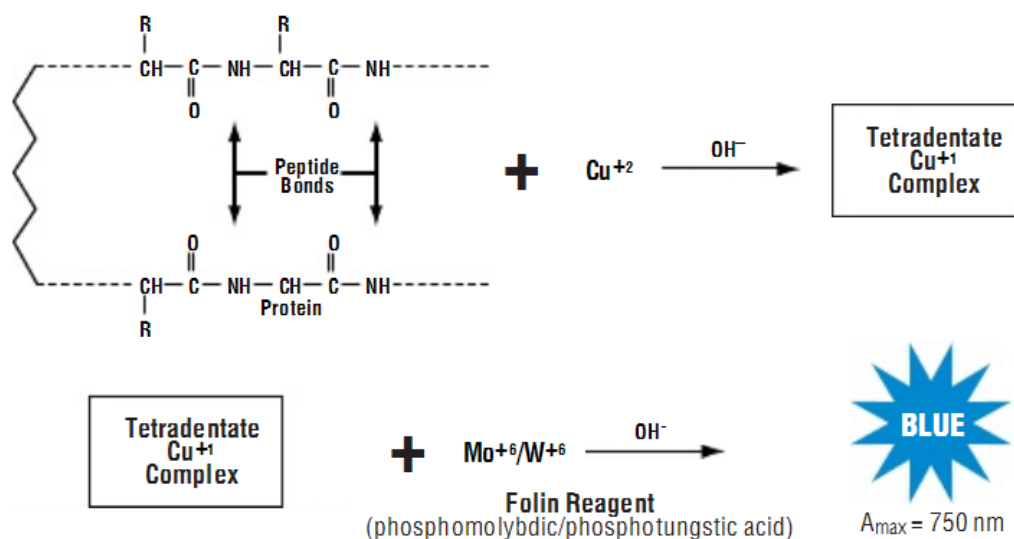
Tab. 8 Nasadzovacia hustota buniek

Počet jamiek	Profil jamky	Povrch pre rast (cm ²)	Objem jamky (μ l)	Nasadzovacia hustota (počet buniek/ jamka)
96	guľatý	0,35	345	3000
6	plochý	9,6	15 000	90 000

3.7.7 Stanovenie obsahu proteínov

Princíp metódy: Proteíny boli stanovované s pomocou kitu RCDC od firmy Bio- Rad. Stanovenie proteínov s týmto kitom je založené na protokole od Lowry a kol., 1951 [103] s modifikáciami smerujúcimi ku kompatibilite redukujúcich činidiel (RC) a detekujúcich činidiel (DC). Princípom Lowryho metódy je redukcia tzv. Folin-Ciocalteuova činidla proteínmi. Spomínané Folin-Ciocalteuova činidlo je zmes fosfowolfrámovej a fosfomolybdénovej kyseliny. Výsledkom reakcie činidla s proteínmi je vznik komplexov

molybdénovej modrej, ktorých množstvo sa detekuje spektrofotometricky. Reakcia je vo všeobecnosti citlivejšia na prítomnosť aminokyselín tyrozínu, tryptofánu a v menšej miere hystidínu a cysteínu v reťazci proteínu (Obr. 18) [104].



Obr. 18 Reakčná schéma modifikovanej Lowryho eseje na stanovenie proteínov [104].

Postup:

Príprava roztokov na zostavenie kalibračnej krivky: Na začiatku bolo navážené do suchej 1,5 ml skúmavky 1,6 mg BSA a rozpustené v 1 ml lýzačného pufru s inhibítormi proteáz za občasného vortexovania (približne 30 minút do úplného rozpustenia). Z tohto roztoku bol pipetovaný 0,5 ml do suchej 1,5 ml skúmavky, do ktorej bol následne pridaný 0,5 ml lýzačného pufru s inhibítormi proteáz (tzv. dvojkové riedenie). Týmto spôsobom bolo pokračované v dvojkovom riedení až do koncentrácie 0,1 mg/ml. Takto vznikla rada roztokov BSA v lýzačnom pufru s inhibítormi proteáz s koncentraciami: 1,6 mg/ ml; 0,8 mg/ ml; 0,4 mg/ ml; 0,2 mg/ ml; 0,1 mg/ ml spolu s blankom (tj. čistý lýzačný pufr s inhibítormi proteáz). Tieto boli postupne rozpipetované po 25 μl do suchých 2 ml skúmaviek. Nerozpipetované roztoky BSA boli ihneď zlikvidované.

Ovplyvňovanie adherentných buniek: Adherentné bunky boli ovplyvňované peptidmi rozpustenými v kultivačnom médiu na výslednú koncentráciu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ deň po nasadení na 6 jamkové panely (Tab. 7). Peptidy boli vážené v sterilnej váhovni a médium bolo sterilizované cez 0,2 μm filter. Bunky boli ovplyvňované pri dodržiavaní zásad sterilnej práce v laminárnom boxe.

Lýza buniek: V deň potreby bolo pripravené požadované množstvo Lýzačného pufru s inhibítormi proteáz. Následne boli 6- jamkové panely vytiahnuté z termostatu. Najskôr bol odsatých 25 μl média na stanovenie obsahu proteínov a po 1 ml na prípadné ďalšie

stanovenia. Bunky určené k lýze boli 2- krát prepláchnuté 1 ml PBS. Panely medzi premývaním boli ukladané na ľad a po druhom premytí boli vysušené na ľade po dobu 2 minút. Do jamiek panelu bolo potom napipetovaných 200 µl Lýzačného pufru s inhibítormi proteáz a bunky boli postupne uvoľňované zo dna krúživými pohybmi na ľade po dobu minimálne 10 minút. Na odstránenie buniek z panela bola použitá sterilná škrabka a uvoľnené bunky boli odsaté do pripravených 1,5 ml skúmaviek. Skúmavky boli umiestnené do ľadu na 30 minút, a počas tejto doby 3- krát sonikované (nastavenie ponorného sonikátoru: cyklus 1, amplitúda 60, čas 15 s). Bunečná suspenzia bola centrifugovaná vo vopred vychladenej centrifúge IEC CL31R Multispeed centrifuge (Thermo Electron Corporation) 30 minút pri teplote 4°C a 12 800 ot./ min. (15 000 g). Supernatanty boli preliate do prichystaných 0,5 ml skúmaviek a z nich bol následne prenesený objem 25 µl do 2 ml skúmaviek, v ktorých prebiehalo stanovenie proteínov. Nakoniec boli všetky skúmavky zamrazené na -20°C do ďalšieho spracovania.

Stanovenie obsahu proteínov: Na začiatku bola rozmrazená jedna kalibračná rada spolu s blankom a tiež lyzáty k analýze a všetky skúmavky boli dôkladne zvortexované. Následne bol do skúmaviek pridaný 125 µl RC Reagent I, opätovne zvortexovaný a necháný minimálne 1 minútu odstáť. Potom bolo pridaných 125 µl RC Reagent II a po zvortexovaní nasledovala centrifugácia 3 minúty pri 12 800 ot./min. (15 000 g) na centrifúge IEC CL31R Multispeed centrifuge (Thermo Electron Corporation). Po opatrnom zliatí supernatantu boli otvorené skúmavky vložené do vákuovej odparky na 40 minút pri teplote 35 °C. Do skúmaviek bol následne pridaný 127 µl RC Reagent A', tieto boli intenzívne vortexované a nechali sa odstáť po dobu minimálne 5 minút (do rozpustenia peletu). Nakoniec bol do skúmaviek pridaný 1 ml DC Reagent B a opakované vortexovanie. Po 15 minútach boli všetky lyzáty rozpipetované v tripletoch a kalibračná rada spolu s blankom po 200 µl do 96 jamkovej mikrotitračnej platničky a premeraná v Microplate Readeru pri 750 nm.

4 VÝSLEDKY

4.1 Charakterizácia peptidov

Na začiatku bolo potrebné zistiť základné fyzikálno- chemické vlastnosti peptidov. Peptidy boli dodané lyofilizované v 50 ml skúmavkách (Obr. 19). V závislosti od aminokyselinového zloženia vzoriek mali peptidy rôzny charakter, od drobných vločiek až po sypký biely prášok.

Z fyzikálno- chemických vlastností bola prioritne zisťovaná rozpustnosť. Nakoľko mnohé kozmetické suroviny sú vo vode nerozpustné, často sa využívajú aj organické rozpúšťadlá (napr. DMSO, metanol, atď.). Všetky štyri peptidy boli však vo vode úplne rozpustné, čo výrazne zjednodušilo ďalšie biologické testovanie.



Obr. 19 Fotky peptidov v 50 ml zaparafinovaných skúmavkách. Označenie jednotlivých vzoriek je umiestnené na priloženom papieri.

4.2 Stanovenie obsahu endotoxínov vo vzorkách peptidov

Pred samotným biologickým testovaním bolo nevyhnutné vylúčiť prítomnosť všetkých nežiadúcich mediátorov, ktoré by mohli akýmkoľvek spôsobom ovplyvniť výsledky. Nakoľko syntéza peptidov neprebiehala v sterilných podmienkach, do úvahy pripadala kontaminácia pyrogénmi. Medzi časté kontaminanty patria bakteriálne endotoxíny (BET). Ako už bolo viackrát spomenuté, BET sú zložky vonkajších stien gramnegatívnych (G^-) baktérií. Ku ich uvoľňovaniu do prostredia dochádza po ich rozpade, spôsobenom napr. použitím organických rozpúšťadiel počas syntézy peptidov, pri lyofilizácii vzoriek, príp. iným spôsobom.

Prítomnosť endotoxínov bola najskôr sledovaná vo vzorke RGD peptidu. S využitím LAL gélovej metódy bola v tomto peptide odhalená prítomnosť endotoxínov v koncentrácii vyššej ako je deklarovaná citlivosť lyzátu, t.j. $> 0,06$ IU/ ml. Schématické znázornenie výsledku tohto testu je v Tab. 9.

Tab. 9 Stanovenia endotoxínov vo vzorke RGD peptidu s koncentráciou 1 mg/ml gelovou metódou (kit s citlivosťou 0,06 IU/ml). Vysvetlenie: znamienko plus (+) indikuje vytvorenie celistvého gélu a prislúcha informácii o detekcii prítomnosti endotoxínov vo vzorke v koncentrácii $\geq 0,06$ IU/ml, znamienko mínus (-) má naopak znázorniť vytvorenie necelitého gélu a nesie opačnú informáciu ako je uvedená vyššie.

	RGD peptid	PPC	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola
1.	+	+	-	+
2.	+	+	-	+

Po preukázaní prítomnosti BET v RGD peptide bola stanovená jeho koncentrácia LAL chromogénnou metódou. Touto metódou bol obsah endotoxínov stanovovaný aj vo zvyšných troch peptidoch, menovite R2, R4 a R6. Obsah endotoxínov bol rovnako sledovaný aj vo vzorke RGD peptidu v kultivačnom médiu po použití kolóniek Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (od firmy Thermo Scientific, Inc.). Koncentrácia endotoxínov v jednotlivých vzorkách vyjadrená v jednotkách IU/ ml je zhrnutá v Tab. 10.

Tab. 10 Kvantifikácia obsahu endotoxínov vo vzorkách peptidov s využitím chromogénnej metódy po zohľadnení faktoru zriedenia.

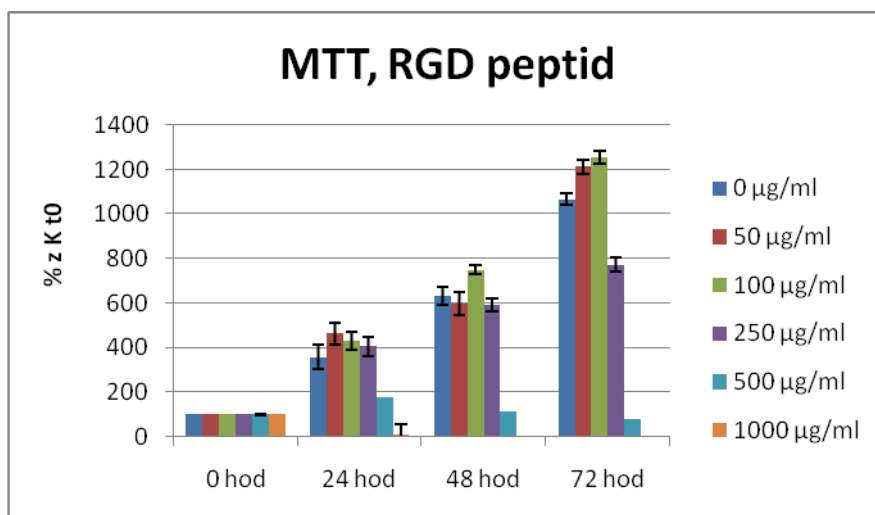
peptid- faktor zriedenia	množstvo endotoxínov (IU/ml)
R2-100x	45,881
R2-10X	3,8493
R4-100X	39,687
R4-10X	4,5806
R6-100X	37,746
R6-10X	4,7
RGD-100X	37,97
RGD-10X	4,2522
RGD- 100X (kolónkovaný)	17,597
RGD-10X (kolónkovaný)	3,991

4.3 Určenie optimálnej testovacej koncentrácie peptidov

Na sledovanie vplyvu rôznych koncentrácií RGD peptidu na viabilitu NIH/3T3 fibroblastov bol prevedený pilotný experiment na jednej šarži buniek pri jednej nasadzovacej hustote (3 000 b/ 0,35 cm²). Myšie fibroblasty boli ovplyvňované piatimi rôznymi

koncentraciami peptidu (konkrétne 50, 100, 250, 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Výsledky viabilitných MTT testov sú znázornené na Obr. 20.

Z Obr. 20 je zrejmé, že pri koncentráciách 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RGD došlo k výraznému poklesu viability myších fibroblastov. Na základe tohto zistenia sa maximálna koncentrácia na testovanie ďalších peptidov stanovila na hranicu 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Za optimálnu koncentráciu peptidov na ovplyvňovanie buniek za účelom sledovania ich vplyvu na proliferáciu bola zvolená koncentrácia 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pre všetky študované peptidy.

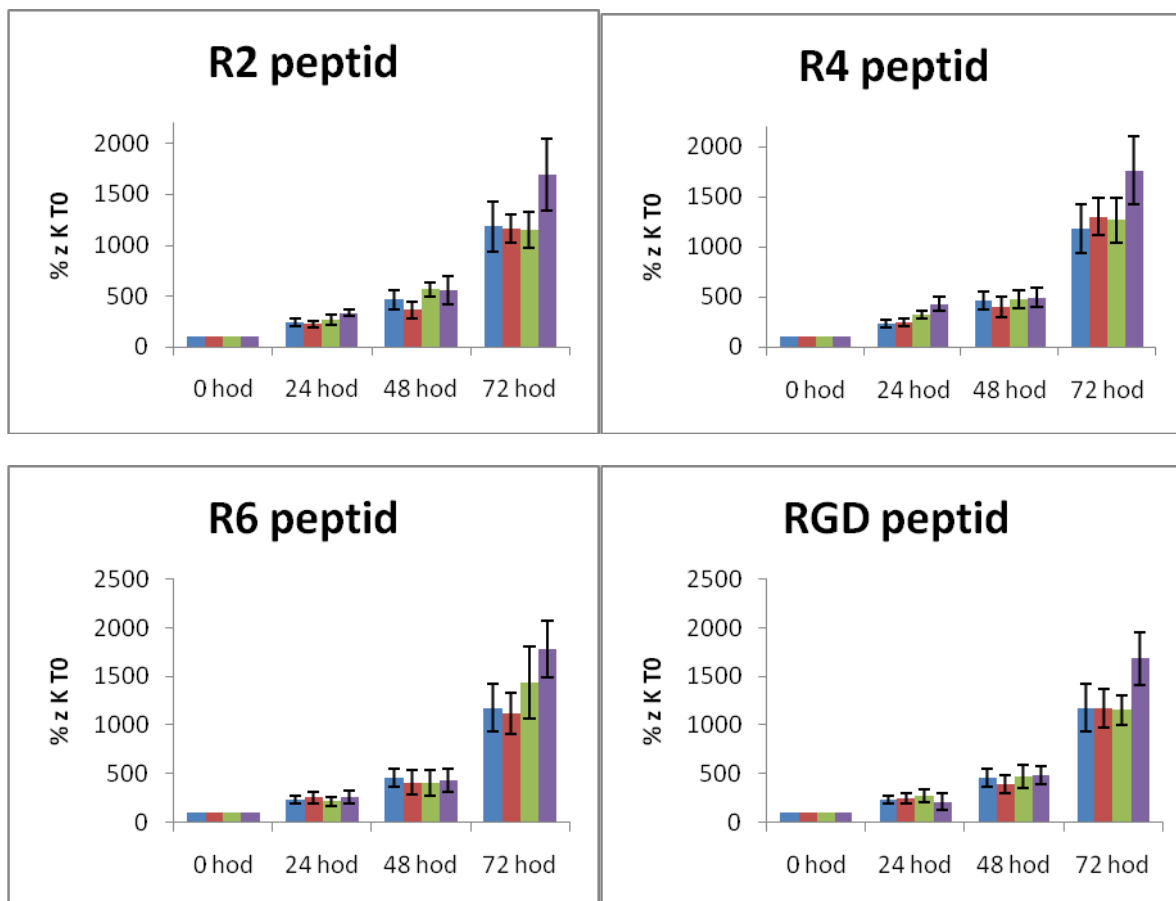


Obr. 20 Viabilita NIH/3T3 myších fibroblastov pri rôznych koncentráciách RGD peptidu v kultivačnom médiu stanovená s využitím MTT testu. Graf bol zostavený zo šiestich opakovaní ($n=6$) pre jednu šaržu buniek a sú v ňom znázornené $\pm$ SEM.

4.4 Sledovanie viability NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi

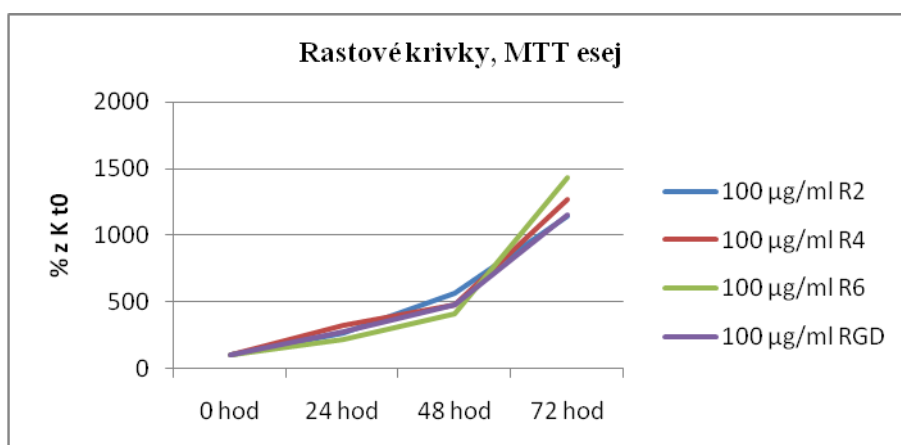
Výsledky zo sledovania vplyvu vybraných koncentrácií peptidov (50, 100 a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R2, R4, R6 a RGD) na viabilitu NIH/3T3 myších fibroblastov sú znázornené na Obr. 21. Pre lepšiu názornosť sú rovnako uvedené aj rastové krivky buniek po ovplyvnení peptidmi s koncentráciou 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Obr. 22).

Najvýraznejší stimulačný efekt na bunky NIH/3T3 myších fibroblastov po troch dňoch kultivácie bol zaznamenaný pri koncentrácii 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ u všetkých testovaných peptidov. Ani v jednom prípade neboli získané výsledky signifikantné. Najvyššia metabolická stimulácia bola zaznamenaná u R6 peptidu vo všetkých časoch v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. U všetkých študovaných peptidov bol zrejmý lineárny nárast viability buniek s rastúcou koncentráciou ovplyvňujúcich peptidov.



- 0 µg/ml
- 50 µg/ml
- 100 µg/ml
- 250 µg/ml

Obr. 21 Vplyv peptidov na viabilitu NIH/3T3 myších fibroblastov. Bunky boli nasadzované v hustote 3000 b/ 0,35 cm². Adherentné bunky boli ovplyvňované tromi rôznymi koncentraciami peptidov R2, R4, R6 a RGD (50, 100 a 250 µg/ml) a ich viabilita bola meraná pomocou MTT testu. Grafy sú zostavené z troch nezávislých opakovaní (n=3) a sú v nich znázornené +/- SEM. $P \leq 0.05$ štatistická významnosť vs. neovplyvnená kontrola v danom čase pomocou Studentovho t testu nebola odhalená.

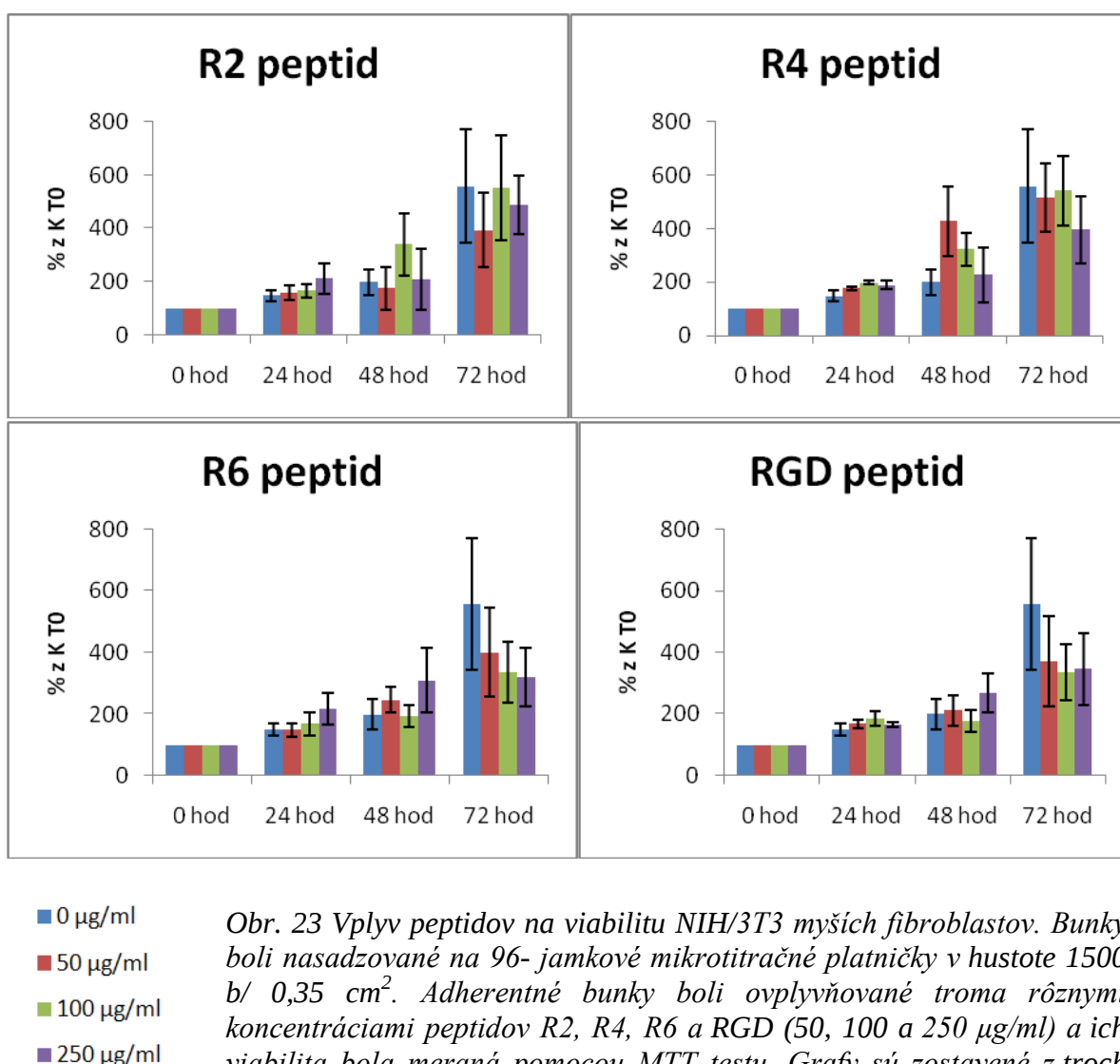


Obr. 22 Rastové krivky NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi s koncentráciou 100 µg/ml (nasadzovaných v hustote 3000 b/ 0,35 cm²). Bunková viabilita bola stanovená pomocou MTT testu. Grafy sú zostavené z troch nezávislých opakovaní (n=3).

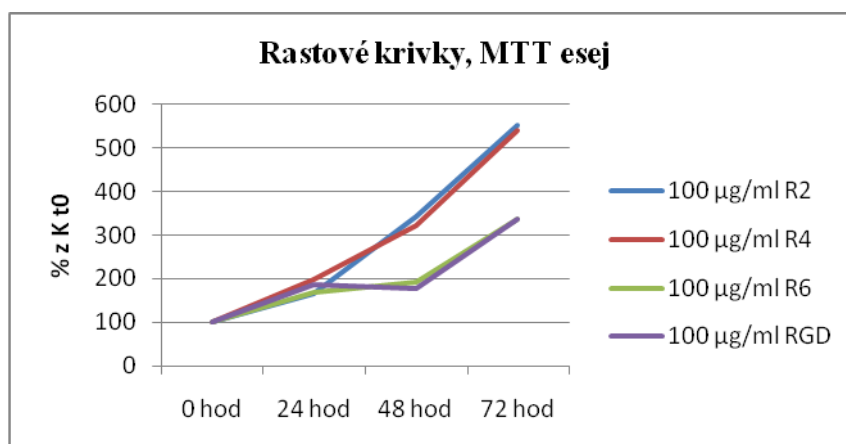
4.5 Sledovanie vplyvu zníženia nasadzovacej hustoty na rast NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi

Vplyv peptidov na viabilitu fibroblastov bol študovaný aj v zmenených podmienkach. Pre účely tejto práce bolo zaujímavé sledovať viabilitu pri zníženej nasadzovacej hustote buniek pri inak zachovaných kultivačných podmienkach. Tri odlišné šarže NIH/3T3 myších fibroblastov boli preto nasadené na 96- jamkové mikrotitračné platničky v polovičnej hustote, tzn. 1 500 b/ 0,35 cm². Po 24- hodinovej kultivácii boli adherentné bunky ovplyvňované príslušnými koncentráciami skúmaných peptidov.

Výsledky MTT testov pre všetky peptidy v sledovanej koncentračnej rade (0, 50, 100 a 250 µg/ ml) sú uvedené na Obr. 23. Pre lepšiu názornosť sú na Obr. 24 uvedené aj rastové krivky buniek po ovplyvnení peptidmi s koncentráciou 100 µg/ ml.



Obr. 23 Vplyv peptidov na viabilitu NIH/3T3 myších fibroblastov. Bunky boli nasadzované na 96- jamkové mikrotitračné platničky v hustote 1500 b/ 0,35 cm². Adherentné bunky boli ovplyvňované tromi rôznymi koncentráciami peptidov R2, R4, R6 a RGD (50, 100 a 250 µg/ml) a ich viabilita bola meraná pomocou MTT testu. Grafy sú zostavené z troch nezávislých opakovaní (n=3) a sú v nich znázornené +/- SEM. $p \leq 0.05$ štatistická významnosť vs. neovplyvnená kontrola v danom čase nebola pomocou Studentovho t testu odhalená. Neošetrená kontrola nebola odhalená.



Obr. 24 Rastové krivky NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvnených peptidmi s koncentráciou 100 µg/ml. Bunková viabilita bola stanovená pomovou MTT testu. Grafy sú zostavené z troch nezávislých opakovaní ($n=3$).

Najvyššia metabolická odozva bola po trojdňovej kultivácii sledovaná u neovplyvnených buniek. Pri bunkách ovplyvnených peptidmi bol naopak zaznamenaný pokles viability, ktorý ani v jednom prípade nebol signifikantný. Výraznejšia stimulácia metabolizmu NIH/3T3 myších fibroblastov bola odhalená len v čase 48 hodín u peptidu R4 pri testovaných koncentráciách 50 a 100 µg/ml. U tohto peptidu bol taktiež detekovaný aj najnižší, takmer zanedbateľný pokles viability v čase 72 hodín po ovplyvnení v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. V získaných výsledkoch nebola odhalená žiadna závislosť medzi rastúcou koncentráciou peptidov a zvýšenou metabolickou odozvou v sledovanom intervale troch dní. Zreteľné je skôr spomalenie bunkového metabolizmu u ovplyvnených vzoriek v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou.

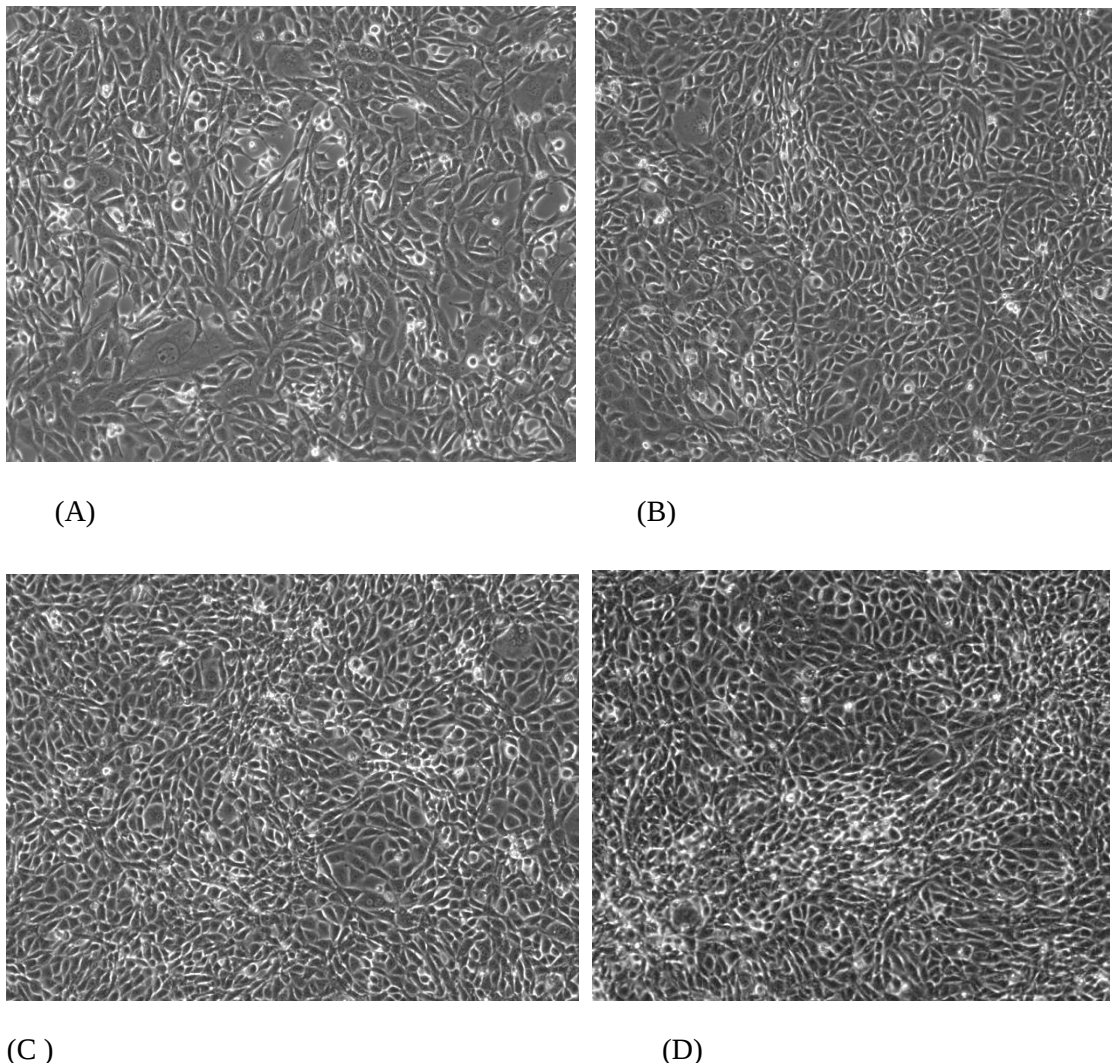
4.6 Zhodnotenie morfológie buniek ovplyvnených peptidmi

Nielen sledovanie viability buniek ale aj zhodnotenie morfológických zmien po ovplyvnení peptidmi je súčasťou základných bezpečnostných *in vitro* testov. V predkladanej práci bola morfológia buniek sledovaná pod svetelným mikroskopom Nikon Ti Eclipse pri 100-násobnom zväčšení pre obe študované koncentrácie buniek.

V oboch študovaných systémoch, tzn. s vyššou aj nižšou počiatočnou nasadzovacou hustotou myších fibroblastov (90 000 buniek/ 9,6 cm², resp. 45 000 buniek/ 9,6 cm²), boli bunky sledované v 24-hodinových intervaloch po ovplyvnení (v časoch 0, 24, 48 a 72 hodín).

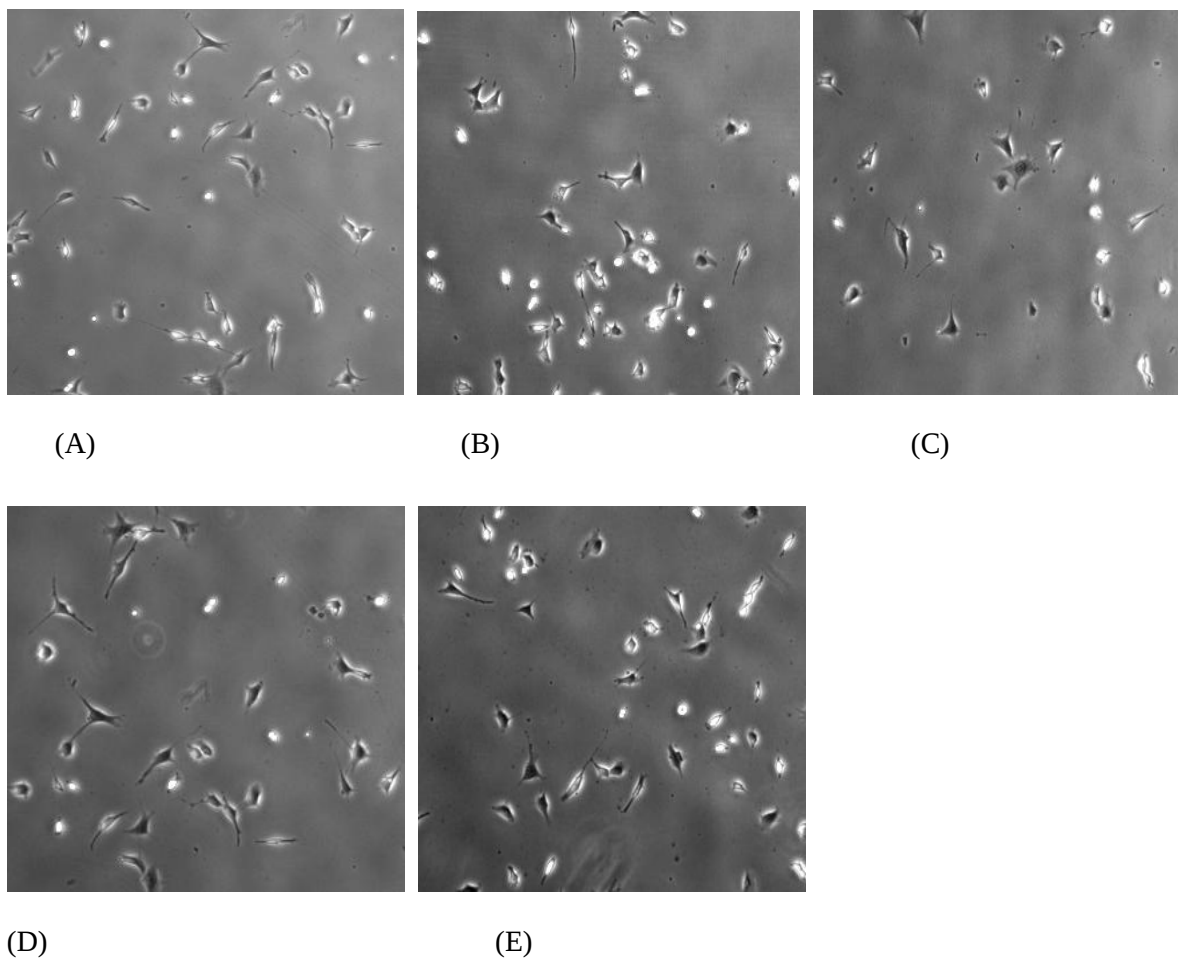
V prvom študovanom prípade (t.j. s počiatočnou nasadzovacou hustotou 90 000 buniek/ 9,6 cm²) bolo zaujímavé pozorovať morfológiu fibroblastov v čase 48 a 72 hodín bez ovplyvnenia, resp. po ovplyvnení peptidom R4 v koncentrácii 100 µg/ml. V čase 48 hodín po ovplyvnení R4 peptidom (Obr. 25 B) bolo vidieť, že bunky majú menej pretiahnutý tvar v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou (Obr. 25 A). V čase 72 hodín od ovplyvnenia

peptidmi aj v neošetrenej kontrole bunky dosahovali stav konfluencie (pre ilustráciu sú uvedené fotky vid'. Obr. 25 B a D).



Obr. 25 Bunkové kultúry NIH/3T3 myších fibroblastov (A) 48 hodín bez ovplyvnenia, (B) 48 hodín po ovplyvnení peptidom R4 s koncentráciou 100 µg/ml, (C) 72 hodín bez ovplyvnenia, (D) 72 hodín po ovplyvnení peptidom R4 s koncentráciou 100 µg/ml. Fotky boli získané pri 100- násobnom zväčšení a pri počiatočnej nasadzovacej hustote 90 000 buniek/ 9,6 cm².

Nakoľko v prvom študovanom prípade sa dalo len veľmi obtiažne sledovať zmeny v morfológii individuálnych myších fibroblastov, druhý systém (bunky nasadzované na 6-jamkové panely v hustote 45 000 buniek/ 9,6 cm²) túto možnosť poskytoval. Adhézia fibroblastov na dno kultivačnej jamky a ich postupné šírenie je dokumentované na Obr. 26 A-E. Na Obr. 26 A a B je možné vidieť väčšie množstvo zagulatených buniek, ktoré neadherovali na povrch plastu. Naopak, Obr. 26 D demonštruje šíriace sa bunky fibroblastov s početnými výbežkami.

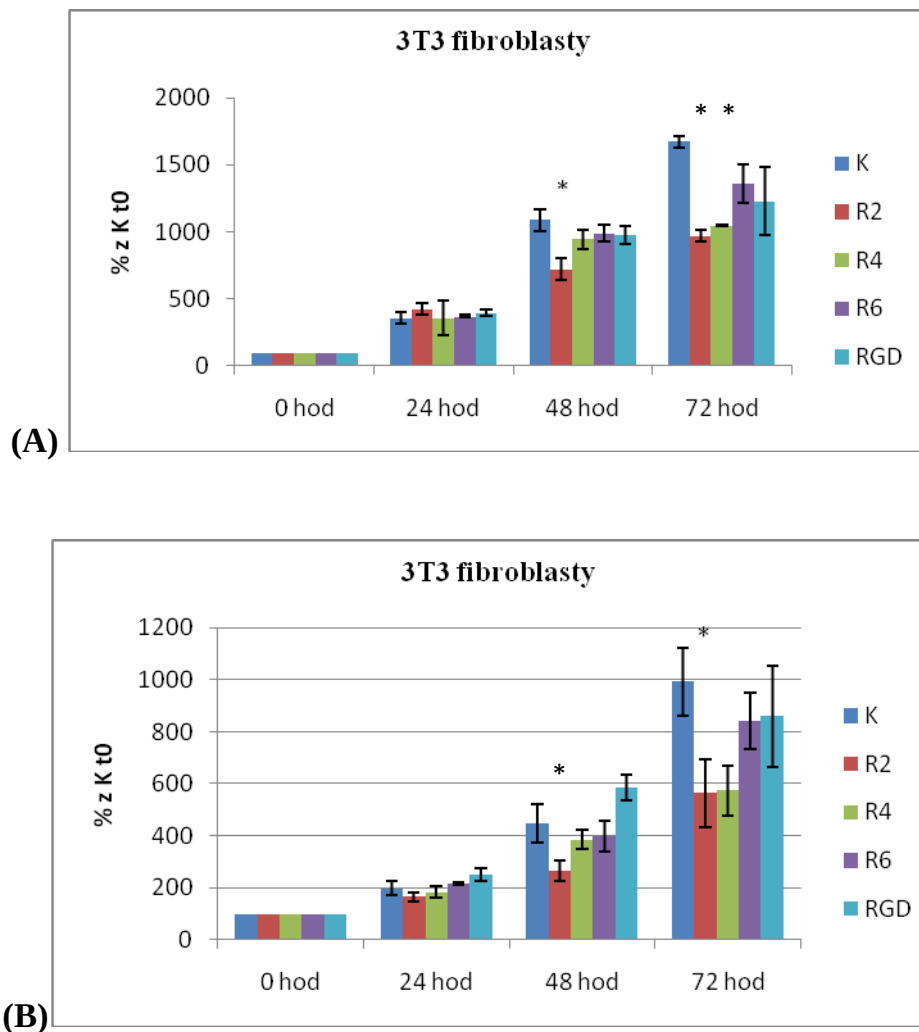


Obr. 26 Bunkové kultúry NIH/3T3 myších fibroblastov (A) 24 hodín po ovplyvnení peptidom R2, (B) 24 hodín po ovplyvnení peptidom R4, (C) 24 hodín po ovplyvnení peptidom R6, (D) 24 hodín po ovplyvnení peptidom RGD, (E) 24 hodín bez ovplyvnenia. Fotky boli získané pri 100- násobnom zväčšení pri počiatočnej nasadzovacej hustote 45 000 buniek/ 9,6 cm² a koncentrácii ovplyvňujúcich peptidov 100 µg/ml.

Nárast množstva buniek po ovplyvnení jednotlivými peptidmi a rovnako aj neovplyvnenej kontroly bol zaznamenaný aj pri 40- násobnom zväčšení. Tieto fotky sú uvedené v Prílohe č. 2, resp. v Prílohe č. 3.

4.7 Sledovanie vplyvu jednotlivých peptidov na akumuláciu proteínov v bunkovej kultúre NIH/3T3 myších fibroblastov

Paralelne s MTT testom bolo pri dvoch nasadzovacích hustotách (90 000 b/ 9,6 cm², resp. 45 900 b/ 9,6 cm²) kvantifikované množstvo proteínov v bunkových kultúrach NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvňovaných peptidmi s koncentráciou 100 µg/ml. Získané výsledky sú sumarizované na Obr. 27.



Obr. 27 Stanovenie obsahu proteínov v NIH/3T3 myších fibroblastoch nasadených na 6-jamkové kultivačné panely v hustote (A) 95 000 b/ 9,6 cm², resp. (B) 45 000 b/ 9,6 cm² po ovplyvnení peptidmi R2, R4, R6 a RGD s koncentráciou 100 µg/ml pomocou RCDC kitu. Grafy sú zostavené z troch nezávislých opakovaní (n=3) a sú v nich znázornené +/- SEM. $P \leq 0.05$ štatistická významnosť vs. neovplyvnená kontrola v danom čase určená zo Studentovho t testu je znázornená hviezdikou.

5 DISKUSIA

5.1 Vplyv koncentrácie endotoxínov na viabilitu fibroblastov

Pred samotnými viabilitnými testami bol sledovaný vo vzorkách peptidov obsah endotoxínov chromogénnou metódou. Vo všetkých vzorkách bola nameraná ich koncentrácia rádovo v jednotkách až desiatkach IU/ ml (podrobnejšie vid'. kapitola 4.2). Vyšší obsah endotoxínov bol zaznamenaný aj po použití kolóniek s polymixínovou náplňou. Nízku účinnosť týchto kolóniek, na ktorých je výrobcom deklarované odstránenie ≥ 9995 EU z 5 ml vzorky obsahujúcej 10,000 EU na 1 ml náplne (vid'. Návod ku kolónkam Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel od Thermo Scientific Inc.), je možné vysvetliť prítomnosť proteínov v médiu. RGD peptid bol totiž rozpúšťaný v rastovom médiu s obsahom BOFES. Je teda možné, že tesné naviazanie proteínov zabránilo interakcii a väzbe endotoxínov na polymixínovú náplň a zamedzilo ich odstráneniu z média.

Vo vzorkách peptidov bola teda odhalená prítomnosť endotoxínov, ktorá je úmerná množstvu rádovo 0,1 ng/ ml až 10 ng/ ml lipopolysacharidu *E. coli* 0113:H10. Pred samotnými testami viability bolo teda potrebné zistiť, či takéto množstvo môže ovplyvniť ich výsledok. Yang a kol. (2006) testovali vplyv rôznych koncentrácií LPS (konkrétne 5, 10, 50, 100, 500 a 1000 ng/ml LPS *E. coli* 055:B5) na ľudské kožné fibroblasty pomocou MTT testu a počítaním množstva buniek pod invertovaným mikroskopom s fázovým kontrastom v intervale deviatich dní od ovplyvnenia. Nárast absorbancie zaznamenali v koncentračnej rade 5- 500 ng/ ml, pričom najsilnejší efekt zaznamenali u buniek ovplyvňovaných LPS s koncentráciou 100 ng/ ml. Tieto rozdiely sledovali od piateho po deviaty deň od ovplyvnenia LPS. Pokles v nameranej absorbancii zaznamenali pri ovplyvňovaní buniek LPS s koncentráciou 1 000 ng/ ml od tretieho až po deviaty deň [108].

Podobné výsledky Yang a kol. získali aj pri štúdiu extraktov z listov *Chromo-laena odorata*, u ktorých chceli dokázať ich mitogénny účinok na ľudské kožné fibroblasty a keratinocyty. U týchto extraktov totiž uvažovali o potencionalnej prítomnosti LPS a zaujímalo ich teda, aký vplyv môžu mať na proliferáciu uvedených buniek. Ako už bolo viackrát spomenuté, endotoxíny môžu zohrávať úlohu v raste buniek a buď prispievať alebo byť plne zodpovedné za mitogénnu aktivitu. Bunky preto nasadili na 96- jamkové mikrotitračné platničky a ovplyvňovali ich LPS rozpustenými v rastovom alebo základnom médiu na výslednú koncentráciu 0,0 ng/ ml (0 IU/ ml) až 5000 ng/ ml (50 000 IU/ ml). MTT testom potom sledovali rast buniek v priebehu desiatich dní. Zistili, že LPS v koncentrácii medzi 50 ng/ ml (500 IU/ ml) a 500ng/ ml (5000 IU/ ml) v rastovom médiu významne stimuluje proliferáciu fibroblastov po inkubácii dlhšej ako šesť dní. Na stimuláciu rastu fibroblastov v základnom médiu bol však potrebný dlhší interval a to viac ako osem dní [109].

Vplyv LPS na proliferáciu buniek a syntézu kolagénu bol sledovaný aj na normálnych ľudských fibroblastoch (NHDF, z angl. *normal human dermal fibroblast*). NHDF bunky boli v tejto práci stimulované definovanou koncentráciou LPS a kontinuálne pasážované. Pomocou MTT metódy bola sledovaná viabilita buniek v tretej pasáži po stimulácii odlišnými koncentraciami LPS (konkrétne 0 ng/ ml, 5 ng/ ml, 10 ng/ ml, 50 ng/ ml, 100 ng/ ml, 500 ng/

ml a 1000 ng/ ml). Zistili, že 100 ng/ml LPS (1000 IU/ml) má významný účinok na viabilitu NHDF buniek. Zaujímavým bolo aj zistenie, že po stimulácii 100 ng/ ml LPS a pasážovaní dochádza ku značným zmenám v profiloch génovej expresie. Jedná sa predovšetkým o zvýšenie expresie prokolagénu I a III a naopak zníženie expresie kolagenázy. Pravdepodobný mechanizmus je založený na zvýšení sekrécie TGF- β 1 (TGF- β 1 inhibuje proliferáciu a stimuluje apoptózu B buniek, kontroluje expresiu protilátok, transferínu a MHC II) a inhibície sekrécie IFN- γ (alebo typ II interferónu je cytokín s imunostimulačnými a imunomodulačnými účinkami, ktorý je kritický pre vnútornú a adaptívnu imunitu proti virálnej a vnútrobunkovej bakteriálnej infekcii) [110].

Z uvedených štúdií sa dá usudzovať, že prítomnosť endotoxínov v nameraných koncentráciách by nemala mať výrazný vplyv na viabilné testovanie. Nasyntetizované peptidy neboli preto čistené cez polymixínové kolónky a boli po prefiltrovaní cez 0,22 μ m filter rozpúšťané v kultivačnom médiu. Týmto boli následne 24 hodín od nasadenia ovplyvňované adherované myšie fibroblasty a ich viabilita bola sledovaná MTT testom a stanovením množstva proteínov pomocou RCDC kitu.

5.2 Stanovenie bezpečnej koncentrácie peptidov

V predkladanej práci boli študované štyri peptidy so základným motívom RGD. Nakoľko už od čias Paracelsusa je známe, že toxicita látok závisí na ich koncentrácii, boli rôzne koncentrácie peptidov podrobené viabilným testom. Viabilné testy sú založené na meraní aktivity pripadajúcej k udržaniu metabolizmu a prežívania buniek. Najčastejšie sú spojené s metabolickými markermi ako ATP alebo aktivitou "housekeeping" enzýmov, napr. mitochondriálnymi dehydrogenázami [105]. Medzi rozšírené patria testy založené na použití tetrazóliových solí ako MTT či jeho derivátoch XTT, WST-1. Na sledovanie viability buniek ovplyvnených rôznymi koncentráciami peptidov bola v tejto práci využitá MTT esej, ktorá odráža metabolickú aktivitu buniek [106]. Princíp tejto metódy leží v spektrofotometrickom sledovaní konverzie žltého MTT na fialový MTT- formazan mitochondriálnymi dehydrogenázami. MTT test vychádza z predpokladu, že aktivita mitochondriálnych enzýmov jednej bunky z populácie je konštantná a teda rýchlosť premeny MTT odráža množstvo buniek v kultúre. Z uvedeného vyplýva, že nevyhnutným predpokladom sú funkčné mitochondrie a táto metóda nie je vhodná na testovanie látok vplývajúcich na ich aktivitu [107]. MTT esej je preto vhodné prevádzať paralelne aj inými nezávislými testami. Pre účely tejto práce boli zvolené sledovanie morfológie buniek a kvantifikácia množstva proteínov v bunkách získaných po odsatí kultivačného média pomocou RCDC kitu.

Na zistenie bezpečnej koncentrácie študovaných peptidov bol zvolený RGD peptid. Z výsledkov MTT eseye je zrejmé, že pri koncentrácii peptidu 500 μ g/ ml dochádza už po 24 hodinách od ovplyvnenia k prudkému poklesu viability buniek. V prípade koncentrácie 1000 μ g/ ml bola v čase 24 hodín nameraná len minimálna absorbancia. V čase 48 a 72 hodín však

nebola nameraná žiadna absorbanca. Zo získaných výsledkov je evidentné, že RGD peptid vykazuje už pri koncentrácii 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytotoxický efekt. Tento je spôsobený nenávratným poškodením integrity membrány. V prípade buniek ovplyvňovaných peptidom s koncentráciou 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bol sledovaný v čase 72 hodín len mierny nesignifikantný pokles viability. Tento mohol byť spôsobený napr. tým, že prítomnosť RGD peptidu v médiu bránila správnej adhézii buniek, nepriaznivo ovplyvňovala rýchlosť replikácie alebo normálneho delenia buniek alebo dokonca spôsobovala až ich smrť apoptózou [105]. U sledovaných koncentrácií 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bol naopak zaznamenaný mierny nárast viability v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou (diskutovaný Obr. 26, kapitola 4.3).

Na základe tohto experimentu bola stanovená najvyššia testovaná koncentrácia peptidov na 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bunky boli ovplyvňované jednotlivými peptidmi v koncentračnej rade 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a ich vplyv na viabilitu bol sledovaný v dvoch systémoch líšiacich sa počiatočnou nasadzovacou hustotou buniek. Zaujímavé je zistenie, že výsledky MTT testov navzájom nekorešponujú (ani v jednom prípade však nebola dosiahnutá významná zmena v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou). V prípade buniek nasadzovaných vo vyššej počiatocnej hustote (3 000 buniek NIH/3T3 myších fibroblastov/ 0,35 cm^2) bol zaznamenaný nárast viability pri koncentrácii 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v čase 72 hodín od ovplyvnenia u všetkých testovaných peptidov (viď. Obr. 27, kapitola 4.4). V rovnakom čase bol však u buniek nasadených v polovičnej hustote a ovplyvnených tiež peptidmi s koncentráciou 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sledovaný pokles viability v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou (viď. Obr. 29, kapitola 4.5). Rozdiely v nameraných výsledkoch je možné vysvetliť rôzne. Jedným z dôvodov môže byť práve príliš nízka počiatočná nasadzovacia hustota buniek. Nevyhnutnou proliferáčnou podmienkou adhézných buniek je totiž vzájomná komunikácia a výmena signálov. Práve táto základná požiadavka nemusela byť splnená.

5.4 RGD peptidy a kozmetika

Peptidy s RGD motívom sú veľmi frekventované vo veľkom množstve aplikácii, kde je potrebné zabezpečiť adhéziu buniek k povrchu. V závislosti od modifikácie základnej RGD sekvencie je možné veľmi selektívne docieľiť interakciu so želaným integrínovým receptorom [111]. Cyklický pentapeptid s RGD motívom (presná sekvencia cyklo(Arg-Gly-Asp-DPhe-Aminocyklohexánová karboxylová kyselina)) bol uvedený aj na kozmetický trh ako aktívna látka s *anti-ageing* účinkom. Bol navrhnutý za účelom vysokej selektivity ku $\alpha\text{v}\beta 5$ a $\alpha\text{v}\beta 6$ integrínovým receptorom. Jeho deklarovaným účinkom je „*down-regulácia*” enzýmov degradujúcich ECM (kolagenázy 3 a elastázy A2) a naopak stimulácia produkcie proteínov bazálnej membrány, predovšetkým laminínu A4 a kolagénu 4 [112].

Peptidy sledované v tejto práci boli modifikované pridávaním linkeru zloženého zo šiestich glycínov v prípade peptidu R4 a R6. U peptidu R2 bol medzi druhým a štvrtým glycínom vložený alanín. Peptidy R4 a aj samotný RGD boli navyše modifikované aj zámenou hydroxylovej skupiny karboxylu amidickou skupinou. Ako už bolo spomínané, pridávanie glycínových linkerov ku RGD peptidom bolo navrhnuté Beerom a kol. Zmyslom tejto modifikácie malo byť dosiahnutie väzobného miesta vo vnútri globulárnej domény integrínu $\alpha\text{IIB}\beta 3$ [82] [83].

Na základe výsledkov MTT eseje a stanovenia proteínov nebol dokázaný signifikantný stimulačný účinok na proliferáciu NIH/3T3 myších fibroblastov ani u jedného zo študovaných peptidov. Naopak, stanovenie proteínov u buniek ovplyvnených peptidmi s koncentráciou 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ odhalilo inhibičný účinok na ich proliferáciu. V čase 72 hodín od ovplyvnenia bol totiž v oboch sledovaných systémoch (počiatočné nasadzovacie hustoty 90 000/ 9,6 cm^2 , resp. 45 000 buniek/ 9,6 cm^2) u všetkých peptidov zaznamenaný pokles v množstve proteínov. Signifikantné zníženie bolo zaznamenané u peptidov R2 a R4, pričom u peptidov R6 a RGD bol tento pokles nižší. Ku slabšej stimulácii proliferácie došlo snáď len u buniek nasadzovaných v nižšej hustote ovplyvnených RGD peptidom. V uvedenom prípade bol rovnako pozorovaný lineárny nárast obsahu proteínov v bunkách so stúpajúcou koncentráciou RGD peptidu (diskutovaný Obr. 27, kapitola 4.7).

V prípade, že by boli bunky kultivované na matrici s imobilizovanými RGD peptidmi a následne adherované bunky ovplyvňované rozpustenými RGD peptidmi, bol by tento pokles ľahko vysvetliteľný. Je totiž známe, že bunky sú závislé na prichytení a strata tohoto prichytenia vedie ku ich apoptóze označovanej termínom „anoikis“ (z gréckeho slova bezdomovectvo). Voľné peptidy vystupujú teda ako antagonisti, nakoľko bránia väzbe buniek na matricu vedúcej ku ich adhézii cez integrínové receptory a preživanju. Namiesto toho obsadzujú tieto receptory a bunky sa oddeľujú od povrchu, zaguľacujú sa a zomierajú apoptózou. Táto inhibícia prichytenia je koncentračne závislá, pri koncentrácii 50 μM RGD dochádza ku redukcii prichytenia o 50 % a pri 500 μM RGD bola dokázaná kompletná redukcia prichytenia k matrici s imobilizovanými ligandami [83]. V tomto prípade by sa dali interpretovať aj rozdiely v množstve proteínov po ovplyvnení jednotlivými peptidmi. Z porovnávaného množstva proteínov u buniek ovplyvnených R4 a R6 peptidmi bol pozorovaný väčší pokles u peptidu R2. Nakoľko tieto peptidy majú rovnakú sekvenciu a líšia sa len koncovou skupinou (amidová skupina u R4, karboxylová skupina u R6) je pravdepodobné, že amidická skupina udeľuje peptidom vyššiu schopnosť interagovať s integrínovým receptorom. U peptidov R2 a R4 bol zaznamenaný najvýraznejší pokles v množstve proteínov v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. Nakoľko R2 peptid neobsahuje amidickú skupinu ako R4 peptid, je možné jeho lepšiu interakciu s integrínovým receptorom pripísať zavedeniu alanínu do glycinového linkeru (pri tvorbe tejto hypotézy sa vychádzalo z Obr. 27, kapitola 4.7).

Vplyv koncentrácie cyklického RGD na afinitu integrínových receptorov ku extracelulárnej matrix bol sledovaný aj Leglerom a kol. Ako testovací systém používali izolovaný a čistený myší integrín $\alpha\beta 3$ z cicavčieho klonovacieho vektoru. Zistili, že v mikromolárnych koncentráciách cRGD kompetitívne inhibuje rozpoznávanie RGD väzobných motívov ligandov, ale pri nízkych koncentráciách (640 pM) zvyšuje interakciu $\alpha\beta 3$ k jeho ligandom. Tieto výsledky boli získané na úrovni *in vitro*, pričom by bolo zaujímavé tento agonistický účinok potvrdiť aj na úrovni *in vivo* [113].

Zaujímavé bolo aj zistenie, že v prípade neovplyvnených buniek nasadených v nižšej hustote bol v čase 72 hodín od výmeny média pozorovaný výrazný nárast obsahu proteínov (viď. Obr. 27 B, kapitola 4.7). Tento jav je pravdepodobne spojený s tým, že bunky najskôr z dôvodu nedostatečného kontaktu väčšinu energie venovali syntéze extracelulárnej matrix a nedelili sa. Až niekedy v čase 48 hodín po ovplyvnení sa im podarilo dosiahnuť optimálnu hustotu a začali proliferovať. V čase 72 hodín bol preto pozorovaný prudký nárast v množstve bunkovej

hmoty. Je totiž známe, že reguláciou konfluencie buniek je možné ovplyvňovať množstvo proteínov. Po zoškriabaní buniek z povrchu jamiek kultivačného 6- jamkového panelu a po ich lýze sú v bunkovom lyzáte z veľkej časti zastúpené intracelulárne proteíny a len v menšej miere proteíny extracelulárnej matrix. Pokiaľ sú teda bunky nasadené v nízkej hustote, sú nútené syntetizovať sekrétované proteíny a menej energie vkladajú do proliferácie.

6 ZÁVER

Na základe MTT testu bola stanovená bezpečná testovacia koncentrácia RGD peptidu na 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Vyššia koncentrácia RGD peptidu, konkrétne 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mala cytotoxický účinok na kultúru NIH/3T3 myších fibroblastov už od prvého dňa po ovplyvnení.

Z MTT testovania nebol odhalený signifikantný vplyv na viabilitu NIH/3T3 myších fibroblastov ani u jedného zo študovaných peptidov R2, R4, R6 a RGD v koncentráciách 50, 100 a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tento záver bol potvrdený pri dvoch rozdielnych nasadzovacích hustotách buniek, konkrétne 3000 a 1500 b. myších fibroblastov/ 0,35 cm^2 , kultivovaných po dobu troch dní od ovplyvnenia.

Výsledky stanovenia množstva proteínov NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvňovaných peptidmi s koncentráciou 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nekorešpondovali s tými, ktoré boli získané z MTT testov. U peptidov R2 a R4 bol pri nasadzovacej hustote 90 000 buniek/ 9,6 cm^2 po troch dňoch od ovplyvnenia zaznamenaný signifikantný pokles v množstve proteínov. Tento bol pri zníženej nasadzovacej hustote 45 000 buniek/ 9,6 cm^2 potvrdený len u peptidu R2.

Zo získaných výsledkov je zrejmé, že pri maximálnej koncentrácii 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ študované peptidy nevykazujú výrazný vplyv na viabilitu NIH/3T3 myších fibroblastov. Či však dochádza ku zmene na úrovni individuálnych buniek by bolo potrebné potvrdiť ďalšími *in vitro* metódami.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

1. Farage, M. A., Miller, K. W., Maibach H. I.: *Textbook of Aging Skin*. 2 vyd.: Springer, 2010. 1220 s. ISBN 978-3-540-89655.
2. Freinkel, R. K., Woodley D.: *The Biology of the Skin*. 6. vyd., New York: Parthenon Pub. Group, 2001. 432 s. ISBN 1850700060 9781850700067.
3. Hojerová, J.: *Kozmetika – zdravie – krása*. Vyd. 2, Bratislava: Foxi, 2004, 144 s. ISBN 978-80-89327-02-7.
4. Vysvetlenie znenia nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 658/2005 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na kozmetické výrobky. 2010 [cit. 29.4. 2012]. Dostupné na: <http://www.uvzsr.sk/docs/bkv/pravne_predpisy/vysvetlenie_znenia_nariadenia_vlady_658_2005_o_kozmetickych_vyrobkov.pdf>.
5. Presland, R. B., Jurevic, R. J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ*, 2002, roč. 66, č. 4, s. 564-574. ISSN 0022-0337.
6. Presland, R. B., Dale, B. A. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2000, roč. 11, č. 4, s. 383-408. ISSN 1045-4411.
7. Karantza, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, 2011, roč. 30, č. 2, s. 127-138. ISSN 0950-9232.
8. Hari, A., Flach, T. L., Shi, Y., Mydlarski, P. R. Toll-like receptors: role in dermatological disease. *Mediators Inflamm.* [online]. 2010 [cit. 29. 4. 2012]. Dostupné na: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/437246/>>
9. Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, 2008, roč. 17, č. 12, s. 1063-1072. ISSN (printed): 0906-6705, ISSN (electronic): 1600-0625.
10. Watt, F. M. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001, roč. 11, č. 4, s. 410-417. ISSN 0959-437X.
11. Burgeson, R. E., Christiano, A. M. The dermal-epidermal junction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, roč. 9, č. 5, s. 651-658. ISSN 0955-0674.
12. Burdett, I. D. Aspects of the structure and assembly of desmosomes. *Micron*, 1998, roč. 29, č. 4, s. 309-328. ISSN 0968-4328.
13. Elias, P. M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, roč. 125, č. 2, s. 183-200. ISSN 0022-202X.
14. Kligman, A. M. Corneobiology and corneotherapy--a final chapter. *Int J Cosmet Sci*, 2011, roč. 33, č. 3, s. 197-209. ISSN 0142-5463.
15. Breitkreutz, D., Mirancea, N., Nischt, R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol*, 2009, roč. 132, č. 1, s. 1-10. ISSN 0948-6143.
16. Moll, R., Moll, I. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as

target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.*, 1998, roč. 432, č. 6, s. 487-504. ISSN 0945-6317.

17. Mayer, U., Nischt, R., Pöschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y., Timpl, R. A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J.*, 1993, roč. 12, č. 5, s. 1879-1885. ISSN 0261-4189.

18. Fleischmajer, R., Utani, A., MacDonald, E. D., Perlish, J. S., Pan, T. C., Chu, M. L., Nomizu, M., Ninomiya, Y., Yamada, Y.. Initiation of skin basement membrane formation at the epidermo-dermal interface involves assembly of laminins through binding to cell membrane receptors. *J. Cell. Sci.*, 1998, roč. 111, č. 14, s. 1929-1940. ISSN 0021-9533.

19. McMillan, J. R., Akiyama, M., Shimizu, H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci.*, 2003, roč. 31, č. 3, s. 169-77. ISSN 0923-1811.

20. Breitkreutz, D., Mirancea, N., Schmidt, C., Beck, R., Werner, U., Stark, H. J., Gerl, M., Fusenig, N. E. Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin gamma1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures. *J. Cell. Sci.*, 2004, roč. 117, č. 12, s. 2611-2622. ISSN 0021-9533.

21. Hasegawa, H., Naito, I., Nakano, K., Momota, R., Nishida, K., Taguchi, T., Sado, Y., Ninomiya, Y., Ohtsuka, A. The distributions of type IV collagen α chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Arch Histol Cytol.*, 2007, roč. 70, č. 4, s. 255-65. ISSN 0914-9465.

22. Iozo, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellular to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2005, roč. 6, č. 8, s. 646-656. ISSN (printed): 1471-0072, ISSN (electronic): 1471-0080.

23. Langevin, H. M. Connective tissue: a body-wide signaling network? *Med. Hypotheses*, 2006, roč. 66, č. 6, s. 1074-1077. ISSN 0306-9877.

24. Röck K., Fischer J. W. Rolle der extrazellulären Matrix bei der extrinsischen Hautalterung. *Hautarzt*, 2011, roč. 62, č. 8, s. 591-597. ISSN 0017-8470.

25. Brincat, M.P., Baron, Y.M. & Galea, R. Estrogens and the skin. *Climacteric*, 2005, roč. 8, č. 2, s. 110-123. ISSN 1369-7137.

26. Kirkwood, T. B. Because aging occurs for nonintuitive reasons and Understanding the Odd Science of Aging. *Cell*, 2005, roč. 120, č. 4, s. 437-447. ISSN 0092-8674.

27. Puizina-Ivić, N. Skin aging. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 2008, roč. 17, č. 2, s. 47-54. ISSN 1318-4458.

28. Johnson, F. B., Sinclair, D. A., Guarente, L. Molecular biology of aging. *Cell*, 1999, roč. 96, č. 2, s. 291-302. ISSN 0092-8674.

29. Puizina-Ivić, N., Mirić, L., Carija, A., Karlica, D., Marasović, D. Modern approach to topical treatment of aging skin. *Coll Antropol*, 2010, roč. 34, č. 3, s. 1145-1153. ISSN 0350-6134.

30. Dangoisse, C. [Dermo-cosmetics and prevention of skin aging]. *Rev Med Brux*, 2004, roč. 25, č. 4, s. 365-370. ISSN 0035-080X.

31. Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., Maibach, H. I. Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol*, 2007, roč. 26, č. 4, s. 343-357. ISSN 1556-9527.

32. Fenske, N. A., Lober, C. W. Structural and functional changes of normal aging skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1986, roč. 15, 4 č. 1, s. 571-585. ISSN 0190-9622.
33. Gilchrist, B. A. Age-associated changes in the skin. *J Am Geriatr Soc*, 1982, roč. 30, č. 2, s. 139-143. ISSN 0002-8614.
34. Maize, J. C., Foster, G. Age-related changes in melanocytic naevi. *Clin. Exp. Dermatol.*, 1979, roč. 4, č. 1, s. 49-58. ISSN 0307-6938.
35. Brégère, F., Soroka, Y., Bismuth, J., Friguet, B., Milner, Y. Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. *Exp. Gerontol.*, 2003, roč. 38, č. 6, s. 619-629. ISSN 0531-5565.
36. Balin, A. K., Pratt, L. A. Physiological consequences of human skin aging. *Cutis*, 1989, roč. 43, č. 5, s. 431-436. ISSN 0011-4162.
37. Montagna, W., Carlisle, K. Structural changes in aging human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1979, roč. 73, č. 1, s. 47-53. ISSN 0022-202X.
38. Oender, K., Trost, A., Lanschuetzer, C., Laimer, M., Emberger, M., Breitenbach, M., Richter, K., Hintner, H., Bauer, J. W. Cytokeratin-related loss of cellular integrity is not a major driving force of human intrinsic skin aging. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, roč. 129, č. 10, s. 563-571. ISSN 0047-6374.
39. Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., Takada, K., Kobayashi, K., Tsunenaga, M., Nishiyama, T., Kohno, Y., Fukuda, M. Possible Involvement of Gelatinases in Basement Membrane Damage and Wrinkle Formation in Chronically Ultraviolet B-exposed Hairless Mouse. *J Invest Dermatol.*, 2003, roč. 120, č. 1, s. 128-34. ISSN 0022-202X.
40. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2000, roč. 16, č. 6, s. 239-244. ISSN 0905-4383.
41. Fisher, G. J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.-Y., Quan, T., Chung, J. H., Kang, S., Voorhees, J. J. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J. Clin. Invest.*, 2000, roč. 106, č. 5, s. 663-670. ISSN 0021-9738.
42. Sams, W. M., Jr. Sun-induced aging. Clinical and laboratory observations in man. *Dermatol Clin*, 1986, roč. 4, č. 3, s. 509-516. ISSN 0733-8635.
43. Krutmann, J. [How the sun ages our skin. The dermis as the driving force]. *Hautarzt*, 2011, roč. 62, č. 8, s. 588-590. ISSN 0017-8470.
44. Schneeberger, E. E., Lynch, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol.* 2004, roč. 286, č. 6, s. C1213 -C1228. ISSN 0002-9513.
45. Dalton, S. L., Scharf, E., Briesewitz, R., Marcantonio, E. E., Assoian, R.K. Cell adhesion to extracellular matrix regulates the life cycle of integrins. *Mol Biol Cell.*, 1995, roč. 6, č. 12, s. 1781-91. ISSN 1059-1524.
46. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K. M. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2001, roč. 11, č. 2, s. 793-805. ISSN 1471-0080.
47. Takada, Y., Ye, X., Simon, S. The integrins. *Genome. Biol.*, 2007, roč. 8, č. 5, s. 215. ISSN (printed): 1465-6906. ISSN (electronic): 1465-6914.

48. Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. Integrins. *Cell tissue Res*, 2010, roč. 339, č. 1, s 269-80. ISSN (printed): 0302-766X, ISSN (electronic): 1432-0878.
49. Luo, B. H., Carman, C. V., Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, roč. 25, s. 619-47. ISSN: 0732-0582
50. Berrier, A. L., Yamada, K. M. Cell-matrix adhesion. *J. Cell. Physiol.*, 2007, roč. 213, č. 3, s. 565-73. ISSN 1097-4652.
51. Fujimura, T., Moriwaki, S., Imokawa, G., Takema, Y. Crucial role of fibroblast integrins alpha2 and beta1 in maintaining the structural and mechanical properties of the skin. *J. Dermatol. Sci.*, 2007, roč. 45, č. 1, s. 45-53. ISSN 0923-1811.
52. Junqueira, L. C., Montes, G. S., Martins, J. E., Joazeiro, P. P. Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry.*, 1983, roč. 79, č. 3, s. 397-403. ISSN 2038-8306.
53. Ruggiero, F., Roulet, M., Bonod-Bidaud, C. [Dermis collagens: beyond their structural properties]. *J. Soc. Biol.*, 2005, roč. 199, č. 4, s. 301-311. ISSN 1760-6128.
54. Chung, J., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., Youn, C. S., Rhie, G., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C., Eun, H. C. Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 2001, roč. 117, č. 5, s. 1218-1224. ISSN 0022-202X.
55. Rock, M. J., Cain, S. A., Freeman, L. J., Morgan, A., Mellody, K., Marson, A., Shuttleworth, C. A., Weiss, A. S., Kielty, C. M. Molecular Basis of Elastic Fiber Formation. Critical interactions and a tropoelastin- fibrillin- 1 cross- link. *J. Biol. Chem.*, 2004, roč. 279, č. 22, s. 23748–23758. ISSN 0021-9258.
56. Clarke, A. W., Weiss, A. S. Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin. Multiple binding sites and the role of divalent cations. *Eur. J. Biochem.*, 2004, roč. 271, č. 14, s 3085–3090. ISSN 0014-2956.
57. Hamill, K. J., Pallerb, A. S. a Jonesc, J. C. R. Adhesion and Migration, the Diverse Functions of the Laminin $\alpha 3$ Subunit. *Clin. Dermatol.*, 2010, roč. 28, č. 1, s. 79-87. ISSN 0738-081X.
58. Hashmi, S., Marinkovich, M. P. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol.*, 2011, roč. 29, č. 4, s. 398-411. ISSN 0738-081X.
59. McMillan, J. R., Akiyama, M., Shimizu, H. Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J. Dermatol. Sci.*, 2003, roč. 31, č. 3, s. 169-77. ISSN 0923-1811.
60. Schultz, G. S., Ladwig, G., Wysocki, A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds* [online]. 2005, august [citované 29. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>>.
61. Sechler, J. L., Corbett, S. A., Schwarzbauer, J. E. Modulatory Roles for Integrin Activation and the Synergy Site of Fibronectin during Matrix Assembly. *Mol. Biol Cell.*, 1997, roč. 8, č. 12, s. 2563-73. ISSN 1059-1524.
62. Pankov, R., Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.*, 2002, roč. 115, č. 20, s. 3861-3. ISSN 0021-9533.

63. King, M. W. Glycosaminoglycans. The medical biochemistry page [online]. 1996- 2012 [citované 29. 4. 2012]. Dostupné z: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/glycans.php>>.
64. Labat- Robert, J., Bihari- Varga, M., Robert, L. Extracellular matrix. *FEBS Lett.*, 1990, roč. 268, č. 2, s. 386- 393. ISSN 0014-5793.
65. Moyna, G. Carbohydrates III. Lecture 35 [online]. 1999 [citované 29.4.2012]. Dostupné z: <<http://tonga.usip.edu/gmoyna/biochem341/lecture35.html>>.
66. Encyclopedia Britannica, Inc. [online]. 2012 [citované 29.4.2012]. Dostupné z: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/450900/peptide>>.
67. Zhang, L., Falla, T. J. Cosmeceuticals and peptides. *Clin. Dermatol.*, 2009, roč. 27, č. 5, s. 485-94. ISSN 1175-0561.
68. Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)[online]. 8. 7. 2002, posledná revízia 21. 3. 2012[cit. 27.4.2012]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm074201.htm>>.
69. Amer, M., Maged, M. Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clin. Dermatol.*, 2009, roč. 27, s. 428-430. ISSN 1175-0561.
70. Kligman, A. The future of cosmeceuticals: an interview with Albert Kligman, MD, PhD. Interview by Zoe Diana Draelos. *Dermatol Surg.*, 2005, roč. 31, 7 č. 2, s. 890-891. ISSN 1076-0512.
71. Reszko, A. E., Berson, D., Lupo, M. P. Cosmeceuticals: practical applications. *Clin. Dermatol.*, 2009, roč. 27, č. 4, s. 401-416. ISSN 1175-0561.
72. Lupo, M. P., Cole, A. L. Cosmeceutical peptides. *Dermatol. Ther.*, 2007, roč. 20, č. 5, s. 343-349. ISSN 1529-8019.
73. Vartanian, A. J., Dayan, S. H. Facial rejuvenation using botulinum toxin A: review and updates. *Facial. Plast. Surg.*, 2004, roč. 20, č. 1, s. 11-19. ISSN 1538-3660.
74. Yamauchi, P. S., Lowe, N. J. Botulinum toxin types A and B: comparison of efficacy, duration, and dose-ranging studies for the treatment of facial rhytides and hyperhidrosis. *Clin. Dermatol.*, 2004, roč. 22, č. 1, s. 34-39. ISSN 1175-0561.
75. Snyder, E. L., Dowdy, S. F. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, 2005, roč. 2, č. 1, s. 43-51. ISSN 1744-7593.
76. Wang, Y.-H., Chen, C. P., Chan, M. H., Chang, M., Hou, Y. W., Chen, H. H., Hsu, H. R., Liu, K., Lee, H. J. Arginine-rich intracellular delivery peptides noncovalently transport protein into living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, roč. 346, č. 3, s. 758-767. ISSN 0006-291X.
77. Maquart, F. X., Pickart, L., Laurent, M., Gillery, P., Monboisse, J. C., Borel, J. P. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *FEBS Lett.*, 1988, roč. 238, č. 2, s. 343-346. ISSN 0014-5793.
78. Kosonen, T., Uriu-Hare, J.Y., Clegg, M.S., Keen, C.L., Rucker, R.B. Incorporation of copper into lysyl oxidase. *Biochem. J.*, 1997, roč. 327, č. 1, s. 283-289. ISSN 0264-6021.

79. Kang, Y.-A., Choi, H. R., Na, J. I., Huh, C. H., Kim, M. J., Youn, S. W., Kim, K. H., Park, K. C. Copper-GHK increases integrin expression and p63 positivity by keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, 2009, roč. 301, č. 4, s. 301-306. ISSN 1432-069X.
80. Sim, G. S., Lee, D. H., Kim, J. H., An, S. K., Choe, T. B., Kwon, T. J., Pyo, H. B., Lee, B. C. Black rice (*Oryza sativa* L. var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, roč. 17, č. 2, s. 271-279. ISSN 1476-5535.
81. Padamwar, M. N., Pawar, A. P., Daithankar, A. V., Mahadik, K. R. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2005, roč. 4, č. 4, s. 250-257. ISSN 1473-2165.
82. Beer, J. H., Springer, K. T., Collerm B. S. Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood.*, 1992, roč. 179, č. 1, s. 117-28. ISSN 1528-0020.
83. Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.*, 2003, roč. 24, č. 24, s. 4385-415. ISSN 0142-9612.
84. Merrifield, R. B. Automated synthesis of peptides. *Science*, 1965, roč. 150, č. 3693, s. 178-85. ISSN 1064-3745.
85. Freshney, R. I.: *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 2. Vydanie, Oxford: Oxford University Press. 1992. ISBN 0 19 963213 8.
86. Davis, J. M.: *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. 2. vydanie, Oxford: Oxford University Press. 2002. ISBN 0 19 963853 5.
87. Hayflick, L., Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.*, 1961, roč. 25, s. 585-621. ISSN 1090-2422.
88. Vejražka, M. Bunečné kultury [online]. [cit. 27.4.2012]. Dostupné z: <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>>.
89. Základní techniky práce s tkáňovými kulturami [cit. 27.4.2012]. Dostupné z: <<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>.
90. Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), USA. Pharmacopeial Convention, Rockville, M. D.
91. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia, Commission, Strasbourg, France.
92. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
93. Todar, K. <kgtodar@wisc.edu>. Online textbook of bacteriology. Bacterial Endotoxin. [HTML dokument]. Madison (Wisconsin): University of Wisconsin Department of Bacteriology, [cit. 27. 4. 2012]. Dostupný z: <<http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>>.

94. Levin, J., Bang, F. B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.*, 1964, roč. 115, s. 265-74. ISSN 0097-1383.
95. Nakamura, T., Morita, T., Iwanaga, S. Intracellular proclotting enzyme in limulus (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes: its purification and properties. *J Biochem.*, 1985, roč. 97, č. 6, s. 1561-74. ISSN 0021-924X.
96. LAL update. Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts (USA), 1995, roč. 13, č. 3, s. 1-6.
97. Morita, T., Tanaka, S., Nakamura, T., Iwanaga, S. A new (1-3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amebocytes. *FEBS Lett.*, 1981, č. 129, s. 318-321. ISSN 0014-5793.
98. Lindsay, G. K., Roslansky, P. F., Novitsky, T. J. Single-step, chromogenic *Limulus* amebocyte lysate assay for endotoxin. *J Clin Microbiol.*, 1989, roč. 27, č. 5, s. 947-51. ISSN (printed): 0095-1137, ISSN (electronic): 1098-660X.
99. Morrison, D. C., Jacobs, D. M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*, 1976, roč. 13, č. 10, s. 813-8. ISSN 0019-2791.
100. Ejim, L., Farha, M. A., Falconer, S. B., Wildenhain, J., Coombes, B. K., Tyers, M., Brown, E. D., Wright, G. D. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol.*, 2011, roč. 7, č. 6, s. 348-50. ISSN 1552-4450.
101. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 1983, roč. 65, č. 1-2, s. 55-63. ISSN 00221759.
102. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., Villanueva, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* [online], 2012 [cit. 28.4. 2012]. ISSN 0065-1281.
103. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, roč. 193, vyd. 1, s. 265-275. ISSN (printed): 0021-9258, ISSN (electronic): 1083-351X.
104. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook, version 2: Thermo Fisher Scientific Inc, 2010.
105. Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L. *In Vitro* Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr Chem Genom.*, 2009, roč. 11, č. 3, s. 33-41. ISSN 1875-3973.
106. Vistejnova, L., Dvorakova, J., Hasova, M., Muthny, T., Velebny, V., Soucek, K., Kubala, L. The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuroendocrinol Lett.*, 2009, roč. 30, č. 1, s. 121-7. ISSN 0172-780X.
107. Collier, A. C., Pritsos, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharmacol.*, 2003, roč. 66, č. 2, s. 281-7. ISSN 0006-2952.

108. Yang, H., Li, F., Chai, J. [Influence of lipopolysaccharide on the biological characteristics of skin fibroblasts and its potential role in wound healing]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.*, 2006, roč. 20, č. 9, s. 873-6. ISSN 1002-1892.
109. Yang, H., Kaneko, M., He, C., Hughes, M. A., Cherry, G. W. Effect of a lipopolysaccharide from *E. coli* on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Phytother Res.*, 2002, roč. 16, č. 1, s. 43-7. ISSN (printed): 0951-418X, ISSN (electronic): 1099-1573.
110. Influence of Lipopolysaccharide on the Biological Characteristics of Human Skin Fibroblasts. *China Papers* [online]. 11. 1. 2010, [citované 29. 4. 2012]. Dostupné z: <http://mt.china-papers.com/2/?p=107595>.
111. Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, 1987, roč. 262, č. 36, s. 17294-8. ISSN (printed): 0021-9258, ISSN (electronic): 1083-351X.
112. Graf, R., Cyclic RGD-Peptide activates anti-ageing pathways in skin. V *Anti-Ageing Skin Care Conference 2010*, Londýn, 2.- 3. Jún 2010 [online]. 2010 [cit. 29. 4. 2012]. Dostupné na: <http://www.employmentweek.com/UserFiles/AA10/Paper%207%20-%20Dr%20Ruediger%20Graf.pdf>.
113. Legler, D. F., Wiedle, G., Ross, F. P., Imhof, B. A. Superactivation of integrin $\alpha v \beta 3$ by low antagonist concentrations. *J. Cell. Sci.*, 2001, roč. 114, vyd. 8, s. 1545-53. ISSN (printed): 0021-9533. ISSN (electronic): 1477-9137.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

A	alanín
AP1.....	aktivačný proteín 1
ATP	adenozíntrifosfát
BET	bakteriálny endotoxín
Cdc42	z angl. <i>cell division cycle 42</i>
CSE	kontrolný štandardný endotoxín
D	kyselina asparágová
DMSO.....	dimetylsulfoxid
E	kyselina glutámová
ECM.....	extracelulárna matrix
EDTA.....	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EGF	epidermálny rastový faktor, z angl. <i>epidermal growth factor</i>
ESF	rozpuštný rastový faktor, z angl. <i>soluble epidermal factor</i>
F	fenylalanín
FAK.....	fokálna adhézna kináza, z angl. <i>focal adhesion kinase</i>
FDA.....	z angl. <i>Food and drug administration</i>
G	glycín
IFN γ	interferón γ
IU	z angl. <i>international unit</i>
L	leucín
LAL	<i>Limulus ameocyt lysate</i>
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza, z angl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
MHCII.....	hlavný histokompatibilitný komplex, z angl. <i>major histocompatibility complex II</i>

MIDAS..... z angl. *metal- ion- dependent adhesion site*

MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

NF- κ B.....jadrový faktor κ B, z angl. *nuclear factor κ B*

NHDFnormálne ľudské dermálne fibroblasty, z angl. *normal human dermal fibroblast*

O hydroxyprolín

PCRpolymerázová reťazová reakcia, z angl. *polymerase chain reaction*

PKC proteín kináza C, z angl. *protein kinase C*

PPC.....pozitívna produktová kontrola

PSI..... z angl. *plexin- semphorin- integrin*

R arginín

RGD tripeptid alebo sekvenčný motív zložený z aminokyselín arginín-glycín- kyselina asparágová

ROS reaktívne kyslíkové radikály, z angl. *reactive oxygen species*

SNAP-25 synaptozomálny asociovaný protein 25, z angl. *synaptosomal associated protein 25*

SNARE..... *soluble N- ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*

TGF transformačný rastový faktor, z angl. *transforming growth factor*

UV *ultraviolet*

V valín

VAMP z angl. *vesicle-associated membrane protein*

WST-1 4- [3- (4- Idofenyl)-2 -(4- nitrofenyl)- 2H- 5- tetrazolio]- 1, 3- benzén disulfonát

XPF..... xeroderma pigmentosum faktor, z angl. *xeroderma pigmentosum factor*

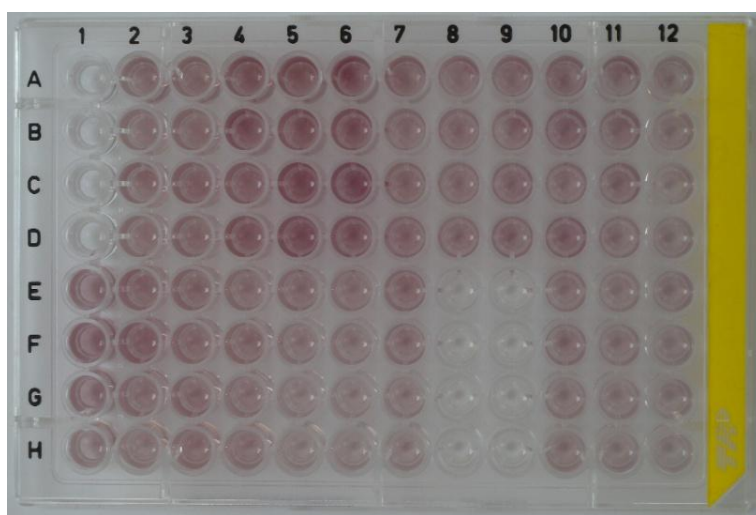
XTT.....sodný hydrát kyseliny 3, 3- [(fenylamino) karbonyl]-3, 4- Tetrazolium- Bis (4- methoxy- 6- nitro) benzénsulfónovej

ZO..... *zonulae occludentes*

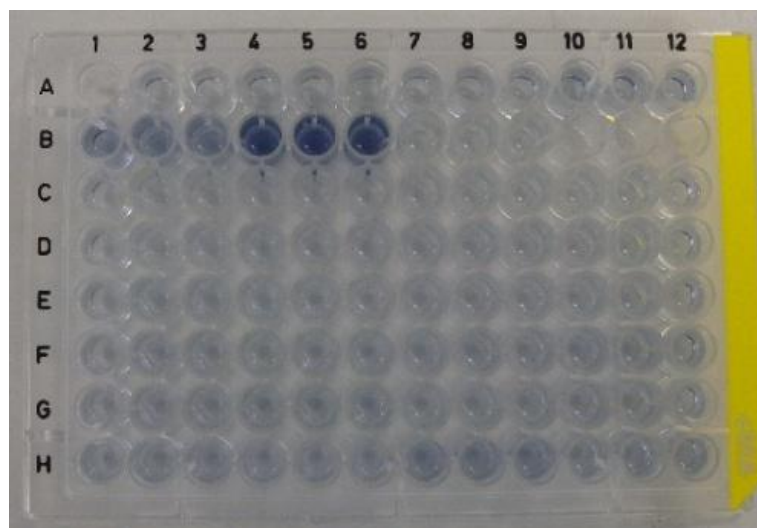
9 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha A: Fotodokumentácia k použitým metódam

(A) MTT test



(B) Stanovenie proteínov RCDC kitom



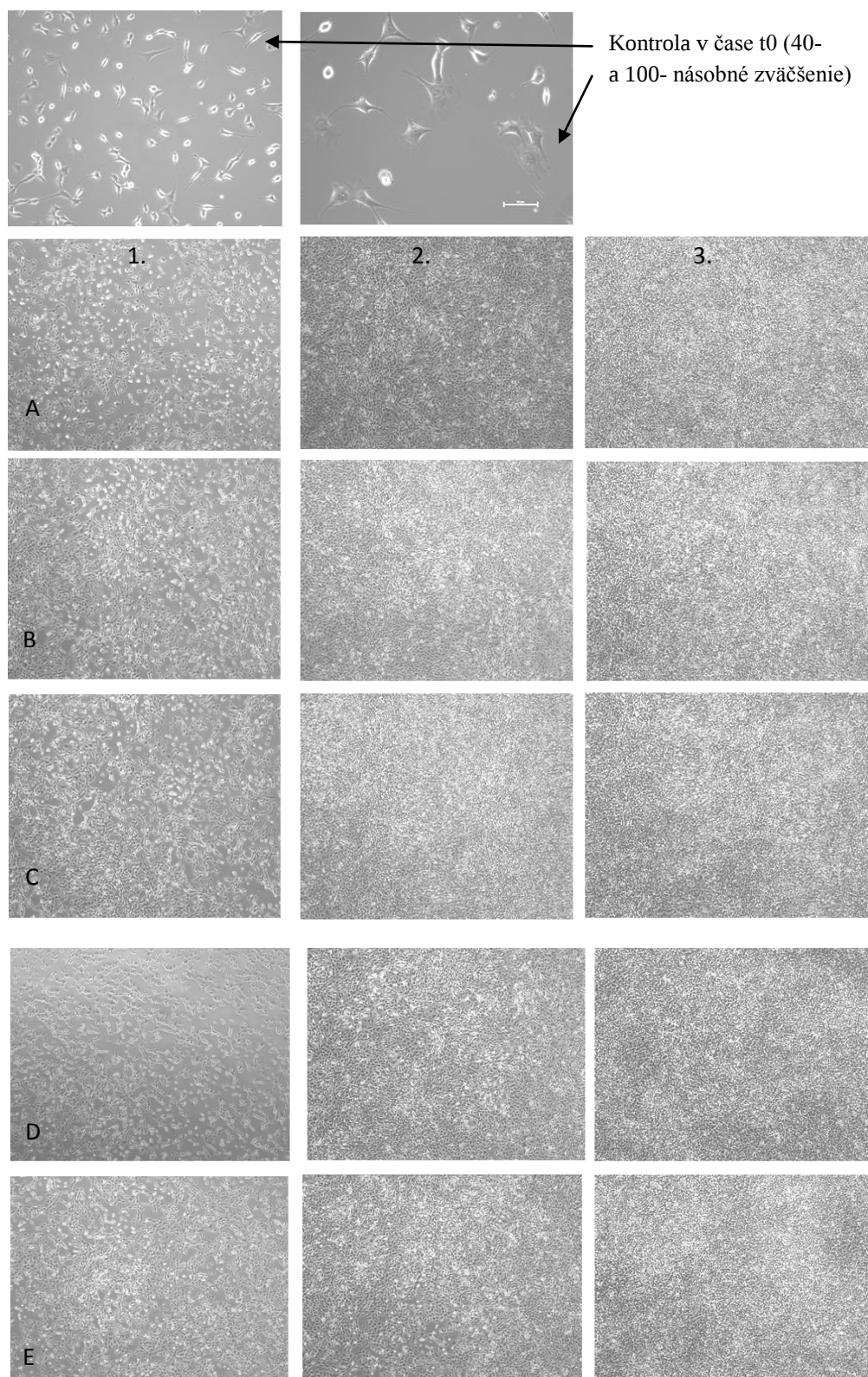
Príloha B: Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov nasadzovaných v hustote 90 000 buniek/ 9,6 cm².

Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvňovaných peptidmi s koncentráciou 100 µg/ml spolu s neovplyvnenými kontrolami získané v časových intervaloch 24 hodín po dobu troch dní (jedna šarža buniek, nasadzovacia hustota 90 000 buniek/ 9,6 cm²) fotené pri 40- násobnom zväčšení. Označenie riadkov zodpovedá jednotlivým peptidom, ktorými boli bunky ovplyvňované: A) bunky neošetrené (kontrola), bunky ošetrené- B) peptidom R2, C) peptidom R4, D) peptidom R6, E) RGD peptidom. Stĺpce vyjadrujú časový interval od ovplyvnenia adherentných buniek príslušnými peptidmi: 1. 24 hodín, 2. 48 hodín, 3. 72 hodín. V najvrchnejšom neoznačenom riadku sú uvedené fotky kontrol v čase t0 pri 40- a 100- násobnom zväčšení.

Príloha C: Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov nasadzovaných v hustote 45 000 buniek/ 9,6 cm².

Fotky bunkových kultúr NIH/3T3 myších fibroblastov ovplyvňovaných peptidmi s koncentráciou 100 µg/ml spolu s neovplyvnenými kontrolami získané v časových intervaloch 24 hodín po dobu troch dní (jedna šarža buniek, nasadzovacia hustota 45 000 buniek/ 9,6 cm²) fotené pri 40- násobnom zväčšení. Označenie riadkov zodpovedá jednotlivým peptidom, ktorými boli bunky ovplyvňované: A) bunky neošetrené (kontrola), bunky ošetrené- B) peptidom R2, C) peptidom R4, D) peptidom R6, E) RGD peptidom. Stĺpce vyjadrujú časový interval od ovplyvnenia adherentných buniek príslušnými peptidmi: 1. 24 hodín, 2. 48 hodín, 3. 72 hodín.

Príloha B:



Príloha C:

